

## Zárójelentés

NKFIH/OTKA K-100807

### Az agyi endotélium és a daganatos sejtek kölcsönhatásának szerepe az agyi metasztázisok kialakulásában

Az intrakraniális tumorok legnagyobb részét az agyi metasztázisok képezik. Az agyi metasztázisok nagy többsége tüdőkarcinóma (40-50%), emlődaganat (15-25%) és malignus melanóma (5-20%) eredetű. Az intenzív kutatási erőfeszítések ellenére az agyi metasztázisok kezelése eredménytelennek tekinthető, amit a betegek rövid túlélése tükröz.

Ezért a primér daganat sebészi eltávolítása mellett a metasztázisok képződésének visszaszorítása, csökkentése lehet az egyik legfontosabb terápiás stratégia. Mivel a központi idegrendszeri parenchima nem rendelkezik nyirokkeringéssel, a tumorsejtek csupán a vérárammal képesek eljutni az agyba. Ily módon a metasztázist képző sejteknek át kell jutniuk a vér-agy gáton. Annak ellenére, hogy az agyi áttétképzés folyamata óriási klinikai jelentőséggel bír, nagyon kevés adat áll rendelkezésünkre a daganatos sejtek transzendoteliális migrációjáról. A jelen pályázatba foglalt kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy milyen szerepet játszik a vér-agy gát az agyi metasztázisok képződésében: milyen úton/utakon jutnak át a metasztatizáló sejtek a vér-agy gáton, milyen proteolitikus folyamatok vesznek részt a junkcionális fehérjék lebontásában, milyen jelátviteli utak játszanak szerepet a metasztatikus sejtek vér-agy gáton történő transzmigrációjában, illetve hogyan tudjuk befolyásolni ezt a folyamatot annak érdekében, hogy csökkentsük a tumorsejtek metasztatizáló képességét.

Kutatásainkhoz elsősorban egy in vitro vér-agy gát modellt (**Wilhelm és Krizbai, Mol Pharm. 2014 Jul 7;11(7):1949-63**), illetve különböző tumorsejt vonalakat használunk. Stabil transzfekcióval előállítottunk fluoreszcens fehérjéket expresszáló tumorsejtvonalakat, így EGFP-vel jelölt B16/F10 egér melanómasejteket, illetve mCherry-vel, TdTomato-val vagy EGFP-vel jelölt 4T1 egér emlőkarcinóma sejteket, lehetővé téve a tumorsejtek megbízható in vivo és in vitro azonosítását. A fluoreszcensen jelölt sejteket élő állatban is nyomon tudjuk követni két-foton mikroszkópiával. A tumorsejteket az *a.cartotis communis*-ba beoltva, 30 perc után számos sejt volt detektálható az agyi erekben, amelyeknek a száma csökkent az első 24 órában. 48 óra után még mindig elsősorban intravaszkuláris volt a tumorsejtek elhelyezkedése. Jelenleg azt vizsgáljuk, hogy hogyan és mikor extravazálódnak a tumorsejtek in vivo.

A jelátviteli utak közül első lépésben a Rho/ROCK és a Rac szignalizáció jelentőségét szerettük volna feltárni. Ezen útvonalak az aktin-citoszkeleton befolyásolása révén jelentős

szereppel bírnak a sejtek mozgásának szabályozásában. Kimutattuk, hogy a ROCK gátlásának hatására a melanómasejtek mezenchimális fenotípust vesznek fel, amelyet elnyúlt, fibroblasztoid morfológia, aktinban gazdag protrúziók és filopódiumok jellemeznek. Ezt a melanómasejtek és az agyi endotélsejtek közötti adhézíós erő fokozódása követi, amit atomerő mikroszkópia segítségével mértünk meg. A ROCK gátlás növeli az endotélréteghez tapadó, illetve azon átvándorló melanómasejtek számát, ezzel szemben a Rac gátlása csökkenti a kitapadó sejtek számát. Irreverzibilis inhibitorok és géncsendesítés segítségével kimutattuk, hogy a melanómasejtekben (és nem az agyi endotélsejtekben) zajló Rho/ROCK szignalizáció gátlása felelős az agyi endotélrétegen keresztül megnövekedett migrációért.

A megnövekedett kitapadás ellenére a ROCK gátlása nem befolyásolta az ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 and PECAM-1 expresszióját agyi endotélsejtekben, illetve az alfa-4, -v, -L és -M, a béta-1, -2 és -3 integrin alegységek, illetve MCAM expresszióját melanómasejtekben. Azonban a heparin kezelés csökkentette a ROCK gátlás hatását, ami – tekintettel arra, hogy a heparin szelektinekhez képes kötődni – a szelektinek szerepére utal.

In vitro eredményeinket in vivo is sikerült igazolni, hiszen ROCK gátlószer alkalmazásával jelentősen nőtt a parenchimális melanóma metasztázisok száma (**Wilhelm és mtsai., Pigment Cell Melanoma Res. 2014 Jan;27(1):113-23**).

Ezzel ellentétben, az emlőkarcinóma sejtekkel végzett kísérleteink során a ROCK gátlása nem okozott transzmigráció növekedést, a Rac gátlása azonban csökkentette azt. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a daganatsejtek átjutásában vannak közös mechanizmusok, de jelentős különbségek is vannak. A PI3K gátlása csökkentette úgy a melanómasejtek, mint az emlőkarcinóma sejtek adhézíóját az agyi endotéliumhoz. A PI3K gátlása (és a Rac gátlása is) a transzmigráció korai fázisára volt hatással melanómasejtek esetén, míg emlőkarcinóma esetén a transzmigráció későbbi lépéseit befolyásolta. Mivel a PI3K gátlás nem befolyásolta az endotélium viabilitását és barrier tulajdonságait, eredményeink arra utalnak, hogy a PI3K/Akt útvonal gátlása új lehetőséget jelenthet az agyi metasztázisok kialakulásának csökkentésében. Ezen eredmények jelentőségét növeli, hogy a PI3K útvonal fokozott aktivációja kulcsfontosságú a tumorsejtek túlélésében és növekedésében, és számos olyan potenciális antitumorális terápiás szer van fejlesztés alatt, amely aPI3K útvonal különböző elemeit gátolja. Eredményeink alapján ezen gátlószernek nemcsak a primér tumorokra lehetnek hatással, hanem az agyi áttétek kialakulására is.

Statikus és dinamikus in vitro vér-agy gát modelleket alkalmazva azt is kimutattuk, hogy a melanómasejtek jobban kitapadnak az agyi endotéliumhoz, mint az emlőkarcinóma sejtek, ugyanakkor nagyobb százalékban és gyorsabban vándorolnak át. Ennek egyik

magyarázata az lehet, hogy a melanómasejtek jobban károsítják az endotélsejteket összekapcsoló szoros kapcsolatokat, mint az emlőkarcinóma sejtek (Molnár és mtsai., *Cell Adh Migr.* 2016 May 3;10(3):269-81). Feltételezéseink szerint a melanómasejtek elsősorban paracellulárisan, az endotélsejtek közötti junkciók károsítása révén vándorolnak ki az erekből, míg az emlőkarcinóma sejtek hajlamosabbak lehetnek a transzcelluláris (endotélsejteken keresztüli) transzmigrációra. Ezen hipotézisünket elektronmikroszkópiás kísérletekkel szeretnénk igazolni, kísérleteink folyamatban vannak.

Az interendoteliális junkciók különböző mértékű károsítása különböző proteolitikus folyamatok következménye lehet melanómában, illetve emlőkarcinómában. Eredményeink alapján mindkét tumorsejt típus zselatinbontó szerin proteázokat termel az agyi endotélsejtek jelenlétében. Ezen proteázok közül azonosítottuk a szeprázt melanómasejtekben, illetve a matriptázt emlőkarcinóma sejtekben. Az általunk vizsgált mindhárom melanómasejt vonalban (A2058, A375 és WM239) jelen volt a szepráz mRNS. Különösen magas szepráz expressziót mutatott az A2058 melanóma sejt vonal. Ezzel ellentétben az emlőkarcinóma sejtekben (MDA-MB-231 és MCF-7) csak minimális szepráz expressziót detektáltunk, ugyanakkor ezekben a sejtekben sikerült kimutatnunk a matriptáz jelenlétét, mely a melanómasejtekre nem volt jellemző. A továbbiakban kíváncsiak voltunk arra, hogy az endotélsejteknek milyen hatása van ezen proteázok termelődésére. Megfigyeltük, hogy a szepráz mRNS expressziója melanómasejtekben többszörösére emelkedett az agyi endotélsejtek által termelt faktorok hatására. Ezzel ellentétben az endotél-kondicionált tápfolyadék nem okozott változást az emlőkarcinóma sejtek matriptáz termelésében. Ráadásul, a melanómasejtekkel ellentétben, az emlőkarcinóma sejtek esetében a szerin proteázok gátlása nem csökkentette az agyi endotélsejtek rétegén átvándorló tumorsejtek számát (publikáció előkészületben).

A tumorsejtek transzmigrációjában az agyi endotélsejtek is aktív szerepet játszanak. Megállapítottuk, hogy úgy a melanóma-, mint az emlőkarcinóma sejtek specifikus változásokat képesek indukálni az endotélsejtekben, amelyek elősegítik átvándorlásukat a keringésből az agyszövetbe. A tumorsejtek TGF-béta szekretálása révén endoteliális-mezenchimális tranzíciót (EndMT-t) indukálnak az agyi endotélsejtekben, amely a junkciók sérülésével és mezenchimális markerek megjelenésével jár. Melanómasejtek aktivált kondicionált médiumának hatására csökkent a claudin-5 junkcionális fehérje mennyisége agyi endotélsejtekben, ugyanakkor megjelent, illetve megnőtt az alfa-aktin és a fibronectin expresszió, illetve a Smad2 és Smad3 foszforiláció. Mindezen változásokat nem tapasztaltuk TGF-béta receptor gátlószer jelenlétében. Az EndMT indukációját kimutattuk több különböző melanóma-, illetve emlőkarcinóma sejt vonal esetében. Az EndMT következményeképpen a

tumorsejtek könnyebben letapadtak az endotélrétegre, és nagyobb számban voltak képesek azon átvándorolni (**Krizbai és mtsai., PLoS One. 2015 Mar 30;10(3):e0123845**).

Megvizsgáltuk a kannabinoid receptorok szerepét is a tumorsejtek vér-agy gáton való átvándorlásában. Korábban kimutattuk, hogy a kannabinoid receptorok aktiválása csökkenti a leukocita adhéziót és transzmigrációt, így választ kerestünk arra a kérdésre, hogy ez így van-e tumorsejtek esetén is. Kimutattuk, hogy az agyi endotélsejtek a kannabinoid receptorok közül a CB1, CB2(A), GPR18 (1-es variáns) és GPR55 receptorokat expresszálják, de nem expresszálnak GPR119-et. A melanómasejtekben CB1, CB2(A), GPR18 (1-es és 2-es variáns), GPR55 és GPR119 expresszálódott. A CB2 receptornak a JWH-133 nevű specifikus agonistájával történő aktivációja csökkentette a melanómasejtek kitapadását az agyi endotélsejtekhez, és csökkentette a transzmigrációt is. Kísérleti eredményeink azt igazolják, hogy ebben a folyamatban az agyi endotélsejtek által expresszált CB2 receptornak van fontos szerepe. Eredményeink felvetik annak lehetőségét, hogy a CB2 receptor potenciális célpontja lehet a melanóma agyi metasztázisainak megelőzését célzó terápiás próbálkozásoknak (**Haskó és mtsai., Int J Mol Sci. 2014 May 8;15(5):8063-74**).

A daganatsejtek transzmigrációját csökkenteni képes molekulák vizsgálata során felismertük, hogy a *Heliopsis helianthoides* (napszem) lignánjai közül kettő (a helioxanthin és a (7E)-7,8-dehydroheliobuphthalmin) javítja az agyi endotélrétegek barrier tulajdonságait, aminek háttérében a szoros kapcsolatok fehérjéinek megnövekedett mennyisége áll. Emellett ezek a lignánok nemcsak az agyi endotélsejtek migrációját gátolták, hanem a melanómasejtekét is. Ezen túlmenően ezek a lignánok csökkentették a melanómasejtek kitapadását az agyi endotéliumhoz (**Hajdu és mtsai., J Nat Prod. 2014 Dec 26;77(12):2641-50**).

Kísérletes és klinikai megfigyelések azt mutatják, hogy szoros összefüggés van az áttétképzés és egyes gyulladáshoz vezető folyamatok között. Kísérleteink során kimutattuk, hogy az agyi endotélsejtek képesek funkcionális inflammaszómák létrehozására, amelynek eredménye a fokozott interleukin-1-béta termelés. A jelenségnek fontos szerepe lehet minden olyan központi idegrendszeri megbetegedésben, amelyhez gyulladással járó folyamatok társulnak (**Nagyósi és mtsai., J Neurochem. 2015 Nov;135(3):551-64**).

Számos adat áll rendelkezésre arról, hogy a vér-agy gát nem rendelkezik minden agyi területen azonos tulajdonságokkal. In silico in vitro és ex vivo kísérletek sorozatával kimutattuk, hogy a junctionális fehérjék (occludin, claudin-5 és  $\alpha$ -catenin) expressziója magasabb a fehérállomány kapillárisaiban, mint a szürkeállományéiban. Ezzel párhuzamosan a fehérállomány endotélsejtjei jobb barrier tulajdonsággal rendelkeznek mint a

szürkeállomány endotélsejtjei. Ezek a különbségek jelentősek lehetnek azokban a központi idegrendszeri megbetegedésekben, amelyek nem egyforma gyakorisággal érintenek egyes agyterületeket (**Nyúl-Tóth és mtsai., Am J Physiol Heart Circ Physiol.2016 Jun 1;310(11):H1702-14**).

A daganatsejtek transzmigrációjával kapcsolatos eredményeinket és az ismert irodalmi adatokat egy review cikkben foglaltuk össze (**Wilhelm és mtsai., Int J Mol Sci. 2013 Jan 11;14(1):1383-411**). Az agyi mikroereknek, illetve a vér-agy gátnak a szerepét az agyi metasztatikus kialakulásában és fenntartásában egy könyvfejezetben foglaltuk össze (**Wilhelm és Krizbai. in: Brain Mapping: An Encyclopedic Reference (Ed. A.W. Toga), vol. 3, pp. 1075-1079, Elsevier, 2015**).

Mindezekon kívül az OTKA/NKFIH támogatását megköszöntük számos vér-agy gát kutatással kapcsolatos publikációban.