A NEUROVASZKULÁRIS EGYSÉG SZEREPE AZ AGYI METASZTÁZISOK KIALAKULÁSÁBAN

Ph.D. tézis

Mészáros-Molnár Kinga

Témavezető: Wilhelm Imola M.D., Ph.D.

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola, Szegedi Tudományegyetem, Szeged

Biofizikai Intézet, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Szeged

Neurovaszkuláris Egység Kutatócsoport

Szeged

2021

1. Bevezetés

Az agyban kialakuló tumorok döntő többsége tüdő- vagy emlőkarcinómából, illetve melanómából származó áttét. Az emlőkarcinóma esetében az agyi léziók kialakulása elsősorban a tripla negatív (ösztrogén receptor (ER), progeszteron receptor (PR), humán epidermális növekedési faktor (Her2) negatív), illetve a Her2-túltermelő altípusokra jellemző. A tripla negatív emlőkarcinóma (triple negative breast cancer (TNBC)) nagyon rossz prognózissal bír, a betegek többségénél agyi metasztázisok alakulnak ki, melyek a korai elhalálozásért tehetők felelőssé. Mivel az agyi metasztázisok prognózisa kiemelkedően rossz, így a kialakulásukban résztvevő folyamatok feltárása nagy jelentőséggel bírna. A vér-agy gát (blood-brain barrier (BBB)) jelenléte, a tumorsejtek heterogenitása és plaszticitása, illetve az agyi metasztatikus sejtek egyedi molekuláris tulajdonságai mind hozzájárulnak a másodlagos agyi tumorok kedvezőtlen kimeneteléhez és a rendelkezésre álló terápiák korlátozott hatékonyságához. A neurovaszkuláris egység (neurovascular unit (NVU)) egy relatíve új fogalom az idegtudományban, mely az agyi sejtek és a közelükben lévő erek szoros kapcsolatát jellemzi. Az NVU-t a szoros kapcsolatokkal egybekötött agyi endotélsejtek, az őket borító periciták, a gliasejtek és a neuronok alkotják. A sejtes alkotóelemeken felül a bazális membrán szintén egy fontos elem, mely segít fenntartani a BBB integritását. A metasztázisképzéshez a tumorsejteknek le kell válniuk az elsődleges tumorról, be kell jutniuk a vér- vagy nyirokkeringésbe (intravazáció), el kell jutniuk a célszervbe és túl kell élniük az idegen mikrokörnyezetben. Az agyi metasztázisképzés kezdeti lépései megegyeznek a nem agyi áttétek kialakulásával, ugyanakkor a metasztatikus sejtek és az NVU komplex interakciói nagyon egyedi tulajdonságokkal ruházzák fel az agyi tumorokat.

2. Célkitűzések

Kísérleteink során szerettük volna megismerni az NVU-t alkotó sejtek válaszát a metasztatikus sejtekre. Elsősorban a pericitákra koncentráltunk, mert ezek azok a sejtek, melyeknek tumorsejtekkel való interakcióiról a legkevesebb információ áll rendelkezésünkre. Főként a TNBC sejteket vizsgáltuk, ugyanis ez a legagresszívebb és legsikeresebb áttétképző emlőkarcinóma altípus, ráadásul az agyi metasztázisok többségéért is felelős.

Korábbi vizsgálataink azt mutatták, hogy a melanómasejtek a paracelluláris útvonalat használják az agyi parenchimába történő inváziójuk során, ezért ezeket a sejteket használtuk viszonyítási alapnak.

In vitro és *in vivo* módszerekkel, továbbá humán mintákat használva az alábbi célokat tűztük ki:

- Megvizsgálni, hogy az emlőkarcinóma sejtek milyen transzmigrációs útvonalakat használnak (paracelluláris vagy transzcelluláris útvonal).
- Megérteni az agyi endotélsejtek és a TNBC sejtek interakcióit.
- Kideríteni, hogy a metasztatikus TNBC sejtek áttörik-e a *glia limitans perivascularis*-t, és feltárni a tumorsejtek és az asztrociták kapcsolataiban szerepet játszó új folyamatokat.
- Felmérni a periciták szerepét a tumorsejtek adhéziójában és proliferációjában *in vitro* és *in vivo*.
- Megvizsgálni a periciták által felszabadított inzulinszerű növekedési faktorok (insulin-like growth factor (IGF)-ek) szerepét a TNBC sejtek agyi proliferációjában.

3. Eredmények

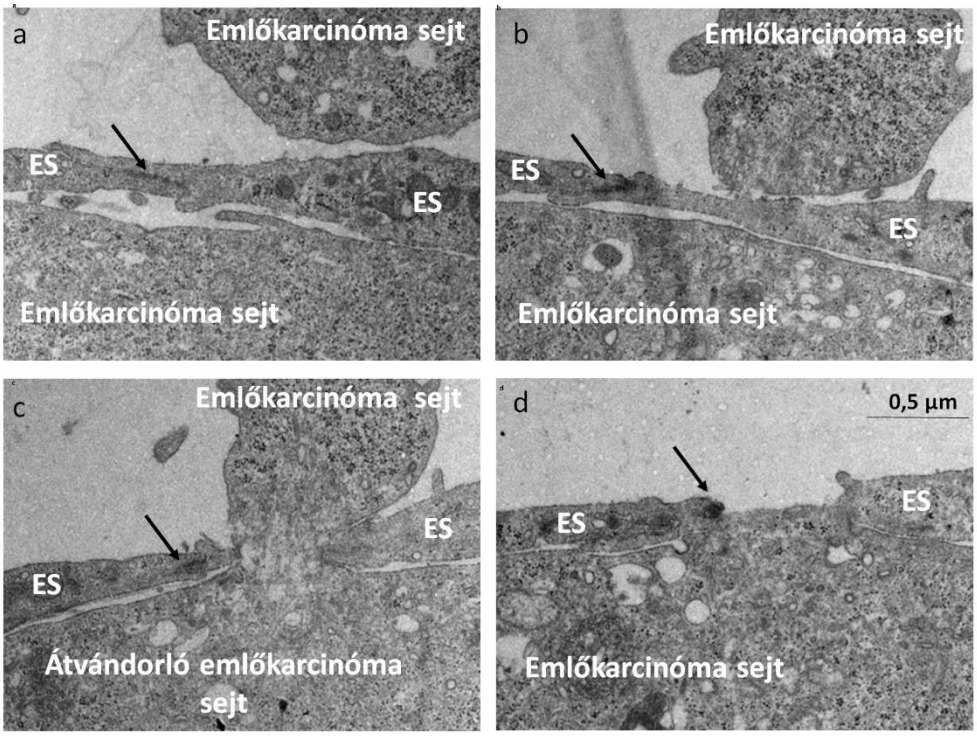
3.1. A metasztatikus tumorsejtek és az agyi endotélsejtek interakciói

Az agyi metasztázisok kialakulása nagyban függ attól, hogy hogyan képesek a tumorsejtek átvándorolni a szervezetünk legszorosabb endoteliális gátrendszerén, a BBB-n. Az agyi endotélsejtek szerepéről a tumorsejtek központi idegrendszerbe (KIR-be) történő extravazációjában kevés információ áll a rendelkezésünkre. Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy a TNBC sejtek a korábban a melanómasejteknél leírt paracelluláris útvonalat (az endotélsejtek közötti szoros kapcsolatokon keresztül) vagy a transzcelluláris (endotélsejteken keresztüli) útvonalat részesítik előnyben a átvándorlásuk során.

Először *in vitro* transzmigrációs kísérleteket végeztünk, ahol konfluens agyi endotésejtek rétegére helyeztünk melanóma- illetve emlőkarcinóma sejteket, és transzmissziós elektronmikroszkóppal összevetettük a diapedezisüket. Együtt tenyésztésük során 8 óra után számos letapadt tumorsejtet észleltünk, főként az endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok közelében. A tumorsejtek környezetében filopódium-szerű endoteliális nyúlványokat figyeltünk meg, melyek részlegesen befedték a tumorsejteket. Az emlőkarcinóma sejtek esetében számos alkalommal

láttunk egész sejtet beborító endoteliális nyúlványokat, amelyek mintha bekebeleznék a tumorsejteket.

Előzetes megfigyeléseink alapján a melanómasejtek kizárólag paracellulárisan, tehát az endotélsejtek közötti szoros és adherens kapcsolatokon keresztül jutnak át az endotélsejteken. Ezt az útvonalat az emlőkarcinóma sejtek is kihasználták, ugyanakkor esetükben megfigyeltük a transzcelluláris—endotélsejteken keresztüli—átvándorlási módot az endotélsejtek apikális oldala felől a bazolaterális oldal felé **(1. ábra)**.



1. ábra: Az emlőkarcinóma sejtek transzcelluláris migrációja. Tripla negatív emlőkarcinóma sejteket helyeztünk konfluens primer patkány endotélsejtekre, majd a tenyészeteket 8 óra elteltével fixáltuk. Az ábrán transzmissziós elektronmikroszkópos sorozatképek láthatók egy átvándorló emlőkarcinóma sejtről. A nyilak az endotélsejtek közötti junkciókat jelölik. ES = endotélsejt

In vitro eredményeinkkel megegyezett az a megfigyelés, miszerint az emlőkarcinóma sejtek *in vivo* is transzcellulárisan vándoroltak át a tumorsejtekkel beoltott egerek agyi kapillárisain. Kimutattuk, hogy az emlőkarcinóma sejtek napokig az agyi mikroerekben maradtak és az átvándorlásuk közben az interendoteliális junkciókat sértetlenül hagyták, melyet a tumorsejt szomszédságában lévő folytonos klaudin-5 festés jelzett.

A TNBC sejtek átvándorlása során számos, endotélsejtben végbemenő változást figyeltünk meg, többek között *in vitro* apikális nyúlványképződéseket és a transzmigráció kezdeti szakaszában létrejövő klaudin-5 immunpozitív membrán

blebeket. Továbbá, miután 24-48 órát töltöttek az agyi mikroerekben, az emlőkarcinóma sejtek érösszehúzódást és endoteliális dugó kialakulását okozták. Ezáltal a tumorsejtek az elakadási helyükhöz viszonyított mindkét irányban elszigetelődtek a keringéstől. Konfokális mikroszkópiával kimutattuk, hogy a kialakult dugókat az endotélsejtek sejtmagja hozta létre, amelyek az érlumenbe türemkedtek be. Érdekes módon ezek a dugók nem sejtosztódás, hanem endoteliális átrendeződés révén keletkeztek. A tumorsejtek vérkeringéstől való izolálásának számos következménye lehet a metasztatikus folyamatokra, amelyek elsősorban a tumorsejtek védelmét biztosítják egyrészt a nyíróerőkkel, másrészt és az immunsejtekkel szemben.

A tumorsejtek endotéliumon való átvándorlása gyakran együtt járt a metasztatikus sejtek és/vagy az endotélsejtek hólyagosodásával. Ez a folyamat a néhány extraluminális endoteliális bleb megjelenésétől egészen az intenzív vakuolarizációig terjedt, és ezek a folyamatok minden esetben a tumorsejt jelenlétéhez kötődtek. Érdekes módon még a súlyos endoteliális hólyagosodás is visszafordítható állapotnak bizonyult, és 1-2 nappal később, miután a tumorsejt befejezte az átvándorlását, az erek teljesen visszanyerték eredeti szerkezetüket.

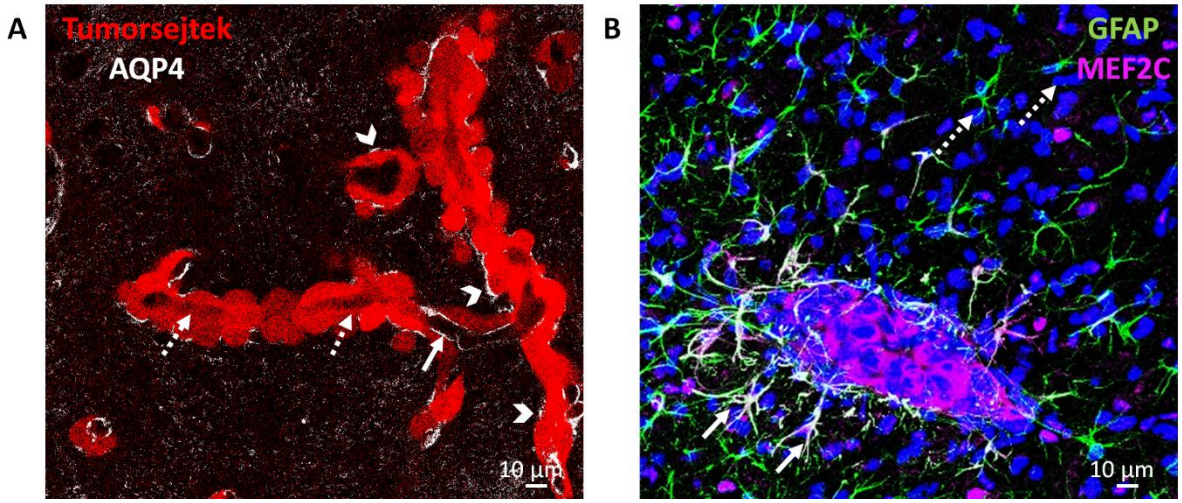
Azt is megfigyeltük, hogy az endoteliális dugók kialakulásában résztvevő endotélsejtek N-kadherin pozitívak voltak, míg a többi endotélsejt és a TNBC sejtek is mind N-kadherin negatívak voltak. Ezzel ellentétben melanómasejtek esetében az N-kadherin részt vett az endotélsejtekhez való kapcsolódásukban mind az agyban, mind a perifférián. Hasonlóképpen, melanómasejtek és agyi endotélsejtek tenyészetében fokozódott az N-kadherin expressziója a melanóma-melanóma és melanóma-endotélsejt kontaktusoknál. Ugyanakkor nem találtunk detektálható mennyiségű N-kadherint az emlőkarcinóma sejtek és endotélsejtek vegyes tenyészetében. Mindez arra utal, hogy az N-kadherin nem vesz közvetlenül részt az emlőkarcinóma sejtek átvándorlásában az agyi endotélsejtek rétegén.

3.2. A metasztatikus tumorsejtek és az asztrociták közötti kölcsönhatások

Az endotélsejteken kívül az asztrociták szintén aktív résztvevői a tumorsejtekre adott válaszreakcióknak. Az azonban nem volt ismert, hogy az immunsejtekhez hasonlóan az emlőkarcinóma sejtek képesek-e áthatolni az asztrocita végtalpak által alkotott *glia limitans perivascularis*-on, vagy azonnal letaszítják őket az erekről, mihelyst átjutottak az endotélsejteken. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy 4T1-tdTomato TNBC sejtekkel oltott egerekben az

emlőkarcinóma sejtek az endotéliumon való átjutásuk után rögtön áttörtek a *glia limitans perivascularis*-on is. Ezt bizonyította az aquaporin-4 (AQP4) immunpozitív asztrocita végtalpak jelenléte az endotélsejtek és a tumorsejtek között. Később azonban, a metasztatikus léziók növekedésével a tumorsejtek kiszorították az asztrocitákat a tumormasszából **(2. A ábra)**. Ezzel egyidőben a reaktív asztrociták visszahúzták a végtalpaikat az erekről, majd beborították vele a tumorok felszínét **(2. A ábra)**.

A metasztázisok kialakulása során a peritumorális asztrociták reaktív fenotípusra váltanak. A TNBC agyi metasztázisainak korai predikciójára irányuló korábbi biomarker kutatásunk során azonosítottunk egy új, asztrocita aktivációhoz köthető molekulajelöltet, a myocyte enhancer factor 2C nevű transzkripciós faktort (MEF2C). Ehhez TNBC sejtekkel beoltott egerek vérplazmájából új generációs szekvenálást végeztünk és azt találtuk, hogy a miR-802-5p és a miR-194-5p szintjének csökkenése az áttétképzés egy korai eseménye. Megvizsgálva ezen miRNS-ek célfehérjéit kimutattuk, hogy a MEF2C mindkét miRNS célpontja lehet, melyet negatívan szabályoznak. Modellünkben a tumorsejteken kívül kizárólag a peritumorális asztrocitákban figyeltük meg a MEF2C expresszióját, de a tumortól távol eső gliasejtekben nem, ami arra utal, hogy a MEF2C-nek fontos szerepe lehet a tumorsejtek és az asztrociták közötti kommunikációban **(2. B ábra)**.



2. ábra: Az emlőkarcinóma sejtek interakciói az asztrocitákkal. (A) Az AQP4-pozitív asztrocita végtalpak fokozatosan visszahúzódnak az erekről a tumormassza felszínére. Tdtomato-4T1 egér TNBC sejteket (piros) injektáltunk egerekbe. Az ábrán konfokális mikroszkóppal készített z-projekció látható 10 nappal a tumorsejtek beadását követően egér agyban. A nyilak az ereket körülvevő AQP4-et jelölik, a szaggatott nyilak az AQP4 hiányát, míg a nyílhegyek a tumor felszínén lévő AQP4-et mutatják. **(B)** MEF2C expresszió a peritumorális asztrocitákban. Az ábrán konfokális mikroszkóppal készített z-projekció látható 4T1 tumorsejttel beoltott egerek agyában. A nyilak MEF2C-pozitív peritumorális asztrocitákat jelölnek, míg a szaggatott nyilak távoli, MEF2C-negatív asztrocitákat.

3.3. A metasztatikus tumorsejtek és az agyi periciták *in vivo* és *in vitro* direkt interakciói

Széles körben ismert tény, hogy miután a tumorsejtek átjutnak a BBB-n, interakcióba lépnek az NVU sejtjeivel, amelyek közül a periciták szerepéről tudunk a legkevesebbet. Arra a megfigyelésünkre alapozva, miszerint a tumormasszában elhelyezkedő endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok megmaradnak akkor is, amikor az asztrocita végtalpak már visszahúzódtak, azt feltételeztük, hogy a periciták erős kapcsolatban maradnak az endotélsejtekkel. Ezt támasztja alá, hogy a TNBC sejtekkel beoltott egerek agyában 7 nap után vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor β (platelet derived growth factor receptor β (PDGFRβ))-pozitív pericitákat figyeltünk meg a metasztatikus léziókban lévő kapillárisokon. Humán TNBC agyi metasztázisokban a PDGFRβ-pozitív perivaszkuláris sejtek egy vagy több rétegben határolták a sztrómális ereket. Ezenkívül találtunk olyan pericitaszerű sejteket, melyek expresszálták a pericita specifikus markereket (a PDGFRβ-t és CD13-at), de ezek a sejtek nem az ereken fordultak elő, hanem főként a nekrotikus zónák közelében, a tumorsejtek között helyezkedtek el.

Mindezek alapján azt feltételeztük, hogy a tumorsejtek és a periciták közötti direkt kapcsolatok fontos szerepet játszhatnak az agyi metasztázisok kialakulásában. Ezért elsőként egy olyan modellt dolgoztunk ki, melynek segítségével figyelemmel tudtuk követni a periciták és a metasztatikus sejtek közötti kontaktusokat. Ehhez periciták vagy más NVU sejtek tenyészeteihez adtunk tumorsejteket. Az emlőkarcinóma sejtek szinte kizárólag a pericitákra tapadtak ki, miközben szabadon hagyták a sejtmentes felületeket a sejttenyésztő felszín bevonatától függetlenül. Ezzel szemben, amikor az emőkarcinóma sejteket endotélsejtekre szélesztettük, akkor elsősorban az endotélsejtek közötti szabad területekre tapadtak le, míg az asztrociták esetében a direkt kontaktusok száma magasabb volt, mint az endotélsejteknél, de kevésbé kifejezett, mint a pericitáknál. Ezzel ellentétben a melanómasejtek legnagyobb számban a szabad területekre tapadtak le, mely független volt attól, hogy milyen sejttípussal voltak együtt tenyésztve.

Mindezek után megvizsgáltuk, hogy az emlőkarcinóma sejtek képesek-e az agyi periciták felé vándorolni. *In vitro* modellünkben a karcinóma sejtek sokkal aktívabban vándoroltak a periciták felé, szignifikánsan nagyobb távolságot megtéve, mint az endotélsejtek felé. Amikor jóval nagyobb szabad területet, több mint 1 cm-t hagytunk a tumorsejtek és a periciták, illetve endotélsejtek között, a

tumorsejtek akkor is a periciták felé vették az irányt. Néhány nap elteltével számos, nagy emlőkarcinóma sejtkolóniát lehetett megfigyelni a periciták között. Ezzel ellentétben az endotélsejtek irányában csak szórványosan jelent meg néhány tumorsejt. Ezen eredmények alapján úgy gondoltuk, hogy a periciták szekretált faktorok felszabadításán keresztül kommunikálhatnak a tumorsejtekkel. Ezért tenyésztőmédiumot kondicionáltunk agyi pericitákon, hogy megvizsgálhassuk ezen faktorok neoplasztikus sejtekre gyakorolt hatását.

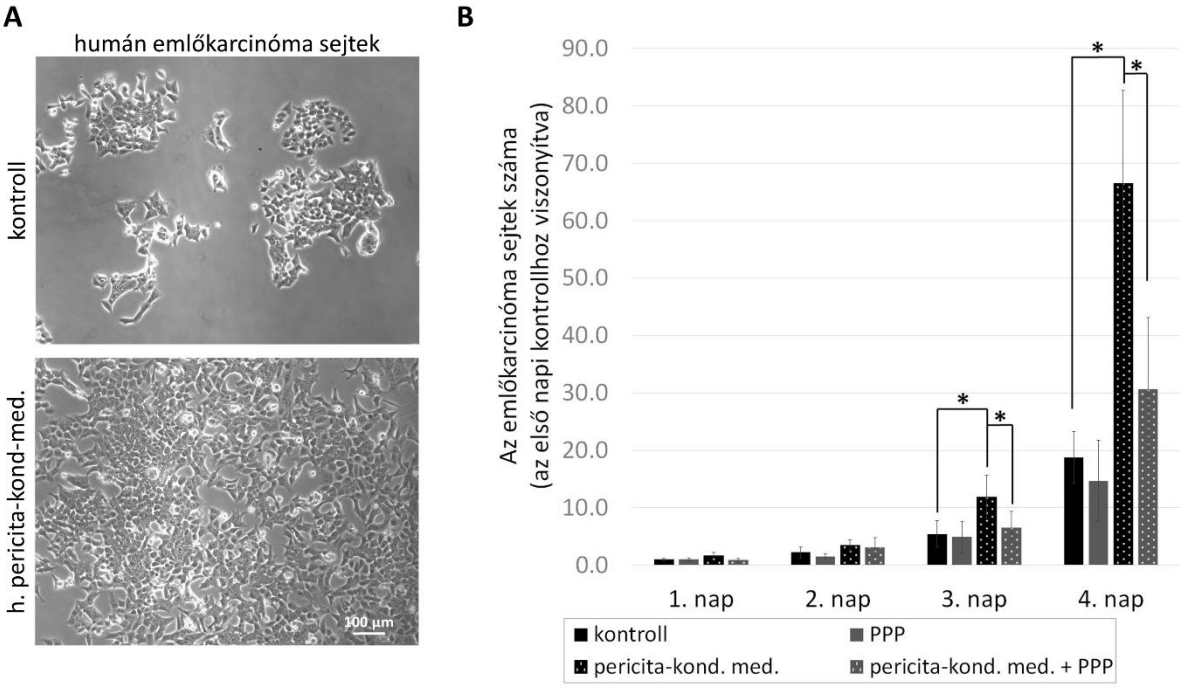
3.4. A periciták hatása a tumorsejtek adhéziójára

Elsőként olyan adhéziós vizsgálatokat végeztünk, ahol emlőkarcinóma és melanómasejteket helyeztünk kontroll, illetve pericita-kondicionált médiumba. A pericita-kondicionált médiumban mind a humán, mind az egér tumorsejtek sokkal gyorsabban tapadtak le és nyúltak ki, mint a kontroll tápfolyadékban, és ez a hatás nagyon erőteljes és szignifikáns volt.

A pericita-kondicionált médium nagyfokú adhézió fokozó hatására magyarázatot adhat az, hogy a periciták az asztrocitákhoz hasonlóan nagy mennyiségű IV-es típusú kollagént és fibronektint szabadítanak fel. Ezenfelül a foszforilált fokális adhéziós kináz és Src szintje is megnövekedett a pericita-kondicionált médiumnak kitett tumorsejtekben, ezzel is jelezve az adhézió fokozódását, mely hatás kivédhető volt a specifikus Src inhibitor, a PP2 használatával.

3.5. A periciták hatása a tumorsejtek proliferációjára

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy a periciták hogyan befolyásolják a tumorsejtek szaporodását. Ehhez nyomon követtük a periciták proliferációját a periciták által felszabadított faktorok hiányában, illetve jelenlétében. Négy nap elteltével szignifikánsan több emlőkarcinóma sejt volt a pericita-kondicionált médiumban, mint a kontrollban **(3. ábra)**. Ez mind humán, mind egér modellben megfigyelhető volt. Ezzel szemben a melanómasejtek szaporodására nem voltak hatással a periciták által szekretált faktorok.



3. ábra: A periciták által felszabadított faktorok hatása a tumorsejtek proliferációjára. (A) Reprezentatív fáziskontraszt képek a tumorsejtekről kontroll illetve kondicionált médiumban 4 nap elteltével. **(B)** MDA sejtek növekedése pericita kontroll illetve kondicionált médiumban PPP hiányában és jelenlétében. Fáziskontraszt képeken végzett sejtszámolás. N = 5, átlag ± SD, * P < 0,05 (ANOVA és Bonferroni post-hoc teszt).

Ezzel együtt a ciklin D1 expressziója is megemelkedett a pericita-kondicionált médiummal kezelt humán és egér emlőkarcinóma sejtekben, de a melanómasejtekben nem.

Azt is megfigyeltük, hogy amellett, hogy megnőtt a TNBC sejtek proliferációja a pericita-kondicionált médiumban, a sejtek disszociáltabbak lettek, vagyis kevesebb kapcsolat maradt közöttük. Ezzel egyidőben az E-kadherin expresszió is szignifikánsan csökkent ezekben a sejtekben. Ez azt jelzi, hogy azon felül, hogy a periciták elősegítik a felszínhez való adhéziót, képesek gátolni a sejtek közötti adhéziókat és az E-kadherin expresszióját, így az emlőkarcinóma sejtek migrációsan aktív, invazív fenotípust vehetnek fel, mely az epiteliális fenotípusról a mezenchimálisra váltó sejtekre jellemző.

3.6. Az agyi periciták által felszabadított IGF-ek szerepe a tumorsejtek proliferációjában

Ahhoz, hogy meghatározhassuk, hogy mely pericita eredetű faktor felelős a tumorsejtek nagy mértékű proliferációjáért, online adatbázis elemzést végeztünk. A http://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html adatbázis alapján az

Igf2 mRNS expressziója az NVU sejtjei közül a pericitákban volt a legmagasabb. A periciták Igf2 mRNS expressziója egér agyban 487,25-ször magasabb volt az endotélsejtekéhez képest, és 86,62-szer nagyobb, mint asztrocitákban. Az általunk használt humán és egér pericitákban nem csak az Igf2, hanem az Igf1 mRNS is jelen volt. Ugyanakkor az Igf2 szintje magasabb volt, mint az Igf1 szintje, és ez az arány kifejezettebb volt a humán sejtekben. Az egér asztrociták nagyon kevés Igf1 és Igf2 mRNS-t fejeztek ki, míg a humán asztrocitákban magasabb volt a szintjük, mint a tumorsejtekben, de még így is kevesebb, mint a pericitákban.

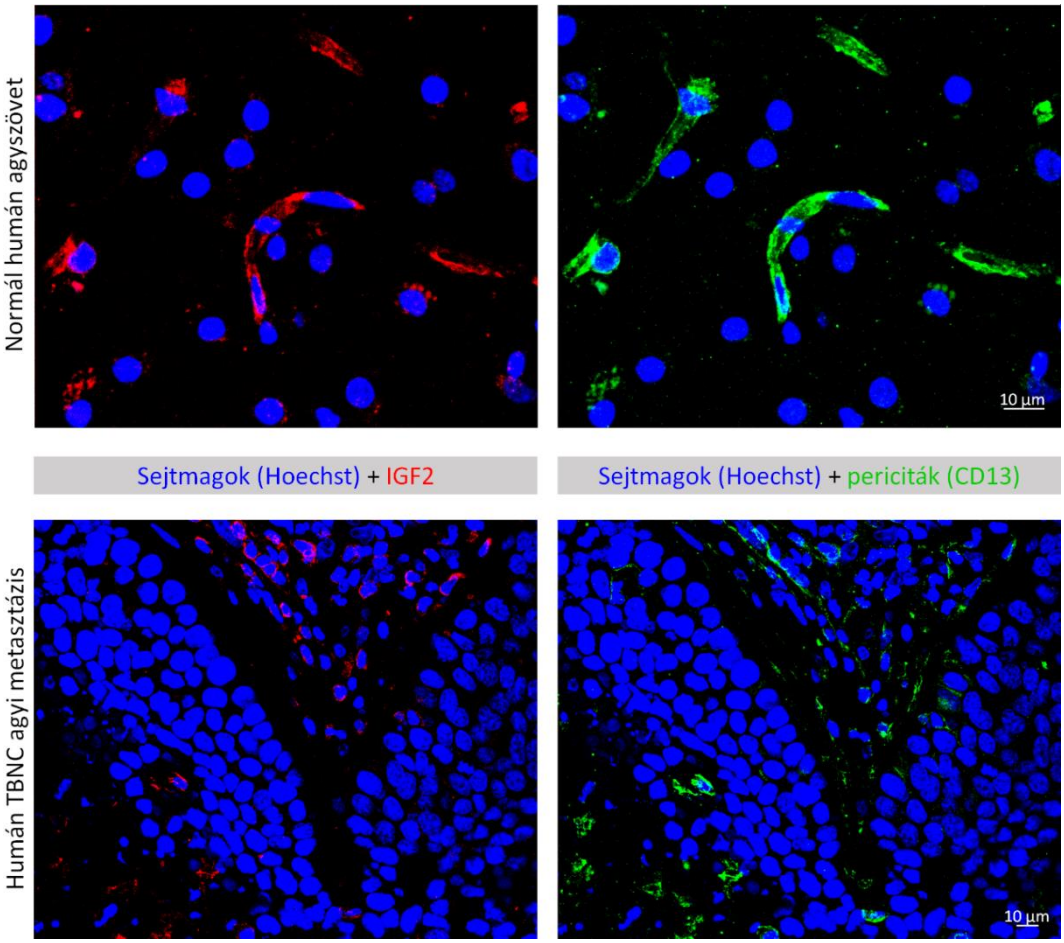
Ezek az adatok később fehérje szinten is bizonyítást nyertek ELISA használatával. A humán periciták több, mint 1000 pg/ml IGF2-t szekretáltak, ami100000 sejtre nézve 100 pg-nak felelt meg, míg az asztrociták szignifikánsan kevesebbet (< 200 pg/ml, < 40 pg/100000 sejt). Az IGF1 szint mindkét sejttípusnál az 1,95 ng/ml-es detekciós küszöb alatt volt. Immunfluoreszcens festéssel kimutattuk, hogy egészséges humán agyban az IGF1 és IGF2 fehérje jelen van a CD13-pozitív pericitákban. Az IGF1 megjelent néhány CD13-negatív sejtben is, valószínűleg az asztrocita végtalpakban, míg az IGF2 kizárólag pericitákban expresszálódott. Humán TNBC agyi metasztatikus mintákban az IGF1 és IGF2 expresszió a perivaszkuláris sejtekre korlátozódott **(4. ábra)**.

Az 1-es típusú inzulin-szerű növekedési faktor receptorhoz (IGF1R) kötődve az IGF-ek szerepet játszanak a normál és a neoplasztikus sejtek túlélésében és szaporodásában. Ez alapján megvizsgáltuk, hogy a periciták által szekretált IGF-ek felelősek-e az emlőkarcinóma sejtek megnövekedett proliferációjáért. Ehhez egy szelektív IGF1R inhibitort, a pikropodofillint (PPP) használtuk, mely blokkolja az IGF1R-t, viszont az inzulin receptorra nincs hatással, és rágcsálóknál alacsony toxicitást mutat. Amennyiben a pericita-kondicionált médiumhoz PPP-t adtunk, az visszaszorította az emlőkarcinóma sejtek proliferációját majdnem kontroll szintre humán és egér modellben **(3. B ábra)**.

A periciták által szekretált IGF2 proliferáció fokozó szerepének további igazolása céljából csendesítettük az Ifg2 gént a pericitákban, majd az ezekről a sejtekről gyűjtött, kondicionált médiumot használtuk a proliferációs modellünkben. Az Igf2 csendesített pericitákról származó kondicionált médiumban az emlőkarcinóma sejtek proliferációja a kontroll szinthez, illetve a PPP kezelt szinthez hasonló mértékű volt.

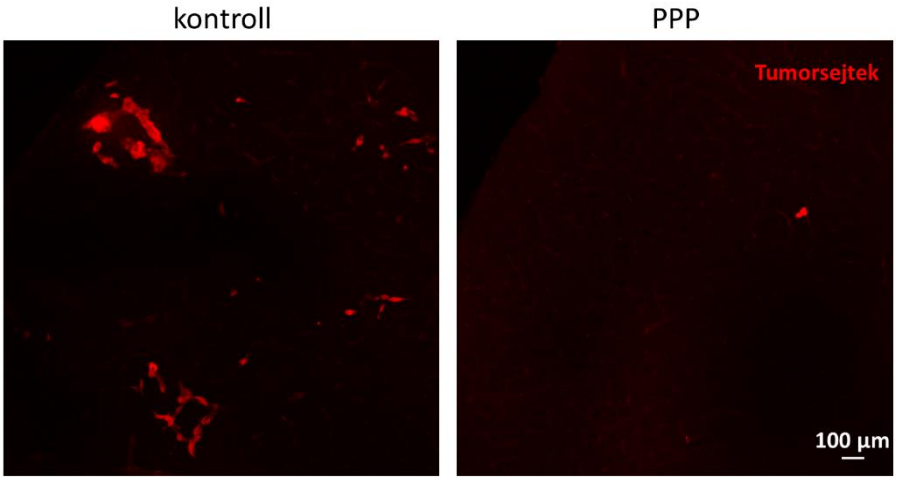
Az emlőkarcinóma sejtekkel ellentétben a melanómasejtek proliferációjában nem okozott változást a PPP. A melanómasejtek IGF-ekkel szembeni

rezisztenciája részben az Igf2R expresszióban való különbséggel magyarázható, hiszen az IGF2R-hoz kötődve az IGF2 lizoszómálisan lebomlik.



4. ábra: Az IGF2 eloszlása normál és metasztatikus humán agymintákon. (A) Reprezentatív immunfluoreszcens képek az IGF2 és CD13 kolokalizációjáról egészséges humán agyszövetben. (B) Reprezentatív immunfluoreszcens képek az IGF2 és CD13 kolokalizációjáról humán TNBC agyi metasztázisban.

Mivel a PPP átjut a BBB-n, így *in vivo* is meg tudtuk vizsgálni az IGF-ek hatását a TNBC agyi metasztázis képzésében. A PPP agyi metasztatikus sejtek proliferációjára gyakorolt hatásának teszteléséhez, a tumorsejtek extravazációjának befejeztével (a tumorsejtek beoltását követő 5. és 6. napon) került sor az egerek PPP kezelésére. Az eredményeink tisztán mutatják, hogy a PPP gátolta az emlőkarcinóma sejtek proliferációját egér agyban. A tumorsejtekkel kitöltött területek szignifikánsan, több, mint 2,5-szer kisebbek voltak az IGF1R inhibitorral kezelt állatokban, mint a kontrollokban **(5. ábra)**.



5. ábra: Az IGF szerepe az emlőkarcinóma sejtek proliferációjában *in vivo*. Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek kontroll és PPP-vel kezelt állatok parietális agyi régiójából 8 nappal a tdTomato-4T1 sejtek beoltását követően.

Az IGF szignalizáció részt vesz a normál és a rákos sejtek növekedésében és túlélésében. Az IGF1R megnövekedett expressziója és aktivitása az emlőkarcinóma mellett számos más tumortípusban is megfigyelhető, mely hozzájárul a fokozott proliferációhoz, áttétképzéshez és a kemoterápiával szembeni rezisztenciához. Ezért az IGF tengely gátlására irányuló kezelések előtérbe kerültek a tumoros megbetegedések terápiájában. Mivel azonban számos klinikai vizsgálat kudarcot vallott, és másokat a tesztelt vegyületek toxicitása vagy alacsony hatékonysága miatt félbe kellett szakítani, sürgetővé vált a prediktív biomarkerek azonosítása a potenciálisan reagáló betegcsoportok meghatározására. Mindazonáltal az agyi metasztázisokat nem vizsgálták kifejezetten az IGF2-t célzó klinikai vizsgálatokban, bár kísérleti modellekben kimutatták, hogy az IGF1R gátlása csökkenti az emlőrák agyi áttétek kialakulását. Ugyanakkor az I. fázisú klinikai vizsgálatok primer agydaganatokban szenvedő betegeknél azt mutatták, hogy a PPP (AXL1717) jól tolerálható és nincsenek jelentős mellékhatásai.

Vizsgálataink az IGF-tengely gátlásának fontosságát igazolják, és felvetik annak a lehetőségét, hogy ez potenciális terápiás stratégiák alapjait képezheti agyi áttétekben. Ez a felfedezés azért tűnik különösen ígéretesnek, mert létezik egy olyan vegyület (PPP/AXL1717), amely az IGF1R-on magas szelektivitással rendelkezik, és amelynek nemcsak alacsony a toxicitása, de a BBB-n is átjut. Ez nagy előny, mivel a BBB jelenti a legnagyobb akadályt a KIR-t célzó gyógyszerek kifejlesztésében.

4. Összefoglalás

Az agyi metasztázisok olyan, az életet veszélyeztető rosszindulatú elváltozások, melyek melanómából, emlőkarcinómából és egyéb típusú tumorokból származhatnak. Az agyi áttétek rossz kimenetele nagyban függ az NVU sejtek által kialakított mikrokörnyezettől, ám a másodlagos tumorok KIR-ben való kialakulásáról keveset tudni. *In vivo* és *in vitro* módszerekkel, továbbá humán mintákat felhasználva olyan új mechanizmusokat írtunk le az agyi metasztázisokban, amelyekben az endotélsejtek, az asztrociták és a pericíták is egyértelműen érintettek.

Eredményeink azt mutatják, hogy az endotélsejtek aktívan részt vesznek a tumorsejtek agyba történő vándorlásában. Egyrészt az agyi endotélsejtek filopodium-szerű nyúlványokkal veszik körül a tumorsejteket. Másrészt az endotélsejtek a hajszálerekben elakadt, még nem átvándorolt tumorsejteket elzárják (védik) a keringéstől. Ugyancsak bizonyítottuk, hogy a melanómasejtek kizárólag a paracelluláris transzmigrációs útvonalat választják, míg az emlőkarcinóma sejtek képesek transzcellulárisan is átjutni az endotélsejteken.

Miután átjutottak az endotéliumon, a karcinóma sejtek áttörik az asztrocita végtalpak által alkotott *glia limitans perivascularis*-t. Amint a tumorsejtek elkezdenek osztódni az agyi parenchimában, bekebelezik a már meglévő ereket az endotélsejtekkel és a pericitákkal együtt, miközben az asztrocita végtalpakat letaszítják az erekről a tumor felszínére.

Az emlőkarcinóma agyi metasztázisképzésének kezdeti szakaszában a keringő miR-802 és miR-194 időfüggő deregulációját figyeltük meg. Ezzel egyidőben, mindkét miRNS targetjének, a MEF2C-nek az emelkedett expresszióját tapasztaltuk a tumorsejtekben és a peri-tumorális asztrocitákban is, mely szerepet játszhat a metasztatikus sejtek és a gliák kommunikációjában.

Elsőként bizonyítottuk azt is, hogy a pericíták erőteljes pro-metasztatikus hatással rendelkeznek. A pericíták számottevő kemoattraktáns hatásának köszönhetően az emlőkarcinóma sejtek aktívan vándorolnak irányukba, és direkt kapcsolatokat alakítanak ki velük. Azáltal, hogy nagy mennyiségű extracelluláris mátrix fehérjét termelnek, a pericíták képesek mind a melanóma-, mind az emlőkarcinóma sejtek adhézióját fokozni, amely fontos tényező lehet a tumorsejtek kizárólagos perivaszkuláris növekedésében. Ezenfelül igazoltuk, hogy a pericíták által felszabadított IGF2 szignifikánsan növeli a mellráksejtek proliferációját, míg a melanómasejtek szaporodására nincs hatással.

Publikációs lista

A doktori értekezés alapját képező publikációk

I. **Molnár, K.**, Mészáros, Á., Fazakas C., Kozma, M., Győri, F., Reisz, Z., Tiszlavicz, L., Farkas, A.E., Nyúl-Tóth, Á., Haskó, J., Krizbai, I.A., Wilhelm, I. (2020) Pericyte-secreted IGF2 promotes breast cancer brain metastasis formation. Mol Oncol. 2020 Sep; 14(9): 2040-2057. (IF2019 = 6.574, Journal Ranking: D1)

II. Sereno, M., Haskó, J., **Molnár, K.**, Medina, S.J., Reisz, Z., Malhó, R., Videira, M., Tiszlavicz, L., Booth, S.A., Wilhelm, I., Krizbai, I.A., Brito MA. (2020) Downregulation of circulating miR 802-5p and miR 194-5p and upregulation of brain MEF2C along breast cancer brain metastasization. Mol Oncol. 2020 Mar;14(3):520-538. (IF2019 = 6.574, Journal Ranking: D1)

III. Haskó, J., Fazakas C., **Molnár, K.**, Mészáros, Á., Patai, R., Szabó, G., Erdélyi, F., Nyúl-Tóth, Á., Győri, F., Kozma, M., Farkas, A.E., Krizbai, I.A., Wilhelm, I. (2019) Response of the neurovascular unit to brain metastatic breast cancer cells. Acta Neuropathol Commun. 2019 Aug 19;7(1):133. (IF = 6.270, Journal Ranking: D1)

IV. Herman, H., Fazakas C., Haskó, J., **Molnár, K.**, Mészáros, Á., Nyúl-Tóth, Á., Szabó, G., Erdélyi, F., Ardelean, A., Hermenean, A., Krizbai, I.A., Wilhelm, I. (2019) Paracellular and transcellular migration of metastatic cells through the cerebral endothelium. J Cell Mol Med. 2019 Apr;23(4):2619-2631. (IF = 4.486, Journal Ranking: Q1)

V. Wilhelm, I., Fazakas C., **Molnár, K.**, Végh, A.G., Haskó, J., Krizbai, I.A. (2018) Foe or friend? Janus-faces of the neurovascular unit in the formation of brain metastases. J Cereb Blood Flow Metab. 2018 Apr;38(4):563-587. (IF = 6.040, Journal Ranking: D1)

Egyéb publikációk

1. **Molnár, K.**; Lőrinczi, B.; Fazakas, C.; Szatmári, I.; Fülöp, F.; Kmetykó, N.; Berkecz, R.; Ilisz, I.; Krizbai, I.A.; Wilhelm, I.; Vécsei, L. (2021) SZR-104, a Novel Kynurenic Acid Analogue with High Permeability through the Blood–Brain Barrier. Pharmaceutics 2021, 13, 61. (IF2019 = 4.421, Journal Ranking: Q1)
2. Nógrádi, B., Nyúl-Tóth, Á., Kozma, M., **Molnár, K.**, Patai, R., Siklós, L., Wilhelm, I., Krizbai, I.A. (2020) Upregulation of Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-, LRR- and Pyrin Domain-Containing Protein 3

in Motoneurons Following Peripheral Nerve Injury in Mice. Front Pharmacol. 2020 Nov 26; 11:584184. (IF2019 = 4.225, Journal Ranking: Q1)

3. Grexa, I., Fekete, T., Molnár, J., **Molnár, K.**, Vizsnyiczai, G., Ormos, P., Kelemen, L. (2020) Single-cell elasticity measurement with an optically actuated microrobot. Micromachines (Basel). 2020 Sep 22;11(9):E882. (IF2019 = 2.523, Journal Ranking: Q2)
4. Mészáros, Á., **Molnár, K.**, Nógrádi, B., Hernádi, Z., Nyúl-Tóth, Á., Wilhelm, I., Krizbai, I.A. (2020) Neurovascular inflammaging in health and disease. Cells. 2020 Jul 4;9(7):1614. (IF2019 = 4.366, Journal Ranking: Q2)
5. Nyúl-Tóth, Á., Kozma, M., Nagyőszi, P., Nagy, K., Fazakas C., Haskó, J., **Molnár, K.**, Farkas, A.E., Végh, A.G., Váró, G., Galajda, P., Wilhelm, I., Krizbai, I.A. (2017) Expression of pattern recognition receptors and activation of the non-canonical inflammasome pathway in brain pericytes. Brain Behav Immun. 2017 Aug;64:220-231. (IF = 6.306, Journal Ranking: D1)
6. Török, N., **Molnár, K.**, Füvesi, J., Karácsony, M., Zsiros, V., Fejes-Szabó, A., Fiatal, S., Ádány, R., Somogyvári, F., Stojiljković, O., Vécsei, L., Bencsik K. (2015) Chemokine receptor V Δ32 deletion in multiple sclerosis patients in Csongrád County in Hungary and the North-Bácska region in Serbia. Hum Immunol. 2015 Jan;76(1):59-64. (IF = 2.127, Journal Ranking: Q1)

Kéziratok elbírálás alatt

1. Figueira, I., Galego, S., Custódio-Santos, T., Vicente, R., **Molnár, K.**, Haskó, J., Malhó, R., Videira, M., Wilhelm, I., Krizbai, I., Brito, M.A. Picturing breast cancer brain metastasis development to unravel molecular players and cellular crosstalk.
2. Fazakas, C., Kozma, M., **Molnár, K.**, Kincses, A., Dér, A., Fejér, A., Horváth, B., Wilhelm, I., Krizbai, IA., Végh, AG. Breast adenocarcinoma-derived exosomes lower first-contact de-adhesion strength of adenocarcinoma cells to brain endothelial layer.
3. Török, N., Maszlag-Török, R., **Molnár, K.**, Szolnoki, Z., Somogyvári, F., Boda, K., Tanaka, M., Klivényi, P., Vécsei, L. Single nucleotide polymorphisms of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 influenced the age onset of Parkinson's disease.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Wilhelm Imolának a szakmai irányításáért és támogatásáért az M.Sc. és Ph.D. tanulmányaim során. Köszönettel tartozom Dr. Krizbai Istvánnak, a Neurovaszkuláris egység kutatócsoport vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított számomra a tanuláshoz és a kutatómunkám elvégzéséhez.

Köszönetet mondok a Biofizikai Intézet minden dolgozójának a barátságos légkörért, amelyben a munkámat végezhettem.

Külön köszönettel tartozom kollégáimnak, Dr. Fazakas Csillának a mindennapi beszélgetésekért és bátorításáért, Mészáros Ádámnak a tumorsejtek injektálásában nyújtott segítségéért és Dr. Haskó Jánosnak az intravitális mikroszkópiában való szakértelméért. Hálás vagyok a Neurovaszkuláris egység kutatócsoport minden egykori és jelenlegi munkatársának, Kozma Mihálynak, Dr. Farkas Attilának, Dr. Nyúl-Tóth Ádámnak, Dudás Tamásnak és Győri Fanninak a segítségükért, a személyes beszélgetésekért és a motiváló csapatmunkáért.

Köszönetet mondok együttműködő partnereinknek és társszerzőinknek az elhivatott részvételükért a kísérletekben, kiemelten Dr. Tiszlavicz Lászlónak (Pathológiai Intézet, Szegedi Tudományegyetem) a humán mintákért, Marta Serenonak és Dr. Maria Alexandra Britonak (Faculty of Pharmacy, University of Lisbon) a miRNS projektben nyújtott segítségükért, Herman Hildegardnak és Dr. Anca Hermeneannak (Institute of Life Sciences, Vasile Goldis Western University of Arad) az elektronmikroszkópos képekért.

Hálás köszönettel tartozom barátaimnak, Gróf Ilonának, Fűr Gabriellának, Nógrádi Bernátnak, Dr. Patai Rolandnak és Kristóf Rebekának a kutatómunka iránti lelkesedésükért, a munkánkat kísérő vidám hangulatért és mindenkori támogatásukért.

Kimondhatatlanul hálás vagyok a családomnak a szüntelen érzelmi támogatásukért, a szeretetükért és hogy mindig mellettem álltak.

Végezetül köszönetet mondok az anyagi támogatásért az Innovációs és Technológiai Minisztérium, Új Nemzeti Kiválósági Programjának (ÚNKP-20-4-SZTE-138). A jelen munka részben a GINOP-2.3.2-15-2016-00020 és a GINOP-2.3.2-15-2016-00034 projektekből valósult meg.