

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 2 (ianuarie-decembrie 2021)

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. Propunerea actuală își propune să înțeleagă mecanismele și mediatorii acestui proces.

Conform propunerii, am efectuat experimente pentru obiectivele 1-4. Acestea includ identificarea factorilor secretați de pericitele cerebrale care influențează proliferarea sau alte proprietăți ale celulelor tumorale și caracterizarea interacțiunilor dintre pericite și celulele tumorale mediate prin nanotubuli. 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. 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 sau 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, care au demonstrat proprietăți chemoattractante mai slabe față de celulele canceroase mamare comparativ cu pericitele.

În al doilea rând, 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. Astfel că am fost nevoiți să omitem obiectivul 2 (evaluarea funcțiilor factorilor secretați de pericite identificați în procesul metastatic) și ne-am concentrat atenția asupra interacțiunii dintre pericite și celulele canceroase mamare mediate de nanotubuli tunnelling (obiectivele 3 și 4).

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 sunt implicate în comunicarea intercelulară și transferul de material. Informațiile noastre indică că celulele tumorale induc formarea de TNT 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. 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 mitocondriile din pericite genetic, 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 celule canceroase mamare conectate la pericite prin TNT-uri, sugerând transferul mitocondrial.

Pe lângă aceasta, am observat marcarea DsRed în câteva celule canceroase mamare care se găseau la distanță mare de pericite, excluzând posibilitatea comunicării mediate prin TNT-uri. Am ajuns la ipoteza că în aceste cazuri a existat o comunicare dependentă de exozomi/vezicule extracelulare. Veziculele extracelulare (EV) sunt structuri veziculare înconjurate 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. 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. La momentul actual investigăm EV-urile eliberate de pericite în mediul de cultură folosind microscopia cu transmisie de electroni (TEM). Pe lângă aceasta, am pregătit mostre de celule canceroase mamare ce ajung în contact cu pericitele doar prin mediul de cultură, pentru a le examina prin TEM. Rezultatele noastre preliminare sugerează posibila activare a sistemului lizozomi/autofagozomi; însă e nevoie de mai multe studii pentru a confirma observația inițială.

În legătură cu diseminarea rezultatelor, în cursul perioadei actuale de evaluare am publicat 5 articole Q1 cu un factor cumulativ de impact de 30,086.