

Derleme

Beyin Metastazlarında Kan-Beyin Bariyerinin Moleküler Biyolojisi

The Molecular Biology of the Blood-Brain Barrier in Brain Metastases

Murat ULUTAŞ¹, Mehmet SEÇER², Kadir ÇINAR¹, Suat Erol ÇELİK³

¹Sanko Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Konukoğlu Hastanesi, Nöroşirürji Kliniği, Gaziantep, Türkiye

²Deva Hastanesi, Nöroşirürji Kliniği, Gaziantep, Türkiye

³Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroşirürji Kliniği, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Malign tümörlerin beyne metastaz yapması onkolojik hastalarda en önemli morbidite ve mortalite sebebidir. Beyin metastazının gelişmesinde birçok faktör ve karşık mekanizmalar iç içedir. Beyin metastazlarının önemli bir çoğunluğu akciğer, meme ve malign melanomlardan kaynak alır. Kansere hücrenin beyin parankimine ulaşması için öncelikle kan-beyin bariyerinin (KBB) temel yapı taşı olan beyin kapiller endotel tabakasından geçmesi gerekir. KBB kemoterapötik ilaçların geçişine bir bariyer oluşturduğundan aynı zamanda beyin metastazının tedavisi içinde bir bariyer oluşturmaktadır. Beyin endotel hücreleri ile kanser hücresi arasındaki etkileşim mekanizması tam olarak tanımlanamamıştır. KBB, kanser hücresinin kapiller içinden beyin parankimine geçişinde önemli bir koruyucu bariyer oluştururken bazen de kanser hücresinin geçişinde aktif rol oynamaktadır. Makalede metastatik hücrelerin transendotelial migrasyonu için gerekli olan ve endotel hücrelerine kanser hücrelerinin tutunmasına aracılık eden mekanizmalar ve sinyal yollarının derlemesi yapıldı.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Kan-beyin bariyeri, Metastaz, Endotel, Kansere, Hücre, Transmigrasyon, Moleküler biyoloji

ABSTRACT

In cancer patients, metastases of the malignant tumors to the brain constitute major morbidity and mortality. Several factors and mechanisms are involved in the development of brain metastases. A vast majority of brain metastases occur in lung and breast cancers and in malignant melanomas. For the metastatic cells to reach the brain parenchyma, they need to migrate through the capillary endothelial layer that constitutes blood-brain barrier (BBB). At the same time, BBB acts as a barrier to chemotherapeutic agents. The mechanisms underlying the interaction between the brain endothelial cells and cancer cells have not been clearly defined. Although the BBB acts as a protective barrier against cancer cells, at times it also plays an active role in their migration. In this manuscript, we review the mechanisms and signaling pathways that are involved in the transendothelial migration of metastatic cells.

KEYWORDS: Blood-brain barrier, Metastasis, Endotel, Cancer, Cell, Transmigration, Molecular biology



Yazışma adresi: Murat ULUTAŞ

E-posta: nrsrgn@yahoo.com

■ GİRİŞ

Metastaz, kansere bağlı ölümün en önde gelen nedenidir (49). Metastatik kitlelerin yıllık rastlanma sıklığı primer intrakranial kitlelerin sıklığından 10 kat daha fazladır (43). Beyin metastazlarının önemli bölümü akciğer kanseri (%40-50), meme kanseri (%15-25) ve malign melanom (%5-20) kaynaklıdır. Bunların arasında da klinik takipte %50, otopsi ile %80-90 oranında en sık beyne metastaz yapan malign melanomdur. Malign melanomun beyne metastaz yapması kötü bir prognostik faktördür ve beş yıllık sağ kalım oranını %10'un altına düşürmektedir (12). Meme kanseri en sık rastlanan ikinci kanser tipidir. Klinik açıdan meme kanseri beyne %78 oranında multipl, %14 oranında tek ve %8 oranında leptomeningeal metastaz yapar (42). Beyin metastazının en sık kaynağı ise akciğer kanseridir. Tüm akciğer kanserinin %20'sini oluşturan küçük hücreli karsinom ise akciğer kaynaklı beyin metastazların %50'sini oluşturur ve ortalama sağ kalım süresinin 4-5 aya düşmesine neden olur (34).

Beyinde metastatik hücrelerin kolonize olabilmesi için primer kanser odağında kanser hücrelerinin çevre dokulara invazyon ve intravazasyon ile kan akımına karışması ve ekstrasvazasyon ile de beyin içine girmesi gerekir (51). Dolaşımdaki metastatik hücrelerin sadece 1/10000 tanesinin yeni ortamda yaşayabildiği ve makroskopik metastaz oluşturabildiği gösterilmiştir (10,31). Kanser hücrelerinin beyin mikro-ortamına geçmesinden sonra da reaktif astrositler tarafından ilk savunma hattı oluşturulmasına rağmen metastatik hücre kolonisi gelişmektedir. Paget'in tohum ve toprak hipotezine göre (40), başarılı bir metastaz sürecinin tamamlanabilmesi için kanser hücrelerinin çevresindeki mikro-ortamı avantajına dönüştürebilme veya kanser hücrelerine karşı oluşturulan savunma mekanizmasından korunabilme özelliklerine sahip olması gereklidir. Valiente ve ark.(52) tarafından yapılan çalışmada da kanser hücrelerinin beyne infiltre olmasından sonra reaktif astrositler tarafından salınan plazminojen aktivatör enzimi ile üretilen plazminin, primer odakta akciğer ve meme kanseri hücrelerinde apoptozu yol açtığı gösterilmiştir. Ancak aynı primer oktadan beyne metastaz yapan kanser hücrelerinin anti plazminojen aktivatör özelliğine sahip proteinler üreterek plazmin ve dolayısıyla apoptozdan kendilerini koruyabildikleri gösterilmiştir. Bu nedenle metastaz sürecinin erken evreleri yerine uzak organdaki ekstrasvazasyon basamaklarını anlamının önemi ön plana çıkmaya başlamıştır (31,52).

Primer kanser odağı, metastaz potansiyeline sahip genetik olarak heterojen hücre gruplarından oluşur. Primer kanser odağından uzak metastaz kan veya lenfatik sistem aracılığı ile olur. Beynin lenfatik sistemi olmadığından buraya metastazın ancak kan dolaşım sistemi ile olması ve kanser hücrelerinin beyne koruyan kan-beyin bariyerini (KBB) geçerek yeni ortamda proliferasyon ile kolonize olması ve kendisi için anjiyogenez oluşturması gerekir. Beyne ekstrasvazasyonun ilk bariyeri olan ve çok kısıtlı moleküllerin geçişine izin veren KBB'nin öncelikle moleküler yapısı ve metastaz sürecindeki rolü oldukça önemlidir.

Bu makalede KBB'ni oluşturan nörovasküler ünitenin yapısı, metastatik hücrelerin endotel hücrelerine tutunmasına aracılık eden mekanizmalar, KBB'nden geçiş süreci, metastaz oluşumu ve kullanılan sinyal yollarının derlemesi yapıldı.

■ KAN-BEYİN BARIYERİNİ OLUŞTURAN NÖROVASKÜLER YAPI

Kan-beyin bariyeri, beynin kapiller yatağında birbirine tight junction (TJ)(Sıkı bağlantı) ile tutunan endotel hücrelerinden oluşan sistemik dolaşım ile santral sinir sistemi (SSS) arasındaki ilk koruma hattıdır (35,36). Kapiller düzeyde, KBB'nin nörovasküler yapıyı oluşturan en önemli hücresel ve yapısal elemanları; endotel hücreleri, astrositler, perisitler, nöron ve bazal membrandır (Şekil 1).

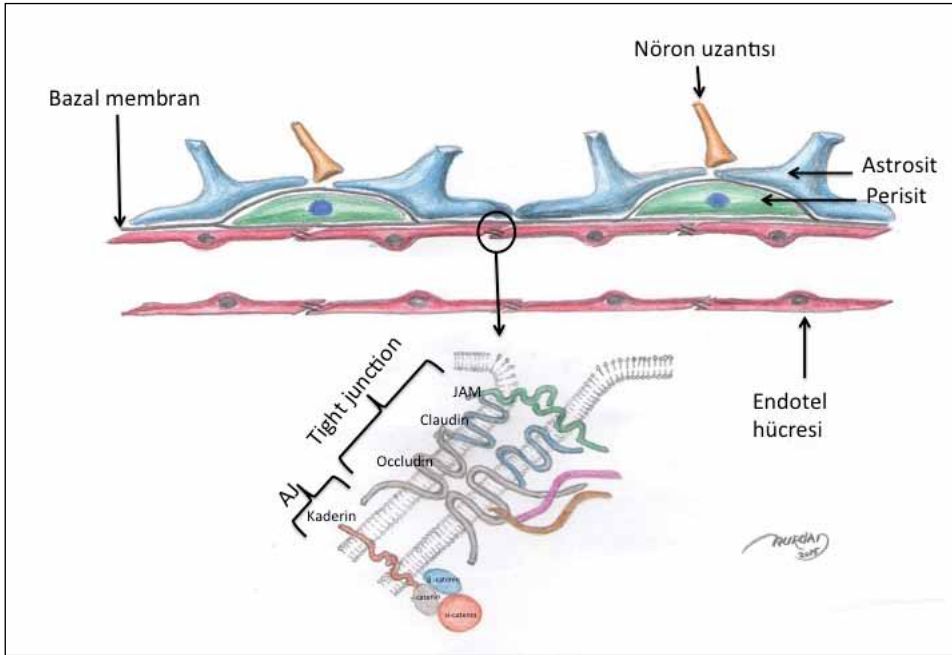
Endotel: Beyin kapillerinin iç yüzeyinde sıralanan, ince ve düz şekilleri ile birbirine sıkıca bağlı olan endotel hücreleri çok miktarda mitokondri içerir. Beyin endotel hücrelerinin temas yüzeyleri birbirinin üstüne biner ve arasında serbest transport ve hücresel geçişi engelleyen TJ ile birbirine bağlanırlar. Beyin endotel hücreleri, hem diğer organ endotel hücreleri (faktör VIII, yüksek alkalin fosfat ve γ -glutamil transpeptidaz aktivitesinin olması, asetilleşmiş düşük dansiteli lipoproteini alabilme) hem de epitel hücrelerinde bulunan (yüksek transendotelial elektriksel direnç, TJ'nin aralıksız sıralanması, pinositozun düşük seviyede olması) özelliklere sahiptir. Özellikle son faktörler KBB fonksiyonu için vazgeçilmez unsurlardır (3,38).

Perisitler: Perisitler ikiye ayrılan bazal membranın içinde bulunur ve endotel hücreleri ile yakın temas halindedirler. Perisitler kontraktıl özelliğe sahiptirler ve biyolojik olarak aktif maddeleri sentez edebilirler. Her ne kadar perisitlerin KBB'indeki fonksiyonu yeterince anlayamamış olsa da kan akımının düzenlenmesi, endotel proliferasyonu, anjiyogenez süreçlerine katılabildikleri, perisit yokluğunda ise endotel hiperplazisi, anormal anjiyogenez ve artan KBB geçirgenliğine sebep olduğu, embriyolojik gelişimde de perisit-endotel hücre arasındaki etkileşimin KBB oluşumunda önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir (1).

Astrositler: Astrositler, KBB ögesi olarak önemli role sahiptir. Astrosit ayakları kapiller duvarı dış yüzeyden çevreler, ancak sinir ucunun bazal membran ile temas halinde olması için açıklık bırakır. Astrositlerin kapiller ile temas eden yüzeylerinden bir kaç değişik ve spesifik proteinlerin salınımı (glukoz transporter 1, P-glikoprotein, aquaporin-4, connexin-43 gibi) gerçekleşir (7,16).

Nöronlar: Beyin hemostazı ve nöronal fonksiyon için önemli olan nöronlar genellikle beyin endotel hücreleri ile doğrudan temas etmezler. Endotel hücrelerden nöronlara veya tersi yönden sinyallerin olup olmadığı konusuna tam bir açıklık getirilememiştir. Ancak böyle bir iletişimin endotel hücrelerinde bulunan nörotansmitter reseptörler yolu ile yapılabileceği düşünülmektedir (21).

Bazal Membran: Bazal membran, kapiller endotel hücrelerinin yapışarak tutunmasını sağlayan özelleşmiş bir ekstraselüler matriksdir. Ana protein komponentleri; kollajen (özellikle tip IV), fibronektin, laminin, tenascin ve proteoglikandır. Laminin, matriks proteinleri ve endotelial integrin reseptörleri aracılığıyla endotel hücrelerinin bazal membrana sağlam bir şekilde tutunabilmesi sağlanır. Bazal membran ile endotel hücreleri arasındaki bu ilişki aynı zamanda TJ proteinlerinin düzenlenmesine de katkıda bulunur (35). Bazal membran, hücre ve makromoleküllerin damar içinden beyne geçişine karşı bariyer rolü



Şekil 1: Beyin mikro-kapiller düzeyinde kan beyin bariyerini oluşturan; endotel, astrosit, perisit, bazal membran ve nöronlardan oluşan nörovasküler ünite ve endoteller arasında yer alan tight junctionun şematik görünümü.
JAM: Junction adhezyon molekülü
TJ: Tight junction
AJ: Adezyonal junction.

oyun, ancak kanser hücrelerinin beyinde kolonizasyon oluşturmaya aracı olduğu da gösterilmiştir (4).

Kapiller endotelden beyin parankimine geçiş dört defans hattı ile önemli derecede sınırlandırılır. Bunlar: TJ ile interendotelial bileşimler tarafından yapılan *parasellüler bariyer*, düşük seviyede endositoz ve transitoz kabiliyeti olan *transellüler bariyer*, *enzimatik bariyer* (asetilkolinesteraz, alkalik fosfat, γ -glutamil transpeptidaz, monoamin oksidaz ve ilaç metabolize eden enzimler) ve *dışarı taşıyıcılar* (*efflux transporterlar*) (ABC-B1, -C1, -C4, -C5 ve -G2) (35).

Parasellüler bariyer, endotel hücreleri arasındaki TJ tarafından düzenlenir. TJ'nin ana parçasını proteinler oluşturur. Bunlar; parasellüler geçirgenlik bakımından belki de en önemlileri olan transmembran proteinleri (occludin, claudin, marvel D2, marvel D3), immünooglobulin ailesine ait moleküller (junction adhezyon molekülü (JAM), endotel selektif adhezyon molekülü (ESAM)) ve immünooglobulin gibi olmayan moleküllerdir. Beyin endotel hücrelerinde en çok bulunan ve karakteristik olanlar occludin, claudin ve JAM'dır (2).

Occludin, beyin endotelleri arasındaki TJ açıklarını kapatır ve diğer kavşak proteinleri ile etkileşime aracılık eder. Claudin ise genel dolaşım sistemindeki endotel hücrelerinde çok çeşitlilikte bulunur. Ancak beyin endotel için temel olan claudin 5'dir. Claudinin tam rolü bilinmemekte, ancak claudin 5 yokluğu 800 Da'dan daha küçük moleküllere KBB'nin selektif açılmasına sebep olur (37,39).

Beyin endotel hücreleri, TJ bölgesinde görev yapan ve immünooglobulin ailesine ait olan JAM ve ESAM üretir. JAM lökositlerin damar dışına çıkma sürecinde yer alır ve JAM-A, JAM-B ve JAM-C alt tipleri mevcuttur. JAM-C ve ESAM proteinlerinin melanom hücrelerinin beyne metastaz yapmasını kolaylaştırdığı gösterilmiştir (22).

■ BEYİN METASTAZININ GELİŞİM SÜRECİ

KBB hem hücresel hem de eriyebilen maddelerden gelebilecek zararlı etkilere beyni korur, ancak kanser hücresi de bariyeri geçtikten sonra immün sistemden korunmuş olur (36). Hücrelerin SSS'ne geçişi KBB tarafından ileri derecede sınırlandırılmasına rağmen bazı kanser tiplerinin özellikle beyne metastaz yapmayı tercih etmesi de şaşırtıcıdır. Bu durum KBB'nin metastazı kolaylaştırmada bir role sahip olma ihtimaline dikkat çekmiştir. Gerçekten beyin endotel hücrelerinin transmigrasyon sürecine katıldığı, hatta metastatik hücrelerin penetrasyonunu kolaylaştırdığı ve migre olmuş hücrenin yaşayabilmesi için ideal ortamı sağlamaya yardımcı olduğu bildirilmiştir (18,40,51,52).

Kanser hücrelerinin hareketi ve migrasyon şekilleri ile ilgili detaylı bilgiler olmasına rağmen, endotel bariyerinden migrasyon sürecine karışan mekanizmalar hakkında bilgiler oldukça sınırlıdır (18). Transendotelial migrasyon süreci immün hücreler kullanılarak yoğun bir şekilde çalışılmıştır. İmmün ve metastatik hücrelerinin migrasyon basamakları (yuvarlanma, adhezyon ve transmigrasyon/diapedez) bazı benzerlikler gösterse de moleküler ve mekanik karakteristiklerinden dolayı önemli farklılıklar olabilir (50). Endotel hücrelerinin kanser hücrelerine karşı davranış şekli, organlar arası da farklılık göstermektedir. Akciğer ve karaciğer endotel hücreleri kanser hücrelerinin üzerine doğru ilerleme gösterirken beyin endotel hücreleri kanser hücrelerini örterek saklamaz, bunun yerine endotel hücrelerinde büzülme olduğu gözlenmiştir (41).

a- Metastaz Sürecinin Morfolojik Yönleri

Kanser hücrelerinin damar içinde hareketinin durması, kapiller ve post-kapiller venül seviyesinde oluşur ve damar içinden beyne geçebilmesi için de diğer organlara göre daha uzun zamana ihtiyaç vardır (18,28,51). Akciğer kanseri metastazında hücrenin ekstraluminal pozisyona gelebilmesi 2 gün, meme

kanseri hücrelerinin de 2-7 gün sürebildiği bulunmuştur. Bu durum beyin metastazında hız sınırlayıcı faktör olarak da görülür. Transendotelyal migrasyon öncesinde intravasküler proliferasyon ve mikrokapiller de gerginlik oluşması sadece beyin için yüksek afiniteli bazı kanser hücrelerine özgün bir karakter olarak düşünülmektedir.(28).

Endotel hücreleri hem kanser hücrelerinin proliferasyonu ve anjiogenezisin gelişimi hem de kan tümör bariyerinin oluşması için gereklidir. Bu durum ancak metastatik hücrelerin endotel hücrelerinin lümenine bakmayan yüzünde perisit benzeri pozisyonda kaldığı sürece gerçekleşir (18). Beyinde ekstrasvaze olmuş meme kanseri hücrelerinin ekstraluminal alanda kan damarları boyunca dizildiği (30), melanom hücreleri ise transendotelyal migrasyon sürecinin tamamlanmasından sonra endotel hücre tabakasının altında perisit benzeri pozisyonda hareket etmeye devam ettiği gösterilmiştir (9). Dahası ekstrasvaze olmuş kanser hücrelerinin % 4 kadarının proliferasyon olma- dan perivasküler alanda 51 güne kadar uykuda kalarak daha sonra proliferasyon olabildikleri gösterilmiştir (18).

Ekstrasvaze olmuş kanser hücrelerinin uzun süre endotel ile yakın temasta kalmasının iki sebebi vardır. Birincisi, mikrokapiller bazal membran, tümörün kendi anjiogenezini oluşturmadan önce metastaz hücrelerinin büyümesini destekler (4). Anjiogenez ihtiyacı duymadan büyüme için konakçı damarlarını kullanarak gelişmeye başlayan bu metastaz şekli (vessel co-option) meme kanseri ve melanom için karakteristiktir (4,18). Ancak akciğer kanserinin beyin metastazında erken anjiogenezis oluşturduğu gösterilmiştir (18). Bu özellik anjiogenezisi inhibe eden kemoterapötik ilaçların kullanım ve faydalanımını etkileyen önemli bir faktördür. İkincisi, kanser hücreleri endotelin arkasında durarak anti-tümör immün hücreler ve kemoterapötik ilaçlara karşı KBB'nin korumasından faydalanırlar. Bu şekilde oluşan kan-tümör bariyeri küçük metastazlarda sağlam kalırken büyük kitlelerde bu bariyerin bütünlüğü değişebilir (11). Meme kanseri metastazında, kan-tümör bariyeri lezyon boyutu ile ilişkili olmadan permeabilite artışına sahiptir, ancak bariyer, ilaçların geçişine karşı yeterli dirençte kalmaya devam eder (26).

b-Kanser Hücrelerinin Transmigrasyonu

Kanser hücresi ile endotel arasındaki etkileşim ve metastaz oluşumuna karışan adezyon ve kavşaksal moleküller tam olarak tanımlanamamıştır. Ancak kanser hücrelerinin, enflamasyon sırasında oluşan lökosit-endotel etkileşiminin moleküler mekanizmasını kısmen taklit edebildiği bilinmektedir. Lökositlerin ve kanser hücrelerinin transendotelyal migrasyon basamakları prensip olarak aynıdır; yuvarlanma, yapışma ve diapedez. Ancak moleküler seviyede kanser hücrelerinin transmigrasyon süreci çok daha az tanımlanmıştır (50). Geçiş sürecinde kanser ve endotel hücreleri yüzey moleküllerinin arasında karşılıklı etkileşimi vardır. Kanser hücreleri, trombosit ve lökositlerin adezyon moleküllerini de dolaylı olarak kullandığı gösterilmiştir. Trombositler kanser hücrelerine yapışarak onları immün sistemden saklar ve endotele daha rahat yapışmasına yardımcı olur. Ayrıca kanser hücreleri endoteli geçmek için lökosit ve trombositlere yapışır ve onları köprü gibi kullanırlar, ancak moleküler açıdan etkileşimleri oldukça karışıktır (13,20).

Hücrelerin transendotelyal migrasyonu iki şekilde olabilir; endotel hücreleri arasındaki bağlantı yolu ile olan *parasellüler yol* ve endotel hücresi içinden oluşan *transsellüler yol*. Lökositler beyin endotelinden iki yol ile de geçebilme kabiliyetine sahiptir. Ancak kanser hücrelerinin beyne transmigrasyon ile geçiş mekanizması hakkında çok az şey bilinmektedir.

Metastatik hücrelerin parasellüler transmigrasyonu endotelyal TJ ve junctional proteinlerin aracılığı ile gerçekleşmesi muhtemeldir. Endotel hücreleri arasındaki kavşak bütünlüğünü sağlayan önemli faktörlerden biri transendotelyal elektrik direncidir (TEED). Melanom hücreleri bu direnci bozarak kendilerine geçiş yolu oluşturabildiği gösterilmiştir (9). Aynı çalışmada hücre kültürü ortamında melanom hücrelerinin TJ'ları bozma kabiliyetlerinin mekanizması tam olarak anlaşılacakla beraber proteolitik süreçlerin önemli rolü sahip olduğu öne sürülmüştür.

Diğer taraftan TJ'nın intersellüler geçişi kapattığı ve bütünlüğünün bozulmadığı durumlarda kanser hücrelerinin transsellüler yolu da kullanarak KBB'ni geçebildiği gösterilmiştir (17). Kienast ve ark. (18) melanom ve akciğer kanseri hücrelerinin beyin kapillerinden gerçek zamanlı olarak geçişini gösteren deneysel bir çalışma yapmışlardır. Kanser hücresi çapı/damar çapı oranı 1 olan mikrokapiller yatakta kanser hücresi duranlaştıkça istirahat geçeri. Bu istirahat süresi 48 saate kadar uzayabilir. Kanser hücrelerinin 1 ile 9 gün arasında ekstrasvaze oldukları ve sadece bir tek hücrenin bile metastaz oluşturabildiğini gözlemişlerdir. Ekstrasvazyon sürecinde kanser hücrelerinin en dar yeri damar duvarında olan kum saati gibi intravasküler kısımları oluşur. Ekstrasvasküler bölümün gerilme ve gevşeme şeklinde dinamik hareketleri ile hücrenin damar duvarından kurtulduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada kanser hücrelerinin damar duvarında oluşturduğu deliklerden aktif transmigrasyon gerçekleştiği düşünülmüştür. Yaşayan tüm kanser hücrelerinin 14 güne kadar ekstrasvaze olduğu ve bundan sonra da 3 gün içinde de makro-metastaz için başarılı bir şekilde proliferasyon oldukları gösterilmiştir (18). Fazakas ve ark.(9) da melanom hücrelerinin transmigrasyon sürecinde yoğun proteolitik enzimler salgılayarak TJ bütünlüğünü hasara uğrattığını göstermişlerdir. Kienast ve ark.(18) ekstrasvaze olmuş kanser hücrelerinin damar duvarı dış yüzü ile temas halinde olamayanların gerilediğini, ancak endotelin dış yüzeyinde perisit benzeri bir pozisyonda endotele yakın temas halinde kalabilen hücrelerin mikro- veya makro-metastaz için başarılı proliferasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Ekstrasvazyon sonrası melanom hücreleri hayatta kalabilmek için konakçının mikro-damarlarını kendisi için tekrar şekillendirmeye başlar- ken akciğer kanseri hücrelerinin ise anjiogenezisi başlattıklarını gözlemlemişlerdir. Melanom hücrelerinin bu süreci sadece konakçı damarı ile temas noktasının varlığında gerçekleştiğini bildirmişlerdir (18). Bu bulgular, intraserebral metastazların neden daha çok beyaz cevher-gri cevher bileşkesinde oluştuğunu açıklamaktadır.

Kanser hücrelerinin endoteli sağlam bırakarak mı terk ettiği yoksa geçiş sırasında damar duvarını tahrip edip etmediği konusu tartışma yaratmıştır. Bu iddialara yönelik bir in-vitro çalışmada melanom hücrelerinin endotel apoptozuna ve transendotelyal elektrik direncin azalmasına neden olarak

beyin endotel hücrelerinin tek sıra bütünlüğünü hasarlattığı gözlenmiştir (9). Başka bir çalışmada ise metastaz hücrelerinin geçişi sonrasında KBB'nin onarıldığı ileri sürülmüştür (11). Meme kanserinde olduğu gibi bazı olgularda ise kanser hücrelerinin intravasküler proliferasyonu, damarın tamamen tıkanmasına ve sonunda KBB'nin bütünlüğünün bozulmasına neden olarak kanser hücrelerinin ekstrasellüler olduğu bildirilmiştir (30).

c-Beyin Metastazının Moleküler Biyolojisi

Metastazları önlemek veya sayısını azaltmaya yönelik önemli konulardan biri de organ spesifik metastazların moleküler mekanizmalarının anlaşılmasıdır. Spesifik organ afinitesi olan metastatik hücrelerin sahip olduğu oldukça fazla ve çeşitte gen veya protein profili, metastaz yer tercihinin önemli belirleyicisidir. Spesifik gen kombinasyonları, kanser hücrelerinin tercih ettiği organı, yaşayıp bölünebildiği ideal ortamı ve beyinde endotel ile metastatik hücre arasındaki etkileşimi belirler (53).

Genleri belirlemeye yönelik bir çalışmada, beyin metastazlı primer akciğer kanserinde test edilen 23040 genin 244'ünde plazma membran proteinleri, hücre antijenleri ve hücre-hücre etkileşimini düzenleyen proteinler dahil farklı seviyelerde gen salınımı bulunmuştur (19). Akciğer adenokarsinom kaynaklı metastatik beyin tümörlerinin gen profilinde farklı salınımı olan 1561 gen bulunmuştur. Aşırı salınımı olan bazı genlerin; invazyon ve metastaz (PTEN, MMP1), adezyon (integrin $\alpha 3$ ve fibronektin1), anjiyogenez (VEGF) ve hücre migrasyonu (Rho GTPase) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (57). Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri teşhisi konulan 142 hastadan alınan örneklerde beyin metastazı ile birliktelik gösteren 3 gen tespit edilmiştir. Bu üç gen [*FALZ* (fetal Alzheimer antijeni), *KIFC1* (kinesin family member involved in cell proliferation) ve *N-cadherin*] beyin metastazı gelişiminin belirleyicisi olarak düşünülmüştür. Bunların ilk ikisi (*FALZ* ve *KIFC1*) metastazın nöronal ortamda büyümesini sağlamada rol alırken, *N-cadherin*'in ise metastatik hücrenin beyin endotel hücreleri ile karşılıklı etkileşiminde rol alabileceği ileri sürülmüştür (14).

Beyne metastaz yapmış meme kanseri hücrelerinde çoğu hücre metabolizması ve hücrenin strese yanıtı ile ilgili 300 den fazla protein bulunmuştur. Bu proteinler, beyin ortamında bolca bulunan glikoz oksidasyonundan enerji elde edebilmek için kanser hücresi metabolizmasının ortama adapte olmasında rol oynadığı bildirilmiştir (6).

d-Kanser Hücresi ve Beyin Endotel Yüzey Molekülleri

Selektinler, normalde lökositlerin endotele tutunması, yuvarlanması ve geçişine aracılık eder. Kanser hücreleri de lökositlere benzer şekilde selektini bağlayabilirler. Selektine bağımlı mekanizmalar, kanser hücreleri ile trombosit ve lökositlerin karşılıklı etkileşiminde de önemlidir. Sadece koagülasyonu değil selektin aracılı etkileşimi de inhibe eden heparinin, ilginç bir şekilde melanomanın beyin metastazı oluşumunu geciktirdiği gösterilmiştir. Böylece heparinin selektin üzerine etkisinden dolayı anti-metastatik nöroprotektif role sahip olduğu ileri sürülmüştür (32).

İntegrinler, lökositlerin endotele sıkı tutunmalarını sağlar. Ayrıca hücre ve ekstrasellüler matris arasındaki yapışma, hücre migrasyonu ve invazyonunda rol alan sinyalleşme reseptör proteinleridir (8). Birkaç integrinin primer kanserin progresyonuna, metastaz oluşmasına, transendotelial migrasyona, apoptoza ve farklı metazatik yerlerde anjiyogenez oluşmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (4,29,56). İntegrin $\alpha v\beta 3$ 'ün aktivasyonu primer lezyonun büyümesinden etkilenmeksizin vasküler endotelial growth faktörün (VEGF) devamlı olarak etkinliğinin artması ile beyindeki metastatik meme kanseri hücrelerinin büyümesini etkilediği gözlenilmiştir (29). Meme kanseri hücrelerinde β_1 integrin, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde de $\alpha_3\beta_1$ kaybı veya bloke edilmesi metastaz oluşmasını ve beyindeki metastazın büyümesini önlediği bildirilmiştir (4,56).

Kaderinler doku organizasyonunda kalsiyum bağımlı temel adezyon molekülleridir. Hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matris arasında yapışıklık sağlayan önemli faktördür. Kaderin disfonksiyonu hücrelerin birbirinden ve ekstrasellüler matrisden ayrılmasını sağlayarak kanser invazyonu ve hücrelerin primer odaklardan ayrılarak metastaz oluşturmasını kolaylaştırır. Kaderinin birçok formu vardır. Bunlardan E-kaderinin kaybı kanser hücrelerinde motilite artışı ve metastaz oluşumunu artırır, epitel hücrelerinin mezenkimal hücreye geçişini kolaylaştırır. Metastatik tümörlerde, hücrelerin proliferasyonunda önemli rol oynayan E-kaderinin tekrar salınımı gözlenmiştir. Bununla uyumlu olarak metastatik beyin tümörlerinde yüksek seviyede E-kaderin salınımı gösterilmiştir (5,48). Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde düşük E-kaderin salınımı beyin metastazı gelişiminde yüksek risk faktörü iken (55), aynı kanserde N-kaderin seviyesi beyin metastazı gelişiminde önemli belirleyici faktördür (14). Akciğer mikro-vasküler endotel hücrelerinden melanom hücrelerinin transendotelial migrasyonunda N-kaderin aracılıklı adezyon moleküllü bulunmaktadır. Benzer mekanizmanın beyin endotel hücrelerinde de olabileceği düşünülmektedir (44).

Heparanaz gibi nörotrofinler ve kanser hücresi tarafından salınan plazminojen aktivatör inhibitör enzimleri beyin içindeki metastatik tümörün invazyon oluşturmasında oldukça önemlidir (33,52). Özellikle malign melanomda heparanaz hem ekstrasellüler matris hem de KBB'nin bazal membranını hasarlatarak beyinde lokal invazyon oluşturur (33).

CD9, CD81 ve CD151 dâhil tetraspanların birkaç üyesi tümör endotel hücresi arasındaki temas alanında bulunur. Bunların melanoma hücrelerinin KBB geçişinde rol aldığı düşünülmektedir (27).

Melanotransferrin, melanom hücrelerinin bir yüzey moleküllü olarak bilinirler. Melanotransferrin melanom hücrelerinin transmigration özelliğini artırarak KBB geçişini kolaylaştırır (45).

Beyin metastazı gelişiminde kemokinler ve reseptörlerinde önemlidir. Melanom hücrelerinin CCR3, CCR4, CXCR3, CXCR7, CX3CR1, ve membran-CX3CL1 dâhil tüm kemokin reseptörlerine sahip olduğu gösterilmiştir. Bunların arasında özellikle metastatik melanom hücrelerinde CCR4 reseptörünün CCL22 ile aktivasyonunun beyin metastazı gelişiminde daha önemli olduğu gösterilmiştir (15). Meme kanseri

hücrelerinin de beyin endotel katmanından migrasyon ile metastaz oluşturmada kemokinlerin önemli katkısı vardır (23).

e-Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) ve Reseptörleri

Anjiyogenezisin önemli bir modülatörü olan VEGF'nin metastaz büyümesindeki rolü iyi bilinmektedir. Ekstravaze olmuş kanser hücreleri tarafından salınan VEGF aynı zamanda permeabiliteyi artırarak transmigasyon sürecine katkı yapar. Meme kanseri hücreleri inter-endotelial kavşağın bozulmasını sağlayan VEGF protein yapımını artırır (8). Ek olarak VEGF meme kanseri hücrelerinin beyin endoteline yapışmasını güçlendirir ve transmigasyonunu kolaylaştırır (24). VEGF'nin küçük hücreli akciğer karsinomunun transendotelial migrasyonunu artırdığı iyi bilinmektedir.

f-Beyin Metastazı Oluşumunda Proteazlar

Preteolitik enzimler; primer tümör bölgesinde invazyon, intravazasyon, ekstravazasyon ve metastatik kolonizasyon oluşumunun birkaç basamağında önemli rol oynayabilirler. Farklı proteolitik enzimler (matriks metalloproteinazlar, serin proteazlar ve heparanlar) beyin metastazı oluşumu ve kan-beyin bariyerinden kanser hücrelerinin geçişine katkıda bulunur. Bu enzimler başlıca kanser hücreleri tarafından salınır, ancak endotelial hücreler veya astrositler de proteaz salımı için kanser hücreleri tarafından indüklenebilirler (53).

g-Beyinde Kanser Hücreleri ile Endotel Arasındaki Etkileşimin Sinyal Yolları

Ekstrasellüler uyarılara yeterli şekilde cevap verebilmek için beyin endotel hücreleri oldukça çeşitli reseptör ve sinyal molekülleri ile donatılmıştır. Kanser hücrelerinin invazyon veya metastaz yapması için hücre iskeletinin tekrar modellenmesine ve motilite artışına ihtiyaç vardır. Bu açıdan bakıldığında küçük Rho ailesi üyeleri, kanser hücre hareketinin iki önemli şekli olan mezenkimal ve amiboid hareket şekillerinin düzenlenmesinde vazgeçilmez bir rol almaktadır. Kanser hücrelerinin mezenkimal tip hareketi için artmış Rac1 aktivasyonu ve azalmış Rho/Rac sinyal oranı gerekir. Bu hareket, uzamış hücre morfolojisi, geniş membran protrüzyonlarının oluşması, integrinler ve ekstrasellüler proteolize bağlılık ile karakterizedir. Diğer taraftan amiboid tip hareket yuvarlak morfoloji ve Rho/ROCK bağımlı aktomyozin kasılma güçleri sayesinde lökositlerin hareketini taklit eder. Bu iki tip kanser hücre hareketi ekstrasellüler matriksin invazyonu sırasında olduğu gösterilmiştir (46,47,54). ROCK'ın inhibisyonu küçük hücreli akciğer karsinomunun beyin endotelinden migrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (25). Ancak bu etki kanser hücre hareketindeki değişiklikten dolayı değildir. Çünkü Rho/ROCK sinyalleşme, hücre iskeletinin tekrar organizasyonu ve endotel hücrelerinin sıkı kavşaklarının eşlik ettiği değişiklikler ile kanser hücrelerinin transendotelial migrasyonunun azalmasından sorumludur.

■ SONUÇ

Nörovasküler ünit ve elektriksel direncin oluşturduğu KBB, beyni iç ve dış kaynaklı moleküler ve hücrel faktörlerden

korur. Bu nedenledir ki beyne metastaz yapabilmiş kanser hücreleri, kemoterapötik ve anti-tümöral immün sisteme karşı korumalı bir ortamda olurlar. Endotel, lökosit, trombosit gibi konakçı hücrelerinin oluşturduğu savunma ve bariyer hattının metastaz sürecine katılması, sinyal yolları, enzimler ve genetik faktörlerinde dahil olduğu oldukça karışık ve halen tam anlaşılamamış mekanizmalar kanser hücrelerinin KBB'ni geçiş sürecinde rol almaktadır. Aynı tümör odağından gelen kanser hücrelerinin genetik yapılarının birbirinden farklı olması, süreci daha da karışık hale getirmektedir. KBB'ini geçmeyi başaran kanser hücreleri metastatik kitle oluşturmadan önce uzun süre uykuda kalabilmekte, ancak bu durum klinik-radyolojik olarak günümüz şartlarında saptanamadığından gerçekleşmiş olan metastaz fark edilememektedir. Bu nedenle metastazı tedavi etmekten ziyade büyük oranda açıklanamamış olan metastatik hücrelerin KBB'inden geçiş sürecini önleyebilme daha çok ön plana çıkmaktadır. Beyin metastaz oluşumunun önlenmesinde bu geçiş mekanizmalarını detaylandırmaya yönelik ileri araştırmalar vazgeçilmez hedef olmalıdır.

■ KAYNAKLAR

1. Armulik A, Genove G, Mae M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C: Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468:557-561, 2010
2. Bauer HC, Traweger A, Zweimueller-Mayer J, Lehner C, Tempfer H, Krizbai I, Wilhelm I, Bauer H: New aspects of the molecular constituents of tissue barriers. *J Neural Transm (Vienna)* 118:7-21, 2011
3. Brightman MW, Reese TS: Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40:648-677, 1969
4. Carbonell WS, Ansorge O, Sibson N, Muschel R: The vascular basement membrane as "soil" in brain metastasis. *PLoS One* 4:5802-5857, 2009
5. Chao YL, Shepard CR, Wells A: Research Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Mol Cancer* 9:179, 2010
6. Chen EI, Hewel J, Krueger JS, Tiraby C, Weber MR, Kralli A, Becker K, Yates JR 3rd, Felding-Habermann B: Adaptation of energy metabolism in breast cancer brain metastases. *Cancer Res* 67:1472-1486, 2007
7. Cohen Z, Molinatti G, Hamel E: Astroglial and vascular interactions of noradrenergic terminals in the rat cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:894-904, 1997
8. Fan J, Cai B, Zeng M, Hao Y, Giancotti FG, Fu BM: Integrin beta4 signaling promotes mammary tumor cell adhesion to brain microvascular endothelium by inducing ErbB2-mediated secretion of VEGF. *Ann Biomed Eng* 39: 2223-2241, 2011
9. Fazakas C, Wilhelm I, Nagyoszi P, Farkas AE, Hasko J, Molnar J, Bauer H, Bauer HC, Ayaydin F, Dung NT, Siklós L, Krizbai IA: Transmigration of melanoma cells through the blood-brain barrier: role of endothelial tight junctions and melanoma-released serine proteases. *PLoS One* 6:20747-20758, 2011
10. Fidler IJ: Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 45:773-782, 1970

11. Fidler IJ: The role of the organ microenvironment in brain metastasis. *Semin Cancer Biol* 21:107-112, 2011
12. Fidler IJ, Schackert G, Zhang RD, Radinsky R, Fujimaki T: The biology of melanoma brain metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 18:387-400, 1999
13. Gay LJ, Felding-Habermann B: Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* 11:123-134, 2011
14. Grinberg-Rashi H, Ofek E, Perelman M, Skarda J, Yaron P, Hajdich M, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Krupsky M, Simansky DA, Ram Z, Pfeffer R, Galanter I, Steinberg DM, Ben-Dov I, Rechavi G, Izraeli S: The expression of three genes in primary non-small cell lung cancer is associated with metastatic spread to the brain. *Clin Cancer Res* 15:1755-1761, 2009
15. Izraeli S, Klein A, Sagi-Assif O, Meshel T, Tsarfaty G, Hoon DS, Witz IP: Chemokine-chemokine receptor axes in melanoma brain metastasis. *Immunol Lett* 130:107-114, 2010
16. Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G: Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: A confocal microscopy study. *Glia* 23:1-10, 1998
17. Khuon S, Liang L, Dettman RW, Sporn PH, Wysolmerski RB, Chew TL: Myosin light chain kinase mediates transcellular intravasation of breast cancer cells through the underlying endothelial cells: A three-dimensional FRET study. *J Cell Sci* 123:431-440, 2010
18. Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Klinkert WE, Goldbrunner R, Herms J, Winkler F: Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* 16: 116-122, 2010
19. Kikuchi T, Daigo Y, Ishikawa N, Katagiri T, Tsunoda T, Yoshida S, Nakamura Y: Expression profiles of metastatic brain tumor from lung adenocarcinomas on cDNA microarray. *Int J Oncol* 28: 799-805, 2006
20. Konstantopoulos K, Thomas SN: Cancer cells in transit: The vascular interactions of tumor cells. *Annu Rev Biomed Eng* 11: 177-202, 2009
21. Krizbai IA, Deli MA, Pestenac A, Siklos L, Szabo CA, Andras I, Joo F: Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res* 54:814-819, 1998
22. Langer HF, Orlova VV, Xie C, Kaul S, Schneider D, Lonsdorf AS, Fahrleitner M, Choi EY, Dutoit V, Pellegrini M, Grossklaus S, Nawroth PP, Baretton G, Santoso S, Hwang ST, Arnold B, Chavakis T: A novel function of junctional adhesion molecule-C in mediating melanoma cell metastasis. *Cancer Res* 71: 4096-4105, 2011
23. Lee BC, Lee TH, Avraham S, Avraham HK: Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells. *Mol Cancer Res* 2: 327-338, 2004
24. Lee TH, Avraham HK, Jiang S, Avraham S: Vascular endothelial growth factor modulates the transendothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through regulation of brain microvascular endothelial cell permeability. *J Biol Chem* 278: 5277-5284, 2003
25. Li B, Zhao WD, Tan ZM, Fang WG, Zhu L, Chen YH: Involvement of Rho/ROCK signalling in small cell lung cancer migration through human brain microvascular endothelial cells. *FEBS Lett* 580:4252-4260, 2006
26. Lockman PR, Mittapalli RK, Taskar KS, Rudraraju V, Gril B, Bohn KA, Adkins CE, Roberts A, Thorsheim HR, Gaasch JA, Huang S, Palmieri D, Steeg PS, Smith QR: Heterogeneous blood-tumor barrier permeability determines drug efficacy in experimental brain metastases of breast cancer. *Clin Cancer Res* 16: 5664-5678, 2010
27. Longo N, Yanez-Mo M, Mittelbrunn M, de la Rosa G, Munoz ML, Sanchez-Madrid F, Sánchez-Mateos P: Regulatory role of tetraspanin CD9 in tumor-endothelial cell interaction during transendothelial invasion of melanoma cells. *Blood* 98:3717-3726, 2001
28. Lorger M, Felding-Habermann B: Capturing changes in the brain microenvironment during initial steps of breast cancer brain metastasis. *Am J Pathol* 176: 2958-2971, 2010
29. Lorger M, Krueger JS, O'Neal M, Staffin K, Felding-Habermann B: Activation of tumor cell integrin alphavbeta3 controls angiogenesis and metastatic growth in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:10666-10671, 2009
30. Lu W, Bucana CD, Schroit AJ: Pathogenesis and vascular integrity of breast cancer brain metastasis. *Int J Cancer* 120: 1023-1026, 2007
31. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC: Multistep nature of metastatic inefficiency: Dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 153: 865-873, 1998
32. Maraveyas A, Johnson MJ, Xiao YP, Noble S: Malignant melanoma as a target malignancy for the study of the anti-metastatic properties of the heparins. *Cancer Metastasis Rev* 29: 777-784, 2010
33. Marchetti D, Denkins Y, Reiland J, Greiter-Wilke A, Galjour J, Murry B, Blust J, Roy M: Brain-metastatic melanoma: A neurotrophic perspective. *Pathol Oncol Res* 9:147-158, 2003
34. Meert AP, Paesmans M, Berghmans T, Martin B, Mascaux C, Vallot F, Verdebout JM, Lafitte JJ, Sculier JP: Prophylactic cranial irradiation in small cell lung cancer: A systematic review of the literature with meta-analysis. *BMC Cancer* 1: 5-33, 2001
35. Nag S: Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels. *Methods Mol Med* 89: 3-36, 2003
36. Neuwelt EA: Mechanisms of disease: The blood-brain barrier. *Neurosurgery* 54: 131-140, 2004
37. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S: Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161: 653-660, 2003
38. Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ: The large apparent work capability of the blood-brain barrier: A study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol* 1:409-417, 1977
39. Ouban A, Ahmed AA: Claudins in human cancer: A review. *Histol Histopathol* 25:83-90, 2010

40. Paget S: The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 8: 98-101, 1989
41. Paku S, Dome B, Toth R, Timar J: Organ-specificity of the extravasation process: An ultrastructural study. *Clin Exp Metastasis* 18: 481-492, 2000
42. Pestalozzi BC: Brain metastases and subtypes of breast cancer. *Ann Oncol* 20: 803-805, 2009
43. Platta CS, Khuntia D, Mehta MP, Suh JH: Current treatment strategies for brain metastasis and complications from therapeutic techniques: A review of current literature. *Am J Clin Oncol* 33: 398-407, 2010
44. Qi J, Chen N, Wang J, Siu CH: Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the β -catenin signaling pathway. *Mol Biol Cell* 16: 4386-4397, 2005
45. Rolland Y, Demeule M, Fenart L, Beliveau R: Inhibition of melanoma brain metastasis by targeting melanotransferrin at the cell surface. *Pigment Cell Melanoma Res* 22: 86-98, 2009
46. Sahai E, Marshall CJ: Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 5: 711-719, 2003
47. Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, Sahai E, Marshall CJ: Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 135:510-523, 2008
48. Shabani HK, Kitange G, Tsunoda K, Anda T, Tokunaga Y, Shibata S, Kaminogo M, Hayashi T, Ayabe H, Iseki M: Immunohistochemical expression of E-cadherin in metastatic brain tumors. *Brain Tumor Pathol* 20: 7-12, 2003
49. Steeg PS: Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 12: 895-904, 2006
50. Strell C, Entschladen F: Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Commun Signal* 6:1-56, 2008
51. Valastyan S, Weinberg RA: Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147:275-292, 2011
52. Valiente M, Obenauf AC, Jin X, Chen Q, Zhang XH, Lee DJ, Chaff JE, Kris MG, Huse JT, Brogi E, Massagué J: Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell* 156:1002-1016, 2014
53. Wilhelm I, Molnar J, Fazakas C, Hasko J, Krizbai IA: Role of the blood-brain barrier in the formation of brain metastases. *Int J Mol Sci* 14: 1383-1411, 2013
54. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Bröcker EB, Friedl P: Compensation mechanism in tumor cell migration: Mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 160: 267-277, 2003
55. Yoo JY, Yang SH, Lee JE, Cho DG, Kim HK, Kim SH, Kim IS, Hong JT, Sung JH, Son BC, Lee SW: E-cadherin as a predictive marker of brain metastasis in non-small-cell lung cancer, and its regulation by pioglitazone in a preclinical model. *J Neurooncol* 109:219-227, 2012
56. Yoshimasu T, Sakurai T, Oura S, Hirai I, Tanino H, Kokawa Y, Naito Y, Okamura Y, Ota I, Tani N, Matsuura N: Increased expression of integrin $\alpha 3\beta 1$ in highly brain metastatic subclone of a human non-small cell lung cancer cell line. *Cancer Sci* 95: 142-148, 2004
57. Zohrabian VM, Nandu H, Gulati N, Khitrov G, Zhao C, Mohan A, Demattia J, Braun A, Das K, Murali R, Jhanwar-Uniyal M: Gene expression profiling of metastatic brain cancer. *Oncol Rep* 18: 321-328, 2007