

Cod proiect: PN-III-P1-1.1-TE-2019-1302

Director proiect: Imola Wilhelm

Instituție: Universitatea de Vest "Vasile Goldiș" Arad

Titlu: Pericitele cerebrale, modulatori cheie în nișa metastatică perivasculară

Acronim: PERIMET

Raport final

Obiectivele proiectului

Metastazele cerebrale ale cancerului mamar triplu negativ sunt boli fatale cu opțiuni terapeutice limitate. Elementele celulare ale unității neurovasculare au o mare importanță în formarea și progresia bolii, însă rolul pericitelor în acest proces este slab înțeles. Conform rezultatelor noastre anterioare, pericitele cerebrale au funcții pro-metastatice importante, participând la co-opțiunea vasculară, supraviețuirea și proliferarea celulelor neoplazice în spațiul perivascular cerebral.

Astfel obiectivul principal al proiectului a fost determinarea mecanismelor prin care pericitele influențează pașii cei mai importanți ai formării metastazelor cerebrale, cum ar fi transmigrarea celulelor tumorale prin peretele capilarelor, formarea nișei metastatice perivasculară, supraviețuirea și proliferarea celulelor tumorale în creier.

În ceea ce privește **mediatorii** acestui proces, există trei posibilități: factorii secretați, veziculele extracelulare și calea de comunicare directă (prin nanotubulii tunnelling):

- Factorii solubili secretați formează secretomul, care conține componenți organici și anorganici și care influențează o serie de procese biologice. Cele mai importante sunt proteinele secretate, care pot fi enzime, citokine, chemokine, factori de adeziune, factori de creștere, etc.
- Veziculele extracelulare (EV) sunt structuri veziculare înconjurată de o membrană lipidică, care sunt eliberate de mai multe tipuri celulare și care transportă o varietate de materiale, inclusiv acizi nucleici (ex. miARN), proteine și organite.
- Nanotubulii tunnelling (TNT) sunt extensii citoplasmice pe distanță lungă, ce se extind de la membrana plasmatică, au diametru mic (50-800 nm), nu aderă la substrat și conțin F-actină. Formând canale deschise între două celule, TNT-urile sunt implicate în comunicarea intercelulară și transferul de material.

În ceea ce privește **efectele** interacțiunii dintre pericite și celulele tumorale, am studiat următoarele: ● contractia pericitelor, ● proliferarea și ● supraviețuirea celulelor tumorale.

Este foarte important de menționat că interacțiunea dintre pericite și celulele tumorale este **bidirecțională**.

Rezultate

Contrația pericitelor indusă de celulele tumorale

Rezultatele noastre preliminare obținute cu ajutorul microscopiei cu doi fotoni au arătat că celulele de carcinom mamar triplu negativ, care s-au oprit în capilarele cerebrale, induc o vasoconstricție marcată în ambele direcții, ducând la obstrucția completă a circulației sanguine (Haskó și colab. 2019, doi: 10.1186/s40478-019-0788-1). După ipoteza noastră, la nivel celular, acest fenomen este indus de pericite. Scopul nostru a fost determinarea mediatorilor celulari și moleculari ai vasoconstricției indusă de celulele tumorale.

Astfel ne-am propus determinarea in vitro a contrației pericitelor indusă de celulele tumorale. Am folosit metoda de contrație a colagenului, care constă în prepararea unui gel tridimensional de colagen în care se incorporează celulele contractile. Această metodă este des folosită în studierea contractilității fibroblaștilor. Noi am optimizat metoda pentru pericite și am studiat efectul factorilor secretați de celulele metastatice de carcinom mamar asupra contractilității pericitelor.

Rezultatele noastre au arătat că celulele de carcinom mamar induc contrația pericitelor atât în modelul in vitro uman, cât și cel de șoarece. Acest efect s-a putut bloca cu ajutorul unui inhibitor al miozinei II (Fig. 1).

Efectul factorilor secretați de pericitele cerebrale asupra celulelor de cancer mamar triplu negativ

Anterior am identificat factori solubili secretați de pericitele cerebrale, inclusiv elemente ale matricei extracelulare și factorul de creștere insulin-like 2, care promovează adeziunea, respectiv proliferarea celulelor de cancer mamar (Molnár și colab. 2020, doi: 10.1002/1878-0261.12752). Ne-am propus să lărgim lista de proteine secretate de către pericite pentru a obține o imagine completă asupra mediatorilor comunicării dintre pericite și celulele tumorale.

În primul rând, am efectuat o analiză bioinformatică folosind baza de date Betsholtz (<http://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html>), concentrându-ne în principal pe chemokinele posibil implicate în efectul chemoattractant al pericitelor asupra celulelor de cancer mamar. Dintre receptorii de chemokine, în celulele de cancer mamar triplu negativ, cei mai exprimați sunt CXCR4, CXCR2, CCR5 și CCR7, astfel că am analizat liganzii acestor receptori. Aceștia sunt următorii:

- CCL5 (ligandul lui CCR5) nu a fost detectat în pericitele cerebrale;
- CCL19 și CCL21 (principalii liganzi ai CCR7) au fost detectați în cantități foarte scăzute sau nu au fost identificați;

· în mod similar, liganzii CXCR2 au fost fie absenți la șoarece (CXCL8), fie nu au fost evaluați (CXCL6 și CXCL7), fie au fost exprimați în cantități foarte scăzute sau nedetectabile (CXCL1, CXCL2, CXCL3 și CXCL5);

· în timp ce CXCL12/SDF-1, ligandul lui CXCR4, deși prezent în pericite, a fost exprimat mai intens în fibroblaste și celule endoteliale (Fig. 2), care au demonstrat proprietăți chemoattractante mai slabe față de celulele canceroase mamare comparativ cu pericitele.

În al doilea rând, pentru a obține o imagine completă, secretomul pericitelor a fost analizat folosind membrana AAH-BLM-1000A-2 (RayBiotech), așa cum a fost descris în propunere. Din păcate, prin această metodă, nu am reușit să identificăm proteinele secretate, probabil din cauza unor limitări tehnice.

În al treilea rând, am analizat expresia osteopontinei, care este o proteină a matricei extracelulare, și care are un rol important în reacțiile inflamatorii tumorale și formarea metastazelor. Rezultatele noastre au arătat că osteopontina nu este exprimată în creier în condiții normale, dar apare în cantități mari în stroma leziunilor metastatice cerebrale atât în creierul uman cât și în modelul de șoarece (Fig. 3). Rămâne de analizat rolul osteopontinei în procesul de formare a metastazelor cerebrale.

Rolul nanotuburilor tunnelling formate între pericite și celulele tumorale

Rezultatele noastre preliminare au indicat că celulele tumorale induc formarea TNT-urilor la nivelul pericitelor pentru a crea o punte între cele două tipuri celulare. Am observat prezența așa-numitelor „gondole” de-a lungul TNT-urilor ce interconectează pericitele și celulele canceroase mamare, care ar putea transporta organite. Astfel, am ajuns la ipoteza că TNT-urile transferă mitocondrii de la pericite la celulele canceroase mamare. În acest sens, am marcat mitocondriile pericitelor cu MitoTracker și am observat mitocondriile marcate în TNT-uri și în celulele canceroase mamare conectate la pericite prin TNT-uri (Fig. 4). Însă am identificat mitocondrii marcate și în celulele canceroase mamare care nu păreau să aibă conexiune prin TNT la pericite; astfel că, prin această metodă, nu am putut exclude posibilitatea transferului marcajului MitoTracker prin mediul de cultură.

Pentru a înlătura această problemă, am marcat genetic mitocondriile din pericite, prin transfecția acestora cu o plasmidă ce codifică DsRed-Mito7. După transfecție și spălarea pericitelor, acestea au fost cultivate împreună cu celule canceroase mamare cu capacitate crescută de a forma metastaze cerebrale (MDA-BrM2). Mitocondriile marcate au fost identificate în pericite, TNT-uri și celulele canceroase mamare conectate la pericite prin TNT-uri, sugerând transferul mitocondrial.

Rolul veziculelor extracelulare în transferul mitocondrial de la pericite la celulele de cancer mamar

Folosind pericite transfectate cu DsRed-Mito7 cultivate împreună cu celulele tumorale MDA-BrM2, am observat marcarea DsRed în unele celule canceroase mamare care se găseau la o distanță mare de pericite, excluzând posibilitatea comunicării mediate prin TNT-uri (Fig. 5). Am ajuns la ipoteza că în aceste cazuri a existat o comunicare dependentă de EV-uri. Am observat că în condiții de control, pericitele au eliberat un număr scăzut de EV-uri, însă, atunci când au ajuns în contact cu celulele tumorale, numărul EV-urilor derivate din pericite a crescut considerabil.

Cu scopul de a dovedi transferul mitocondriilor prin mediul de cultură, respectiv prin EV-uri, am folosit celule provenite din diferite specii: pericite umane (HBVP) și celule de cancer mamar de șoarece (4T1). Aceste celule au fost cultivate în felul în care au putut comunica prin mediul de cultură, dar fiind separate fizic nu au avut posibilitatea să formeze TNT-uri (Fig. 6). După cinci zile am extras acizii nucleici din ambele tipuri de celule și am verificat prezența unor secvențe de ADN mitocondriale și genomiale cu ajutorul primerilor specifici umani sau de șoarece. Pe lângă prezența ADN-ului mitocondrial și genomic uman în celulele umane, și cele de șoarece în celulele de șoarece, am detectat ADN-ul mitocondrial uman (dar nu pe cel genomic) în celulele tumorale (Fig. 7). După cum ne-am așteptat, celulele tumorale au migrat spre pericite, astfel în proba de pericite umane am detectat atât ADN mitocondrial cât și ADN genomic de șoarece.

Astfel am dovedit că pericitele (umane) au transferat mitocondrii celulelor de cancer mamar (de șoarece) prin mediul de cultură, cel mai probabil prin EV-uri (microvezicule).

Efectul pericitelor asupra chimiorezistenței celulelor de cancer mamar

În final am dorit să înțelegem rolul pericitelor în supraviețuirea celulelor neoplazice expuse la un agent chimioterapeutic, respectiv doxorubicina. Cu acest scop am construit un model in vitro cultivând pericitele cerebrale împreună cu celulele de cancer mamar în felul în care au putut comunica doar prin mediul de cultură (Fig. 8). După șase zile cele două tipuri de celule au fost separate, iar celulele de cancer mamar au fost tratate cu doxorubicină. Celulele care în prealabil au fost expuse la factorii emiși de pericite au supraviețuit într-un număr semnificativ mai mare decât celulele control (Fig. 9). Presupunem că acest efect protectiv a fost indus de mitocondriile transferate de pericite. În curând urmează să eliminăm EV-urile din mediul condiționat pe pericite și să comparăm efectul acestuia cu efectul mediului condiționat, cu păstrarea EV-urilor, asupra chimiorezistenței celulelor de carcinom mamar.

Impactul rezultatelor

Cancerul mamar triplu negativ este una dintre tumorile care metastatizează cel mai frecvent în creier. Din păcate, bolnavii cu metastaze cerebrale au un timp foarte scurt de supraviețuire (de doar câteva luni) din cauza lipsei tratamentelor eficiente. Dat fiind acest fapt, este urgent nevoie de identificarea unor noi ținte terapeutice, adică a unor mecanisme încă necunoscute, care stau la baza formării metastazelor.

În acest sens, ipoteza noastră de bază este că pericitele pot deveni celule ținte în tratamentul metastazelor cerebrale. Rolul acestor celule în formarea tumorilor secundare cerebrale a fost aproape complet necunoscut până recent, când am observat că pericitele au un caracter clar pro-metastatic prin încurajarea adeziunii și/sau proliferării celulelor tumorale la nivel cerebral. În cadrul proiectului meu precedent (PN-III-P1-1.1-TE-2016-1352) am descris două mecanisme moleculare prin care pericitele ajută la formarea metastazelor, și anume secreția factorilor de adeziune și a factorului de creștere IGF2.

În cadrul proiectului actual am deschis direcții noi în ceea ce privește înțelegerea rolului pericitelor în sprijinirea celulelor metastatice în creier. Am observat că prin creșterea contractilității în prezența celulelor canceroase, pericitele pot contribui la vasoconstricția protectivă care blochează efectele negative ale circulației sanguine până ce celulele tumorale trec bariera hemato-encefalică.

După ce celulele metastatice ajung în parenchimul cerebral, ele vin în contact direct cu pericitele și factorii emiși de ele (factori secretați și vezicule). În cadrul proiectului am identificat mecanisme noi prin care aceste celule comunică între ele ajutând supraviețuirea celulelor neoplazice în nișa metastatică perivasculară în creier. În acest sens, cel mai important este transferul mitocondrial, care poate fi realizat prin două căi, și anume comunicarea directă (prin TNT-uri) sau indirectă (veziculară).

Rezultatul cel mai important este chimioprotecția asigurată de pericite. Această funcție a pericitelor completează imaginea complexă prin care aceste celule ajută la formarea metastazelor cerebrale, și anume prin încurajarea adeziunii, proliferării și supraviețuirii celulelor neoplazice în creier. Aceste rezultate subliniază faptul că pericitele cerebrale au un rol pro-metastatic extrem de important, confirmând ipoteza noastră de bază că pericitele pot deveni celule ținte în viitor în tratamentul metastazelor cerebrale.

Diseminarea rezultatelor

Rezultatele proiectului, precum și alte informații legate de el (participanții, articolele științifice publicate, colaboratorii) sunt actualizate pe pagina web a proiectului:

<https://proiecte.uvvg.ro/PERIMET/>

În cursul perioadei de doi ani a proiectului am publicat șase articole Q1 în care a fost menționat numele finanțatorului și numărul contractului, cu un factor cumulativ de impact de 41,109. Rezultatele încă nepublicate vor fi incluse în două manuscrise care sunt în faza de pregătire.