

ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**«Μελέτη του ρόλου της οστεοποντίνης στην ανοσολογική αντίδραση
στο μικροπεριβάλλον του όγκου»**

ΜΑΡΙΑ ΦΙΛΙΚΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

Ουρανία Τσιτσιλώνη

Καθηγήτρια Ανοσολογίας

Τομέας Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου

ΑΘΗΝΑ, 2021

ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**«Μελέτη του ρόλου της οστεοποντίνης στην ανοσολογική αντίδραση
στο μικροπεριβάλλον του όγκου»**

ΜΑΡΙΑ ΦΙΛΙΚΑ

A.M.:41910

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ουρανία Τσιτσιλώνη, Καθηγήτρια Ανοσολογίας, Τομέας Φυσιολογίας Ζώων & Ανθρώπου

Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας Κυττάρου & Ανάπτυξης

Παναγιώτα Παπαζαφείρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ζώων

Υπεύθυνος εργαστηρίου: Νικόλαος Πασχαλίδης, Μεταδιδακτορικός Ερευνητής στο ΙΙΒΕΑΑ

ΑΘΗΝΑ, 2021

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Οστεοποντίνη (OPN), είναι μία μη κολλαγονούχα γλυκοπρωτεΐνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, η οποία εκφράζεται από ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων και εμπλέκεται σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, όπως η μετανάστευση και η κυτταρική προσκόλληση, χάρη στην ικανότητά της να αλληλεπιδρά με τα κύτταρα μέσω των υποδοχέων της, τις ιντεγκρίνες και το μόριο CD44. Έχει αποδειχθεί ότι η OPN εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό από τα ενεργοποιημένα CD4⁺ κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και συμμετέχει στη ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων. Επίσης, η OPN είναι μία πρωτεΐνη που εκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνων και συμμετέχει ενεργά στην εξέλιξη του όγκου, μέσω διαδικασιών όπως η αγγειογένεση και η μετάσταση. Τελευταία, εκτιμάται ολοένα και περισσότερο η μεγάλη συμβολή του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, στην πρόοδό του και στην προώθηση της μετάστασης. Η αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος, επηρεάζει ισχυρά την έναρξη και την πρόοδο της ασθένειας, καθώς και την πρόγνωση του ασθενή. Φαίνεται ότι η προερχόμενη από τον όγκο OPN ασκεί σημαντική επίδραση στο καρκινικό μικροπεριβάλλον, ρυθμίζοντας την ανοσολογική απόκριση. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου της καρκινικής OPN στην ανοσολογική απόκριση στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Για το λόγο αυτό, επιτεύχθηκε αρχικά η μείωση της έκφρασης της OPN, με την τεχνολογία shRNA, στην κυτταρική σειρά μελανώματος B16F10. Έπειτα, τα B16F10 αγρίου τύπου και τα B16F10 shRNA-OPN, χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή μελανώματος σε μύες C57BL/6 Foxp3/GFP. Στη συνέχεια ακολούθησε η ανάλυση των κυτταρικών πληθυσμών των όγκων των μυών με χρήση κυτταρομετρία ροής, καθώς και η μέτρηση του μεγέθους τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα B16F10 κύτταρα, τα οποία είχαν λάβει τα shRNA ολιγονουκλεοτίδια, εξέφραζαν όντως μειωμένη OPN, σε σύγκριση με τα B16F10 κύτταρα αγρίου τύπου. Επιπλέον, η ενσωμάτωση των ολιγονουκλεοτιδίων αυτών δεν είχε αντίκτυπο στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Η μείωση της έκφρασης της OPN, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ποσοστού, και πιθανόν και της λειτουργίας των Foxp3⁺ κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου στους μύες, καθώς και την αύξηση του ποσοστού των CD4⁺ και CD8⁺ κυττάρων. Επιπλέον, οι μύες με μελανώματα που εξέφραζαν μειωμένη OPN, σχημάτιζαν μικρότερους σε μέγεθος όγκους, συγκριτικά με τους μύες με τα B16F10 μελανώματα.

Λέξεις-κλειδιά: οστεοποντίνη (OPN), μικροπεριβάλλον του όγκου, ανοσολογική αντίδραση, επαγόμενο μελάνωμα, κυτταρική σειρά μελανώματος B16F10, shRNA-OPN, T ρυθμιστικά κύτταρα (Treg).

ABSTRACT

Osteopontin (OPN) is a non-collagenous extracellular matrix glycoprotein, which is expressed by a broad range of cells and is involved in a variety of cellular processes, such as migration and cell adhesion, due to its ability to interact with cells through its receptors integrins and CD44. It has been shown that OPN is highly expressed in activated CD4⁺ immune cells and participates in the regulation of immune responses. OPN is also a protein produced by many cancers and is actively involved in tumour progression through processes such as angiogenesis and metastasis. Recently, the great contribution of the tumour microenvironment in cancer progression and promotion of metastasis is increasingly appreciated. The two-way communication between cancer cells and tumour microenvironment strongly influences the onset and progression of the disease, as well as the prognosis of the patient. Tumor-derived OPN appears to have a significant effect on the tumour microenvironment, regulating the immune response. The aim of this project is to study the role of tumour OPN in the regulation of immune response in the tumor microenvironment. For this reason, the reduction of OPN expression was initially achieved, using shRNA technology, in the B16F10 melanoma cell line. Then, wild type B16F10 and B16F10 shRNA-OPN were used to induce melanoma in C57BL/6 Foxp3/GFP mice. This was followed by the analysis of the cell populations of the tumors using flow cytometry, as well as the measurement of their size. The results showed that B16F10 cells that received the shRNA oligonucleotides, actually expressed reduced OPN, compared to wild type B16F10 cells. In addition, the incorporation of these oligonucleotides had no impact on cell viability. The decrease in OPN expression resulted in a decrease in the percentage, and possibly in the function of Foxp3⁺ cells in the tumor microenvironment of mice, as well as an increase in the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ cells. In addition, mice with melanoma expressing reduced OPN formed smaller tumors compared to mice with B16F10 melanoma.

Key words: osteopontin (OPN), tumour microenvironment, immune response, induced melanoma, melanoma cell line B16F10, shRNA-OPN, T regulatory cells (Treg).

EΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
APCs	Antigen presenting cells
ATP	Adenosine trisphosphate
7-AAD	7-amino-actinomycin
BNSP/BSP-1	Bone sialoprotein 1
CAFs	Cancer associated fibroblasts
CCL2	C-C motif ligand 2
CCR4	C-C motif chemokine receptor 4
CD-	Cluster of differentiation
Cox-2	Cyclooxygenase 2
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CTLs	Cytotoxic T lymphocytes
DCs	Dendritic cells
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Estrogen growth factor
EMT	Epithelial to mesenchymal transition
ETA-1	Early T-lymphocyte activator 1
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Foxp3	Forkhead box P3
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IDPs	Intrinsically disordered proteins
IFN- γ	Interferon γ
IL-	Interleukin
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
iTregs	Induced regulatory T cells
MDSCs	Myeloid-derived suppressor cells
MHC I & II	Major histocompatibility complex I & II
MMPs	Matrix metalloproteinases
NF- κ B	Nuclear factor Kappa B
NK	Natural killer cells
nTregs	Natural regulatory T cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death ligand 1

PGE-2	Prostaglandin E2
PRRs	Pattern recognition receptors
PS	Phosphatidylserine
PTMs	Post-translational modifications
RAE	Ras-activated enhancer
ROS	Reactive oxygen species
RRF	Ras-response factor
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SNP	Single nucleotide polymorphism
sOPN	Secreted osteopontin
SPP1	Secreted phosphoprotein 1
TAMs	Tumour associated macrophages
Tc	Cytotoxic T cells
TCR	T-cell receptor
TGF- β	Tumour growth factor β
Th	T helper cells
TILs	Tumour-infiltrating lymphocytes
TLRs	Toll-like receptors
TME	Tumour microenvironment
TNF- α	Tumour necrosis factor alpha
Treg	T regulatory cell
VDRE	Vitamin D response element
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την προσπάθεια μου αυτή, θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθώ σε όλους εκείνους που μου συμπαραστάθηκαν και συνέβαλλαν στην περάτωση αυτής της διπλωματικής εργασίας, που χωρίς την παρουσία, την υποστήριξη και την ανεκτικότητα τους δεν θα ήταν δυνατή η υλοποίηση της.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κυρία Ουρανία Τσιτσιλώνη για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου στον τομέα της ανοσολογίας.

Θεωρώ υποχρέωση μου να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον μεταδιδακτορικό ερευνητή Νίκο Πασχαλίδη, υπεύθυνο της εργασίας αυτής, ο οποίος με καθοδήγησε μαθαίνοντας μου τις απαραίτητες τεχνικές, μεταδίδοντας μου τις γνώσεις του πάνω στο αντικείμενο και λύνοντας μου οποιαδήποτε απορία σε όλα τα πεδία.

Επίσης, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και στους φίλους μου που σε όλη αυτή την προσπάθεια μου ήταν δίπλα μου ανά πάσα στιγμή. Ευχαριστώ λοιπόν ιδιαίτερα τους γονείς μου, Αντώνιο και Φωτεινή Φίλικα, των οποίων η συνεισφορά ήταν καθοριστική ώστε να φέρω εις πέρας τις σπουδές μου και στους οποίους αφιερώνω την πτυχιακή μου εργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Contents

1.1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1.	Το ανοσοποιητικό σύστημα	10
1.1.1.	Έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία	11
1.1.2.	Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.....	13
1.1.3.	Τ ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs).....	16
1.1.4.	Ανοσοποιητικό σύστημα και καρκίνος.....	18
1.2.	Οστεοποντίνη (OPN).....	21
1.2.1.	Γονίδιο της OPN	21
1.2.2.	Δομή και ισομορφές της OPN.....	22
1.2.3.	Εκκρινόμενη και ενδοκυττάρια OPN.....	25
1.2.4.	Ρύθμιση της έκφρασης της OPN.....	26
1.2.5.	Κύτταρα και ιστοί που εκφράζουν OPN.....	26
1.2.6.	Υποδοχείς OPN και σηματοδότηση	27
1.2.7.	Λειτουργίες της OPN	30
1.2.8.	OPN και καρκίνος.....	32
1.3.	Μικροπεριβάλλον του όγκου	34
1.4.	OPN στο μικροπεριβάλλον του όγκου	35
1.4.1.	Επίδραση της OPN στην ανοσολογική αντίδραση στο μικροπεριβάλλον του όγκου	36
1.5.	Μελάνωμα και OPN.....	38
1.6.	Σκοπός της εργασίας.....	39
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	40
2.1.	Μύες	40
2.2.	Η κυτταρική σειρά B16F10.....	40
2.2.1.	Καλλιέργεια B16F10 κυττάρων.....	41
2.3.	Στρατηγική κατασκευής shRNA για την OPN	45
2.4.	Έλεγχος της μείωσης της έκφρασης της OPN με RT-qPCR.....	47
2.5.	Μέτρηση των κυττάρων και εκτίμηση της απόπτωσής τους με κυτταρομετρία ροής	49

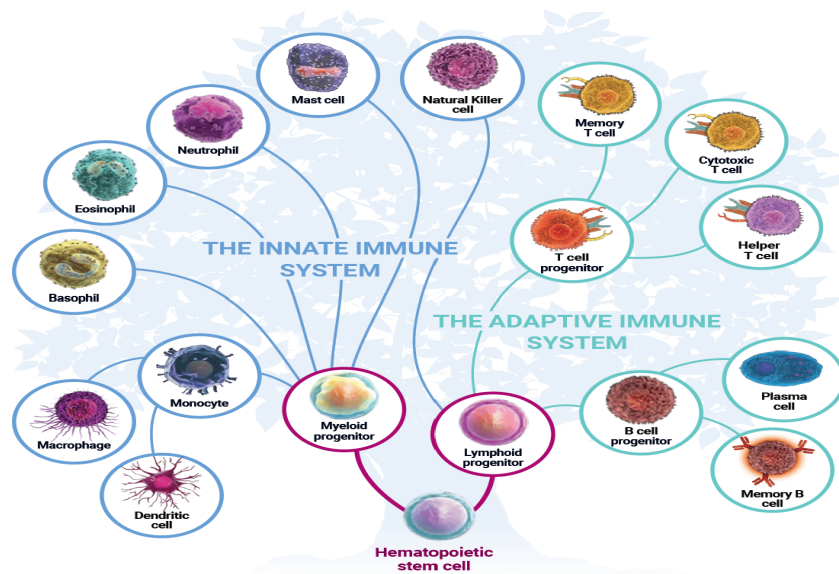
2.6.	Επαγωγή μελανώματος στους μύες	51
2.7.	Απομόνωση και ανάλυση των πληθυσμών των όγκων	51
2.8.	Στατιστική ανάλυση	52
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
3.1.	Τα κύτταρα που έχουν λάβει τα shRNA ολιγονουκλεοτίδια για την OPN, εκφράζουν μειωμένη OPN.....	53
3.2.	Η ενσωμάτωση των shRNA ολιγονουκλεοτιδίων από τα B16F10 κύτταρα δε φαίνεται να επηρεάζει τη βιωσιμότητά τους.....	54
3.3.	Μικρότερη ανάπτυξη όγκων σε μύες με μελάνωμα που επάγεται από B16F10 κύτταρα που φέρουν shRNA-OPN, συγκριτικά με τους μύες με B16F10 μελάνωμα	56
3.4.	Η απουσία της καρκινικής OPN μειώνει το ποσοστό των ρυθμιστικών Τ κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου	58
3.5.	Η απουσία της καρκινικής OPN φαίνεται να αυξάνει το ποσοστό των CD4+ και CD8+ κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου	60
3.6.	Η μείωση της έκφρασης της OPN δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό των NK 1.1+, B220+ και CD11c+ κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου	62
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	63
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το ανοσοποιητικό σύστημα

Το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ένα υψηλά ευπροσάρμοστο αμυντικό σύστημα με προστατευτικό ρόλο, ικανό να πραγματοποιεί αποτελεσματικές αποκρίσεις έναντι μιας ποικιλίας ξένων παθογόνων ή κυττάρων που έχουν εξαλλαχθεί και μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου, μέσω ενός εξελιγμένου συνόλου κυττάρων και μορίων, τα οποία μπορούν να τα αναγνωρίσουν και να τα εξουδετερώσουν. Μετά την αρχική αναγνώριση των λεγόμενων «μη εαυτών» συστατικών, ακολουθεί η έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης, δηλαδή της προσπάθειας εξάλειψής τους.

Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος προέρχονται από ένα πολυδύναμο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο, από το οποίο προκύπτει ένα λεμφοειδές προγονικό κύτταρο και ένα μυελοειδές προγονικό κύτταρο, κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της αιμοποίησης. Το πρώτο, δίνει γένεση στα Β, Τ και τα φυσικά φονικά κύτταρα (NK) κύτταρα, ενώ από το δεύτερο, προέρχονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια, όπως ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα (DCs) και τα μεγακαρυοκύτταρα, από τα οποία προκύπτουν τα αιμοπετάλια.



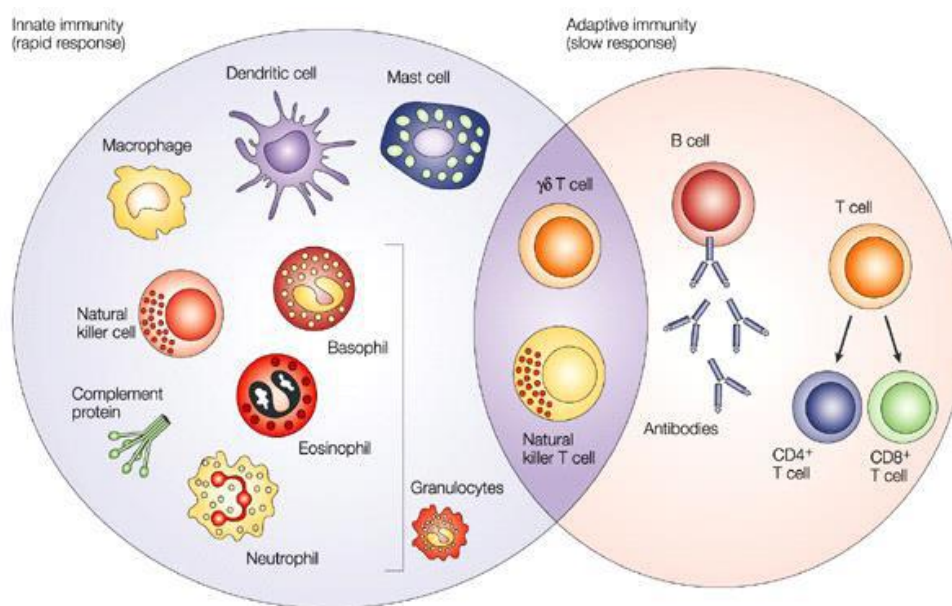
Εικόνα 1: Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Ένα πολυδύναμο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο δίνει γένεση είτε σε ένα μυελοειδές προγονικό κύτταρο, είτε σε ένα λεμφοειδές προγονικό κύτταρο. Τα μυελοειδή αρχέγονα κύτταρα δημιουργούν προγονικά κύτταρα, τα οποία δίνουν τα μεγακαρυοκύτταρα (από τα οποία προκύπτουν τα αιμοπετάλια), τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα μαστοκύτταρα και όλες τις κατηγορίες λευκών αιμοσφαιρίων (βασεόφιλα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και μονοκύτταρα που δίνουν μακροφάγα). Τα λεμφοειδή προγονικά κύτταρα δίνουν γένεση στα B και T λεμφοκύτταρα και στα NK κύτταρα. (Cells of the Immune System, LAB-A-PORTER, 2019)

1.1.1. Έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία

Στα σπονδυλωτά, το ανοσοποιητικό σύστημα αποτελείται ουσιαστικά από δύο συστήματα ανοσίας, το έμφυτο και το προσαρμοστικό. Η έμφυτη ανοσία (innate immunity) αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας ενός οργανισμού, και περιλαμβάνει τους πρωτογενείς φραγμούς (π.χ. το δέρμα, το pH του στομάχου, το ένζυμο λυσοζύμη στα δάκρυα, κ.ά) αλλά και τους μοριακούς και κυτταρικούς μηχανισμούς που αναπτύσσονται πριν τη μόλυνση, με στόχο την παρεμπόδιση ή την εξάλειψή της. Τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας μπορούν να διακρίνουν τα εαυτά συστατικά από τα ξένα, μέσω υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (PRRs), αλλά δεν ξεχωρίζουν λεπτές διαφορές μεταξύ των δεύτερων. Η έμφυτη ανοσία περιλαμβάνει τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, καθώς και τα φυσικά φονικά κύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα. Επίσης, υπάρχουν κάποιοι τύποι κυττάρων, τα οποία θεωρούνται λεμφοκύτταρα με αντιγονική ειδικότητα, και

επομένως συγκαταλέγονται στα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας, με κάποιες ομοιότητες με τα δραστικά λεμφοκύτταρα. Τέτοια κύτταρα αποτελούν τα γδ Τ κύτταρα και τα ΝΚ Τ κύτταρα. Τα μονοκύτταρα και τα ΝΚ κύτταρα κυκλοφορούν στο αίμα, ενώ τα μακροφάγα βρίσκονται στους ιστούς.

Η προσαρμοστική ανοσία (adaptive immunity) είναι πιο εξειδικευμένη, απόλυτα ειδική απόκριση στη μόλυνση, η οποία εξαρτάται από την έμφυτη και αναγνωρίζει, εξαλείφει και στη συνέχεια απομνημονεύει το παθογόνο. Βασικό χαρακτηριστικό της αποτελεί η μνήμη: σε μία δεύτερη πιθανή έκθεση του οργανισμού στο ίδιο παθογόνο, η επίθεση εναντίον του θα είναι πιο άμεση και δραστική. Η αναγνώριση στην προσαρμοστική ανοσία πραγματοποιείται από αντιγονικούς υποδοχείς. Οι κυριότεροι κυτταρικοί τύποι της προσαρμοστικής ανοσίας είναι τα Τ και Β λεμφοκύτταρα.



Nature Reviews | Cancer

Εικόνα 2: Τα κύτταρα της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας. Στα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας ανήκουν τα μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα φυσικά φονικά κύτταρα, τα μαστοκύτταρα, και τα κοκκιοκύτταρα(ηωσινόφιλα, βασεόφιλα και ουδετερόφιλα). Στα κύτταρα της προσαρμοστικής ανοσίας ανήκουν τα Τ και Β λεμφοκύτταρα. Επίσης, υπάρχουν κάποια κύτταρα της έμφυτης ανοσίας με χαρακτηριστικά δραστικών λεμφοκυττάρων (γδ Τ και ΝΚ Τ κύτταρα). (Nature Reviews Cancer, 2004)

Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι τα συστήματα της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας δε λειτουργούν ανεξάρτητα, αλλά αλληλεπιδρούν και συνεργάζονται, οδηγώντας σε ενισχυμένη ανοσολογική απόκριση, αν και ο διαχωρισμός τους καθιστά πιο εύκολη την κατανόησή τους. Μία επιτυχημένη ανοσολογική απόκριση περιλαμβάνει δύο κύριες ομάδες κυττάρων: τα λεμφοκύτταρα και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs).

1.1.2. Κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος

Σε μία πιθανή μόλυνση, τα ουδετερόφιλα είναι τα πρώτα κύτταρα τα οποία μεταναστεύουν και συσσωρεύονται στην περιοχή της φλεγμονής, εξαιτίας της ύπαρξης χημειοτακτικών παραγόντων. Τα ουδετερόφιλα διαθέτουν κοκκία με λυτικά ένζυμα και βακτηριοκτόνα, πραγματοποιώντας έτσι τη φαγοκυττάρωση των παθογόνων και την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων.

Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα ανήκουν στα μονοπύρρηνα φαγοκύτταρα. Τα πρώτα κυκλοφορούν στο αίμα, ώσπου στη συνέχεια μεταναστεύουν στους ιστούς και διαφοροποιούνται σε ειδικά για κάθε τύπο ιστού μακροφάγα. Τα ήρεμα μακροφάγα ενεργοποιούνται εξαιτίας ποικιλίας ερεθισμάτων, όπως κυτταροκινών (cytokines), και μεσολαβητών της φλεγμονώδους απόκρισης, αλλά και αναγνώρισης μικροβιακών συστατικών. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα παρουσιάζουν μεγάλη φαγοκυτταρική ικανότητα, αποτέλεσμα της οποίας είναι η πέψη των διάφορων εξωγενών αντιγόνων και η παρουσίαση πεπτιδίων στη μεμβράνη τους, συνδεδεμένα με μόρια της τάξης II του κύριου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας (MHC). Συνεπώς, τα μακροφάγα δρουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και η διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης είναι καθοριστικής σημασίας για την μετέπειτα ενεργοποίηση των Τ βοηθητικών κυττάρων (T_H) του προσαρμοστικού συστήματος. Επιπλέον, οι ίδιες οι αλληλεπιδράσεις των μακροφάγων με τα παθογόνα παράγουν διαλυτές πρωτεΐνες, τις λεγόμενες κυτταροκίνες, οι οποίες στη συνέχεια αλληλεπιδρούν με άλλους κυτταρικούς τύπους, οδηγώντας τους στη σύνθεση νέων παραγόντων ή συμβάλλοντας στη διαφοροποίησή τους. Παραδείγματα τέτοιων κυτταροκινών είναι οι IL-6, TNF- α και IL-1, οι οποίες προάγουν τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, παρά το γεγονός ότι κάθε μία διαθέτει πληθώρα δράσεων. Μία κατηγορία κυτταροκινών, οι χημειοκίνες (chemokines), διαθέτουν χημειοτακτική δραστηριότητα και στρατολογούν εξειδικευμένα κύτταρα του ανοσοποιητικού προς τη θέση των κυττάρων που τις εκκρίνουν.

Τα ανώριμα δένδριτικά κύτταρα αναγνωρίζουν τα παθογόνα μέσω ποικιλίας υποδοχέων και έτσι ενεργοποιούνται και ωριμάζουν. Χρησιμοποιούν για να συντονίζουν τις ανοσοαποκρίσεις, αφού και αυτά δρουν ως αυτογονοπαρουσιαστικά κύτταρα, μέσω της έκφρασης των μορίων MHC τάξης I και MHC τάξης II, καθώς και άλλων συνδεδεγμένων μορίων, όπως των CD80 και CD86, ενεργοποιώντας στη συνέχεια τα Τ κυτταροτοξικά κύτταρα (T_C) και T_H , αντίστοιχα, στα λεμφοειδή όργανα. Τα δένδριτικά κύτταρα παράγουν και αυτά αντιμικροβιακά πεπτιδία, κυτταροκίνες και ιντερφερόνες.

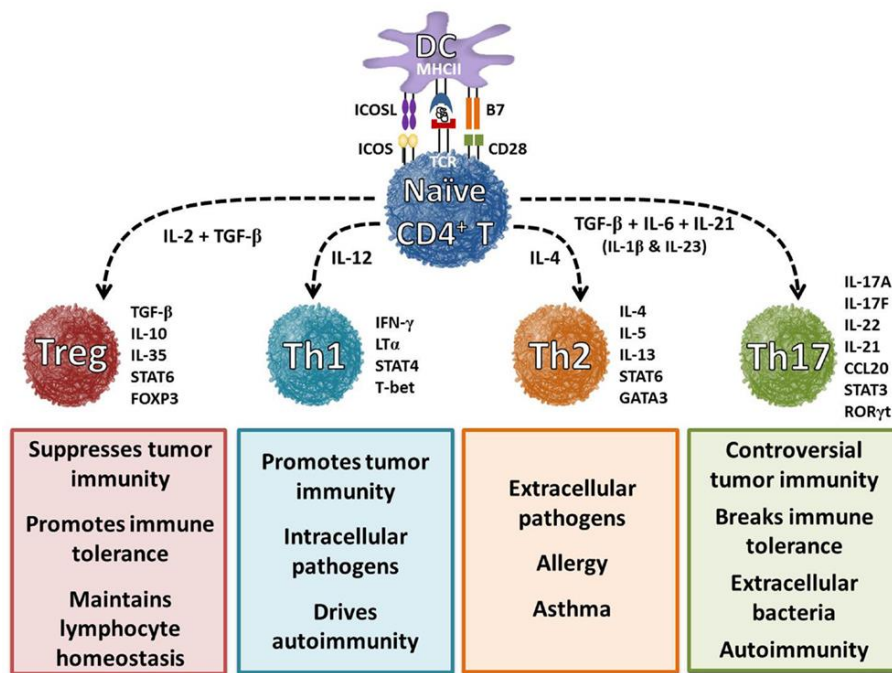
Τα NK κύτταρα αποτελούν έναν μικρό πληθυσμό μεγάλων κοκκιωδών λεμφοκυττάρων, τα οποία εκδηλώνουν κυτταροτοξική δραστηριότητα έναντι τροποποιημένων κυττάρων του ξενιστή, π.χ. μολυσμένων με ιό ή μετασχηματισμένων/καρκινικών κυττάρων, διατηρώντας τον έλεγχο έως ότου ενεργοποιηθεί η προσαρμοστική ανοσία. Τα ενεργοποιημένα NK κύτταρα παράγουν ανοσορυθμιστικές κυτταροκίνες, οι οποίες ρυθμίζουν άλλα κύτταρα (π.χ. μακροφάγα και δένδριτικά κύτταρα), όπως η IFN- γ και ο TNF- α . Τελευταία, έχει αναγνωρισθεί ένας νέος κυτταρικός τύπος, που ονομάζεται NKT κύτταρο (NKT cell), ο οποίος διαθέτει κάποια χαρακτηριστικά τόσο των Τ όσο και των NK. Τα κύτταρα αυτά διαθέτουν την ικανότητα καταστροφής κυττάρων-στόχων και εκκρίνουν μεγάλα ποσά κυτταροκινών, ενεργοποιώντας στη συνέχεια την παραγωγή αντισωμάτων από τα Β κύτταρα και τον πολλαπλασιασμό των κυτταροτοξικών Τ κυττάρων.

Τα Β λεμφοκύτταρα της προσαρμοστικής ανοσίας προέρχονται και ωριμάζουν στο μυελό των οστών. Τα παρθένα (naïve) Β λεμφοκύτταρα φέρουν στην επιφάνειά τους μεμβρανικές ανοσοσφαιρίνες (αντισώματα), τα οποία όταν έρθουν σε επαφή για πρώτη φορά με συγκεκριμένα αντιγόνα που τους ταιριάζουν, πολλαπλασιάζονται ταχέως, με τους απογόνους πληθυσμούς να διαφοροποιούνται σε κύτταρα μνήμης (memory B cells), και δραστικά Β κύτταρα (effector B cells) ή αλλιώς πλασματοκύτταρα (plasma cells). Τα τελευταία παράγουν τα αντισώματα σε εκκριτική μορφή, σε αντίθεση με τα Β κύτταρα μνήμης, οργανώνοντας έτσι τη χυμική ανοσία.

Τα Τ λεμφοκύτταρα προέρχονται από τον μυελό των οστών αλλά ωριμάζουν στο θύμο αδέν, όπου και εκφράζουν στη μεμβράνη τους τον υποδοχέα Τ κυττάρου (TCR), ο οποίος σχετίζεται με το μόριο CD3, το οποίο συμμετέχει στη μεταγωγή μηνυμάτων. Οι δύο πληθυσμοί των Τ κυττάρων, T_H και T_C , μπορούν να διακριθούν από την παρουσία, στην επιφάνειά τους, των μεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών CD4 ή CD8, αντίστοιχα. Έτσι, η ανοσολογία των T_H προς τα T_C κύτταρα σε ένα δείγμα,

μπορεί να προσεγγιστεί με μέτρηση του αριθμού των CD4+ και CD8+ T κυττάρων. Ο TCR υποδοχέας αναγνωρίζει αντιγόνα μόνον όταν αυτά είναι προσδεδεμένα στις μεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες του MHC. Επίσης, συνδιεγερτικά μόρια που εκφράζονται στα APCs (CD80,CD86), προσδένονται με συνδιεγερτικά μόρια των T κυττάρων (CD28), με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους. Τα MHC τύπου I εκφράζονται σχεδόν σε όλα τα εμπύρνηγα κύτταρα των σπονδυλωτών, ενώ τα MHC τύπου II, όπως προαναφέρθηκε, μόνο στα APCs.

Όταν ένα naïve T κύτταρο, έρθει σε επαφή με το σύμπλοκο αντιγόνου-MHC, πολλαπλασιάζεται και διαφοροποιείται σε T κύτταρα μνήμης και διάφορα δραστικά T κύτταρα. Με λίγες εξαιρέσεις, η ειδική ανοσοαπόκριση ξεκινά με την παρουσίαση του αντιγόνου στα T_H κύτταρα, μέσω των MHC τάξης II μορίων. Οι κλώνοι των T_H διαιρούνται σε δύο κύριους φαινοτύπους, τύπου 1 (Th1) και τύπου 2 (Th2) κύτταρα, σύμφωνα με τις κυτταροκίνες που παράγουν και απελευθερώνουν. Τα Th1 κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα έναντι των ενδοκυτταρικών παθογόνων, π.χ. των ιών, στην απελευθέρωση της IFN-γ και της IL-2. Τα Th2 κύτταρα απελευθερώνουν IL-4, IL-5, IL-6 και IL-13 και φαίνεται να εμπλέκονται στην προστασία έναντι των εξωκυτταρικών παράσιτων και στην επαγωγή της χυμικής ανοσίας (παραγωγή αντισωμάτων και άλλων διαλυτών παραγόντων που κυκλοφορούν στο αίμα και σε άλλα υγρά του σώματος). Ως εκ τούτου, οι κυτταροκίνες που απελευθερώνονται από τα Th2 κύτταρα μπορούν να ενεργοποιήσουν τα B λεμφοκύτταρα. Ένα πιθανό αποτέλεσμα των κυτταροκινών είναι η μετατροπή των T_C κυττάρων σε κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTLs), τα οποία εκδηλώνουν κυτταροτοξική δράση έναντι μολυσμένων, καρκινικών και άλλων κυττάρων. Η δράση των T_H και των CTLs, ως δραστικών κυττάρων, οργανώνουν την κυτταρομεσολαβητική ανοσία. [1]



Εικόνα 3: Η διαφοροποίηση των T βοηθητικών κυττάρων καθορίζεται από κυτταροκίνες. Παρουσία IL-6, IL-21 και TGF-β, τα παρθένα CD4⁺ T κύτταρα διαφοροποιούνται στον Th17 φαινότυπο, ο οποίος έχει ρόλο-κλειδί στην ενίσχυση της αυτοανοσίας και της άμυνας του ξενιστή. Οι κυτταροκίνες IL-12, IL-4 και TGF-β και οι μεταγραφικοί παράγοντες T-bet, GATA3 και Foxp3, έχουν δείξει να ρυθμίζουν τους Th1, Th2 και Treg φαινοτύπους, αντίστοιχα. Αυτά τα διάκριτα υποσύνολα κυττάρων ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση έναντι σε ξένα, εαυτά και καρκινικά αντιγόνα.(Frontiers in Immunology, 2014).

1.1.3. T ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs)

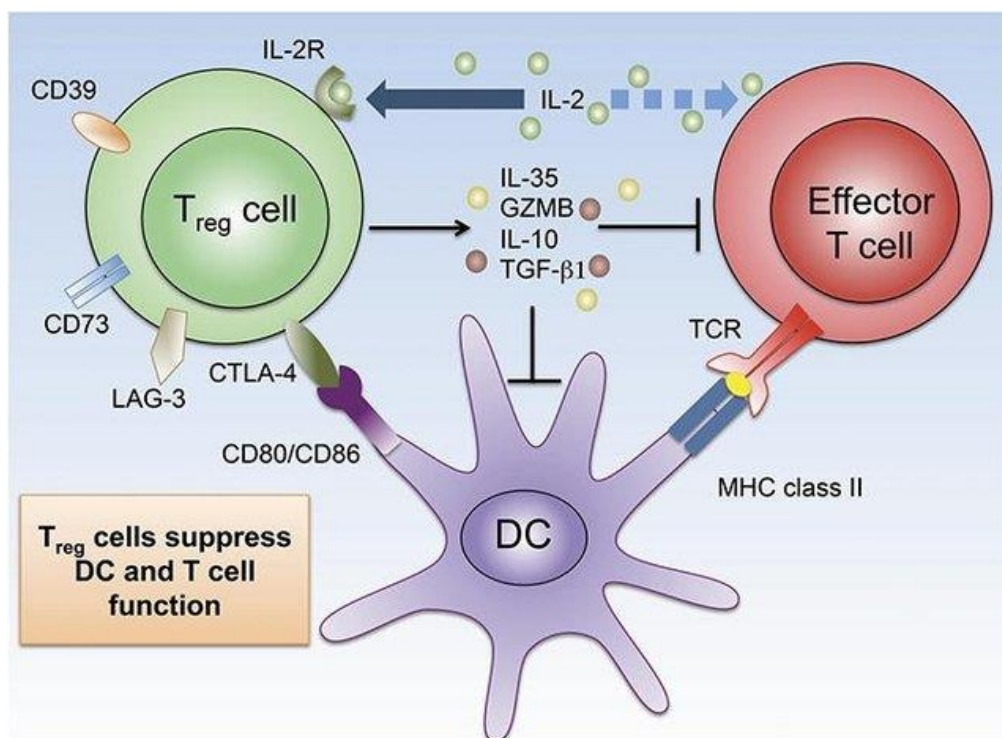
Υπάρχει ένας τρίτος πληθυσμός T κυττάρων, τα T ρυθμιστικά κύτταρα (T_{reg}), τα οποία φέρουν CD4 στην επιφάνειά τους, αλλά μπορούν να διακριθούν από τους προηγούμενους δύο, βάσει επιφανειακών δεικτών, σχετιζόμενων με το στάδιο ενεργοποίησής του, όπως του παράγοντα Foxp3 και των CD25 μορίων. Ο παράγοντας Foxp3, ανήκει σε μία οικογένεια πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων, αποτελεί ρυθμιστή της ανάπτυξης και της λειτουργίας των Tregs, καθώς και τον καλύτερο παράγοντα για την ανίχνευσή τους σε μύες. Η έκφρασή του είναι μεγάλης σημασίας για τη διατήρηση της καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος.

Οι δύο κύριες ομάδες των Tregs είναι τα φυσικά (n Tregs) και τα επαγόμενα (i Tregs). Τα πρώτα, είναι CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ κύτταρα, τα οποία ωριμάζουν στο θύμο αδένι και μεταναστεύουν στην περιφέρεια, με σκοπό τη διατήρηση της

ομοιόστασης. Τα δεύτερα προέρχονται από μη ρυθμιστικά CD4+CD25- T κύτταρα της περιφέρειας ή των λεμφικών ιστών, στα οποία η έκφραση του CD25 γίνεται έξω από το θύμο αδένα, στα δευτερογενή λεμφικά όργανα και ιστούς, κυρίως σε φλεγμονώδεις και παθολογικές καταστάσεις, όπως η αυτοανοσία και ο καρκίνος. Τέλος, Foxp3 μπορούν να εκφράζουν και άλλοι πληθυσμοί T κυττάρων, όπως τα CD8+ T κύτταρα, χωρίς όμως να έχει προσδιοριστεί η κατασταλτική τους δράση.

Ο ρόλος των Tregs είναι η ρύθμιση ή η καταστολή άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, είναι δηλαδή αρνητικοί ρυθμιστές του. Τα Tregs ελέγχουν την ανοσολογική απόκριση σε αυτο- και αλλο-αντιγόνα και συμβάλλουν στην αποφυγή εμφάνισης αυτοάνοσων νοσημάτων και χρόνιας φλεγμονής, άρα στη διατήρηση της αυτοανοχής και της ομοιόστασης. Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης τους είναι η καταστολή μέσω επαφής κυττάρου-κυττάρου. Τα μόρια CTLA-4 και LAG3 που εκφράζονται από αυτά, και τα συνδιεγερτικά μόρια CD80 και CD86, που εκφράζονται από τα APCs, παίζουν βασικό ρόλο στην καταστολή μέσω Tregs. Το CTLA-4 αλληλεπιδρά με αυτά τα δύο και έτσι μεταδίδεται ένα συνδιεγερτικό σήμα στα Tregs, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους. Επιπλέον, το CTLA-4 πυροδοτεί την παραγωγή του ενζύμου ινδολεαμίνη 2,3-διοφυγενάση (IDO) στα DCs, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανοσοκατασταλτικών επιδράσεων στο περιβάλλον τους. Επιπλέον, τα Tregs, μέσω του CTLA-4, μειώνουν την έκφραση των CD80 και CD86 στα DCs, εμποδίζοντας έτσι την ενεργοποίηση άλλων T κυττάρων από αυτά. Τέλος, το CTLA-4 συνδέεται με τα CD80 και CD86 των ενεργοποιημένων T κυττάρων, μεταδίδοντας ένα αρνητικό σήμα στα δραστικά T κύτταρα.

Τα Tregs εκφράζουν στην επιφάνειά τους μόρια όπως το CD39 και CD73, τα οποία μετατρέπουν την ATP σε ανοσοκατασταλτική αδενοσίνη. Επιπλέον, εκκρίνουν ανοσοκατασταλτικές κυτταροκίνες όπως IL-10, η οποία επάγει τα κατασταλτικά συνδιεγερτικά μόρια B7-H4 στα DCs, και TGF-β, η οποία απαιτείται για τη διατήρηση των nTregs και την επαγωγή νέων. Έτσι, καταστέλλεται η παραγωγή κυτταροκινών από CD4+ T και CD8+ T κύτταρα, όπως IFN-γ και IL-4. Τέλος, η IL-2 η οποία παράγεται από τα δραστικά κύτταρα τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί, προσδένεται στους υποδοχείς των Tregs και ενεργοποιούν την κατασταλτική τους δράση, αποφεύγοντας την υπερευαισθησία σε περιπτώσεις μεγάλης ενεργότητας T κυττάρων. Το CTLA-4 εκφράζεται επίσης από άλλους τύπους T κυττάρων περιοδικά, π.χ. από τα ενεργοποιημένα T κύτταρα, αν και ο ρόλος του σε αυτά δεν είναι σαφώς καθορισμένος. [1,2]



Εικόνα 4: Μηχανισμός κατασταλτικής δράσης των Tregs. Τα Tregs αναστέλλουν την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, και ρυθμίζουν την επιβίωση των T κυττάρων, μέσω έκκρισης ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών (IL-10, TGF και IL-35) και της πρόσδεσης των ανοσορρυθμιστικών μορίων κυτταρικής επιφανείας (CTLA-4 και LAG-3) με τους αντίστοιχους προσδέτες τους στα κύτταρα-στόχους. Επιπλέον μηχανισμοί καταστολής αποτελούν η μετατροπή της ATP σε αδενοσίνη και η στέρση της IL-2 για τα δραστικά T κύτταρα. (Future Directions and Methods for IBD Research, 2015)

1.1.4. Ανοσοποιητικό σύστημα και καρκίνος

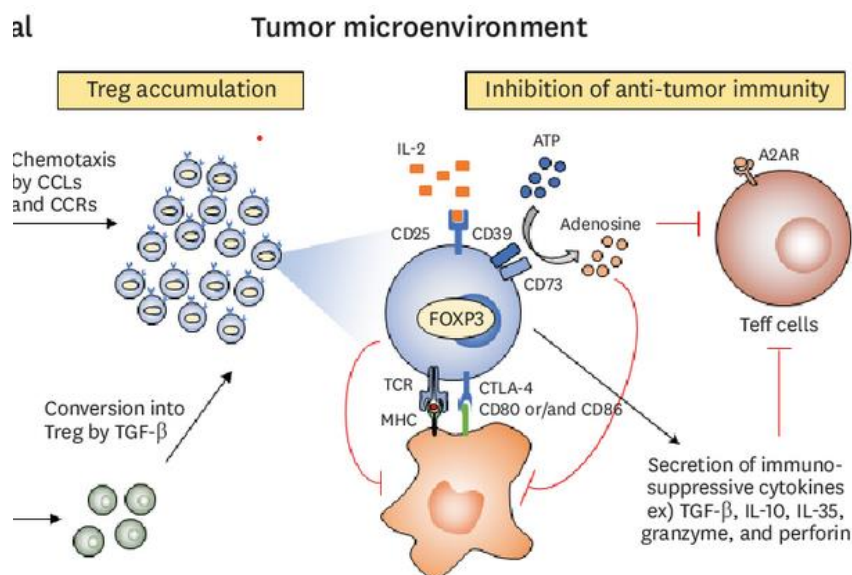
Το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να έχει ποικίλες επιδράσεις στην ανάπτυξη και εξέλιξη ενός όγκου. Αρχικά, το σύστημα αυτό μπορεί να προλαμβάνει την εγκατάσταση ενός φλεγμονώδους περιβάλλοντος, το οποίο ευνοεί την ογκογένεση, εξαλείφοντας την ύπαρξη παθογόνων μικροοργανισμών και ιών. Επιπλέον, είναι πλέον γνωστό ότι τα προ-καρκινικά και καρκινικά κύτταρα, εκφράζουν στην επιφάνειά τους καρκινικά αντιγόνα, τα οποία εντοπίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Με αυτό τον τρόπο, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν και αναγνωρίζουν και κατ'επέκταση εξουδετερώνουν τα καρκινικά κύτταρα, μέσω της επαγωγής χυμικής και κυτταρομεσολαβητικής

ανοσολογικής απόρισης, διαδικασία η οποία ονομάζεται ανοσοεπιτήρηση. Σε γενικές γραμμές, η κυτταρομεσολαβητική ανοσία αναλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της άμυνας εναντίον των καρκινικών κυττάρων. Έχει δειχθεί ότι ένας αριθμός όγκων επάγουν την ενεργοποίηση ογκο-ειδικών CTLs, τα οποία αναγνωρίζουν τα καρκινικά αντιγόνα που παρουσιάζονται από τα MHC τάξης I των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, τα NK κύτταρα μπορούν να έχουν αντικαρκινική δράση, η οποία δεν περιορίζεται από τη χαμηλή έκφραση μορίων MHC I και II, μία στρατηγική την οποία ακολουθούν τα καρκινικά κύτταρα ώστε να περιορίσουν την ενεργοποίηση των CTLs. Σε μερικές περιπτώσεις, μέσω των Fc υποδοχέων τους, τα NK κύτταρα προσδένονται σε καρκινικά κύτταρα καλυμμένα με αντίσωμα και τα καταστρέφουν μέσω της ADCC. Το ίδιο ισχύει και για τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, τα οποία μπορούν και εκκρίνουν υδρολυτικά ένζυμα και TNF- α , παράγοντας με ισχυρή αντικαρκινική δράση.

Πολλές φορές, ωστόσο, ένας αναπτυσσόμενος όγκος μπορεί να διαφεύγει της ανοσολογικής ανίχνευσης, μέσω ανάπτυξης διάφορων μηχανισμών, γεγονός το οποίο οδηγεί στην επιβίωση καρκινικών τύπων και στην καταστολή της αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης. Σημαντική θεωρείται η ικανότητα του όγκου να παρεμβαίνει στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, επάγοντας και στρατολογώντας ανοσοκατασταλτικά κύτταρα ή/και καταστέλλοντας τη φυσιολογική δράση των δραστικών κυττάρων. Για παράδειγμα, στο καρκινικό μικροπεριβάλλον υπάρχουν κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως μακροφάγα και T και B λεμφοκύτταρα, που μπορούν να εκκρίνουν διάφορα μόρια τα οποία προωθούν την εξέλιξη του όγκου, όπως τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα, τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα, διάφορες φλεγμονώδεις χημειοκίνες και κυτταροκίνες κ.ά. Επιπλέον, οι όγκοι διηθούνται από CD8⁺ T κύτταρα, ειδικά για τα καρκινικά αντιγόνα, τα οποία ωστόσο φαίνονται να έχουν μειωμένη λειτουργικότητα στο μικροπεριβάλλον του. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στην χαμηλή παραγωγή IL-2 ή στην ατελή ενεργοποίησή τους, κατά την οποία τα παρθένα T κύτταρα δέχονται συνδιεγερτικά σήματα χαμηλής έντασης από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, ή κατασταλτικά σήματα υψηλής έντασης. Χωρίς την παρουσία ικανού αριθμού APCs στο μικροπεριβάλλον του όγκου, τα ογκο-ειδικά T κύτταρα δέχονται σήματα ενεργοποίησης μόνο μέσω του TCR, γεγονός το οποίο οδηγεί σε ανέργεια των συγκεκριμένων κλώνων T κυττάρων. Τέλος, η κακοήθης εξαλλαγή των κυττάρων συσχετίζεται συχνά με ελάττωση και μερικές φορές ολική εξαφάνιση των μορίων MHC τάξης I. Η ίδια η ανοσολογική απόκριση μπορεί να

οδηγήσει στην επιλεκτική αύξηση καρκινικών κυττάρων με χαμηλή έκφραση των μορίων αυτών, οδηγώντας στην προοδευτική αύξηση του φορτίου του όγκου.

Επιπλέον, ένας όγκος μπορεί να αποφύγει την ανοσολογική απόκριση, στρατολογώντας Tregs στο περιβάλλον του όγκου, μέσω έκκρισης χημειοτακτικών παραγόντων (CCL2, CCL22), οι οποίοι προσδένονται με τον υποδοχέα CCR4 των Tregs. Ακόμη, όπως προαναφέρθηκε, η έκκριση αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως ο TGF- β και η IDO, μπορούν να μετατρέψουν τα δραστικά T κύτταρα σε Tregs, ενώ η έκκριση TGF- β και IL-10, μειώνει τις αντικαρκινικές αποκρίσεις των CD4+, CD8+ και NK κυττάρων. Το μικροπεριβάλλον του όγκου διατηρεί πολλά MDSCs, τα οποία καταστέλλουν την ενεργοποίηση των T κυττάρων, μέσω της παραγωγής μορίων όπως ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) και IL-10, ή με την επαγωγή Tregs. Ακόμη, ο CD25 ετεροδιμερής υποδοχέας τους μπορεί να έχει υψηλή συγγένεια με την IL-2 και άλλες αντικαρκινικές κυτταροκίνες (IL-7, IL-12, IL-15). Τέλος, τα Tregs εκφράζουν επιφανειακά μόρια, όπως CTLA-4 και PD-1, τα οποία αλληλεπιδρούν με τους αντίστοιχους συνδέτες τους CD80/CD86, PD-L1 στα APCs, διατηρώντας ένα κατασταλτικό περιβάλλον, όπως περιγράφεται παραπάνω. [1,3]



Εικόνα 5: Μηχανισμοί συσσώρευσης των T ρυθμιστικών κυττάρων στο περιβάλλον του όγκου και δράσεις τους στην καταστολή της αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης. (Επεξήγηση στο κείμενο) (Regulatory T Cells in Tumor Microenvironment and Approach for Anticancer Immunotherapy, 2020)

1.2. Οστεοποντίνη (OPN)

Η Οστεοποντίνη (OPN), είναι μία εκκρινόμενη, φωσφορυλιωμένη, μη κολλαγονούχα γλυκοπρωτεΐνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM), η οποία εκφράζεται από ένα μεγάλο αριθμό κυτταρικών τύπων και βρίσκεται σε μία ποικιλία ιστών.

Η OPN αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1979, εκκρινόμενη από μετασχηματισμένα κακοήγη επιθηλιακά κύτταρα. Το 1985 ερευνητές την εντόπισαν στα οστά, ως βασικό συστατικό της εξωκυττάριας μήτρας και την περιέγραψαν ως σιαλοπρωτεΐνη των οστών 1 (BSP-1 ή BNSP). Μετέπειτα δεδομένα έδειξαν την ύπαρξη της OPN ενδοκυτταρικά, στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα [4,5]. Το 1986, ο Oldberg και οι συνεργάτες του πρότειναν το σύνθετο όνομα «Οστεοποντίνη» (από το ελληνικό «όσteo-» και το λατινικό «pons», που σημαίνει γέφυρα), όταν η πρωτεΐνη απομονώθηκε από κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος αρουραίου. Το όνομα αυτό υποδηλώνει αφενός την άφθονη έκφραση της OPN στα οστά, αφετέρου τη λειτουργία της ως «γέφυρα», ανάμεσα στα κύτταρα του οστίτη ιστού και στους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη της ECM του οστού, μέσω μοτίβων πολυασπαρτικού οξέος, που ανακαλύφθηκαν στην πρώιμη αλληλουχία της [6]. Παράλληλα, αναγνωρίστηκε η έκφραση του ίδιου γονιδιακού προϊόντος, ως μίας σημαντικής λεμφοκίνης, και σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως για παράδειγμα σε ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και μακροφάγα, παίρνοντας την ονομασία γονίδιο πρώιμης ενεργοποίησης T λεμφοκυττάρων 1 (ETA-1). Το γεγονός αυτό ήταν το πρώτο στοιχείο σύνδεσης της OPN με το ανοσοποιητικό σύστημα [7].

Το γεγονός της εύρεσης της OPN σε πληθώρα ιστών και με ποικιλία ρόλων, κατέστησαν αναγκαία μία πιο γενική περιγραφή της, οπότε και εισήχθη ο όρος εκκρινόμενη φωσφοπρωτεΐνη 1 (SPP1). Τελικά ωστόσο, επικράτησε η ονομασία Οστεοποντίνη, σε συμφωνία με την ορολογία που χρησιμοποιείται για το ανθρώπινο γονίδιο.

1.2.1. Γονίδιο της OPN

Στον άνθρωπο, η OPN κωδικοποιείται από το ενός αντιγράφου γονίδιο SPP1 ή *spp1*, το οποίο εδράζεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 4, στη θέση

4q22.1. Το γονίδιο αυτό έχει μήκος περίπου 8 kb, αποτελείται από 942 νουκλεοτίδια, ενώ περιλαμβάνει 7 εξώνια και 6 εσώνια, με το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης να βρίσκεται στο δεύτερο εξώνιο. Συνολικά, 6 εξώνια κωδικοποιούν για μία μόνο πολυπεπτιδική αλυσίδα 314 αμινοξικών καταλοίπων [8].

Η θέση του γονιδίου της OPN βρίσκεται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, ανάλογα το είδος του οργανισμού. Το ορθόλογο γονίδιο στον μυ είναι το Spp1, το οποίο εντοπίζεται στην περιοχή (locus) *ric'* του χρωμοσώματος 5, στη θέση qE5 [4]. Το γονίδιο αυτό είναι μεγέθους 4,8 kb και αποτελείται από 8 εξώνια, τα οποία κωδικοποιούν για μία πρωτεΐνη 297 αμινοξικών καταλοίπων. Έχει αναγνωριστεί ότι το ανθρώπινο γονίδιο μοιράζεται περίπου 40% ομολογία στην αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων με άλλα είδη, όπως οι μύες, τα κουνέλια, οι χοίροι και οι αγελάδες [9].

Τα εξώνια του SPP1 ανθρώπινου γονιδίου μπορούν να υπόκεινται σε εναλλακτικό μάτισμα, παράγοντας διαφορετικές παραλλαγές (splice variants) της πρωτεΐνης. Το εναλλακτικό μάτισμα της OPN περιγράφηκε το 2006 και είναι κρίσιμος μηχανισμός για τη δημιουργία πρωτεωμικής ποικιλομορφίας· το αποτέλεσμα είναι 3 διαφορετικά μετάγραφα: το OPN-a, το οποίο θεωρείται το κανονικό μετάγραφο και τα OPN-b και OPN-c, από τα οποία αποκόπτονται τα εξώνια 5 και 4, αντίστοιχα. Το γονίδιο της OPN, έχει επίσης μία εναλλακτική θέση έναρξης της μετάφρασης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία της ενδοκυττάριας και της εξωκυττάριας μορφής της πρωτεΐνης [10].

Αξίζει να αναφερθεί ότι κατά μήκος του γονιδίου της OPN στον άνθρωπο, μπορεί να βρεθεί διάσπαρτος ένας μεγάλος αριθμός πολυμορφισμών, κάποιοι από τους οποίους έχουν συσχετιστεί με υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης αυτοάνοσων ασθενειών και καρκίνου. Επιπλέον, η έκφραση της OPN, επηρεάζεται από γενετικούς πολυμορφισμούς στον υποκινητή του γονιδίου της, καθώς και από την παρουσία πολλών τύπων ρυθμιστικών αλληλουχιών και αλληλουχιών πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων [11].

1.2.2. Δομή και ισομορφές της OPN

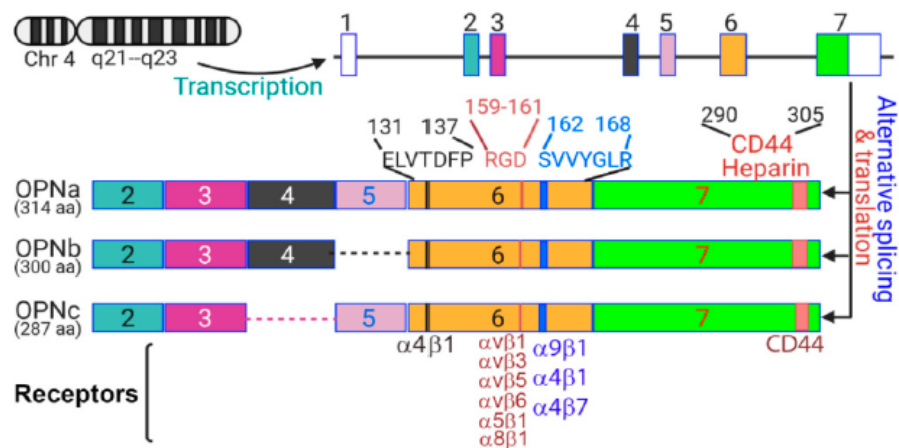
Η ανθρώπινη OPN κωδικοποιείται από 6 εξώνια και αποτελεί μία πρωτεΐνη 314 αμινοξικών καταλοίπων μονής αλυσίδας. Είναι μία πολύ όξινη πρωτεΐνη, αφού το 30-36 % των αμινοξικών καταλοίπων της είναι είτε ασπαρτικό είτε γλουταμικό οξύ,

ιδιαίτερα υδρόφιλη και με χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο. Στον μυ, η OPN αποτελείται από 297 αμινοξικά κατάλοιπα [4]. Είναι σχετικά απλή δομικά και πιθανόν περιλαμβάνει 8 α-έλικες και 6 β-πτυχωτές επιφάνειες. Ωστόσο, ανήκει στις IDPs (Intrinsically Disordered Proteins), μίας κατηγορίας βιολογικά ενεργών πρωτεϊνών, οι οποίες στερούνται καθορισμένης δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής [6,7].

Το προβλεπόμενο μοριακό βάρος της ανθρώπινης OPN είναι περίπου 33 kDa. Ωστόσο, υπόκειται σε διάφορες διαδικασίες όπως εναλλακτικό μάτισμα, εναλλακτική μετάφραση και εκτεταμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs), εξαιτίας των οποίων προκύπτουν διαφορετικές λειτουργικές ισομορφές της, με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 41 έως 75kDa, σε διαφορετικά κύτταρα θηλαστικών(44 kDa κατά προσέγγιση στον άνθρωπο) [11].

Απόρροια του εναλλακτικού ματίσματος είναι η ύπαρξη τριών διαφορετικών ισομορφών της OPN, οι οποίες μπορεί να είναι εκκρινόμενες ή ενδοκυτταρικές. Η OPN-a αντιπροσωπεύει την ισομορφή πλήρους μήκους, έχει επιλεγθεί ως η κανονική αλληλουχία, περιέχει και τα 7 εξώνια και αποτελείται από 314 αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία σχηματίζουν τη μοναδική πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η OPN-b, δε διαθέτει το εξώνιο 5 και αποτελείται από 300 αμινοξικά κατάλοιπα, ενώ η OPN-c, στερείται του εξωνίου 4 και περιέχει 287 αμινοξέα [7,11].

Η εκκρινόμενη μορφή της OPN (sOPN), υπόκειται επιπλέον και σε έναν μεγάλο αριθμό εκτεταμένων PTMs, με διαφορετικά αλλά συγκεκριμένα μοτίβα αναλόγως των κυττάρων προέλευσής της. Αυτές περιλαμβάνουν τη φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης/θρεονίνης, τη N- και O- γλυκοζυλίωση, τη θείωση καταλοίπων τυροσίνης και την πρωτεολυτική διάσπαση. Για παράδειγμα, τα 27 από τα 42 κατάλοιπα σερίνης του μορίου αποτελούν στόχους φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, στη νεοσυντιθέμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα, προσαρτώνται περίπου 30 υδατανθρακικά κατάλοιπα, συμπεριλαμβανομένων 10 καταλοίπων σιαλικού οξέος, έχοντας ως αποτέλεσμα μία πολύ όξινη, αρνητικά φορτισμένη φωσφογλυκοπρωτεΐνη [11].



Εικόνα 6: Οι πρωτεϊνικές δομές της ανθρώπινης OPN. Το ανθρώπινο SPP1 γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί για την OPN έχει 7 εξώνια. Τρία εναλλακτικά μετάγραφα της OPN μεταφράζονται σε πρωτεΐνη. Παραπάνω, φαίνονται οι περιοχές δέσμευσης των υποδοχέων της OPN (ιντεγκρίνες και CD44). (Osteopontin: A Key Regulator of Tumour Progression and Immunomodulation, 2020).

Οι διαφορετικές ισομορφές της OPN έχουν διαφορετικό προφίλ έκφρασης, με ιστο-ειδική και κυτταρο-ειδική δομή και λειτουργία. Για παράδειγμα, έχουν αναγνωρισθεί ισομορφές OPN, οι οποίες διαφέρουν στα μοτίβα φωσφορυλιώσεων και εμφανίζονται να είναι λειτουργικά διακριτές. Επιπλέον, όπως θα περιγραφεί παρακάτω, το γεγονός αυτό ίσως επηρεάζει τον πιθανό ρόλο της OPN στην ογκογένεση, καθώς και στον χαρακτηρισμό της καρκινικό βιοδείκτη [7]. Ωστόσο, παρά την αυξανόμενη βιβλιογραφία πάνω στο θέμα, η σχέση δομής και λειτουργίας της OPN, παραμένει μόνο μερικώς κατανοητή [4,11].

Παρά την ετερογένεια στη γενική δομή και λειτουργία, το μόριο της OPN έχει πολλές υψηλά συντηρημένες δομικές επικράτειες (domains). Αρχικά, φέρει μία περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα ασπαρτικού οξέος στο N-τερματικό άκρο, μέσω της οποίας συνδέεται με τον υδροξυαπατίτη και τα ιόντα ασβεστίου στο οστό, μία περιοχή καταλοίπων αργινίνης-γλυκίνης-ασπαρτικού οξέος (Arg-Gly-Asp, RGD domain), στο κεντρικό τμήμα του μορίου καθώς και μία παρακείμενη αλληλουχία καταλοίπων Ser-Val-Val-Tyr-Gly-Leu-Arg (SVVYGLR) [11,12]. Η OPN περιέχει επιπλέον λειτουργικά σημαντικές θέσεις πρωτεολυτικής διάσπασης (cleavage sites), για μεταλλοπρωτεάσες της θεμέλιας ουσίας (MMPs), πλασμίνη, καθεψίνη D, καθώς επίσης και για τη θρομβίνη. Η θέση αναγνώρισης για τη θρομβίνη ονομάζεται RSK

[9]. Η θρομβίνη διασπά την OPN σε δύο λειτουργικά θραύσματα : ένα αμινοτελικό, το OPN-R, το οποίο φέρει τις RGD και SVVYGLR αλληλουχίες, και ένα καρβοξυτελικό. Ουσιαστικά, η SVVYGLR, είναι ένα «κρυφό μοτίβο αμινοξέων», το οποίο αποκαλύπτεται μετά από πέψη με θρομβίνη. Η OPN μπορεί επίσης να αποτελεί υπόστρωμα για την ηπαρίνη, περιέχοντας θέσεις δέσμησης στο C-άκρο της, ενώ τέλος, έχει περιοχές δέσμησης για το ασβέστιο. Η πρωτεολυτική διάσπαση είναι μείζονος σημασίας, καθώς συμβάλλει περαιτέρω στη δομική ποικιλομορφία και κατ' επέκταση στη λειτουργική πολυπλοκότητα [7,11].

1.2.3. Εκκρινόμενη και ενδοκυττάρια OPN

Η OPN έχει κυρίως μελετηθεί στην εκκρινόμενη μορφή της. Ωστόσο, ερευνητικά δεδομένα δείχνουν την ύπαρξή της στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα [10]. Στον μυ, τα mRNA της OPN, έχουν το κανονικό κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης AUG, καθώς και ένα εναλλακτικό. Όταν η μετάφραση ξεκινά από το πρώτο, η παραγόμενη πρωτεΐνη στοχεύεται σε εκκριτικά κυστίδια, ενώ όταν ξεκινά από το δεύτερο, η σύνθεση της πρωτεΐνης συνοδεύεται από απαλειφή της σηματοδοτικής αλληλουχίας στόχευσης και εντοπισμό της στο κυτταρόπλασμα. Ο ρόλος της ανθρώπινης sOPN στη φυσιολογία των κυττάρων, έχει μελετηθεί εκτενώς, σε αντίθεση με την ενδοκυττάρια OPN (iOPN), της οποίας οι βιολογικές λειτουργίες έχουν αρχίσει να μελετώνται τα τελευταία χρόνια. Σε φυσιολογικές διαδικασίες, όπως η επούλωση πληγών, η sOPN εμπλέκεται στην κυτταρική προσκόλληση στην ECM, μέσω της αλληλουχίας πρόσδεσης σε ιντεγκρίνες [6]. Επιπλέον, η sOPN ρυθμίζει την ανοσολογική απόκριση, την αναγέννηση των κυττάρων και την αγγείωση [9]. Μέχρι στιγμής, η iOPN έχει βρεθεί σε δένδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, νευρικά και NK κύτταρα και συμμετέχει στην κινητικότητα και τη μετανάστευσή τους, την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, τη μίτωση μέσω της Plk-1 κινάσης, καθώς και σε σηματοδοτικά μονοπάτια των υποδοχέων του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, όπως των TLRs [5,18,19]. Επομένως, αν και οι δύο μορφές παράγονται από το ίδιο mRNA, τα βιολογικά αποτελέσματά τους μπορεί να είναι διαφορετικά. Παρόμοια, οι δύο αυτές μορφές ίσως έχουν διάκριτους ρόλους και στην καρκινογένεση. Όπως θα αναφερθεί παρακάτω, σε ποικίλους τύπους συμπαγών όγκων, η sOPN έχει προταθεί ως διαγνωστικός και προβλεπτικός βιοδείκτης. Από την άλλη, η κυτταροπλασματική OPN, δεν έχει συσχετιστεί με το μέσο μέγεθος και το στάδιο του όγκου [10].

1.2.4. Ρύθμιση της έκφρασης της OPN

Πολλά είναι τα ερεθίσματα τα οποία ενεργοποιούν μονοπάτια σηματοδότησης σε διάφορες καταστάσεις (φυσιολογικές ή/και παθολογικές), αυξάνοντας ή αναστέλλοντας την έκφραση της OPN. Τέτοια είναι το μηχανικό στρες, η υπεργλυκαιμία, η υποξία, διάφορες ορμόνες (βιταμίνη D, οιστρογόνα, αγγειοτενσίνη II, γλυκοκορτικοειδή, παραθυρεοειδής ορμόνη), κυτταροκίνες (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ) και άλλοι [9,11]. Πολλά από αυτά τα μονοπάτια, τα οποία όταν δε ρυθμιστούν σωστά, ενεργοποιούν την έκφραση της OPN, είναι ογκογόνα, όπως το μονοπάτι του υποδοχέα τυροσίνης, τα μονοπάτια των G-πρωτεϊνών, το Wnt/ β -κατενίνης, του NF- κ B κ.ά. [7].

Η ρύθμιση της OPN καθορίζεται από την ύπαρξη γενετικών πολυμορφισμών στον υποκινητή του γονιδίου της, καθώς επίσης και πολλών cis-ρυθμιστικών αλληλουχιών και αλληλουχιών πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων. Για παράδειγμα, η έκφραση της OPN από τα κύτταρα του οστίτη ιστού, απαιτεί την παρουσία των μεταγραφικών παραγόντων Runx2 και Osx. Η υπασβεσταιμία και η υποφωσφοταιμία αυξάνουν τη μεταγραφή της, λόγω του VDRE στοιχείου στον υποκινητή της. Ο παράγοντας RRF (Ras-response factor), προσδένεται στο στοιχείο RAE (Ras-activated enhancer), μετά από ενεργοποίηση του Ras μονοπατιού σε ινοβλάστες και επιθηλιακά κύτταρα. Πολλοί είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται στον υποκινητή του γονιδίου της OPN, όπως οι Sp1, Myc and Oct-1 κ.ά., ενώ έχουν αναγνωριστεί και άλλες πιθανές ρυθμιστικές αλληλουχίες του στους διάφορους τύπους κυττάρων. Στον μυ, υπάρχουν παρόμοιοι ρυθμιστές, όπως η βιταμίνη D₃, η οποία μειώνει την έκφραση της OPN, ή μεταγραφικοί παράγοντες που ενεργοποιούν την έκφρασή της, μέσω πρόσδεσης στον υποκινητή της [6].

1.2.5. Κύτταρα και ιστοί που εκφράζουν OPN

Η OPN συντίθεται από μία ποικιλία κυττάρων και ιστών στον άνθρωπο και σε άλλους οργανισμούς, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Αρχικά, εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα κύτταρα του οστίτη ιστού, δηλαδή τα επενδυματικά κύτταρα, τα οστεοκύτταρα, αλλά κυρίως τους ώριμους οστεοβλάστες,

τους οστεοκλάστες και λιγότερο στους προ-οστεοβλάστες. Επιπλέον, παράγεται από πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, μυελοειδή και λεμφοειδή, όπως μονοκύτταρα και μακροφάγα, ενεργοποιημένα T, δένδριτικά, B και NK κύτταρα, κύτταρα Kurpfger, NK T κύτταρα, ηωσινόφιλα, κύτταρα μικρογλοίας και ουδετερόφιλα. Άλλες πηγές OPN περιλαμβάνουν τα νευρικά κύτταρα, τα επιθηλιακά, τα λεία μυικά, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και οι ινοβλάστες. Τέλος, OPN εκφράζεται από κακοήγη κύτταρα διάφορων τύπων καρκίνων, καθώς και από πολλές καρκινικές σειρές σε συνθήκες καλλιέργειας [6,7,12].

Η έκφραση της OPN σε ιστούς, αντικατοπτρίζει τις κυτταρικές πηγές της. Έτσι, η OPN εκφράζεται κυρίως στα οστά και σε κάποιους άλλους επιμεταλλωμένους ιστούς, ως συστατικό της ECM, καθώς και σε επιθηλιακές επιφάνειες, όπως στο αναπνευστικό, στο αναπαραγωγικό, στο ουροποιητικό και στο γαστρεντερικό επιθήλιο. Κατά τη διάρκεια παθολογικών διαδικασιών, παράγεται εκτενώς από τραυματισμένα και φλεγμονώδη επιθήλια και ενδοθήλια, λεία μυικά κύτταρα, ινοβλάστες επουλωμένων πληγών και καρκινικά κύτταρα διάφορων οργάνων (νεφρών, μαστού και δέρματος) καθώς επίσης και φλεγμονωδών ανοσοκυττάρων [4,10].

Λόγω του ότι η OPN υφίσταται σε εκκρινόμενη μορφή, μπορεί να διανέμεται σε μία ποικιλία ιστών αλλά και να εντοπίζεται σε διάφορα σωματικά υγρά. Πράγματι, υψηλές συγκεντρώσεις OPN έχουν εντοπισθεί στο αίμα, στο πλάσμα, στα ούρα, στα σπερματικά υγρά, στη χολή και στο μητρικό γάλα, γεγονός με μεγάλη προγνωστική και διαγνωστική αξία [4,7,11].

1.2.6. Υποδοχείς OPN και σηματοδότηση

Η OPN εκτελεί τις δράσεις της, είτε απευθείας προσδενόμενη σε υποδοχείς κυτταρικής επιφανείας, είτε με την πρόσδεσή της σε άλλες πρωτεΐνες της ECM. Οι γνωστοί υποδοχείς της OPN είναι τα μόρια προσκόλλησης ιντεγκρίνες και το μόριο CD44, τα οποία βρίσκονται με τη σειρά τους σε μία ποικιλία κυττάρων και συμμετέχουν στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και κυττάρου-κυττάρου [12].

Οι ιντεγκρίνες είναι μία οικογένεια ετεροδιμερών διαμεμβρανικών γλυκοπρωτεϊνών, μη οποιοπολικά συνδεδεμένων, οι οποίες αποτελούνται από διαφορετικούς συνδυασμούς των υπομονάδων α και β . Οι περισσότερες ιντεγκρίνες εκφράζονται σε ποικιλία κυττάρων. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της εξωκυττάριας OPN και των ιντεγκρινών επιφανείας, έχουν αναγνωρισθεί σε μερικά κύτταρα του ανοσοποιητικού, όπως ουδετερόφιλα, μακροφάγα και T λεμφοκύτταρα [6].

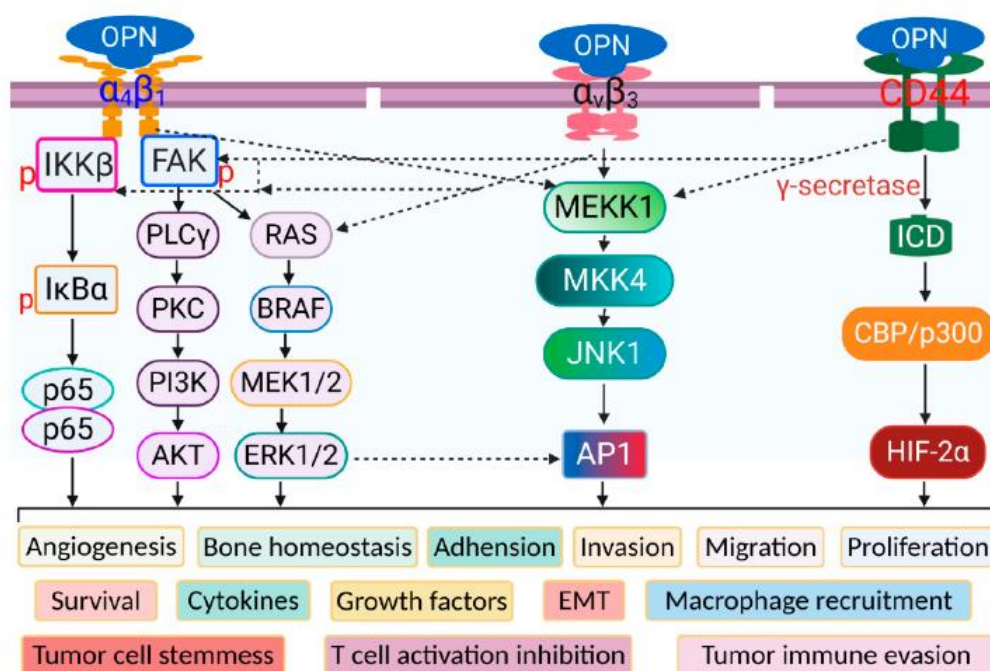
Υπάρχουν δύο επικράτειες πρόσδεσης ιντεγκρινών που έχουν ταυτοποιηθεί: η RGD και η SVVYGLR στο N-τερματικό άκρο της OPN. Η RGD αλληλουχία αλληλεπιδρά με επτά ισομορφές ιντεγκρινών ($\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_8\beta_1$ και $\alpha_5\beta_1$), ενώ η SVVYGLR αλληλεπιδρά με τις ιντεγκρίνες $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_9\beta_4$ και $\alpha_4\beta_7$, οι οποίες είναι παρούσες στην επιφάνεια ανοσοκυττάρων, όπως των T κυττάρων, των ουδετερόφιλων, των μακροφάγων και των μαστοκυττάρων. Ο καλύτερα μελετημένος υποδοχέας της OPN είναι η ιντεγκρίνη $\alpha_v\beta_3$ (υποδοχέας βιτρονεκτίνης). Ο υποδοχέας αυτός ρυθμίζει την προσκόλληση στην OPN των B κυττάρων, των αιμοπεταλίων, των οστεοκλαστών και των λείων μυικών κυττάρων. Ως απόρροια των παραπάνω, η OPN ανήκει στις όξινες πρωτεΐνες των γενετικά σχετιζόμενων SIBLINGs πρωτεϊνών (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins), μίας ομάδας εκκρινόμενων πρωτεϊνών, τα γονίδια των οποίων συσσωρεύονται κατά μήκος μίας περιοχής 600 kb του χρωμοσώματος 4 [7,11].

Εκτός των ιντεγκρινών, η OPN αλληλεπιδρά και με το CD44, μέσω πολλών περιοχών του καρβοξυτελικού της άκρου. Το επιφανειακό μόριο CD44 είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη της οικογένειας των υαλουρονικών υποδοχέων. Εκφράζεται ευρέως από τους περισσότερους κυτταρικούς τύπους και από καρκινικά κύτταρα, ενώ υπάρχουν πολλές διαφορετικές ισομορφές του μορίου, αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος, οι οποίες ονομάζονται ως CD44v6-15 [14].

Το CD44 δρα ως μόριο προσκόλλησης, το οποίο ρυθμίζει τη σύνδεση και την εγκατάσταση των λευκοκυττάρων στα περιφερικά λεμφικά όργανα και σε περιοχές φλεγμονής καθώς επίσης και των καρκινικών κυττάρων διάφορων όγκων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αλληλεπίδραση OPN και CD44, μεσολαβεί στη χημειοταξία των μακροφάγων και τη ρύθμιση των T βοηθητικών κυττάρων τύπου 1 και των κυττάρων του μυελού των οστών.

Η πρόσδεση της OPN σε ιντεγκρίνες και το CD44, επιδρά σε πολλά σηματοδοτικά γεγονότα, όπως της ρύθμισης των Akt, Raf/MEK/ERK, ILK/PIEK/GSK-3 β και RAN GTPase/c-Met/PIEK σηματοδοτικών μονοπατιών, επάγοντας λειτουργίες όπως η κυτταρική μετανάστευση, η διαφοροποίηση, η μείωση της απόπτωσης κ.ά.

Για παράδειγμα, μέσω του PI3K/AKT μονοπατιού, πραγματοποιείται η μεσολαβούμενη από τον NF-κΒ αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης [7,10]. Επιπλέον, μέσω του μονοπατιού Ras/Raf/MEK/ERK και της επακόλουθης ενεργοποίησης των AP-1, Ura και MMPs, η πρόσδεση της OPN με ιντεγκρίνες προσδίδει ένα μεταστατικό φαινότυπο σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα. Τέλος, η αλληλεπίδραση της OPN με συγκεκριμένες ιντεγκρίνες, προωθεί την αγγειογένεση, μέσω του VEGF και της ενισχυμένης μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων [9,10]. Ο αποκλεισμός της πρόσδεσης της OPN με αυτούς τους υποδοχείς αποτελεί πεδίο εκτεταμένης έρευνας [14].



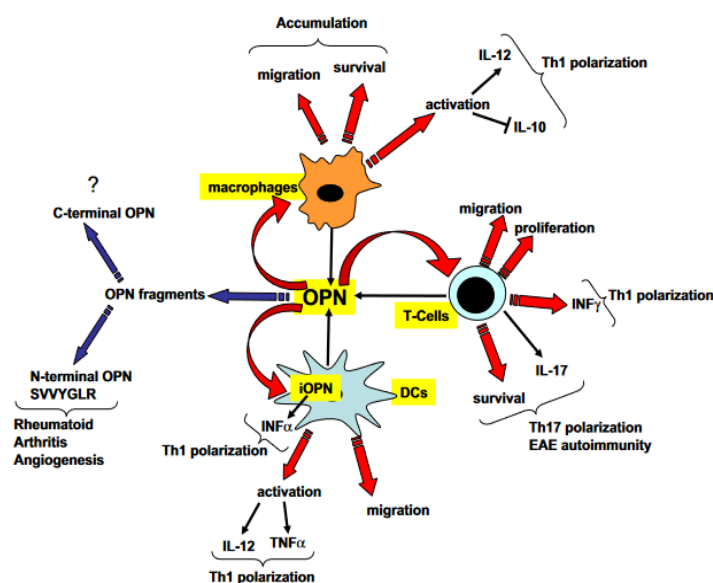
Εικόνα 7: Υποδοχείς της OPN και τα σηματοδοτικά τους μονοπάτια. Οι τρεις κύριες επικράτειες πρόσδεσης υποδοχέων προσδένονται στους αντίστοιχους υποδοχείς τους και ενεργοποιούν διακριτά και επικαλυπτόμενα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία ρυθμίζουν κυτταρικές διεργασίες, κάτω από φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος. *Osteopontin: A Key Regulator of Tumour Progression and Immunomodulation*, 2020).

1.2.7. Λειτουργίες της OPN

Το ευρύ προφίλ έκφρασής της OPN, καθώς και η παρουσία πολλών ισομορφών και λειτουργικών θραυσμάτων της, αντικατοπτρίζουν τον πολυσύνθετο λειτουργικό ρόλο που επιδεικνύει, σε πολλές βιολογικές καταστάσεις, τόσο φυσιολογικές όσο και παθολογικές.

Φυσιολογικά, ως μία σημαντική πρωτεΐνη της οστικής θεμέλιας ουσίας, η OPN συμμετέχει ενεργά στην οστική ομοιόσταση, επιδιόρθωση και οστική απορρόφηση, αναστέλλοντας την εναπόθεση ασβεστίου και το σχηματισμό κρυστάλων υδροξυαπατίτη και ενισχύοντας τη δράση των οστεοκλαστών, μεσολαβώντας στην προσκόλλησή τους στο απορροφόμενο οστό, μέσω της $\alpha\beta_3$ ιντεγκρίνης [4,6]. Έρευνες έχουν δείξει ότι OPN-/- μύες εμφανίζουν διαταραγμένη οστική απορρόφηση και πιο εύθραυστα οστά, συγκριτικά με τους αγρίου τύπου.

Επιπλέον, ερευνητικά δεδομένα έχουν αναγνωρίσει έναν εναλλακτικό ρόλο της OPN, ως κυτοκίνη-κλειδί στη ρύθμιση της επιδιόρθωσης της ιστικής βλάβης, της επούλωσης πληγών, αλλά και των ανοσολογικών και φλεγμονωδών αποκρίσεων. Η OPN εκφράζεται από πολλά είδη κυττάρων του ανοσοποιητικού και ρυθμίζει τόσο το έμφυτο όσο και το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα, προωθώντας μία κυτταρομεσολαβούμενη ανοσολογική απόκριση, μέσω της παραγωγής κυτοκινών και της διακίνησης μακροφάγων και άλλων κυττάρων. Για παράδειγμα, υπό φυσιολογικές συνθήκες, η OPN ρυθμίζει την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή έναντι της λοίμωξης, μέσω ενίσχυσης της Th1 και Th17 πόλωσης [13]. Η OPN μπορεί να πυροδοτήσει τη συσσώρευση των μακροφάγων, προωθώντας τη μετανάστευση και την επιβίωσή τους. Επιπλέον, προκαλεί την έκφραση IL-12 και αναστέλλει την IL-10, διαδίδοντας την Th1 απόκριση. Στα δένδριτικά κύτταρα, η OPN εμφανίζεται να ρυθμίζει την λειτουργία τους, ως εξωκυτταρική διαλυτή κυτοκίνη αλλά και ως ένα ενδοκυτταρικό μόριο (iOPN). Και οι δύο μορφές φαίνονται να προκαλούν την έκφραση της IL-12 και του TNF- α , ενώ η iOPN εμφανίζεται να ρυθμίζει την παραγωγή της INF- α . Επιπλέον, στα δένδριτικά καταστέλλεται η έκφραση της IL-27. Στα T κύτταρα, η OPN προωθεί τη μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση και την έκκριση της IL-17, ενισχύοντας την Th17 πόλωση. Επιπλέον, η OPN φαίνεται να προκαλεί την έκκριση IFN- γ από τα T κύτταρα, προωθώντας μία Th1 απόκριση [13,14].



Εικόνα 8: Η παραγωγή των Th1 και Th17 ρυθμίζεται από την OPN. (Επεξήγηση στο κείμενο)(The role of osteopontin in inflammatory processes, 2009)

Η OPN, δεν είναι σημαντική μόνο σε φυσιολογικές βιολογικές λειτουργίες, αλλά έχει συσχετιστεί και με πολλές ασθένειες, όπως η αθηροσκλήρωση, τα καρδιαγγειακά και αυτοάνοσα νοσήματα, η χρόνια φλεγμονή, ο διαβήτης, η νεφρολιθίαση και η ίνωση του ήπατος [7,9]. Υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η OPN φαίνεται να δρα στη φλεγμονώδη φάση αυτών των παθολογικών διαδικασιών, ρυθμίζοντας τη στρατολόγηση και τη διήθηση των μακροφάγων και των T κυττάρων στα σημεία της φλεγμονής [4,16,17]. Τέλος, όπως περιγράφεται παρακάτω, έχειδειχθεί ότι η OPN εμπλέκεται στην καρκινογένεση, με πολυλειτουργικές δράσεις. Αν και ο ακριβής ρόλος της OPN in vivo παραμένει ασαφής, μελέτες σε μύες με έλλειψη του γονιδίου της, θα παρέχουν περαιτέρω γνώση πάνω στον παθοφυσιολογικό της ρόλο [10].

1.2.8. OPN και καρκίνος

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, η OPN έχει αναγνωρισθεί ως ένας σημαντικός παράγοντας στη βιολογία του καρκίνου, καθώς τόσο απο πειραματικές όσο και κλινικές μελέτες, φαίνεται να συμμετέχει στην ογκογένεση, την εξέλιξη και την μετάσταση του όγκου, ρυθμίζοντας ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Πολλά ερευνητικά δεδομένα έχουν δείξει τη συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης ή/και της παρεκκλίνουσας έκφρασής της και της προώθησης ποικίλων κακοηθειών, όπως του μαστού και του προστάτη, του οστεοσαρκώματος, του μελανώματος, των καρκίνων του πνεύμονα και του παχέος εντέρου κ.ά. [11]. Πράγματι, τα επίπεδα της, έχουν βρεθεί ιδιαίτερα υψηλά σε πολλούς ανθρώπινους όγκους, τόσο από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα όσο και από τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι οι ανοσολογικές ρυθμιστικές λειτουργίες της OPN έχουν αποδειχθεί σε ποικίλες φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες παθήσεις, η εμπλοκή της και ο μηχανισμός δράσης της στο καρκινικό μικροπεριβάλλον είναι ακόμη μόνο μερικώς κατανοητός [13].

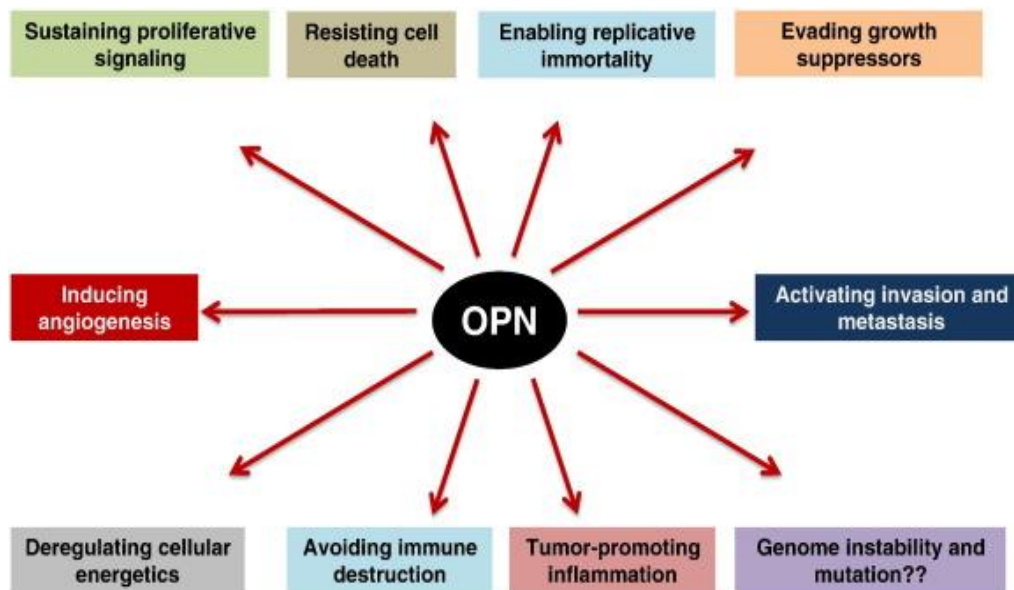
Πολλά είναι τα διαφορετικά γεγονότα τα οποία προκαλούν εκτροχιασμό της περίπλοκης κυτταρικής ρύθμισης της OPN, όπως η αύξηση της ρύθμισης της μεταγραφής μέσω πολυμορφισμών στον υποκινητή, η μη φυσιολογική ενεργοποίηση, η έλλειψη κατασταλτικής λειτουργίας και η παρεκκλίνουσα επιγενετική ρύθμιση. Πρόσφατες μελέτες εστιάζουν στη συμβολή της OPN στην κακοήθεια των καρκίνων, η οποία φαίνεται να εμπλέκεται σε διαδικασίες όπως η ενεργοποίηση αντι-αποπτωτικών μονοπατιών, μονοπατιών κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επιβίωσης, η αύξηση της κινητικότητας, η διατήρηση ενός φαινοτύπου βλαστικού κυττάρου, η μετάβαση από την επιθηλιακή στη μεσεγχυματική κατάσταση (EMT), η αγγειογένεση, η αποικοδόμηση της ECM, η κυτταρική προσκόλληση, η διήθηση και τελικά η μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και η αντίσταση στη χημειοθεραπεία και την ακτινοβολία [7]. Επίσης, νέα δεδομένα υπογραμμίζουν τη συμμετοχή της OPN στην ανοσολογική απόκριση στον καρκίνο και τη ρύθμιση της ανοσοδιαφυγής. Γενικά, οι προ-καρκινικές και προ-μεταστατικές λειτουργίες της OPN, έχουν δείχθει τόσο σε ζωικά μοντέλα όσο και σε ασθενείς [12].

Οι διαφορετικές παραλλαγές της OPN ίσως παίζουν διαφορετικούς ρόλους στην εξέλιξη του καρκίνου, ενώ τα επίπεδα έκφρασης των ισομορφών διαφέρουν σε διαφορετικούς όγκους. Για παράδειγμα, η OPN-c ασκεί μεγάλη επίδραση στον

καρκίνο του προστάτη και υποστηρίζει τη διηθητικότητα στον καρκίνο του μαστού, ενώ οι OPN-a και -b, προωθούν τη μετανάστευση στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Τα μοτίβα έκφρασης και οι λειτουργίες των ισομορφών της OPN, φαίνονται να είναι ογκο-ειδικά, και σε κάποιες περιπτώσεις, κλινικά σχετικά. Από την άλλη, σε πολλές περιπτώσεις, οι διαφορετικές ισομορφές της OPN, ενδέχεται να επηρεάζουν συλλογικά το φαινότυπο, αλλά λογικά με διάκριτους σηματοδοτικούς μηχανισμούς.

Εκτός από τον καρκινικό ιστό και τα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, αυξημένα επίπεδα της OPN έχουν εντοπισθεί στο περιφερικό αίμα των ασθενών, σε διάφορους καρκινικούς τύπους. Το γεγονός αυτό έχει συσχετιστεί με το στάδιο και την επιθετικότητα του όγκου, δηλαδή την πιθανότητα υποτροπής και μεταστατικής του ικανότητας. Πολλές μελέτες υποδηλώνουν ότι η αυξημένη έκφραση της OPN στον όγκο, ανεξάρτητα από την πηγή της, οδηγεί σε ενισχυμένη αύξηση του όγκου και σε μετάσταση, και κατ' επέκταση σε κακή πρόγνωση, μειωμένη συνολική επιβίωση και επιβίωση ελευθέρας νόσου. Για παράδειγμα, αυξημένα επίπεδα OPN έχουν συσχετισθεί με προχωρημένο στάδιο, βαθμό, μέγεθος όγκου και αυξημένο κίνδυνο θανάτου σε ασθενείς με μελάνωμα [7].

Συνεπώς, η OPN μπορεί να αποτελέσει μελλοντικά πολύτιμο προγνωστικό και διαγνωστικό βιοδείκτη για πολλούς τύπους καρκίνου, αφού τα εκκρινόμενα επίπεδα της μπορούν να υπολογισθούν με λιγότερο επεμβατικούς τρόπους, όπως με μία αιμοληψία. Ωστόσο, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως καθολικός δείκτης, καθώς πυροδοτείται τόσο από το στρες όσο και τη φλεγμονή και έχει περιορισμένη ειδικότητα (η έκφρασή της αυξάνεται σε περίπου 30 τύπους καρκίνου). Η δυνατότητα συνδυασμού της με άλλους παραδοσιακούς βιοδείκτες, μπορεί να παρέχει πιο ακριβείς προβλέψεις για την πρόγνωση, τα επίπεδα επιβίωσης και την πιθανή απόκριση σε θεραπείες, σε σύγκριση με μεμονωμένα μόρια. Από την άλλη, η πλήρης κατανόηση της ρύθμισης της έκφρασής της αλλά και των μοριακών μηχανισμών δράσης της, στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου, ίσως συμβάλλει στην ανάπτυξη καινοτόμων θεραπευτικών εφαρμογών, καθιστώντας την πιθανό στόχο στόχευσης σε μεταγραφικό ή πρωτεϊνικό επίπεδο. Παρ' όλα αυτά, απαιτείται περισσότερη έρευνα και κλινικές δοκιμές για το σκοπό αυτό [7,9].



Εικόνα 9: Ο ρόλος της OPN στα πολλαπλά στάδια της ογκογένεσης και της μετάστασης. (Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer, 2014)

1.3. Μικροπεριβάλλον του όγκου

Ένας όγκος αποτελείται από γενετικά τροποποιημένα καρκινικά κύτταρα, διεσπαρμένα σε ένα στρώμα, το οποίο σχηματίζεται από μια ποικιλία φυσιολογικών κυττάρων, όπως ινοβλάστες, ανοσοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα κ.ά., και την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Η ECM, στο μικροπεριβάλλον ενός όγκου, παράγεται και από τα φυσιολογικά κύτταρα του ξενιστή, αλλά και από τα καρκινικά κύτταρα, και αποτελείται από δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες, αυτές της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (matricellular proteins). Μία τέτοια πρωτεΐνη αποτελεί και η OPN. Όλα τα παραπάνω στοιχεία συνιστούν το μικροπεριβάλλον του όγκου (TME).

Ενώ οι γενετικές και οι επιγενετικές αλλαγές στα κακοήγη κύτταρα έχουν μελετηθεί εκτενώς κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος του όγκου έχει παραβλεφθεί σε μεγάλο βαθμό. Έχει προταθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα δεν δρουν μόνα, αλλά σε στενή αλληλεπίδραση με την ECM και τα κύτταρα του στρώματος. Η αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ των καρκινικών

κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντος, επηρεάζει ισχυρά την έναρξη και την πρόοδο της ασθένειας, καθώς και την πρόγνωση του ασθενή. Το τοπικό μικροπεριβάλλον (niche), συμμετέχει ενεργά στην ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου, η οποία συμβάλλει στην έναρξη της μεταστατικής διαδικασίας και τη διάδοση των καρκινικών κυττάρων στις προ-μεταστατικές θέσεις άλλων οργάνων, αν και η δυναμική αυτή διαδικασία της διάδοσης και αύξησης των καρκινικών κυττάρων στις νέες θέσεις, παραμένει ασαφής. Από την άλλη, όπως θα περιγραφεί παρακάτω, και η παρουσία του όγκου οδηγεί σε αλλαγές στα κύτταρα του στρώματος, όπως η στρατολόγηση λευκοκυττάρων, ενδοθηλιακών κυττάρων και μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων [11,12].

1.4. OPN στο μικροπεριβάλλον του όγκου

Η OPN συντίθεται σε ποικίλες μορφές από πολλούς κυτταρικούς τύπους που είναι παρόντες στο μικροπεριβάλλον του όγκου, όπως τα μακροφάγα και τα κύτταρα του στρώματος, συμπεριλαμβανομένου και του ίδιου του όγκου. Επιπροσθέτως, και τα καρκινικά και τα φυσιολογικά κύτταρα, έχουν υποδοχείς ικανούς να προσδένουν την sOPN. Έτσι, εξαιτίας των αυτοκρινών και παρακρινών δράσεων της, η OPN φαίνεται να είναι κρίσιμος παράγοντας της κυτταρικής διασταυρούμενης επικοινωνίας στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Επιπλέον, σε μερικούς τύπους καρκίνου μπορεί να βρίσκεται ως συστατικό της ECM. Το γεγονός της ποικιλόμορφης κατανομής της, καθιστά περίπλοκες τις λειτουργικές δραστηριότητές της. Η OPN μπορεί να έχει είτε προ-καρκινικές είτε αντι-καρκινικές επιδράσεις, αναλόγως τον κυτταρικό τύπο και το καρκινικό μικροπεριβάλλον. Η καρκινική και η OPN του ξενιστή, ίσως αμοιβαία επηρεάζουν η μία την άλλη και η αλληλεπίδραση μεταξύ όγκου και μικροπεριβάλλοντος ίσως τελικά καθορίζει αν η συνολική επίδραση της OPN θα είναι προωθητική ή ανασταλτική του όγκου.

Η καρκινική OPN έχει σημαντικό ρόλο σε όλα τα στάδια της μεταστατικής διαδικασίας. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι τα καρκινικά κύτταρα αλλά και τα στρωματικά, εκκρίνουν διαλυτές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της OPN, ώστε να συμβάλλουν στην εξέλιξη του όγκου, την αγγειογένεση και να προετοιμάσουν τη μεταστατική θέση. Η OPN συμμετέχει στον αναπρογραμματισμό των φυσιολογικών

ινοβλαστών του ιστού στους σχετιζόμενους με τον όγκο ινοβλάστες (CAFs), οι οποίοι μέσω έκφρασης του TGF-β1 συμβάλλουν στην EMT, ώστε να επιτρέπεται στα καρκινικά κύτταρα να αποσπώνται από την πρωτοπαθή μάζα και να διαδίδονται στις προ-μεταστατικές θέσεις. Οι CAFs εκκρίνουν επίσης παράγοντες αύξησης του όγκου, όπως EGF και IL-6, καθώς και πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας και παράγοντες ρύθμισης της αγγειογένεσης, όπως π.χ. τον VEGF, ώστε να δημιουργήσουν ένα κατάλληλο προ-μεταστατικό μικροπεριβάλλον. Επίσης, φαίνεται ότι συμμετέχει και στην πολυφαρμακευτική αντίσταση, λόγω της EMT και της έκφρασης μεσεγχυματικών δεικτών, βασική αιτία της αποτυχίας της χημειοθεραπείας [20].

1.4.1. Επίδραση της OPN στην ανοσολογική αντίδραση στο μικροπεριβάλλον του όγκου

Η καρκινική OPN συμμετέχει στην ανοσολογική απόκριση στο μικροπεριβάλλον του όγκου και ρυθμίζει την ανοσοδιαφυγή, αφού αρκετά πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι φαίνεται να ρυθμίζει τη λειτουργία των μακροφάγων και των T κυττάρων [13,21]. Αρχικά, η καρκινική OPN υποστηρίζει την αυξημένη επιβίωση και αύξηση των καρκινικών κυττάρων, παρεμποδίζοντας την κυτταροτοξικότητα των μακροφάγων έναντι του όγκου. Η ιδιότητα αυτή σχετίζεται με το μετασχηματισμό από την OPN των M1 αντικαρκινικών μακροφάγων στα σχετιζόμενα με τον όγκο μακροφάγα (TAMs). Κατά τη διάρκεια των πρώιμων σταδίων της ανάπτυξης, τα TAMs φαίνεται να αποκτούν τον κλασικό ενεργοποιημένο M1 φαινότυπο, εκκρίνοντας προφλεγμονώδη μόρια, όπως IL-1, IL-6, TNF-α, IL-23 και iNOS, τα οποία εμπλέκονται στην έναρξη της νόσου. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου, μόρια τα οποία παράγονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού και τα καρκινικά κύτταρα, όπως η IL-4, CSF1 και TGF-β, συμβάλλουν στην μετατροπή των TAMs στον εναλλακτικό M2 φαινότυπο, ο οποίος παράγει αντιφλεγμονώδη και προ-αγγειογενετικά μόρια, όπως IL-10, αργινάση 1, TGF-β και VEGF, αλλά και πρωτεάσες, που προωθούν την αποσύνθεση της ECM, υποστηρίζοντας την καρκινική αύξηση, την αγγειογένεση, την ανοσοκαταστολή και τη μετάσταση [11]. Για παράδειγμα, έχειδειχθεί ότι τα ενεργοποιημένα από την OPN μακροφάγα, προωθούν την αγγειογένεση και τη μετανάστευση καρκινικών κυττάρων

στο μελάνωμα, με έναν εξαρτώμενο από τη COX-2 τρόπο. Τέλος, η OPN μειώνει την παραγωγή της επαγόμενης συνθάσης νιτρικού οξειδίου από τα μακροφάγα, με αποτέλεσμα την μείωση της κυτταροτοξικής τους δράση και την αναστολή του θανάτου των καρκινικών κυττάρων. Τα TAMs είναι ο κυρίαρχος τύπος κυττάρων του στρώματος στον όγκο. Υψηλά επίπεδά τους συσχετίζονται συχνά με προχωρημένο στάδιο και κακή έκβαση της νόσου. Επιπλέον, και τα TAMs παράγουν OPN (τα καρκινικά κύτταρα αυξάνουν την παραγωγή OPN στα TAMs) μέσα στο καρκινικό μικροπεριβάλλον, η οποία συνεισφέρει στην εξέλιξη του καρκίνου. Η OPN η προερχόμενη από τον ξενιστή, μπορεί να προσελκύσει TAMs στη θέση του όγκου, μέσω χημειοταξίας. Σε μοντέλο μελανώματος μυός, ο Kale και οι συνεργάτες του έδειξε ότι η διείσδυση των TAMs στη θέση του όγκου, όπως και η αύξηση του όγκου και η αγγειογένεση, μειώθηκαν σημαντικά σε OPN-/- μύες, συγκριτικά με OPN +/-.

Επιπλέον, η OPN φαίνεται να καταστέλλει τη δραστηριότητα των T κυττάρων στα καρκινικά μικροπεριβάλλον. Σε καλλιέργεια μακροφάγων μαζί με καρκινική σειρά γλοιώματος, παρατηρήθηκε μείωση στη δραστηριότητα των CD4⁺ Th κυττάρων, η οποία αποκαταστάθηκε με την αναστολή της OPN [21]. Η OPN ρυθμίζει επίσης την έκφραση του PD-L1 στα μακροφάγα, συνεισφέροντας περαιτέρω στην ανοσοκαταστολή του όγκου. Για παράδειγμα, σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, η αναστολή του PD-L1 είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερη διήθηση CD8⁺ Tc κυττάρων στον όγκο. Η υψηλή έκφραση του είτε στα καρκινικά κύτταρα είτε στα μακροφάγα, επιτρέπει την ανοσοδιαφυγή, μέσω ανοσοκατασταλτικών αλληλεπιδράσεων με ογκο-ειδικά T κύτταρα. Επιπλέον, η έκφραση του PD-L1, μπορεί να προωθήσει τον ανοσοκατασταλτικό M2 φαινότυπο στα μακροφάγα. Συνεπώς, η OPN δρα επίσης ως ένα σημείο ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, ώστε να ρυθμίζει αρνητικά τη δραστηριότητα των T κυττάρων.

Πολλά νέα δεδομένα συνηγορούν στο ότι η διήθηση των Tregs στον όγκο, σχετίζεται με κακή πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο, καθώς όπως προαναφέρθηκε, διατηρούν την ανοσολογική ανοχή και προλαμβάνουν τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, καταστέλλοντας την κυτταροτοξική δραστηριότητα των T κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό των δραστικών T κυττάρων. Πράγματι, μείωση των Tregs καταστέλλει την εξέλιξη του όγκου σε μοντέλα με καρκίνο του μαστού, λευχαιμία, καρκίνο του πνεύμονα κ.ά. επιπλέον η διήθησή τους στον πρωτοπαθή όγκο, έχει προταθεί να προωθεί το μεταστατικό δυναμικό [20].

Η OPN μπορεί να έχει αντικαρκινική δραστηριότητα, εξαιτίας της ικανότητάς της να ενεργοποιεί NK T κύτταρα τύπου I και να αναστέλλει την απόπτωσή τους, μέσω σύνδεσης και ενεργοποίησης του CD44 υποδοχέα. Τα παραπάνω συνηγορούν στο ότι η OPN μπορεί είτε να αναστέλλει είτε να προάγει τις λειτουργίες των

λευκοκυττάρων, και ότι η ισορροπία μεταξύ των ενεργοποιημένων από αυτή μακροφάγων και της απόκρισης των NK T τύπου I κυττάρων, καθορίζει εάν η συνολική επίδραση της φλεγμονώδους απόκρισης θα είναι προωθητική ανασταλτική του όγκου [11,20].

1.5. Μελάνωμα και OPN

Το μελάνωμα είναι μία κακοήθης επιθετική μορφή καρκίνου του δέρματος, και αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως, συγκριτικά με άλλους δερματικούς όγκους. Περισσότερο από άλλους όγκους, το μελάνωμα εμφανίζει μία ανοσορυθμιστική συμπεριφορά, κάτι το οποίο σημαίνει ότι ολόκληρη η προ-κλινική και κλινική του εξέλιξη ελέγχεται από το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενούς. Τα κύτταρα του μελανώματος εμφανίζουν πολλά αντιγόνα και πεπτιδικούς επιτόπους, οι οποίοι βοηθούν το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή να ανταποκριθεί, είτε ορολογικά είτε μέσω κυτταρομεσολαβούμενους μηχανισμούς. Κατά την έναρξη του σχηματισμού του μελανώματος, πυροδοτείται ο μηχανισμός άμυνας του ασθενούς, όπου λεμφοκύτταρα, ιστιοκύτταρα και μακροφάγα (τα λεγόμενα TILs) κινητοποιούνται στο σημείο, οδηγώντας στο σχηματισμό μίας φλεγμονώδους διήθησης. Αυτή η διαδικασία αποτελεί την πρώτη απόπειρα του ανοσοποιητικού συστήματος να περιορίσει την εξάπλωση των άτυπων μελανοκυττάρων. Ωστόσο, κάποια κύτταρα καταφέρνουν να επιβιώσουν και να εξωπλωθούν στη δερμίδα και την υποδερμίδα, προκαλώντας τη μεταστατική εξέλιξη της νεοπλασίας.

Πολλά ερευνητικά δεδομένα έχουν υπογραμμίσει την επίδραση της έκφρασης της OPN στην εξέλιξη του μελανώματος. Μεμονωμένες βιοψίες μελανώματος που ελήφθησαν από διαφορετικά στάδια, έχουν δείξει ότι η έκφραση της OPN αποκτάται πρωτίστως στο στάδιο της εισβολής του μελανώματος στους ιστούς. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση της OPN σε μεταστατικά μελανώματα, σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς, ενώ η παρεμπόδιση της έκφρασής της με αποσιώπηση RNA, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση στον αριθμό των κυττάρων μελανώματος, καθώς και στην διηθητική τους ικανότητα, *in vitro*. Ένας συγκεκριμένος πολυμορφισμός μονού νουκλεοτιδίου (SNP), ο -443T/C, στον υποκινητή του γονιδίου της OPN, έχει φανεί να επηρεάζει την έκφρασή του στα κύτταρα μελανώματος. Επιπλέον, έχει ανιχνευθεί η

παρουσία της OPN στο πλάσμα ασθενών με προχωρημένο μεταστατικό μελάνωμα. Η έκφραση της OPN πιθανόν να αποτελεί προγνωστικό βιοδείκτη για μετάσταση στους λεμφαδένες, και τα αυξημένα επίπεδά της στον ορό, συσχετίστηκαν με μετάσταση στο ήπαρ. Ένας μηχανισμός με τον οποίο η OPN μπορεί να προάγει τη μετάσταση στο μελάνωμα είναι μέσω της ενεργοποίησης της MMP-2, αλλά και της μεμβράνης τύπου 1 (MT1) MMP, μίας πρωτεΐνης που ενεργοποιεί την pro-MMP-2 σε MMP-2, μέσω του NF-κΒ. Προγνωστικά, υψηλά επίπεδα της έκφρασης της OPN, σχετίζονται με μειωμένη επιβίωση χωρίς υποτροπή και επιβίωση ειδική για τη νόσο. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι τα μακροφάγα που εκφράζουν OPN, συμβάλλουν στην ανάπτυξη μελανώματος και στην αγγειογένεση, μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού ERK/p38, οδηγώντας στην παραγωγή των μορίων COX-2 και PGE-2. Η παρεμβολή RNA (π.χ. siRNA) και/ή η καταστολή της έκφρασης της OPN στα κύτταρα μελανώματος, μειώνει τον αριθμό των κυττάρων και την ικανότητα διήθησης [22,23].

1.6. Σκοπός της εργασίας

Η OPN είναι μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη, της οποίας οι δράσεις έχουν μελετηθεί εκτενώς στα πλαίσια τόσο φυσιολογικών όσο και παθολογικών καταστάσεων. Η έκφραση της OPN έχει βρεθεί να είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε ανθρώπινους καρκίνους και να συμμετέχει σε πολλά στάδια της ογκογένεσης και της μεταστατικής διαδικασίας. Από την άλλη, η OPN έχει αποδειχθεί σημαντικό συστατικό του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς ρυθμίζει τόσο τις έμφυτες όσο και τις προσαρμοστικές ανοσοαποκρίσεις. Επίσης, αν και οι ανοσορυθμιστικές λειτουργίες της OPN έχουν μελετηθεί σε ποικίλα μοντέλα φλεγμονωδών και αυτοάνοσων ασθενειών, η εμπλοκή της στο καρκινικό μικροπεριβάλλον είναι ακόμη μερικώς κατανοητή. Νέα δεδομένα υποδεικνύουν τον πιθανό ρόλο της OPN στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη του ρόλου της OPN στην ανοσολογική αντίδραση στο μικροπεριβάλλον του όγκου, σε μοντέλο μελανώματος. Σε προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου μας, δείχθηκε ότι τα B16F10 κύτταρα μελανώματος εκφράζουν OPN σε *in vitro* καλλιέργειες, και ότι η εξουδετέρωση της καρκινικής OPN σε καλλιέργεια Foxp3+/B16F10 κυττάρων, μειώνει την κατασταλτική δράση των Tregs. Επομένως, για την επιβεβαίωση αυτών των ευρημάτων *in vivo*,

χρησιμοποιήθηκε ένα επαγόμενο σύστημα μείωσης της έκφρασης της OPN σε κύτταρα B16F10, καθώς και μείωσης της έκκρισης της στο καρκινικό μικροπεριβάλλον σε μοντέλο μελανώματος σε μυ, με σκοπό την παρακολούθηση της ανάπτυξης των όγκων και την ανάλυση πληθυσμών του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως των Tregs.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Μύες

Για τα πειράματα , χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη C57BL/6 για Foxp3/GFP, στα οποία έγινε έγχυση της κυτταρικής σειράς μελανώματος B16F10, με στόχο την ανάπτυξη μελανωμάτων. Οι μύες αυτοί εκφράζουν πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη υπό τον έλεγχο του υποκινητή του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3 (forkhead box P3), ο οποίος αποτελεί τον αποτελεσματικότερο δείκτη ανίχνευσης των Tregs. Οι μύες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αρσενικοί, ηλικίας περίπου 8 με 12 εβδομάδων. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σε συμφωνία με τους κανονισμούς της Μονάδας Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

2.2. Η κυτταρική σειρά B16F10

Η κυτταρική σειρά B16F10 είναι ογκογόνα σειρά η οποία χρησιμοποιείται για μοντέλα μελανώματος. Το B16 μελάνωμα προήλθε από ένα αυθόρμητα προκύπτουν μελάνωμα δέρματος, σε ένα C57BL / 6J μυ, το οποίο στη συνέχεια καθιερώθηκε ως μόνιμη κυτταρική σειρά. Τα κύτταρα της συγκεκριμένης καρκινικής σειράς επιβιώνουν μόνο ως προσκολλόμενα (adherent) σε μία κατάλληλη επιφάνεια, όπου πολλαπλασιάζονται σε μία στοιβάδα (monolayer).

2.2.1. Καλλιέργεια B16F10 κυττάρων

Όλες οι διαδικασίες που αφορούσαν στην ανάπτυξη των καλλιιεργειών πραγματοποιήθηκαν σε πλήρως αποστειρωμένο περιβάλλον, στην απαγωγή, προς αποφυγή επιμολύνσεων από αερομεταφερόμενες ουσίες. Ο καθαρισμός της επιφάνειας εργασίας, όλων των αντικειμένων και σκευών, αλλά και των θρεπτικών μέσων και διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, έγιναν με ψέκασμα με διάλυμα 70% αιθανόλης.

Παρασκευή θρεπτικού μέσου

Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε πλήρες θρεπτικό μέσο (complete medium), το οποίο αποτελούνταν από DMEM Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1X, 500 mL), εμπλουτισμένο με ορό FCS (Fetal Calvin Serum) σε τελική συγκέντρωση 10% κατ' όγκο (50 ml) και γλουταμίνη 1% (5 ml), παρουσία των αντιβιοτικών πενικιλίνης και στρεπτομυκίνης (Penicillin, Streptomycin, 1 X), τελικής συγκέντρωσης 1% (5 ml) και 500 μ L μερκαπτοαιθανόλης.

Ο ορός FCS παρέχει τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, ενώ τα προστατεύει από οξειδωτική βλάβη και απόπτωση. Αξίζει να αναφερθεί ότι πριν τη χρήση του ορού στο θρεπτικό μέσο, αυτός απενεργοποιήθηκε με θέρμανση στους 55° C για 30 λεπτά (για αποφυγή ενεργοποίησης του συμπληρώματος ή/και τυχόν ενζύμων, επιβλαβών για τα κύτταρα). Τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη χρησιμοποιούνται με σκοπό την πρόληψη βακτηριακής μόλυνσης των καλλιιεργειών, λόγω της αποτελεσματικής συνδυασμένης δράσης τους έναντι των Gram(+) και Gram(-) βακτηρίων. Το complete medium, μετά την παρασκευή του, διατηρήθηκε σε ψυγείο, σε θερμοκρασία 4° C και ζεσταινόταν σε υδατόλουτρο, στους 37° C, πριν τη χρήση του.

Απόψυξη κυττάρων

Τα καρκινικά κύτταρα ήταν αποθηκευμένα σε cryovials σε καταψύκτη, στους -80°C . Το ξεπάγωμά τους πραγματοποιήθηκε σε σύντομο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα κυτταρικού θανάτου. Αρχικά, 1 ml κυττάρων αναμείχθηκε με 1 ml complete medium και αναδεύθηκε συνεχώς με τη χρήση πιπέτας, έως ότου ξεπαγώσουν εντελώς τα κύτταρα. Στη συνέχεια, το μίγμα μεταφέρθηκε σε falcons των 15 ml, με τουλάχιστον 5πλάσιο όγκο complete medium (εδώ 5 ml συνολικά), και φυγοκεντρήθηκε στις 1200 rpm για 10 λεπτά (ώστε να απομακρυνθεί το DMSO από το freezing medium και τα νεκρά κύτταρα). Η πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml medium, μεταφέρθηκε σε πλαστικό και πλήρως αποστειρωμένο πιάτο καλλιέργειας, το οποίο περιείχε 10 ml medium και τοποθετήθηκε σε επωαστικό κλίβανο με συνθήκες 37°C και 5% CO_2 . Στην επιφάνεια του τρυβλίου σημειωνόταν ο αριθμός των περασμάτων της κάθε κυτταρικής σειράς, η ημερομηνία και οποιαδήποτε άλλη σημαντική πληροφορία.

Πολλαπλασιασμός και ανακαλλιέργεια κυττάρων

Τις επόμενες μέρες, τα πιάτα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί η πυκνότητά των κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των κυττάρων, αυτά φαίνονταν να καταλαμβάνουν ολόκληρη την επιφάνεια των πιάτων. Αν χρειαζόταν, γινόταν αλλαγή στο medium, απομακρύνοντας το παλιό και προσθέτοντας 10 ml καινούριο, ώστε να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα και άλλοι βλαπτικοί παράγοντες. Όταν η καλλιέργεια έφτανε περίπου σε 75-80% και άνω πληρότητα (confluency), ακολουθούσε η ανακαλλιέργεια των κυττάρων, (δηλαδή η μεταφορά τους σε νέο πιάτο), καθώς άρχιζε η αναστολή της ανάπτυξής τους λόγω επαφής με τα γειτονικά κύτταρα. Εξαιτίας του πολλαπλασιασμού τους, παρατηρούνταν στο σημείο αυτό και αλλαγή του χρώματος του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας, από πορτοκαλοκόκκινο σε κίτρινο.

Για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων, αρχικά απομακρύνθηκε το medium και ακολούθησε μία έκπλυση με 10 ml PBS (Phosphate Buffered Saline, 1X, 500 mL). Το PBS είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, το οποίο διατηρεί τη ζωτικότητα των κυττάρων της καλλιέργειας, κρατώντας το pH και την οσμωμοριακότητα σε φυσιολογικά επίπεδα. Ο σκοπός της έκπλυσης ήταν η

απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων ορού, πριν από την επώαση με τρυψίνη, τα οποία ήταν ικανά να αναστείλουν τη δράση της. Για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα τρυψίνης-EDTA (0,25%, 1X) (1 ml), ώστε να καλυφθεί όλη η επιφάνεια του πιάτου, το οποίο τοποθετήθηκε γρήγορα στον κλίβανο, για 5 λεπτά στους 37° C. Το πιάτο παρακολουθούταν διαρκώς για το πότε θα ξεκολλήσουν τα κύτταρα. Η τρυψίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο το οποίο διασπά τις πεπτιδικές αλυσίδες στο καρβοξυτελικό άκρο της λυσίνης και της αργινίνης. Συνεπώς, με τη χρήση της, επιτυγχάνεται η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας.

Στη συνέχεια προστέθηκε medium με δύναμη στην επιφάνεια, σε τελικό όγκο 5 ml, ώστε να ξεκολλήσουν όλα τα κύτταρα από την επιφάνεια και να διαλυθούν τυχόν συσσωματώματα που έχουν δημιουργηθεί. Για να επιβεβαιωθεί ότι όλα τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί, παρακολουθήσαμε με το μάτι. Μία καλή ένδειξη αποτελεί γενικά η θολερότητα του υγρού στο πιάτο, ενώ για μεγαλύτερη βεβαιότητα, ακολουθούσε έλεγχος των κυττάρων με το μικροσκόπιο, όπου αναμενόταν τα κύτταρα να είναι σφαιρικά και να αιωρούνται.

Το περιεχόμενο του τρυβλίου στη συνέχεια μεταφέρθηκε σε falcon των 15 ml και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά σε 1200 rpm, ώστε να απομακρυνθεί η τρυψίνη, να κατακρυσταλλωθούν τα κύτταρα και να κατανεμηθούν πιο ομοιόμορφα στο νέο πιάτο καλλιέργειας. Μετά τη φυγοκέντρωση, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και η πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml complete medium. Μία ποσότητα από το εναιώρημα κυττάρων (συνήθως 1/5-1/10 αναλόγως τον κυτταρικό τύπο και τις ανάγκες του πειράματος, εδώ περίπου 100 μl) μεταφέρθηκε σε νέο πιάτο καλλιέργειας με 10 ml medium, το οποίο επωάστηκε πάλι σε επωαστικό κλίβανο στους 37° C, παρουσία 5% CO₂ και 95% αέρα.

Ψύξη κυττάρων

Τα καρκινικά κύτταρα που δε χρησιμοποιήθηκαν άμεσα, ψύχθηκαν σε ειδικό μέσο (freezing medium) και αποθηκεύτηκαν στους -80° C. Το freezing medium αποτέλεσε διάλυμα FCS και DMSO, η τελική συγκέντρωση του οποίου ήταν 20% (κατ όγκο). Το DMSO είναι ένας εξαιρετικός πολικός και ουσιαστικά απρωτικός διαλύτης (polar aprotic solvent), δηλαδή διίσταται, παρέχοντας πρωτόνια σε απειροελάχιστο βαθμό. Η μεγάλη διπολική ροπή του, το καθιστά ικανό να σχηματίζει συζεύγματα και ενώσεις προσθήκης με πλήθος οργανικών και ανόργανων μορίων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται σαν κρυοπροστατευτικός ή κρυοσυντηρητικός παράγοντας, για τη διατήρηση των κυττάρων. Η χρήση του δεν επιτρέπει το

σχηματισμό κρυστάλλων νερού κατά το πάγωμα, με αποτέλεσμα την προστασία των κυττάρων.

Κατά τη διάρκεια του παγώματος των κυττάρων, αυτά φυγοκεντρήθηκαν στα 1200 rpm για 10 λεπτά, με την πελέτα να επαναδιαλύεται σε 0,5 ml medium. Στη συνέχεια, στο συγκεκριμένο κυτταρικό εναιώρημα προστέθηκε 0,5 ml freezing medium (FCS 80%, DMSO 20 %) και το μίγμα τοποθετήθηκε σε cryovials στους -80° C.

Μέτρηση κυττάρων

Τα κύτταρα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια σε άλλες πειραματικές διαδικασίες, μετρήθηκαν πρώτα με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και χρήση της χρωστικής Trypan blue, η οποία δεν μπορεί να διαπεράσει τη μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων, ώστε να γίνει διάκριση μεταξύ αυτών και των νεκρών κυττάρων. Το αιμοκυτταρόμετρο Neubauer αποτελείται από δύο διαμερίσματα, σε κάθε ένα από τα οποία βρίσκονται χαραγμένα 9 τετράγωνα, το καθένα με πλευρά 1 mm και ύψος 0.1mm. 10 μl εναιωρήματος κυττάρων αναμείχθηκαν με 90μl PBS σε ένα erpendorf, από όπου πάρθηκαν 10 μl και αναμείχθηκαν με 10 μl χρωστικής. Από αυτό το μίγμα τοποθετήθηκαν 10 μl στη μία πλευρά του αιμοκυτταρομέτρου και ακολούθησε η μέτρηση σε 4 τετράγωνα με 40X φακό, όπου και υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους. Τα ζωντανά κύτταρα εμφανίστηκαν «φωτεινά» και τα νεκρά βάφτηκαν μπλε. Έπειτα, ακολούθησε η αναγωγή στο αρχικό δείγμα, με τον τύπο :

$$\text{Αριθμός κυττάρων} = n \cdot 2 \cdot V \cdot 10^4$$

όπου n ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν και V, ο όγκος σε ml που βρίσκονταν τα κύτταρα.

2.3. Στρατηγική κατασκευής shRNA για την OPN

Η κατασκευή shRNA, αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για σταθερή μείωση της έκφρασης ενός γονιδίου (knock down). Για τη μεταφορά των shRNA, μπορούν να χρησιμοποιηθούν λεντοιοί (lentiviral vectors), παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα να μολύνουν τους περισσότερους κυτταρικούς τύπους θηλαστικών με μεγάλη αποτελεσματικότητα, ανεξαρτήτως το στάδιο πολλαπλασιασμού [24].

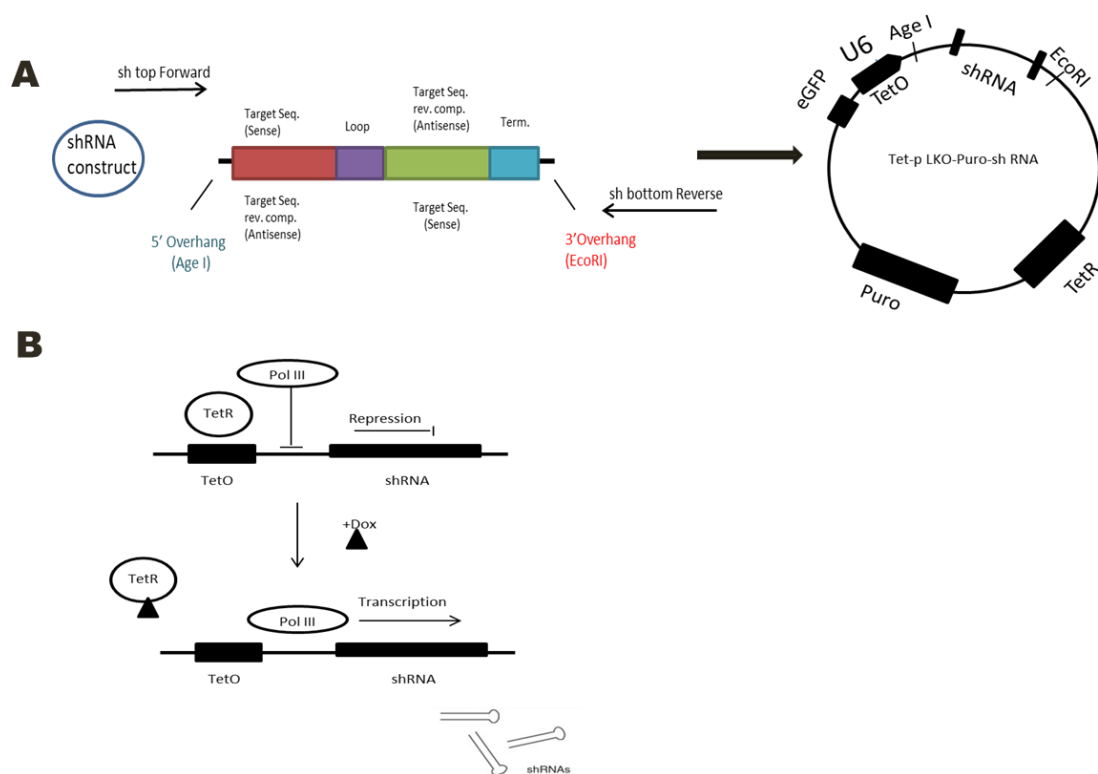
Για την κατασκευή τους, επιλέχθηκαν 3 αλληλουχίες-στόχοι του γονιδίου της OPN στον μυ, οι οποίες εμφάνιζαν το υψηλότερο σκορ σε κατάλληλο selection tool. Η γενική δομή των ολιγονουκλεοτιδίων, περιλάμβανε: τη 5' θέση για το περιοριστικό ένζυμο Age I, τη νοηματική αλληλουχία, την αλληλουχία-θηλιά, την αντι-νοηματική αλληλουχία και την αλληλουχία τερματισμού της μεταγραφής (top forward). Η bottom reverse αλληλουχία ήταν αντιστρόφως συμπληρωματική της πρώτης. Οι αλληλουχίες οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

		sense	antisense
shRNA oligos	a.	5'-CCGGGAGGTCAAAGTCTAGGAGTTTCATGGAACTCCTAGACTTTGACCTCTTTTG CTCCAGTTTCAGATCCTCAAAGGTACCTTTGAGGATCTGAACTGGAGAAAACTTAA-5'	
	b.	5'-CCGGGCAGGAATACTAAGTCTCATCCATGGATGAGCAGTTAGTATTCCTGCTTTTG CGTCCTTATGATTGACGAGTAGGTACCTACTCGTCAATCATAAGGACCAAAAACTTAA-5'	
	c.	5'-CCGGAGGATGACTTTAAGCAAGAAACCATGGTTTCTTGCTTAAAGTCATCCTTTTGT TCCTACTGAAATTCGTTCTTTGTACCAAGAACGAATTCAGTAGGAAAACTTAA-5'	

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε και ο πλασμιδιακός φορέας Tet-pLKO-Puro, ο οποίος έφερε το γονίδιο ανθεκτικότητας για το αντιβιοτικό πουρομυκίνη (puro), καθώς και το σύστημα TetO/TetR, για την μετέπειτα επαγωγή με δοξυκυκλίνη (dox). Και τα δύο επεξεργάστηκαν με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και AgeI, ώστε να δημιουργηθούν τα ίδια συμπληρωματικά μονόκλωνα άκρα, και ακολούθησε η σύνδεσή τους, ώστε κάθε πλασμίδιο να φέρει μία αλληλουχία-στόχο. Στη συνέχεια, τα πλασμίδια με τις αλληλουχίες shRNA, συσκευάστηκαν με πλασμίδια για την παραγωγή των λεντοιών, και καλλιεργήθηκαν με HEK293T κύτταρα, από όπου συλλέχθηκε το υπερκείμενο δύο ημερών, το οποίο περιείχε τον ιό, σύμφωνα με τη

διαδικασία καλλιέργειας που περιγράφεται παραπάνω. Έπειτα, ο ιός χρησιμοποιήθηκε για τη μόλυνση των κυτταρικών σειρών B16F10, τα οποία είχαν πρωτίστως καλλιεργηθεί σε 6well πιάτο, όταν είχαν περίπου 50% confluency. Μετά από 24 ώρες, αφαιρέθηκε το medium με τον ιό, και ακολούθησε η επιλογή των κυττάρων με πουρομυκίνη 2γ, 5γ και 10γ διαδοχικά, έως ότου αποκτηθεί ένας σταθερός πληθυσμός κυττάρων, χωρίς να παρατηρείται θάνατος.

Στη συνέχεια τα κύτταρα ξεκόλλησαν με τρυψίνη, μετρήθηκαν και ίσος αριθμός από κάθε κατηγορία, τοποθετήθηκε σε 24well πιάτο (20.000 cells/well), σε triplicates, με complete medium 0,5 ml/well και dox σε συγκέντρωση 100 ng/ml, με στόχο την επαγόμενη μείωση της έκφρασης της OPN. Παρουσία δοξυκυκλίνης, αυτή δεσμεύεται στον καταστολέα Tet/R, αφήνοντας ελεύθερη την RNA polymerase III, να αρχίσει τη μεταγραφή, με αποτέλεσμα την παραγωγή των shRNAs. Μετά από τρεις μέρες, συλλέχθηκε το υπερκείμενο από κάθε well της καλλιέργειας σε eppendorfs, για να χρησιμοποιηθεί σε άλλη πειραματική διαδικασία. Σε όλες τις παραπάνω διαδικασίες, χρησιμοποιήθηκαν ως control τα B16F10 κύτταρα



Εικόνα 10: Στρατηγική κατασκευής shRNA. (A) Γενική δομή των shRNA ολιγονουκλεοτιδίων και ο πλασμιδιακός φορέας Tet-Plko Puro που χρησιμοποιήθηκε. (B) Επίδραση της δοξυκυκλίνης στην επαγωγή της μείωσης της έκφρασης της OPN. Η Dox προσδένεται στον αναστολέα TetR και επιτρέπει τη μεταγραφή των shRNAs.

2.4. Έλεγχος της μείωσης της έκφρασης της OPN με RT-qPCR

Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση του RNA από τα B16F10 κύτταρα, χρησιμοποιήθηκε το NucleoSpin RNA XS Kit (Macherey Nagel). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, προσέξαμε ιδιαίτερα τις μεταχειρίσεις και την καθαριότητα του πάγκου, ώστε να αποτραπεί η μόλυνση των δειγμάτων με RNA-άσες και εξωγενή RNA. Αρχικά, κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 1200 rpm, ώστε να απαλλαχθεί από υπολείμματα medium. Στη συνέχεια, η πελέτα επαναδιαλύθηκε, ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων, σε Lysis Buffer RA1 (100 μ L/10⁵ cells), το οποίο περιείχε TCEP (2 μ L/10⁵ cells) και Carrier RNA (5 μ L/10⁵ cells), με στόχο τη λύση και την ομογενοποίηση των κυττάρων. Το TCEP αραιώθηκε σε 100 μ L H₂O RNAase free και το Carrier RNA σε 750 μ L Lysis Buffer RA1, πριν τη χρήση τους. 100 μ L από κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν σε NucleoSpin Filter (violet ring), μέσα σε Collection Tube και φυγοκεντρήθηκαν για 30 s στα 11.000 g. Στο προϊόν της λύσης προστέθηκαν 100 μ L αιθανόλης 70 % και το μίγμα φορτώθηκε σε NucleoSpin RNA XS Column (light blue ring), η οποία τοποθετήθηκε σε δεύτερο Collection Tube. Ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρωση για 30 s στα 11.000 g, με αποτέλεσμα την πρόσδεση του RNA στη στήλη. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 100 μ L MDB (Membrane Desalting Buffer) σε αυτή και φυγοκεντρήθηκε για 30 s στα 11.000 g, ώστε να ξηρανθεί η μεμβράνη. Ακολούθησε η προσθήκη 25 μ L rDNase reaction mixture (το οποίο αποτελούταν από rDNase και Reaction Buffer for rDNase) στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης, η οποία επώαστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με αποτέλεσμα την πέψη του DNA. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν τρεις εκπλύσεις: η πρώτη με προσθήκη 100 μ L Buffer RA2, για 2 λεπτά σε RT, για απενεργοποίηση της rDNase, η δεύτερη με προσθήκη 400 μ L Buffer RA3 και

φυγοκέντρωση για 30 s στα 11.000 g και η Τρίτη με προσθήκη 200 μ L Buffer RA3 και φυγοκέντρωση για 2 λεπτά στα 11.000 g. Τέλος, η στήλη τοποθετήθηκε σε καθαρό nuclease-free Collection Tube, όπου προστέθηκε 10 μ L H₂O (RNAase free) και φυγοκεντρήθηκε για 30 s στα 11.000 g, για να γίνει έκλουση του RNA.

Σύνθεση cDNA

Στη συνέχεια, για τη σύνθεση cDNA, χρησιμοποιήθηκε το FIREScript RT cDNA Synthesis KIT (Solis BioDyne). Σε 12 δείγματα σε κάθε δείγμα (εκμαγείο) RNA 10 μ L, προστέθηκαν συνολικά 20 μ L αντιδραστηρίων: 1 μ L Random Primers (100 μ M) το οποίο συμπληρώθηκε με Nuclease-free H₂O έως τελικό όγκο 16 μ L (Master Mix 1) και 2 μ L 10X RT Reaction Buffer with DTT, 0.5 μ L dNTP MIX, 0.5 μ L RiboGrip Rnase Inhibitor και 1 μ L από το ένζυμο FIREScript RT (Master Mix 2). Για τη σύνθεση του cDNA, ακολουθήθηκε το εξής πρόγραμμα στον θερμικό κυκλοποιητή: θέρμανση για αποδιάταξη στους 65°C, για 5 λεπτά, αντίστροφη μεταγραφή στους 50 °C για 1 ώρα και απενεργοποίηση του ενζύμου και καταστροφή της αλυσίδας RNA στους 85 °C για 5 λεπτά.

Quantitative PCR (RT-PCR)

Το cDNA που δημιουργήθηκε, χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια ως εκμαγείο για την ποσοτική PCR, ώστε να ποσοτικοποιηθεί η ποσότητα cDNA σε κάθε κατηγορία κυττάρων, άρα και η μείωση της έκφρασης του γονιδίου της OPN. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου, ο οποίος «διάβαζε» το φθορισμό που εκπέμπεται από διάφορες φθορίζουσες χρωστικές, καθώς αυτές ενσωματώνονται στα προϊόντα της PCR. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίζεται στο ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων cDNA στο αρχικό δείγμα, τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού που χρειάζονται για να παραχθεί ικανός αριθμός προϊόντων, ώστε ο φθορισμός του δείγματος να ξεπεράσει το επίπεδο ανίχνευσης.

Αρχικά, φτιάχθηκε η Standar Curve, δηλαδή η πρότυπη καμπύλη η οποία δημιουργήθηκε από δείγματα με γνωστή συγκέντρωση, με την οποία έγινε η σχετική ποσοτικοποίηση. Η St curve κατασκευάστηκε από αρχικό μίγμα, το οποίο περιείχε 25 μ L spleen cDNA και 25 H₂O, με 6 διαδοχικές αραιώσεις αυτού σε eppendorfs, μεταφέροντας 12,5 μ L υλικού από το ένα στο άλλο (το 6^ο περιείχε μόνο H₂O). Κάθε μία αραιώση μπήκε στην plate σε duplicates. Έπειτα, χρησιμοποιήθηκαν 6 μ L

cDNA από κάθε δείγμα (στα οποία είχε μετρηθεί η ποσότητα cDNA, και είχαν πραγματοποιηθεί κατάλληλες αραιώσεις με H₂O, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 2 ng/μL) τα οποία αναμίχθηκαν με 36 μL H₂O, για συνολικά 12 δείγματα, από δύο σειρές για κάθε ένα, μία για το γονίδιο της OPN και μία για το γονίδιο αναφοράς HPRT, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για κανονικοποίηση των συγκεντρώσεων. Όλα τα δείγματα μπήκαν στην plate σε triplicates. Για την παρασκευή των Master Mix χρησιμοποιήθηκαν κατά σειρά: H₂O (440 μL), 10X Buffer (125 μL), MgCl₂ (62,5 μL), Primers Fw και Rv (37,5 μL), dNTPs 10 Mm (25 μL), τη μη ειδική χρωστική SYBR Green I (2,5 μL) και τέλος την Platinum πολυμεράση (2,5 μL). Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 42 μL από το Master Mix και έπειτα, 25 μL από κάθε δείγμα σε κάθε well της plate, η οποία σφραγίστηκε προσεκτικά και τοποθετήθηκε στο μηχάνημα για περίπου 2 ώρες. Ακολούθησε η ανάλυση των αποτελεσμάτων και η ποσοτικοποίηση βάσει των πρότυπης καμπύλης.

2.5. Μέτρηση των κυττάρων και εκτίμηση της απόπτωσής τους με κυτταρομετρία ροής

Μετά από τρεις μέρες σε καλλιέργεια με medium με dox, τα κύτταρα ξεκόλλησαν και μετρήθηκαν με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, ώστε να προσδιοριστεί ο αριθμός τους. Στη συνέχεια διερευνήθηκε η πιθανότητα ύπαρξης αποπτωτικών ή/και νεκρωτικών καρκινικών κυττάρων στις καλλιέργειες, καθώς ήταν σημαντικό να διασφαλιστεί ότι τα καρκινικά κύτταρα που θα χρησιμοποιούνταν στα in vivo πειράματα με τους μύες, δεν ήταν νεκρά πριν την έγχυσή τους σε αυτά, αλλά και ότι η κατασκευή shRNA δεν επηρεάζει την επιβίωσή τους. Έτσι, κύτταρα B16F10 που απομονώθηκαν από την καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκαν σε ένα πρωτόκολλο χρώσης με Αννεξίνη V (eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC), με στόχο τον ποσοτικό προσδιορισμό της απόπτωσης, μέσω της ποσοτικοποίησης της αναστροφής της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) στην εξωτερική μονοστιβάδα της πλασματικής μεμβράνης, με κυτταρομετρία ροής.

Οι αννεξίνες είναι μία οικογένεια εξαρτώμενων από το ασβέστιο πρωτεϊνών, οι οποίες προσδένονται κατά προτίμηση στη φωσφατιδυλοσερίνη (PS), ενός αρνητικά φορτισμένου μεμβρανικού φωσfolιπιδίου, το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται κυρίως στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης. Κατά την έναρξη της απόπτωσης, η PS χάνει την ασύμμετρη κατανομή της κατά μήκος της διπλοστιβάδας και μετατοπίζεται στην εξωτερική πλευρά της. Έκεί, η PS μπορεί να δεσμευθεί με σχετικά υψηλή συγγένεια από την αννεξίνη V, όταν αυτή είναι σημασμένη με την φθορίζουσα ουσία ισοθειοκυανική φλουορεσκειΐνη (Fluorescein isothiocyanate, FITC). Επίσης, στην πρώιμη απόπτωση, η μεμβράνη αποκλείει τις χρωστικές βιωσιμότητας, όπως την 7-ακτινομυκίνη (7-amino-actinomycin, 7-AAD). Ωστόσο, σε νεκρά κύτταρα, δεδομένου ότι η ακεραιότητα της πλασματικής μεμβράνης χάνεται, η εσωτερική της πλευρά είναι διαθέσιμη για σήμανση. Επομένως, ο συνδυασμός των δύο χρώσεων μπορεί να διακρίνει τα ζωντανά (αννεξίνη V⁻/7-AAD⁻), τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (αννεξίνη V⁺/7-AAD⁻), από τα όψιμα αποπτωτικά/νεκρωτικά κύτταρα (αννεξίνη V⁺/7-AAD⁺).

Το εναιώρημα των κυττάρων κάθε κατηγορίας που απομονώθηκε από την καλλιέργεια τοποθετήθηκε σε falcons των 15 ml, πλύθηκε αρχικά με 3 ml PBS και για δεύτερη φορά με 50 μ L 1X Binding Buffer (αραίωση 1 mL 10X Binding Buffer+ 9 mL dH₂O). Κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 1200 rpm και η πελέτα επαναδιαλύθηκε σε 100 μ L 1X Binding Buffer. Στη συνέχεια, προστέθηκε σε κάθε falcon 2,5 μ L Annexin V-FITC, τα οποία επώαστηκαν για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε πλύση με 500 μ L, επαναδιάλυση της πελέτας σε 400 μ L 1X Binding Buffer και προσθήκη 5 μ L 7-AAD. Στη συνέχεια, ακολούθησε ανάλυση των δειγμάτων με χρήση κυτταρόμετρου ροής. Τέλος, ένα δείγμα B16F0 κυττάρων χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των controls. Συγκεκριμένα, μετά τις πρώτες πλύσεις του δείγματος με PBS και Binding Buffer, ακολούθησε η επαναδιάλυση της πελέτας σε 200 μ L Binding Buffer, από τα οποία χρησιμοποιήθηκαν 90 μ L χωρισμένα σε τρία falcons (30 μ L/falcon) για τα controls. Στο ένα falcon προστέθηκε μόνο Annexin V-FITC, στο άλλο μόνο 7-AAD και στο τρίτο τίποτα από τα δύο.

2.6. Επαγωγή μελανώματος στους μύες

Κύτταρα B16F10 αγρίου τύπου καθώς και B16F10 shRNA-OPN, καλλιεργήθηκαν, όπως περιγράφεται παραπάνω, και χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή μελανώματος. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 150.000 κύτταρα/100μL/μυ, ενώ είχαμε 4 μύες για κάθε κατηγορία κυττάρων. Οι μύες αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα και αφαιρέθηκε τμήμα του τριχώματός τους, πίσω από την περιοχή της πλάτης. Οι ενέσεις πραγματοποιήθηκαν υποδόρια. Μετά το πέρας 7 περίπου ημερών, τοποθετήθηκε στο νερό των μυών δοξυκυκλίνη, σε συγκέντρωση 2 mg/ml και 5% σουκρόζης. Μετά το πέρας 10 ημερών, οι όγκοι που είχαν σχηματιστεί μετρούνταν καθημερινά με παχύμετρο, και έπειτα, υπολογιζόταν το μέγεθος κάθε όγκου, σύμφωνα με τον τύπο: $(L*W*W)/2$, όπου L=μήκος και W=πλάτος. Μετά το πέρας ακόμα 5 ημερών, οι μύες θυσιάστηκαν με χρήση ισοφλουρανίου, και απομονώθηκε ο όγκος κάθε μυός. Τέλος, οι όγκοι ζυγίστηκαν και στη συνέχεια ακολούθησε κατάλληλη επεξεργασία και ανάλυση των κυτταρικών πληθυσμών με κυτταρομετρία ροής.

2.7. Απομόνωση και ανάλυση των πληθυσμών των όγκων

Οι όγκοι που απομονώθηκαν από τους μύες τεμαχίστηκαν με νυστέρι (<1-2mm) σε τρυβλίο με PBS και ακολούθησε η σύθλιψή τους έως ότου προκύψει ένα υγρο εναιώρημα, το οποίο φυγοκεντρήθηκε για 8 λεπτά σε 400 g. Η πελέτα επαναδιαλύθηκε σε ένα μίγμα ενζύμων 2 mL, κολλαγενάσης (2mg/mL) και DNase I (0,1 MG/mL) και επωάστηκε στους 37°C. Στη συνέχεια προστέθηκε FACS buffer έως τελικό όγκο 10 mL, και το υλικό περάστηκε από φίλτρο. Ακολούθησε δεύτερη φυγοκέντρωση για 8 λεπτά στα 400 g. Η νέα πελέτα από κάθε δείγμα επαναδιαλύθηκε σε 3 mL FACS buffer, και χωρίστηκε σε 3 falcons, ώστε να πραγματοποιηθεί η χρώση για την κυτταρομετρία. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν λεμφαδένες για control.

Για τη χρώση, χρησιμοποιήθηκαν 3 panel αντισωμάτων, τα οποία φαίνονται παρακάτω. Παρασκευάστηκαν 3 Master Mix, τελικού όγκου 500 μL , όπου κάθε ένα είχε 10 μL από το κάθε αντίσωμα, και προστέθηκαν 50 μL ανά δείγμα.

Panel 1		Panel 2		Panel 3	
Αντίσωμα	Χρώμα	Αντίσωμα	Χρώμα	Αντίσωμα	Χρώμα
Anti-CD45	V500	Anti-CD45	V500	Anti-B220	V500
Anti-CD3	PE	Anti-CD3	PE	Anti-NK1.1	PE-Cy5
Anti-CD4	PE-Cy7	Anti-CD4	PE-Cy7	Anti-CD11b	BV421
Anti-CTLA-4	Pacific Blue	Anti-CD8	Pacific Blue	Anti-CD11c	Pacific Orange
Anti-PD-1	Pacific Orange	Anti-PD-1	Pacific Orange		

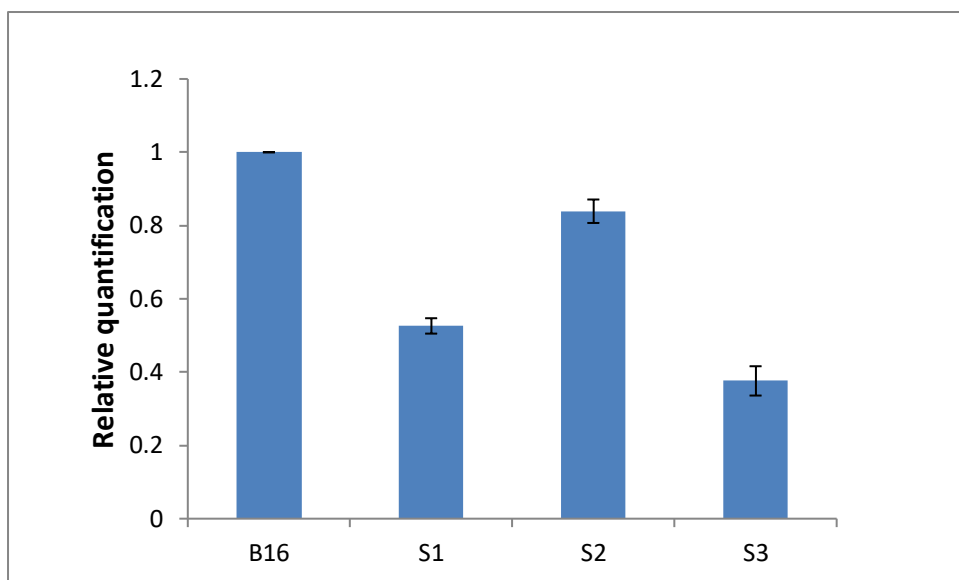
2.8. Στατιστική ανάλυση

Οι όγκοι μετρήθηκαν με παχύμετρο ακριβείας, και τα μεγέθη τους υπολογίστηκαν με τον τύπο $(L \cdot W \cdot W) / 2$, όπου L =μήκος και W =πλάτος. Οι αναλύσεις των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για κυτταρομετρία ροής έγιναν με το πρόγραμμα FlowJo V10. Οι στατιστικές διαφορές υπολογίστηκαν με τη χρήση του Student's t test χωρίς ζεύγη. Οι διαφορές θεωρήθηκαν σημαντικές για $P \text{ value} < 0,05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Τα κύτταρα που έχουν λάβει τα shRNA ολιγονουκλεοτίδια για την OPN, εκφράζουν μειωμένη OPN

Στα *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά μελανώματος B16F10, καθώς επίσης και B16F10 κύτταρα που είχαν προσλάβει shRNAs έναντι της OPN. Η τεχνική αυτή αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για σταθερή μείωση της έκφρασης ενός γονιδίου (knock down). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, η οποία περιγράφεται παραπάνω, και την παραγωγή τριών σταθερών κυτταρικών πληθυσμών (με τη χρήση τριών διαφορετικών αλληλουχιών για το γονίδιο της OPN), ακολούθησε η ποσοτικοποίηση της έκφρασης της OPN σε κάθε έναν από αυτούς, με χρήση RT-PCR. Στο παρακάτω γράφημα φαίνεται η σχετική έκφραση της OPN στα κύτταρα με shRNA έναντι της OPN, συγκριτικά με τα κύτταρα B16F10, τα οποία την εκφράζουν κανονικά.



Εικόνα 11: Μείωση της έκφρασης της OPN στα κύτταρα με shRNA για την OPN. Ο πληθυσμός S3 εμφάνισε τη μεγαλύτερη μείωση στην έκφραση της OPN, συγκριτικά με τα B16F10 κύτταρα αγρίου τύπου.

Παρατηρήθηκε ότι τα πρώτα, εμφάνιζαν μειωμένη έκφραση της OPN, με τον τρίτο πληθυσμό (S3) να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη μείωση στην έκφραση. Επομένως, το παρακάτω shRNA ολιγονουκλεοτίδιο φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικό στη μείωση της έκφρασης της OPN.

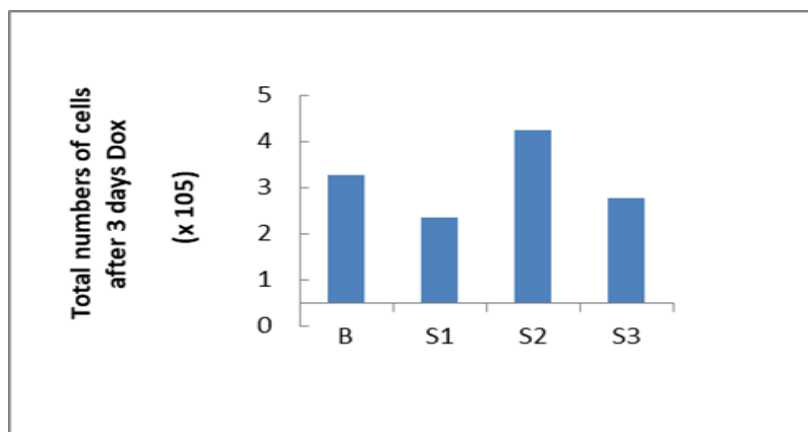
5'-CCGGAGGATGACTTTAAGCAAGAAACCATGGTTCTTGCTTAAAGTCATCCTTTTGT
TCCTACTGAAATTCGTTCTTTGGTACCAAGAACGAATTTCAGTAGGAATAAACTTAA-5'

3.2. Η ενσωμάτωση των shRNA ολιγονουκλεοτιδίων από τα B16F10 κύτταρα δε φαίνεται να επηρεάζει τη βιωσιμότητά τους

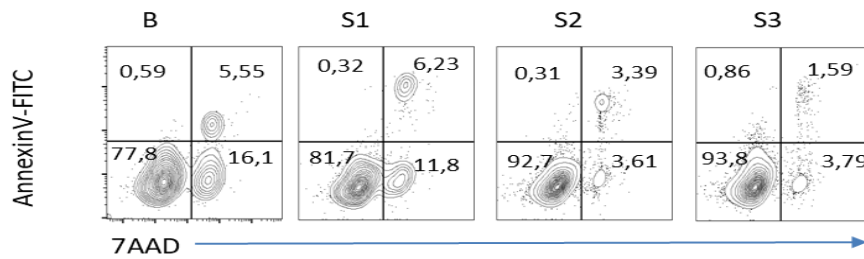
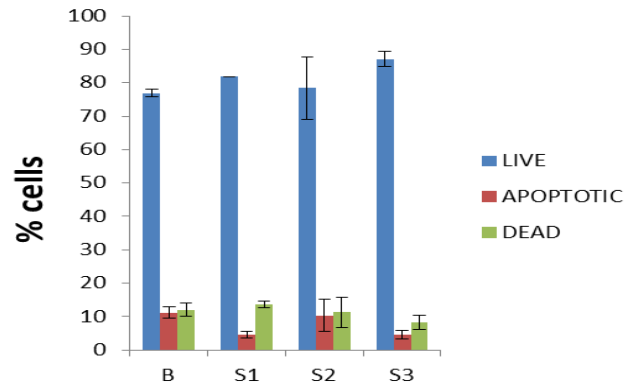
Ίσος αριθμός κυττάρων από κάθε πληθυσμό, καλλιεργήθηκε σε medium με δοξυκυκλίνη για τρεις μέρες και αφού αυτά πολλαπλασιάστηκαν, μετρήθηκαν με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, ώστε να διαπιστωθεί ο αριθμός τους. Δεν παρατηρήθηκε μεγάλο ποσοστό θανάτου σε κανέναν πληθυσμό, ούτε κάποια αξιοσημείωτη αλλαγή στον αριθμό τους. Έτσι, τα B16F10 μετρήθηκαν 326.000, τα S1 235.000, και τα S2 και S3 425.000 και 276.000, αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η πιθανότητα ύπαρξης αποπτωτικών ή/και νεκρωτικών καρκινικών κυττάρων στις καλλιέργειες, καθώς ήταν σημαντικό να διασφαλιστεί ότι τα καρκινικά κύτταρα που θα χρησιμοποιούνταν στα in vivo πειράματα με τους μύες, δεν ήταν νεκρά πριν την έγχυσή τους σε αυτά, αλλά και ότι τα shRNA ολιγονουκλεοτίδια δεν επηρεάζουν την επιβίωσή τους. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο χρώσης με Αννεξίνη V και 7-AAD (eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC), με στόχο τον ποσοτικό προσδιορισμό της απόπτωσης. Ο συνδυασμός των δύο χρώσεων μπορεί να διακρίνει τα ζωντανά (αννεξίνη V ⁻/7-AAD⁻), τα πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (αννεξίνη V ⁺/7-AAD⁻), από τα όψιμα αποπτωτικά/νεκρωτικά κύτταρα (αννεξίνη V ⁺/7-AAD⁺). Τα αποτελέσματα της

κυτταρομετρίας έδειξαν ότι το ποσοστό των αποπτωτικών/νεκρών κυττάρων ήταν αρκετά χαμηλό, ενώ φάνηκε ότι ο S3 πληθυσμός, ο οποίος έφερε το shRNA που προκαλούσε τη μεγαλύτερη μείωση στην έκφραση της OPN, εμφάνιζε το μεγαλύτερο ποσοστό ζωντανών κυττάρων και το μικρότερο ποσοστό νεκρών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, τα B16F10 κύτταρα, εμφάνιζαν κατά μέσο όρο 76,85 % ζωντανά κύτταρα και 11,1% και 12,06% αποπτωτικά και νεκρά κύτταρα, αντίστοιχα. Τα S1 ήταν ζωντανά κατά 81,8%, αποπτωτικά κατά 4,59% και νεκρά κατά 13,6%. Το 78,4% των S2 ήταν ζωντανά, ενώ το 10,35% αποπτωτικά και το 11,2 νεκρά. Τέλος, το 87,1 % των S3 ήταν ζωντανά κύτταρα, ενώ το 4,5% και 8,2% αποπτωτικά και νεκρά, αντίστοιχα. Στις παρακάτω εικόνες αποτυπώνονται οι αριθμοί και τα ποσοστά των κυττάρων που προαναφέρθηκαν.



Εικόνα 12: Μέτρηση του αριθμού κυττάρων μετά από καλλιέργεια τριών ημερών σε dox, από ίσο αρχικό αριθμό κυττάρων. Τα κύτταρα φαίνονταν να πολλαπλασιάζονται κανονικά, ενώ δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη διαφορά στον αριθμό τους. Όπου B για B16F10, και S1, S2, S3 για τα κύτταρα με τις τρεις διαφορετικές αλληλουχίες στόχους έναντι της OPN, αντίστοιχα. Οι αριθμοί των κυττάρων αντιστοιχούν σε $\chi \cdot 10^5$ κύτταρα.

B**C**

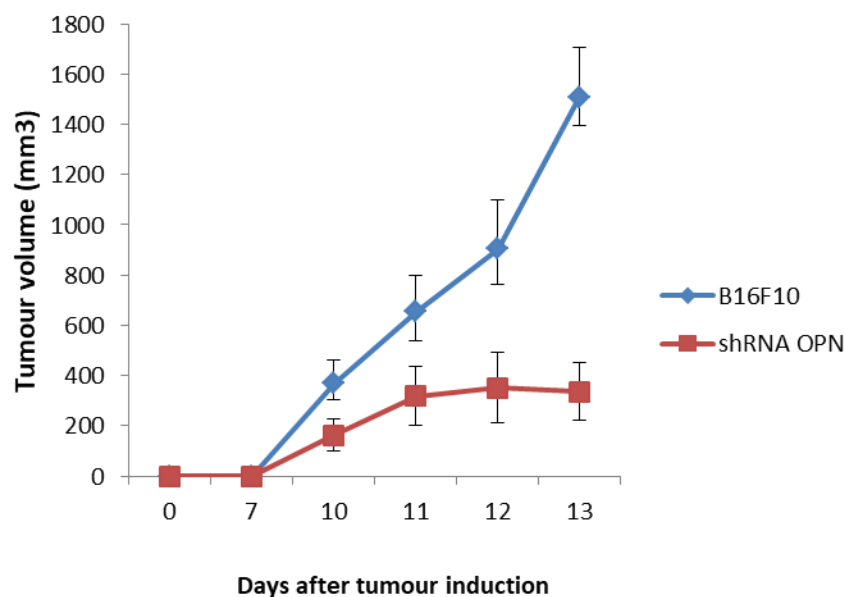
Εικόνα 13: Η ενσωμάτωση των shRNA ολιγονουκλεοτιδίων έναντι της OPN δε φάνηκε να επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων. (B) Ποσοστιαία έκφραση των ζωντανών, των αποπτωτικών (πρώιμων και όψιμων) και των νεκρών κυττάρων, μετά από χρώση για Annexin V και 7-AAD. (C). Γραφική παράσταση του ποσοστού των παραπάνω κυττάρων. Όπου B για B16F10 κύτταρα και S1, S2, S3 για τα κύτταρα με τις τρεις διαφορετικές αλληλουχίες στόχους έναντι της OPN, αντίστοιχα.

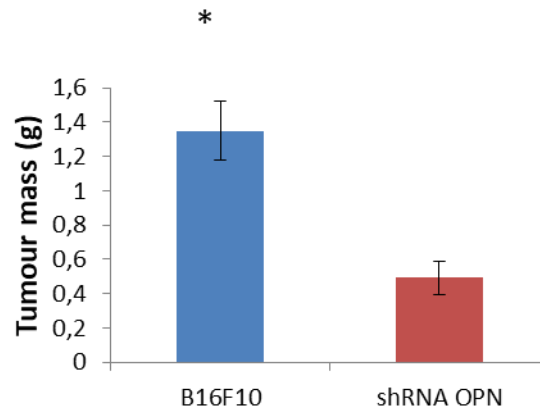
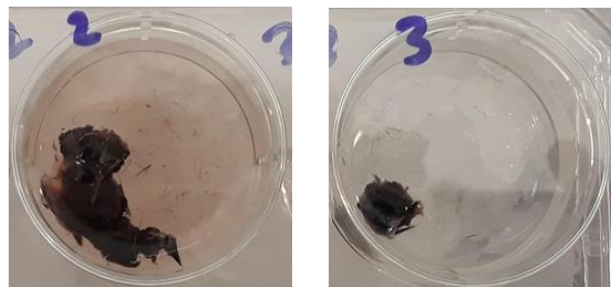
3.3. Μικρότερη ανάπτυξη όγκων σε μύες με μελάνωμα που επάγεται από B16F10 κύτταρα που φέρουν shRNA-OPN, συγκριτικά με τους μύες με B16F10 μελάνωμα

Τα B16F10 και τα S3 κύτταρα, τα οποία φάνηκε να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη μείωση στην έκφραση της OPN, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την

επαγωγή μελανώματος σε C57BL/6 Foxp3/GFP μύες. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 4 μύες ανά ομάδα (B16F10 και B16F10 shRNA-OPN). Μετά το πέρας 10 ημερών από την αρχική έγχυση των κυττάρων, οι όγκοι που είχαν σχηματιστεί μετρούνταν καθημερινά με παχύμετρο, και έπειτα, υπολογιζόταν το μέγεθος κάθε όγκου, σύμφωνα με τον τύπο: $(L*W*W)/2$, όπου L=μήκος και W=πλάτος. Επίσης, έπειτα από 5 μέρες, όταν οι μύες θυσιάστηκαν και απομονώθηκε ο όγκος κάθε μυός, οι όγκοι ζυγίστηκαν. Από τις μετρήσεις προέκυψε ότι οι όγκοι που σχημάτισαν οι μύες με τη μειωμένη έκφραση της OPN ήταν αρκετά μικρότεροι, σε σύγκριση με τους όγκους των B16F10 μυών, με τον μεγαλύτερο να είναι στα 351 mm³, σε αντίθεση με την άλλη ομάδα, η οποία εμφάνισε μέγιστο μέσο μέγεθος στα 1.506 mm³, τη 13^η μέρα, πριν την θυσία. Επίσης, μικρότερη συνολική μάζα, εμφάνισε η ομάδα με shRNA-OPN, με μέσο όρο τα 0,45g, σε αντίθεση με την άλλη ομάδα, η οποία είχε μέσο όρο μάζας 1,22g.

A



B**C**

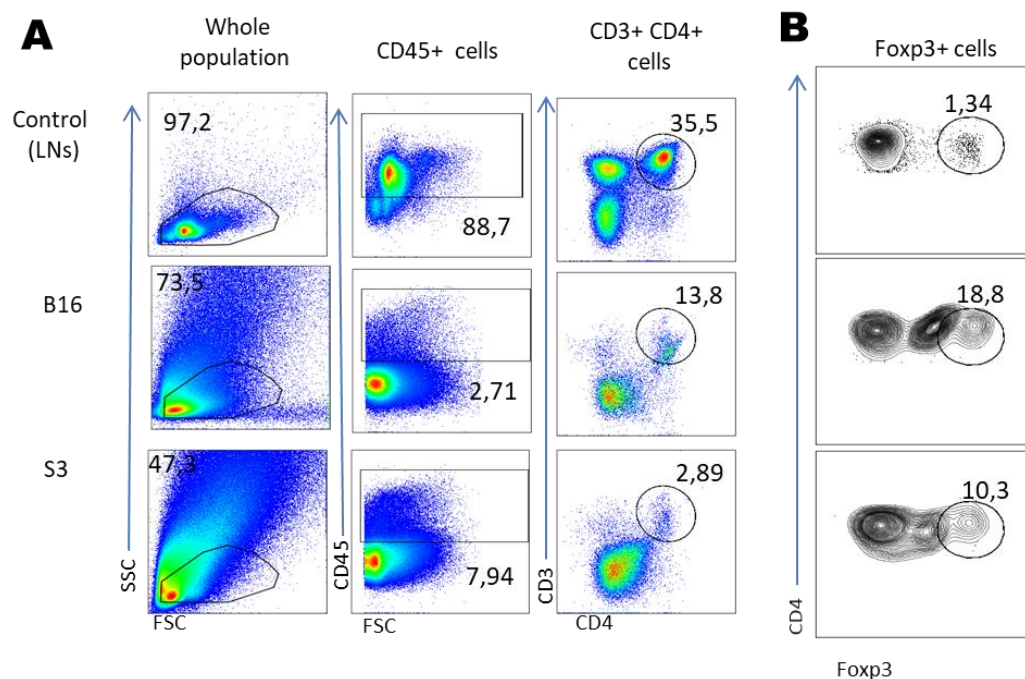
Εικόνα 14: Μειωμένη ανάπτυξη του όγκου σε μύες με μελάνωμα που φέρουν shRNA για την OPN. Σύγκριση του μεγέθους του όγκου που σχηματίστηκε μεταξύ των δύο ομάδων μυών, αυτών με τα B16F10 και αυτών με τα shRNA. (Α) Γραφική αναπαράσταση του μεγέθους των όγκων στις δύο ομάδες μυών. (Β) Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει τη συνολική μάζα (g) των όγκων στις δύο ομάδες. (C) Φωτογραφία που αναπαριστά το μέγεθος των όγκων για τα B16F10(αριστερά) και τα shRNA(δεξιά). Τα δεδομένα αναπαριστούν αποτελέσματα ενός πειράματος, $n=4$ μύες/group. $*=P$ value $<0,05$ (two tailed student's t test χωρίς ζεύγη, γραμμές σφάλματος S.E.M.)

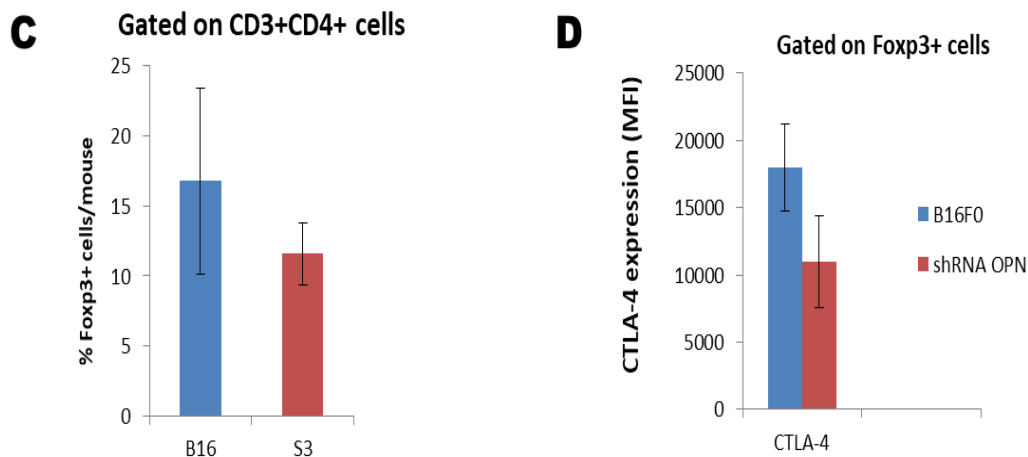
3.4. Η απουσία της καρκινικής OPN μειώνει το ποσοστό των ρυθμιστικών T κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε αν η μείωση της έκφρασης της OPN, επιδρά στους πληθυσμούς των ανοσοκυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Για το σκοπό αυτό, οι όγκοι οι οποίοι απομονώθηκαν από τους μύες, τεμαχίστηκαν και

επεξεργάστηκαν με ένζυμα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία υγρου εναιωρήματος, για την απομόνωση των κυτταρικών πληθυσμών. Αρχικά, οι όγκοι ελέγχθηκαν για την παρουσία Foxp3+ κυττάρων. Επίσης, πραγματοποιήθηκε και έλεγχος για τους δείκτες CTLA-4 και PD-1. Οι μύες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Foxp3/GFP. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 3 πειράματα, ενώ τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αφορούν σε ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στο περιβάλλον των όγκων που σχηματίζονταν από κύτταρα B16F10 shRNA-OPN, υπήρχαν λιγότερα Foxp3+ κύτταρα, σε σύγκριση με τους όγκους από τα B16F10 κύτταρα. Κατά μέσο όρο, το ποσοστό των Foxp3+ κυττάρων στους όγκους με τη μειωμένη έκφραση OPN, από το σύνολο των CD3+CD4+ κυττάρων, ήταν 11,5%, ενώ στους B16F10 όγκους 16,7%. Επιπλέον, φαίνεται ότι η μέση έκφραση του CTLA-4 στους S3 όγκους ήταν μικρότερη (MFI:17.942) σε σύγκριση με τους B16 (MFI:10.969). Ο δείκτης PD-1 δεν εμφάνισε κάποια αλλαγή ανάμεσα στις δύο ομάδες όγκων.





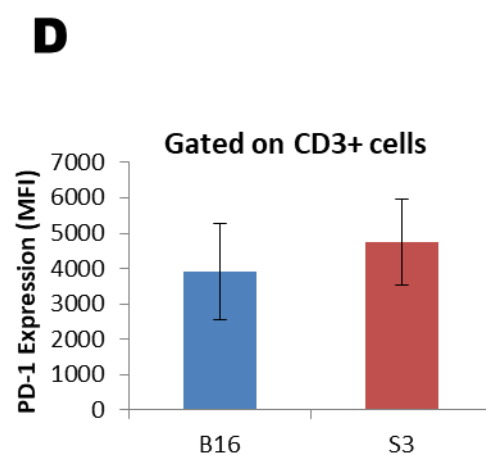
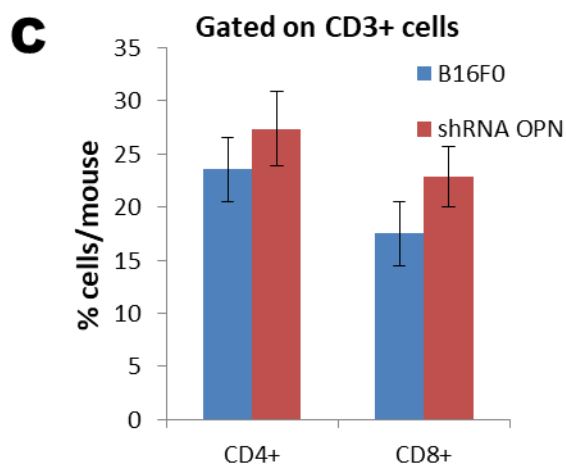
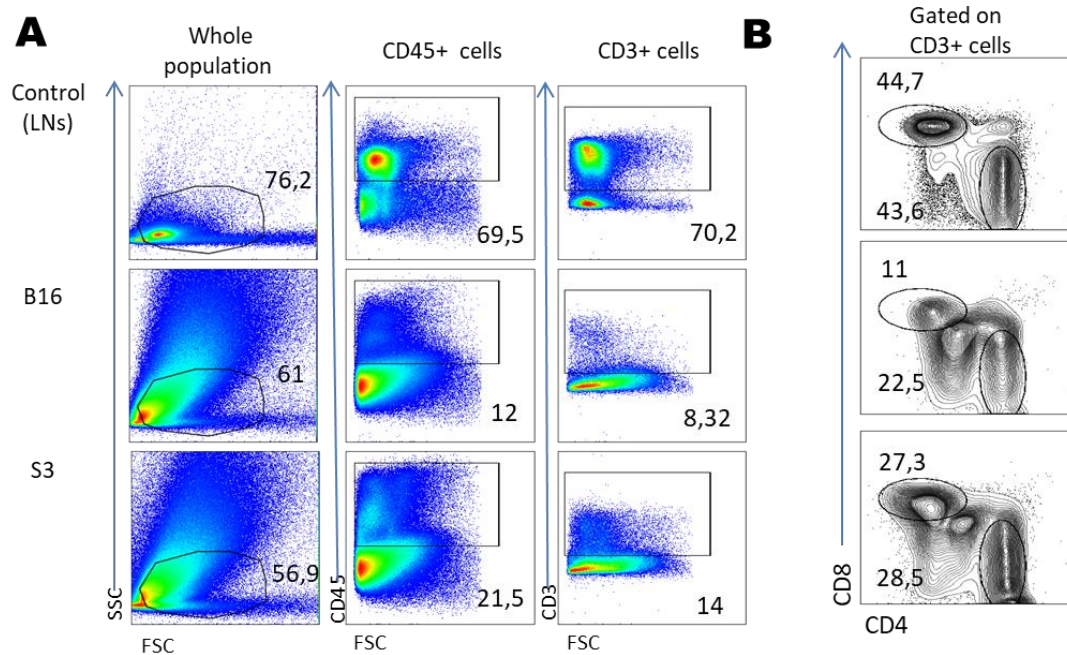
Εικόνα 15: Η μείωση της καρκινικής OPN, μειώνει το ποσοστό των ρυθμιστικών T κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Σύγκριση του αριθμού των Tregs μεταξύ των B16 και S3 όγκων. (A) Gating strategy για τα Foxp3+ κύτταρα. (B) Αντιπροσωπευτική απεικόνιση των ποσοστών των Foxp3+ κυττάρων, σε LNs (control), B16 και S3 όγκους. (C) Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει τα ποσοστά των Foxp3+ κυττάρων, από το σύνολο των CD3+CD4+ κυττάρων, μεταξύ B16 και S3 όγκους. (D) Μέση έκφραση του δείκτη CTLA-4 στα Foxp3+ κύτταρα. Τα δεδομένα αναπαριστούν αποτελέσματα ενός πειράματος, n=4 μύες/group.

3.5. Η απουσία της καρκινικής OPN φαίνεται να αυξάνει το ποσοστό των CD4+ και CD8+ κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου

Στη συνέχεια, εφόσον τα Tregs ρυθμίζουν τα υπόλοιπα κύτταρα του ανοσοποιητικού, ελέγξαμε αν η μείωσή τους προκαλεί κάποια επίδραση στους αριθμούς των CD4+ και CD8+ κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, οι πληθυσμοί που απομονώθηκαν από τους όγκους των Foxp3/GFP μυών, βάφτηκαν με αντισώματα έναντι των CD4 και CD8. Επίσης, πραγματοποιήθηκε και εδώ έλεγχος για την έκφραση του δείκτη PD-1. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 3 πειράματα, ενώ τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αφορούν σε ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στο περιβάλλον των όγκων που σχηματίζονταν από κύτταρα B16F10 shRNA-OPN, υπήρχαν περισσότερα CD4+ και CD8+ κύτταρα, σε σύγκριση με τους όγκους από τα B16F10 κύτταρα. Κατά μέσο όρο, το ποσοστό των CD4+ κυττάρων στους όγκους με τη μειωμένη έκφραση OPN, από το σύνολο των CD3+ κυττάρων, ήταν 27,35%, ενώ στους B16F10 όγκους ήταν 23,55%. Επίσης, το ποσοστό των CD8+ κυττάρων στους S3 όγκους ήταν 22,9%, ενώ στους B16

όγκους 17,5%. Επιπλέον, φαίνεται ότι η μέση έκφραση του PD-1 στους S3 όγκους, από το σύνολο των CD3+ κυττάρων ήταν μεγαλύτερη (MFI:4.742) σε σύγκριση με τους B16 (MFI:3.912).

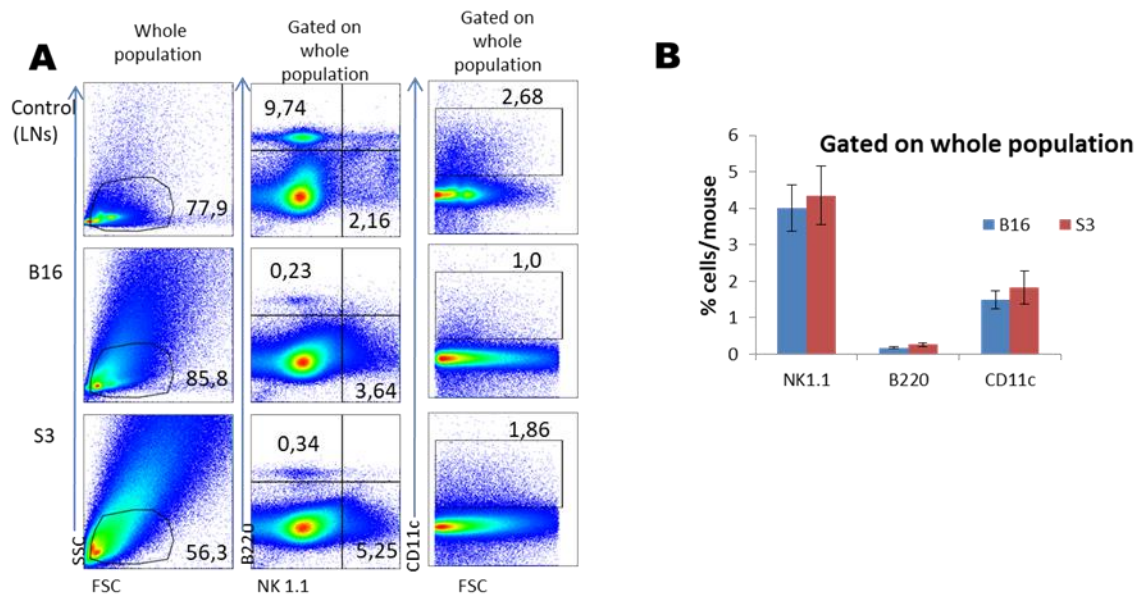


Εικόνα 16: Η μείωση της καρκινικής OPN, αυξάνει το ποσοστό των CD4+ και CD8+ κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Σύγκριση του αριθμού των CD4+ και CD8+ κυττάρων μεταξύ των B16 και S3 όγκων. (A) Gating strategy για τα CD4+ και CD8+ κύτταρα. (B) Αντιπροσωπευτική απεικόνιση των ποσοστών των CD4+ και CD8+ κυττάρων, σε LNs (control), B16 και S3 όγκους. (C) Παβδόγραμμα που παρουσιάζει τα ποσοστά των CD4+ και CD8+ κυττάρων, από το σύνολο των CD3+ κυττάρων, μεταξύ B16 και S3 όγκους. (D) Μέση έκφραση του δείκτη PD-1 στα CD3+ κύτταρα. Τα δεδομένα αναπαριστούν αποτελέσματα ενός πειράματος, n=4 μύες/group.

3.6. Η μείωση της έκφρασης της OPN δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό των NK 1.1+, B220+ και CD11c+ κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η επίδραση της μείωσης της έκφρασης της OPN, σε άλλους πληθυσμούς κυττάρων του ανοσοποιητικού στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Για το σκοπό αυτό, οι πληθυσμοί που απομονώθηκαν από τους όγκους των Foxp3/GFP μυών, βάφτηκαν με αντισώματα έναντι των NK 1.1, B220 και CD11c. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 3 πειράματα, ενώ τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αφορούν σε ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στο περιβάλλον των όγκων που σχηματίζονταν από κύτταρα B16F10 shRNA-OPN, υπήρχαν ελαφρώς περισσότερα NK1.1+ και CD11c+ κύτταρα, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς των B16F10 όγκων, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία ουσιαστική διαφορά στον πληθυσμό των B220+ κυττάρων. Κατά μέσο όρο, το ποσοστό των NK1.1+ κυττάρων στους όγκους με τη μειωμένη έκφραση OPN, από το σύνολο του πληθυσμού, ήταν περίπου 4,3%, ενώ στους B16F10 όγκους ήταν 4%. Επίσης, το ποσοστό των CD11c+ κυττάρων στους S3 όγκους ήταν 1,8%, ενώ στους B16 όγκους 1,4%. Τα ποσοστά των B220+ κυττάρων για τους S3 και B16 όγκους ήταν 0,26% και 0,17%, αντίστοιχα.



Εικόνα 17: Η μείωση της καρκινικής OPN δε φαίνεται να επηρεάζει τα ποσοστά των NK1.1+, CD11c+ και B220+ κυττάρων, στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Σύγκριση του αριθμού των NK1.1+, CD11c+ και B220+ κυττάρων μεταξύ των B16 και S3 όγκων. (A) Αντιπροσωπευτική απεικόνιση των ποσοστών των NK1.1+, CD11c+ και B220+ κυττάρων, σε LNs (control), B16 και S3 όγκους. (B) Ραβδόγραμμα που παρουσιάζει τα ποσοστά των NK1.1+, CD11c+ και B220+ κυττάρων, από το σύνολο του πληθυσμού, μεταξύ B16 και S3 όγκους. Τα δεδομένα αναπαριστούν αποτελέσματα ενός πειράματος, n=4 μύες/group.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Οστεοποντίνη (OPN), είναι μία φωσφορυλιωμένη, μη κολλαγονούχα γλυκοπρωτεΐνη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, η οποία εντοπίζεται κυρίως στα οστά. Ωστόσο, συντίθεται από μία ποικιλία κυττάρων και ιστών και εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως η μετανάστευση και η κυτταρική προσκόλληση, ως απόρροια της αλληλεπίδρασής της με άλλα κύτταρα μέσω ιντεγκρινών και του μορίου CD44. Η OPN παράγεται και από πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, τα δένδριτικά, τα B και NK κύτταρα και συμμετέχει σε διαδικασίες όπως η επιδιόρθωση της ιστικής βλάβης και η απόκριση έναντι ξένων παθογόνων. Στα δένδριτικά κύτταρα, η OPN εμφανίζεται να ρυθμίζει την λειτουργία τους, ως εξωκυτταρική διαλυτή κυτοκίνη αλλά και ως ένα

ενδοκυτταρικό μόριο (iOPN). Έχει αποδειχθεί ότι η OPN εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό από τα ενεργοποιημένα CD4+ κύτταρα και συμμετέχει στη ρύθμιση των αποκρίσεων των Th1 και Th17, προκαλώντας την έκφραση αντίστοιχων κυτταροκινών. Επίσης, η OPN έχει εμπλακεί και σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως σε αυτοάνοσα νοσήματα και στον καρκίνο. Υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η OPN φαίνεται να δρα στη φλεγμονώδη φάση αυτών των παθολογικών διαδικασιών, ρυθμίζοντας τη στρατολόγηση και τη διήθηση των μακροφάγων και των T κυττάρων στα σημεία της φλεγμονής. Για παράδειγμα, η έκφραση της OPN σχετίζεται με τη διήθηση των T κυττάρων και των μονοκυττάρων, σε διαδικασίες όπως η σαρκοείδωση, ο σχηματισμός αθηρωματικής πλάκας και η πνευμονική ίνωση σε μοντέλα ποντικών. Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι οι ανοσολογικές ρυθμιστικές λειτουργίες της OPN έχουν αποδειχθεί σε ποικίλες φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες παθήσεις, η εμπλοκή της και ο μηχανισμός δράσης της στο καρκινικό μικροπεριβάλλον είναι ακόμη μόνο μερικώς καταναητός¹³. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του ρόλου της OPN στην ανοσολογική αντίδραση στο μικροπεριβάλλον του όγκου, σε μοντέλο μελανώματος μυός.

Τα αποτελέσματα των *in vitro* πειραμάτων, έδειξαν μειωμένη έκφραση της OPN, σε κύτταρα μελανώματος τα οποία είχαν προσλάβει τα ολιγονουκλεοτίδια shRNAs για την OPN. Μάλιστα, ένας συγκεκριμένος πληθυσμός, παρουσίασε σχεδόν τη μισή έκφραση OPN. Ο πληθυσμός αυτός χρησιμοποιήθηκε στις μετέπειτα εγχύσεις στους μύες, για την επαγωγή μελανώματος. Επιπλέον, η προσθήκη των shRNA ολιγονουκλεοτιδίων, δεν προκάλεσε το θάνατο των κυττάρων, κάτι το οποίο επιβεβαιώθηκε τόσο με μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer, όσο και με χρώση Annexin V- AAD. Το εργαλείο shRNA, αποδείχτηκε πολύ σημαντικό στην επαγόμενη μείωση της έκφρασης του γονιδίου της OPN, καθώς μας έδωσε τη δυνατότητα να ελέγχουμε τις επιπτώσεις της πρωτεΐνης στο ανοσολογικό περιβάλλον του όγκου επαγόμενα με χρήση δοξυκυκλίνης, παρέχοντας πολύτιμη γνώση για μελλοντικές εφαρμογές.

Λίγες πληροφορίες είναι γνωστές, σχετικά με την επίδραση της OPN στα Foxp3 T ρυθμιστικά κύτταρα. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, έδειξαν ότι η εξουδετέρωση της καρκινικής OPN σε καλλιέργειες B16F10/Foxp3+ κυττάρων, προκάλεσε μείωση της κατασταλτικής τους ιδιότητας, *in vitro*. Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε αρχικά αν η μείωση της έκφρασης της OPN στον όγκο, ως αποτέλεσμα της παραγωγής του shRNA για την OPN, είχε επίδραση στο ποσοστό και τη λειτουργικότητα των Foxp3+ κυττάρων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες μυών reporters για τον Foxp3, στους οποίους έγινε έγχυση της καρκινικής σειράς μελανώματος B16F10 και shRNA-OPN, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν

μία τάση μείωσης του ποσοστού των Tregs στο μικροπεριβάλλον του όγκου των μυών που εμφάνιζαν μειωμένη έκφραση της καρκινικής OPN. Επιπλέον, παρατηρήθηκε και μείωση του δείκτη ενεργοποίησης CTLA-4, κάτι που σημαίνει ότι τα Tregs στο μικροπεριβάλλον αυτών των όγκων ίσως εμφανίζουν μειωμένη δραστηριότητα. Επιπλέον, οι μύες αυτοί εμφάνισαν κατά μέσο όρο μικρότερους όγκους, σε σύγκριση με τους B16 μύες, με τις διαφορές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές. Η μικρότερη ανάπτυξη των όγκων, θα μπορούσε να συσχετισθεί με το μικρότερο ποσοστό Tregs που εντοπίζονται στο καρκινικό μικροπεριβάλλον, καθώς τα κύτταρα αυτά δρουν ανοσοκατασταλικά σε άλλους πληθυσμούς ανοσοκυττάρων, εμποδίζοντας τη δράση τους στον περιορισμό του όγκου. Παρ'όλα αυτά, το γεγονός ότι η ανάλυση των πληθυσμών, έδειξε γενικά λίγα CD3+ στο μικροπεριβάλλον, ίσως αυτό αποτελεί ένδειξη ότι τα κύτταρα εμφανίζουν μειωμένη διήθηση, επομένως και ο μικρός αριθμός των Foxp3+ οφείλεται στο μικρό αριθμό των CD3+ τα οποία διηθούν τον όγκο.

Στη συνέχεια ελέγχθηκαν οι πληθυσμοί των CD4+ και CD8+ στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Επειδή τα Tregs είναι ρυθμιστικά κύτταρα των άλλων κυττάρων του ανοσοποιητικού, θεωρήθηκε ότι έπρεπε να μελετηθούν οι πιθανές επιδράσεις τους και σε άλλους πληθυσμούς. Παρατηρήθηκε ότι στους όγκους με μειωμένη έκφραση της OPN, υπήρξε μικρή αύξηση των CD4+ και CD8+ κυττάρων, χωρίς κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τη μείωση των Tregs στο μικροπεριβάλλον των ίδιων όγκων, καθώς αυτά καταστέλλουν την ενεργοποίηση των T κυττάρων και μειώνουν την αποτελεσματικότητα των T δραστηρίων κυττάρων. Επιπλέον, παρατηρήθηκε και μία μικρή αύξηση της έκφρασης του δείκτη ενεργοποίησης των T κυττάρων, PD-1. Ο δείκτης αυτός, αποτελεί αρχικά στοιχείο ενεργοποίησης των T κυττάρων που τον εκφράζουν. Ωστόσο, η έκφρασή του μπορεί να αυξάνεται αρχικά, ώστε στη συνέχεια, να λειτουργήσει ενδεχομένως αρνητικά στη δραστηριότητα των T κυττάρων.

Όλα τα ευρήματα συμβαδίζουν με το γεγονός της μειωμένης ανάπτυξης των όγκων απουσία OPN. Γενικά, η αύξηση των T κυττάρων παρουσία OPN, έχει επιβεβαιωθεί σε *in vitro* πειράματα, αλλά και σε ζωικά μοντέλα αυτοάνοσων ασθενειών, όπως στην πολλαπλή σκλήρυνση, όπου έχειδειχθεί ότι η OPN συμμετέχει στην εξέλιξη της ασθένειας, ενισχύοντας την απόκριση T κυττάρων μέσω πολλαπλών μηχανισμών. Επιπλέον, η σχέση μεγέθους του όγκου και έκφραση OPN, έχει μελετηθεί αρκετά με ζωικά μοντέλα *in vivo*. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί μείωση του μεγέθους του όγκου σε μύες, στους οποίους είχε γίνει έγχυση καρκινικής σειράς γλοιώματος, η οποία δεν εξέφραζε OPN, σε σύγκριση με τους μύες οι οποίοι έφεραν τον όγκο αγρίου τύπου.

Τέλος, ελέγχθηκαν τα ποσοστά των NK1.1+, B220+ και CD11c+ κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου, ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές μεταξύ των αριθμών των πληθυσμών στους δύο τύπους όγκων. Επομένως, η μείωση της έκφρασής της δεν φαίνεται να επηρεάζει τη διήθηση αυτών των κυττάρων.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η OPN φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση στο καρκινικό μικροπεριβάλλον. Η επαγόμενη μείωση της έκφρασής της, δείχνει να σχετίζεται με την μείωση του αριθμού και της λειτουργίας των Tregs, των ρυθμιστικών αυτών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία καταστέλλουν την δράση άλλων κυττάρων, όπως των CD3+. Επίσης, η μείωση της έκφρασης της OPN φαίνεται να αυξάνει τον αριθμό και τη δραστικότητα των CD4+ και CD8+ κυττάρων. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν με τη μειωμένη ανάπτυξη των όγκων στο περιβάλλον μειωμένης έκφρασης της OPN. Ωστόσο, επειδή παρατηρήθηκε μικρός αριθμός CD3+ κυττάρων από την ανάλυση των πληθυσμών, είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση ενός πειράματος για την απεικόνιση της θέσης των TILs στο περιβάλλον του όγκου, με χρώση έναντι του CD45, ώστε να αποσαφηνιστεί το αν ο μειωμένος αριθμός των Tregs, είναι αποτέλεσμα της μείωσης της έκφρασης της OPN, και όχι μειωμένης διηθητικής τους ικανότητας.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kuby, J., Kindt, T. J., Osborne, B. A., & Goldsby, R. A. (2006). *Kuby Immunology: International edition (6th ed.)*. W.H. Freeman
2. Vignali, D. A. A., Collison, L. W., & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature Reviews. Immunology*, 8(7), 523–532.
3. Li, C., Jiang, P., Wei, S., Xu, X., & Wang, J. (2020). Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Molecular Cancer*, 19(1), 116.
4. O'Regan, A., & Berman, J. S. (2000). Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation: Osteopontin in cell-mediated and granulomatous inflammation. *International Journal of Experimental Pathology*, 81(6), 373–390
5. noue, M., & Shinohara, M. L. (2011). Intracellular osteopontin (iOPN) and immunity. *Immunologic Research*, 49(1–3), 160–172
6. Lamort, A.-S., Giopanou, I., Psallidas, I., & Stathopoulos, G. T. (2019). Osteopontin as a link between inflammation and cancer: The thorax in the spotlight. *Cells (Basel, Switzerland)*, 8(8), 815
7. Shevde, L. A., & Samant, R. S. (2014). Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 37, 131–141.
8. Zhao, H., Chen, Q., Alam, A., Cui, J., Suen, K. C., Soo, A. P., Eguchi, S., Gu, J., & Ma, D. (2018). The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour. *Cell Death & Disease*, 9(3).
9. Wei, R., Wong, J. P. C., & Kwok, H. F. (2017). Osteopontin -- a promising biomarker for cancer therapy. *Journal of Cancer*, 8(12), 2173–2183.
10. Hao, C., Cui, Y., Owen, S., Li, W., Cheng, S., & Jiang, W. G. (2017). Human osteopontin: Potential clinical applications in cancer (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 39(6), 1327–1337.
11. Castello, L. M., Raineri, D., Salmi, L., Clemente, N., Vaschetto, R., Quaglia, M., Garzaro, M., Gentili, S., Navalesi, P., Cantaluppi, V., Dianzani, U., Aspesi, A., & Chiocchetti, A. (2017). Osteopontin at the Crossroads of inflammation and tumor progression. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1–22.

12. Rouanne, M., Adam, J., Goubar, A., Robin, A., Ohana, C., Louvet, E., Cormier, J., Mercier, O., Dorfmueller, P., Fattal, S., de Montpreville, V. T., Lebreton, T., Dartevelle, P., Fadel, E., Besse, B., Olaussen, K. A., Auclair, C., & Soria, J.-C. (2016). Osteopontin and thrombospondin-1 play opposite roles in promoting tumor aggressiveness of primary resected non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 16(1), 483.
13. Moorman, H. R., Poschel, D., Klement, J. D., Lu, C., Redd, P. S., & Liu, K. (2020). Osteopontin: A key regulator of tumor progression and immunomodulation. *Cancers*, 12(11), 3379.
14. Caputo, S., & Bellone, M. (2018). Osteopontin and the immune system: another brick in the wall. *Cellular & Molecular Immunology*, 15(4), 405–407.
15. Pang, X., Gong, K., Zhang, X., Wu, S., Cui, Y., & Qian, B.-Z. (2019). Osteopontin as a multifaceted driver of bone metastasis and drug resistance. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 144, 235–244.
16. Iida, T., Wagatsuma, K., Hirayama, D., & Nakase, H. (2017). Is osteopontin a friend or foe of cell apoptosis in inflammatory gastrointestinal and liver diseases? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 7.
17. Cantor, H., & Shinohara, M. L. (2009). Regulation of T-helper-cell lineage development by osteopontin: the inside story. *Nature Reviews. Immunology*, 9(2), 137–141.
18. Leavenworth, J. W., Verbinen, B., Wang, Q., Shen, E., & Cantor, H. (2015). Intracellular osteopontin regulates homeostasis and function of natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(2), 494–499.
19. Shi, L., Shi, L., Wang, X., & He, J. (2018). Regulatory roles of osteopontin in production of monocyte-origin MCP-1. *Cell Transplantation*, 27(8), 1185–1194.
20. Koh, B. I., & Kang, Y. (2012). The pro-metastatic role of bone marrow-derived cells: a focus on MSCs and regulatory T cells. *EMBO Reports*, 13(5), 412–422.
21. Shurin, M. R. (2018). Osteopontin controls immunosuppression in the tumor microenvironment. *The Journal of Clinical Investigation*, 128(12), 5209–5212.
22. Botti, G., Cerrone, M., Scognamiglio, G., Anniciello, A., Ascierto, P. A., & Cantile, M. (2013). Microenvironment and tumor progression of melanoma: new therapeutic perspectives. *Journal of Immunotoxicology*, 10(3), 235–252.
23. Guarneri, C., Bevelacqua, V., Polesel, J., Falzone, L., Cannavò, P. S., Spandidos, D. A., Malaponte, G., & Libra, M. (2017). NF- κ B inhibition is

- associated with OPN/MMP-9 downregulation in cutaneous melanoma. *Oncology Reports*, 37(2), 737–746.
24. Clemente, N., Raineri, D., Cappellano, G., Boggio, E., Favero, F., Soluri, M. F., Dianzani, C., Comi, C., Dianzani, U., & Chiocchetti, A. (2016). Osteopontin bridging innate and adaptive immunity in autoimmune diseases. *Journal of Immunology Research*, 2016, 7675437
25. Frank, S. B., Schulz, V. V., & Miranti, C. K. (2017). A streamlined method for the design and cloning of shRNAs into an optimized Dox-inducible lentiviral vector. *BMC Biotechnology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0341-x>

«Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον»