

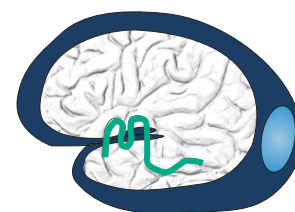
MTA doktora pályázat

A doktori értekezés tézisei

A neurovaszkuláris egység szerepe agyi gyulladásos és metasztatikus folyamatokban

Dr. Wilhelm Imola

**HUN
REN**



Neurovaszkuláris Egység
Kutatócsoport

Szeged

2024

A gondolat összetett és kimondható, az igazság egyszerű és kimondhatatlan.

Weöres Sándor: A teljesség felé

1 Irodalmi áttekintés

A **neurovaszkuláris egységet** a központi idegrendszerben található idegsejtek és gliasejtek, valamint az erek falát alkotó endotélsejtek és az őket körülvevő periciták alkotják, amelyek szoros morfológiai és funkcionális kapcsolatban állnak egymással. A neurovaszkuláris egységnek két fő funkciója van, a neurovaszkuláris kapcsolás és a vér–agy gát.

A **vér–agy gát** az agy legfontosabb barrier rendszere, amely megakadályozza a potenciálisan káros anyagok és sejtes elemek bejutását a vérből az agyi parenchimába. Az agyi endotélsejtek specifikus barrier tulajdonságai az idegrendszeri környezet – elsősorban a periciták és az asztrociták – jelenlétében alakulnak ki és maradnak fenn. Ennek legfontosabb elemei a folytonosan elhelyezkedő szoros kapcsolatok, amelyek szinte teljesen átjárhatatlanná teszik a sejtek közötti (paracelluláris) útvonalat.

A **neuroinflammáció**, amely a központi idegrendszer gyulladásos válaszreakciója a homeosztázis megváltozására, számos agyi patológiás folyamat és az öregedés velejárója is. A neuroinflammáció fő résztvevői a mikroglia és a bevándorló immunsejtek, azonban az asztrociták és a vaszkuláris sejtek is részt vehetnek a folyamatban.

A gyulladásos folyamatok aktiválódása fertőző és nem fertőző ágensek hatására indulhat be, amelyeket a citokin receptorok és a PRR-ek (mintázatfelismerő receptor, *pattern recognition receptor*) ismernek fel. A PRR-ek közé tartozó TLR-ek (Toll-szerű receptor, *Toll-like receptor*) és az NLR-ek (NOD-szerű receptor, *NOD-like receptor*, *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor*) inflammaszómák kialakításában vehetnek részt, amelyek olyan intracelluláris multiprotein komplexek, amelyek platformként szolgálnak a gyulladásos

kaszpázok aktivációjához. Az inflammaszómák számos patológiás folyamat során aktiválódhatnak, például daganatos megbetegedésekben is.

Az **agyi metasztázisok** nagyon rossz prognózisú megbetegedések, amelyeknek döntő többsége tüdőrák, mellrák, illetve melanóma eredetű. Az agyi áttétek kialakulásának két fő sajátos lépése van, a daganatsejtek átvándorlása a vér–agy gáton és túlélése az agyi környezetben. Mindkettőről korlátozott ismeretekkel rendelkezünk.

2 Kérdésfelvetés, célkitűzések

Munkánk során a neurovaszkuláris egység, illetve a vér–agy gát működését szerettük volna minél jobban megérteni fiziológias és patológiás körülmények között, elsősorban gyulladásos és metasztatikus folyamatokban. Munkánk elsősorban alapkutatás jellegű volt, azonban végig fontos szempontnak tekintettük, hogy olyan kérdéseket fogalmazzunk meg, amelyeknek gyakorlati haszna, klinikai relevanciája lehet.

Célkitűzéseinket három pillérre építettük:

- 1. pillér: A vér–agy gát működését és szabályozását érintő alapvető mechanizmusok feltárása*
- 2. pillér: A neurovaszkuláris sejtek szerepének feltérképezése gyulladásos folyamatokban*
- 3. pillér: A neurovaszkuláris egység szerepének tisztázása az agyi metasztázisok kialakulásában*

3 Módszerek

Kísérleteink során *in vitro* és *in vivo* modelleket, valamint humán mintákat használtunk. A neurovaszkuláris sejtek tenyészetei és a komplex *in vitro* vér–agy gát kokultúra modell mellett humán és egér tripla negatív emlőkarcinóma-sejteket és melanómasejteket használtunk.

Egérmodelleket a perifériás idegsérülések, valamint az agyi metasztázisok vizsgálata során alkalmaztunk. Az élő egerek agyában zajló folyamatokat megfelelő altatás és immobilizálás után koponyaablakon keresztül vizsgáltuk egy FEMTO 2D Alba kétfoton-mikroszkóp segítségével, amelyhez egy Mai Tai HP Ti-zafír lézer fényforrás volt kapcsolva.

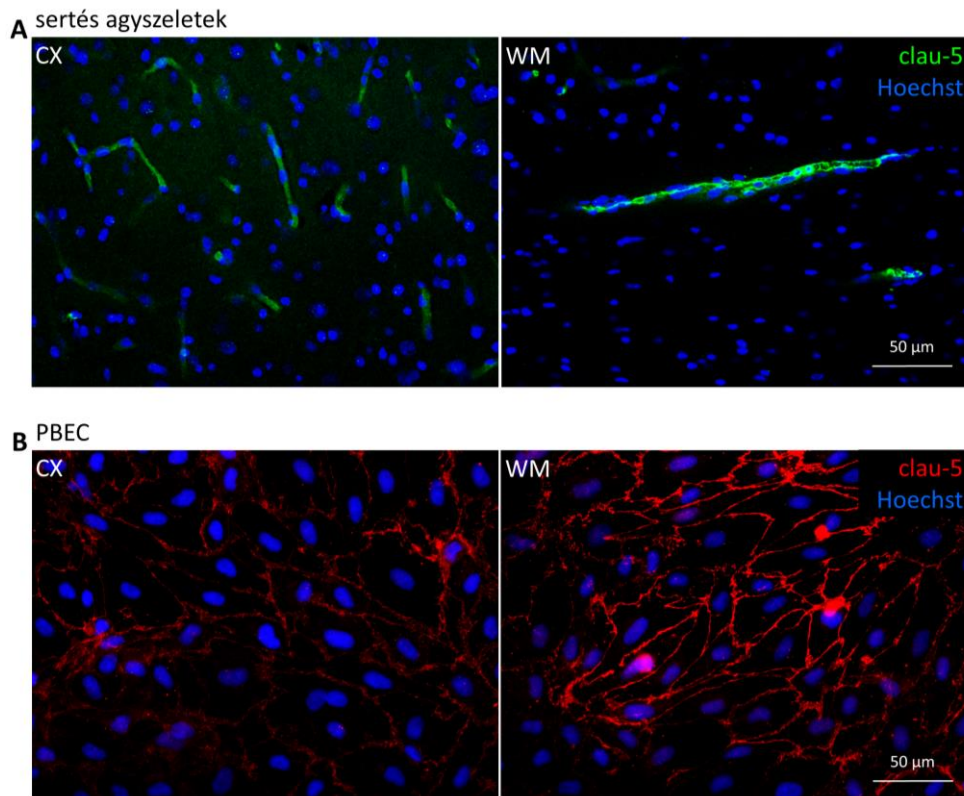
4 Eredmények

Az agyi erek meghatározó szereppel bírnak a periféria és a központi idegrendszer közötti kommunikáció szabályozásában úgy fiziológias körülmények között, mint patológias folyamatok során.

4.1 A vér–agy gát működése és szabályozása

Kísérleteink egy része arra irányult, hogy jobban megértsük a vér–agy gát felépítését, működését és szabályozását fiziológias és patológias körülmények között.

Elsőként állapítottuk meg, hogy a vér–agy gát felépítését és működését tekintve nem egységes a teljes agyszövetben, hanem regionális heterogenitást mutat. Érdekes módon a fehérállomány szintjén szorosabb a barrier az agykérgi szürkeállományhoz viszonyítva, hiszen a szoros kapcsolatok fehérjéi, az okkludin és a klaudin-5 nagyobb mennyiségben expresszálódnak a fehérállományi endotelsejteken úgy mRNS, mint fehérje szinten (**1. ábra**).



1. ábra. Az agyi endothelisejtek heterogenitása.

A: Sertés agyszeletekből származó reprezentatív kladuin-5 (clau-5) immunfluoreszcens képek N = 3 független kísérletből. **B:** Agykéregből és fehérállományból izolált sertés agyi endothelisejtek (PBEC) kladuin-5 (clau-5) expressziója. Reprezentatív IF képek N = 3 független kísérletből. CX = agykéreg (*cortex*), WM = fehérállomány (*white matter*).

A vér–agy gát regionális heterogenitásának sem okai, sem következményei nem tisztázottak, de valószínűleg összefüggésben áll azzal, hogy bizonyos megbetegedések kifejezetten a fehérállományt érintik.

A vér–agy gát integritásának védelme ugyanis fontos szempont lehet az agyi kórfolyamatok során. Ebben szerepet játszhat a PACAP, amely egy olyan endogén neuropeptid, amely a cAMP útvonalon keresztül védő hatásának bizonyult az agyi endothelisejtek szoros kapcsolataira.

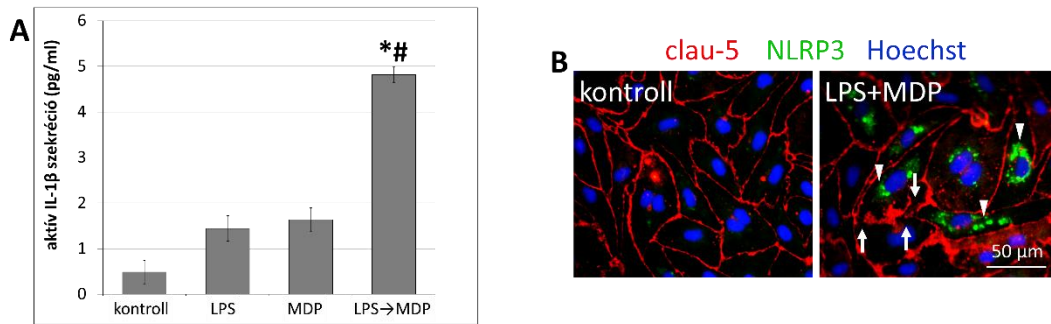
Klinikai szempontból a vér–agy gát működésének ismerete többek között azért is fontos, mert az agyi endothelisejtek által képzett barrier jelenti a legnagyobb akadályt a potenciális terápiás szerek agyi penetrációja számára. Az agyi

gyógyszerbejuttatásra számos stratégia van fejlesztés alatt, amelyek közül mi a molekulák kémiai módosítását alkalmaztuk új fájdalomcsillapító, illetve neuroprotektív szerek esetében. Ezzel a módszerrel olyan EM-2, illetve KYNA analógokat találtunk, amelyek jobb átjutást mutattak a vér–agy gát *in vitro* modelljén az eredeti molekulákhoz viszonyítva.

4.2 A PRR-ek és az inflammaszómák szerepe a neurovaszkuláris egység sejtjeiben

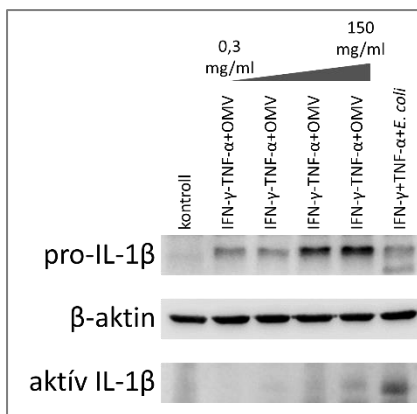
A vér–agy gát szinte minden központi idegrendszeri patológiás folyamatban érintett, és megnyílása gyakran tovább súlyosbítja a betegség lefolyását. Hasonlóképpen a neuroinflammáció is kísérője gyakorlatilag az összes agyi megbetegedésnek. Kísérleteinkben összefüggéseket kerestünk a két folyamat között, és megpróbáltuk megérteni, hogy hogyan vesznek részt a vaszkuláris sejtek az agyi gyulladáshoz vezető folyamatokban. Ennek megfelelően feltérképeztük, hogy a veleszületett immunitás receptorai expresszálódnak-e agyi endotélsejtekben és pericitákban, és meghatároztuk ezen sejtek TLR és NLR mintázatát.

Elsőként igazoltuk, hogy az agyi endotélsejtek és periciták inflammaszóma-aktivációra képesek, amelynek eredményeként aktív IL-1 β -t szabadítanak fel. Azt tapasztaltuk, hogy agyi endotélsejt-tenyészetekben LPS vagy MDP bakteriális sejt-falkomponensek, illetve LPS *priming*ot követő MDP aktiváció (LPS \rightarrow MDP) hatására megnőtt a pro-IL-1 β mennyisége a sejtekben és fokozódott a szekretált IL-1 β mennyisége a felülúszóban (**2. A ábra**). Ezzel párhuzamosan csökkent a sejtekben a szoros kapcsolatok fehérjéinek mennyisége (**2. B ábra**). Az agyi pericitákban nem tudtunk kimutatni kanonikus inflammaszóma-aktivációt, azonban a nem-kanonikus útvonal aktiválása (azaz baktériumok vagy bakteriális vezikulák fagocitózisa) az IL-1 β hasításához vezetett (**3. ábra**).



2. ábra. Inflammaszóma-aktiváció agyi endothelsejtekben.

A: Az aktív IL-1 β fehérje mennyisége D3 humán agyi endothelsejtek tápfolyadékában ELISA-val mérve. N = 3, átlag \pm standard hiba, *P < 0,05 a kontrollhoz viszonyítva, #P < 0,05 az LPS, illetve MDP kezeléshez viszonyítva (ANOVA és Bonferroni *post-hoc* teszt). **B:** Reprezentatív immunfluoreszcens képek kontroll és LPS+MDP-vel kezelt PBEC sejtekről. A nyílak a klau-5 (clau-5) szakadozottságát, a nyílhegyek az NLRP3 feldúsulását mutatják. Alkalmazott koncentrációk: 1 μ g/ml LPS és 100 μ g/ml MDP.



3. ábra. Nem-kanonikus inflammaszóma-aktiváció agyi pericitákban.

Az IL-1 β felszabadulása az OMV-k (külső membrán vezikula, *outer membrane vesicle*) és a baktériumok hatására. Az OMV-eket 0,3 mg/ml, 3 mg/ml, 30 mg/ml és 150 mg/ml fehérje-koncentrációban adtuk a sejtekhez. Az *E. coli*-t 10^7 CFU/lyuk sűrűségben adtuk a 6-lyukú lemezben tenyésztett HBVP (humán agyi vaszkuláris pericita, *human brain vascular pericyte*) sejtekhez. A reprezentatív *western-blot* N = 3 független kísérletből származik. CFU = telepkepző egység (*colony forming unit*).

Az agyi vaszkuláris sejtekből felszabaduló IL-1 β mennyisége feltételezhetően nem elég a gyulladásos reakció elindításához, azonban fontos szerepet játszhat az információ közvetítésében a periféria és a központi idegrendszer között.

Megvizsgáltuk az inflammaszóma-aktiváció szerepét két patológiás folyamatban is. Perifériás idegsérülés során az agyban nem elsősorban a vaszkuláris sejtekben, hanem az axonléziót szenvedett idegsejtekben aktiválódott az NLRP3 inflammaszóma, egy gyulladásos kaszkádot indítva el. Egérmodellben azt is igazoltuk, hogy a neuronokban aktiválódó inflammaszóma gátlása javította az

idegi regenerációt. Agyi metasztázisokat vizsgálva pedig azt tapasztaltuk, hogy az NLRP3 inflammaszóma a peritumorális asztrocitákban aktiválódott. Ennek gátlásával csökkenteni tudtuk az áttétes léziók számát és méretét az agyban, szintén egérmódelben.

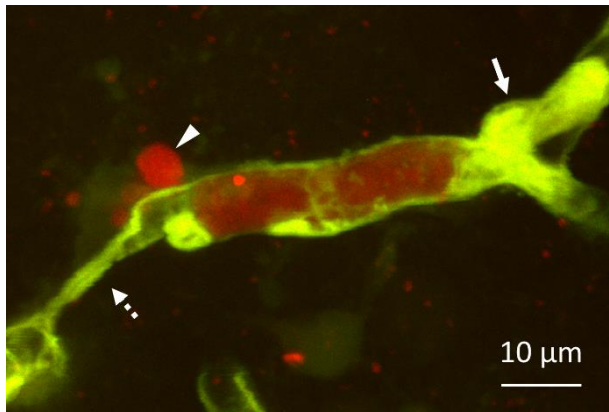
4.3 Az agyi áttétes tumorok kialakulásának mechanizmusai

Munkánk legnagyobb részében arra próbáltunk választ találni, hogy hogyan vesznek részt a neurovaszkuláris egység sejtjei az agyi metasztázisok kialakulásában a tripla negatív emlőkarcinóma-sejteknek a vér–agy gáton való átvándorlása, illetve az agyi környezetben való túlélése és szaporodása során.

Bár az agyi endotéliumon való átvándorlás néhány óra alatt lezajlik, előtte a tumorsejtek napokig a hajszálerek lumenében maradnak, amelynek során számos változást indukálnak az endotélsejtekben. Azt figyeltük meg, hogy a tumorsejtek hatására endotéldugók és érösszehúzódások alakulnak ki, amelyek valószínűleg védik a tumorsejteket (**4. ábra**).

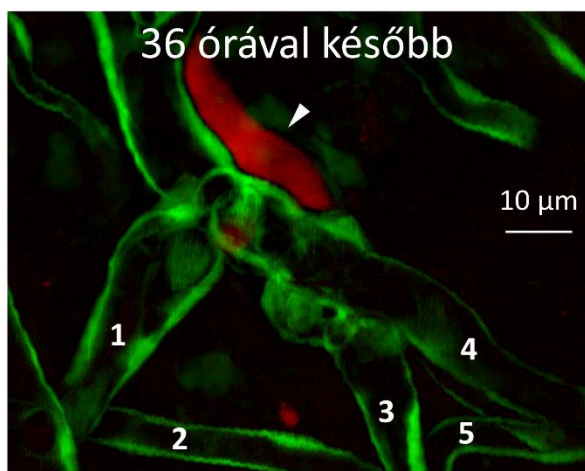
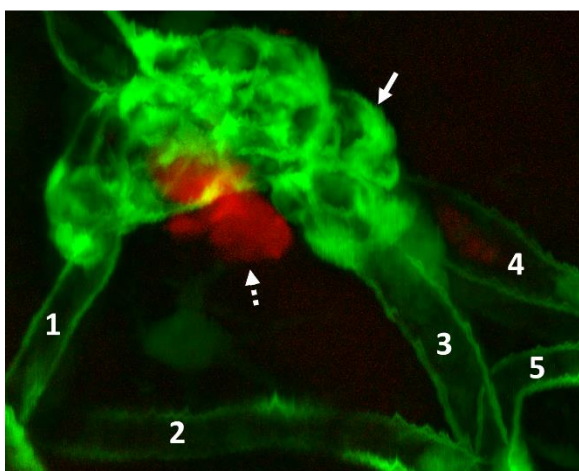
A metasztatikus sejtek az endotélsejtek hólyagosodását és másodlagos lumenek kialakulását is kiváltották, feltételezhetően elősegítve transzmigrációjukat (**5. ábra**). Azt is megfigyeltük, hogy az endotélsejtek protrúziókat bocsátottak ki, amelyekkel mintegy körülölelték a daganatsejteket, biztosítva a többszörös lumenek kialakulását, illetve megkönnyítve a metasztatikus sejtek átvándorlását.

Az emlőkarcinóma-sejtek diapedézise gyakran transzcellulárisan, azaz egyedi endotélsejteken keresztül valósult meg, míg melanómasejtek esetében csak paracelluláris, az endotélsejtek közötti útvonalon történő átvándorlást figyeltünk meg. Az átvándorlást olyan jelátviteli utak aktiválása segítheti, amelyek szerepet játszanak általában a metasztázisképzésben és a tumorsejtek mezenchimális átalakulásában.



4. ábra. Az agyi erek elzáródása az elakadt tumorsejtek közelében.

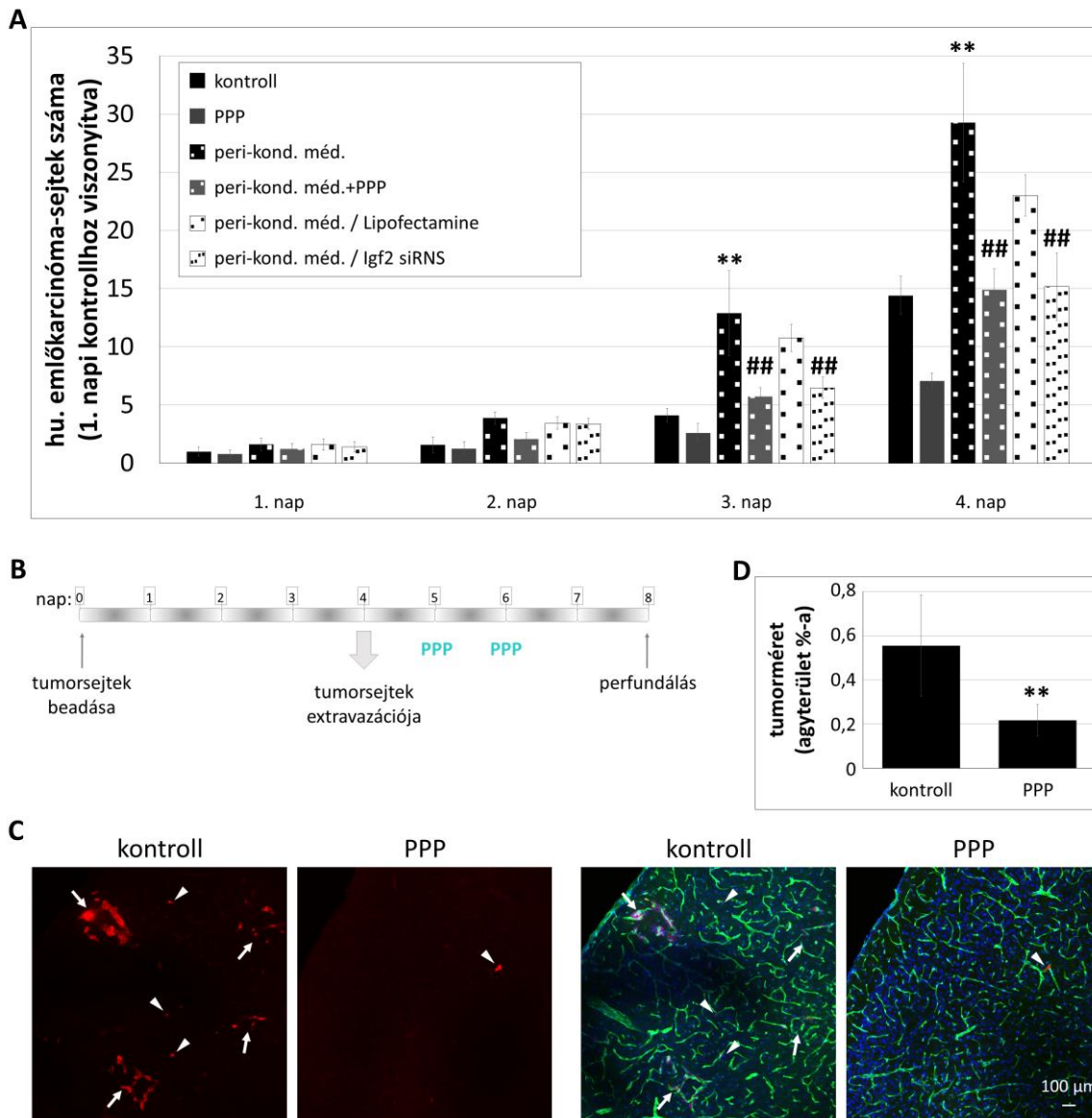
Reprezentatív kétfoton-mikroszkópos felvétel (z-projekció) FVB/Ant:TgCAGyfp_sb #27 egerekbe injektált tdTomato-4T1 emlőkarcinóma-sejtekről és azok környezetéről. Zöldessárga = endotélsejtek, piros = tumorsejtek. A nyíl az endotéldugót, a szaggatott nyíl az érösszehúzódást, a nyílhegy az átvándorló tumorsejtet jelöli.



5. ábra. Az agyi erek hólyagosodása a lumenben elakadt és átvándorló tumorsejtek hatására.

Kétfoton-mikroszkópos felvétel egy tdTomato-4T1 emlőkarcinóma-sejtekkel beoltott FVB/Ant:TgCAGyfp_sb #27 egér agyából. A felvételen egy átvándorló tumorsejt körüli intenzív endoteliális hólyagosodás látszik, amely szinte teljesen megszűnt a transzmigráció befejezése után. A számok az azonos ereket jelölik a két képen. Zöld = endotélsejtek, piros = tumorsejtek.

A mikrokörnyezetnek alapvető szerepe van a metasztatikus daganatok növekedésében és terjedésében. Eredményeink azt mutatták, hogy a periciták elősegítik a tumorsejtek kitapadását az érfalhoz, illetve szaporodásukat is. Ez utóbbit elsősorban az IGF2 termelése által tudják biztosítani, hiszen az IGF2 szignalizáció gátlása (a pericitákban történő csendesítéssel vagy a PPP IGF1-receptor inhibitor adagolásával) csökkentette a tumorsejtek szaporodását, illetve a metasztatikus léziók méretét az egerek agyában (**6. ábra**).



6. ábra. Az IGF2 gátlás hatása az emlőkarcinóma-sejtek szaporodására.

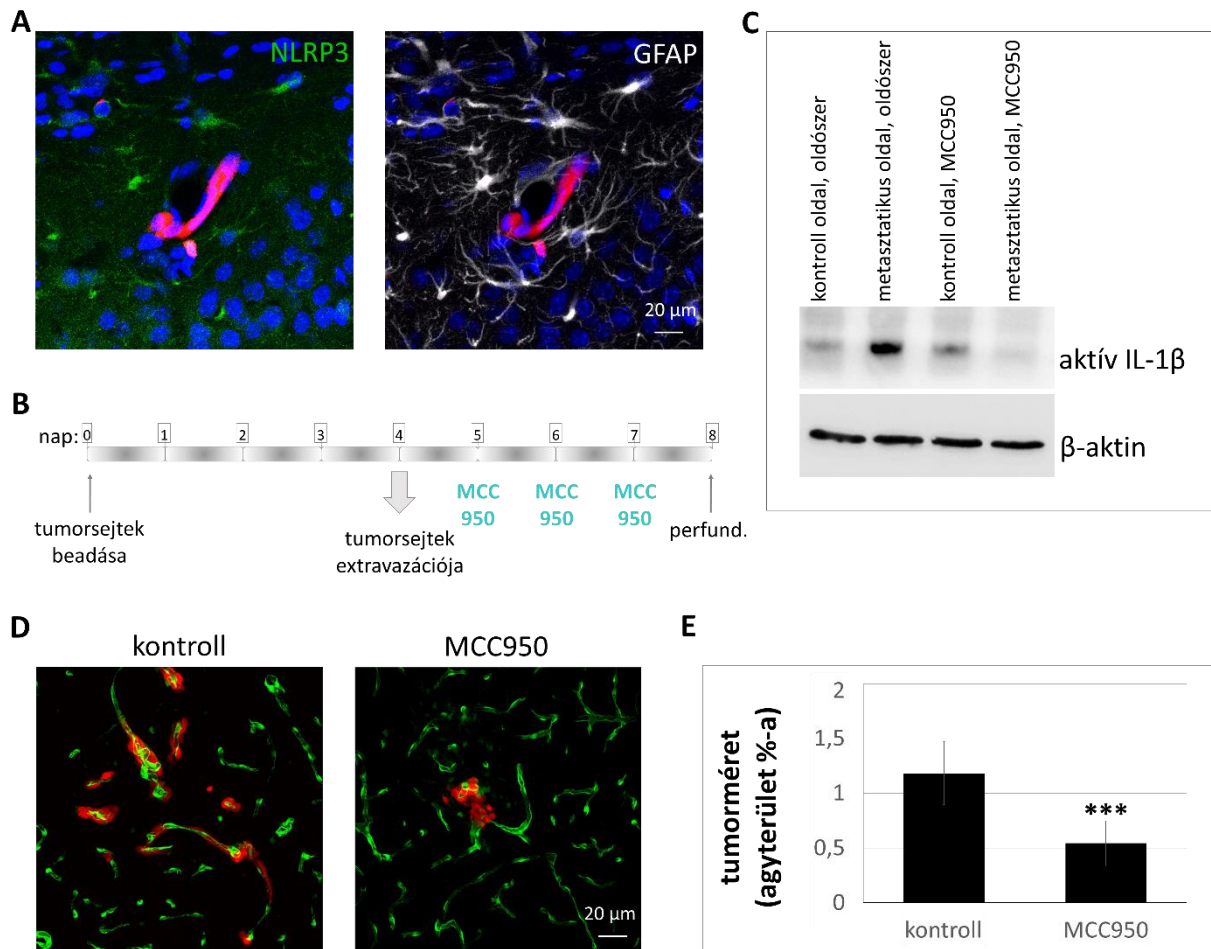
A: Az MDA-MB-231 sejtek szaporodása kontroll, illetve pericita-kondicionált médiumban PPP jelenlétében vagy hiányában, valamint Igf2-csenedesített pericitákról származó kondicionált médiumban. $N = 5$, átlag \pm szórás, $**P < 0,01$ a kontrollhoz viszonyítva az adott napon, $##P < 0,01$ a pericita-kondicionált médiummal kezelt sejtekhez viszonyítva az adott napon (ANOVA és Bonferroni *post-hoc* teszt). Peri-kond. méd. = pericita-kondicionált médium, Peri-kond. méd. / Lipofectamine = Lipofectamine 2000-rel kezelt pericitákról gyűjtött kondicionált médium, Peri-kond. méd. / Igf2 siRNS = Igf2-csenedesített pericitákról gyűjtött kondicionált médium, hu. = humán. **B:** Az *in vivo* kísérleti felállás sematikus ábrája. A tdTomato-4T1 sejtek beoltása utáni 5. és 6. napon az FVB/Ant:TgCAGyfp_sb #27 egereket PPP-vel kezeltük, majd a 8. napon perfundáltuk őket, és agyszeleteken vizsgáltuk a metasztatikus léziók méretét. **C:** Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek kontroll (oldószerrel kezelt) és PPP-vel kezelt állatok agyából. Piros = tumorsejtek, zöld/zöldessárga = erek, kék = sejtmagok (Hoechst jelölés). A nyilak a nagyobb tumorokat, a nyílhegyek a mikrometasztázisokat jelölik. **D:** A tumorméretet $N = 3$ állatból származó 17 agyszelet kvantitatív analízise alapján. Átlag \pm standard hiba, $**P < 0,01$ (ismétlés nélküli kétszemponstú ANOVA).

Az asztrocitáknak is fontos szerepe van az agyi metasztatikus folyamatokban, mivel képesek olyan mechanizmusokat aktiválni, amelyekkel gátolják, és olyanokat is, amelyekkel segítik a daganatsejtek túlélését az agyban. Kísérleteinkben a MEF2C transzkripciós faktor expressziójának fokozódását figyeltük meg a peritumorális asztrocitákban és a tumorsejtekben egyaránt, ami összefüggésben lehet a miR-802-5p és miR-194-5p mennyiségének csökkenésével az agyban és a szérumban is. Ezen és más miRNS-ek megváltozott expressziója fontos szerepet játszhat a metasztázisok kialakulásában, és akár biomarkerként is szolgálhat a daganatok korai azonosításában.

Amint azt a korábbiakban már említettük, az NLRP3 inflammaszóma is a peritumorális asztrocitákban aktiválódott, hozzájárulva a gyulladásos környezet kialakításához és a daganatok növekedéséhez.

Humán és egér tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztatázis mintákat vizsgálva azt találtuk, hogy az NLRP3 és az IL-1 β fehérjék csak a peritumorális asztrocitákban voltak jelen kimutatható mennyiségben, míg a tumorsejtekben vagy más sztromális sejtekben, illetve a tumoroktól távolabb elhelyezkedő gliasejtekben nem (**7. A ábra**). Az agyi metasztatázis-modellben a daganatsejteket tartalmazó oldalon megnőtt az aktív IL-1 β mennyisége az egerek agyában, amit meg tudtunk akadályozni az MCC950 NLRP3 gátlószer adagolásával (**7. B, C ábra**). Ezzel párhuzamosan, az MCC950-nel kezelt állatokban nemcsak csökkent az asztrogliózis és kevesebb IL-1 β fehérje volt kimutatható az asztrocitákban, hanem a metasztatikus léziók száma és mérete is szignifikánsan alacsonyabb volt az egerek agyában (**7. D, E ábra**). Mindez arra utal, hogy az áttétes sejtek közelében levő asztrocitákban aktiválódnak az NLRP3 inflammaszómák, és az így termelődő aktív IL-1 β fokozza a tumorsejtek proliferációját az agyban. A folyamat gátlásával lassítható a metasztatikus emlődaganatok növekedése az

agyban. Az inflammaszómák farmakológiai gátlásának tehát az agyi daganatok kezelésében is szerep juthat a jövőben.



7. ábra. Az NLRP3 inflammaszóma aktiválódása a peritumorális asztrocitákban és az NLRP3 inflammaszóma gátlásának hatása az agyi áttétképzésre.

A: Reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek (z-projekciók) az NLRP3 és a GFAP és kolokalizációjáról BALB/c egér metasztázis-modellben. Az NLRP3-pozitív pixelek 95%-a GFAP-pozitívnak bizonyult. **B:** A kísérleti felállás sematikus ábrája. Az egerek jobb *a. carotis communis*-ába tdTomato-4T1 sejteket injektáltunk. Az 5., 6. és 7. napon 10 mg/kg MCC950-et vagy oldószert (PBS-ben oldott DMSO-t; kontroll) oltottunk az állatokba intraperitoneálisan. A 8. napon az állatokat feláldoztuk WB, illetve mikroszkópos kísérletek céljából. **C:** Reprezentatív WB a kontroll (bal), illetve a metasztatikus sejteket tartalmazó (jobb) agyféltekékből. **D:** FVB/Ant:TgCAGyfp_sb #27 egerekbe tumorsejteket és MCC950-et injektáltunk a séma szerint. Az ábra reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételeket (z-projekciókat) mutat. Piros = tumorsejtek, zöld = erek (Venus-YFP). **E:** A tumorméreteket N = 3 állatból származó, állatonként 8 agyszelet kvantitatív analízise alapján. Átlag ± standard hiba, ***P < 0,001 (ANOVA és Fisher LSD *post-hoc* teszt).

5 Összefoglalás

Összefoglalva, olyan alapvető mechanizmusokat azonosítottunk az agyban, amelyek befolyásolják neurovaszkuláris egység, illetve a vér–agy gát működését fiziológias, gyulladásos és metasztatikus körülmények között.

Főbb megállapításaink a következők:

- A vér–agy gát a fehérállományban szorosabb barriert képez, mint a szürkeállományban.
- A PACAP endogén neuropeptid patológias körülmények között javíthatja az agyi endotélsejtek barrier tulajdonságait.
- Az általunk vizsgált EM-2- és egyes KYNA-analógok könnyebben átjutnak az agyi endotélsejtek rétegén, mint az alapvegyületek.
- Az agyi endotélsejtek és periciták számos mintázatfelismerő receptort expresszálnak és inflammaszóma-aktivációra is képesek.
- Az agyi vaszkuláris sejtek közvetíthetik a gyulladásos információkat az agyszövet és a periféria között.
- A neurovaszkuláris egység sejtjeiben aktiválódó inflammaszómák fontos szerepet játszhatnak patológias folyamatokban. Perifériás idegsérülések során az idegsejtekben, míg agyi metasztázisokban a peritumorális asztrocitákban aktiválódik az NLRP3 inflammaszóma, tovább súlyosbítva a betegség lefolyását.
- A neurovaszkuláris egység sejtjei alapvető szerepet játszanak a metasztatikus sejtek vér–agy gáton való átvándorlásában és az agyszövetben való túlélésében.

- A vér–agy gáton való transzmigráció előtt és alatt az endotélsejtek izolálják a emlőkarcinóma-sejteket a keringő vértől.
- Az emlőkarcinóma-sejtek képesek átmigrálni az egyedi agyi endotélsejteken keresztül, a transzcelluláris útvonalat használva. A melanómasejtek paracellulárisan, az endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok megnyitásával jutnak át a vér–agy gáton.
- A tumorsejtek vér–agy gáton való átvándorlását elősegíti a Rac és a PI3K útvonal aktivációja, valamint a proteázok termelése.
- Az agyi periciták mátrixfehérjék és IGF2 termelésével segítik a metasztatikus emlőkarcinóma-sejtek kitapadását és szaporodását az agyban.
- Az agyi metasztázisok kialakulásának korai fázisában megváltozik a vérplazma miRNS-mintázata, ami biomarkerek azonosítását teheti lehetővé.
- Az asztrociták több mechanizmus révén befolyásolják az agyi metasztázisok kialakulását, mint például a MEF2C felszaporodása és az inflammaszómák aktivációja.

6 Klinikai hasznosíthatóság, további tervek

Bár munkánk elsősorban alapkutató jellegű volt, mindig hangsúlyt fektettünk arra, hogy klinikailag releváns kérdéseket próbáljunk megválaszolni, a következőképpen:

- Bár a vér–agy gát regionális heterogenitásának jelentősége még nem pontosan ismert, feltételezésünk szerint összefüggésben áll az agyi patológiák heterogén lokalizációjával. Épp ezért folytatjuk ezt a témát, és transzkriptomikai módszerrel

fogjuk összehasonlítani a pericitákat a fehér- és a szürkeállományban fiatal és öreg egerekben.

- Ami az agyi gyógyszerbejuttatást illeti, vegyész kollégáinkkal azon dolgozunk, hogy megtaláljuk azt a KYNA analógot, amely megőrzött neuroprotektív tulajdonságai mellett a legjobb vér–agy gáton keresztüli permeabilitást mutatja.
- A neuroinflammáció és az inflammaszóma gátlás klinikai relevanciája szintén megkérdőjelezhetetlen. Az inflammaszóma inhibitorok fejlesztése és tesztelése nagy erővel zajlik, és számos kismolekula tűnik ígéretesnek nemcsak specifikus hatása, hanem a vér–agy gáton való átjutása miatt is.
- A PI3K/Akt/PTEN útvonal gátlására is számos gyógyszerjelölt vizsgálata zajlik preklinikai és klinikai szinten, és eredményeink alapján ezek a szerek nemcsak a primér tumorokra, hanem az agyi áttétek kialakulására is hatással lehetnek. Hasonlóan, a Rac1, a CB2 és az integrin szignalizáció gátlása is rendelkezik terápiás potenciállal. Ezzel szemben a *fasudil* – amely egy Japánban és Kínában engedélyezett gyógyszer érszűkület kezelésére – eredményeink szerint növelheti az agyi áttétek kialakulásának kockázatát.
- Eredményeink alapján az IGF2 jelátvitel gátlása kaphat még fontos szerepet az agyi metasztatizáció kezelésében. Mivel még nagyon kevésbé ismert, hogy mi a fiziológiai szerepe az agyi pericitákban expresszálandó IGF2-nek, ezt is szeretnénk körüljárni.
- Végül a miRNS-ekben rejlő potenciált emelném ki, amelyeket a jövőben akár diagnosztikus vagy terápiás biomarkerként is lehetne hasznosítani, és amelyeknek kutatását jelenleg is folytatjuk.

7 Az értekezésben felhasznált közlemények

1. Krizbai I, **Wilhelm I**, Bauer HC, Bauer H. The role of glia in the formation and function of the blood-brain barrier. *Neuroglia* 2. kiadás. (szerk.: H. Kettenman, B.R. Ransom), Oxford University Press, 33. fejezet, pp. 417-29 (2013). doi: 10.1093/med/9780199794591.003.0033.
2. **Wilhelm I**, Krizbai IA. In vitro models of the blood-brain barrier for the study of drug delivery to the brain. *Mol Pharm*. 11:1949-63 (2014). doi: 10.1021/mp500046f. (IF: 4,384, D1, független idéző: 157)
3. **Wilhelm I**, Nyúl-Tóth Á, Suciú M, Hermenean A, Krizbai IA. Heterogeneity of the blood-brain barrier. *Tissue Barriers*. 4:e1143544 (2016). doi: 10.1080/21688370.2016.1143544. (D1, független idéző: 146)
4. Krizbai IA, Nyúl-Tóth Á, Bauer HC, Farkas AE, Traweger A, Haskó J, Bauer H, **Wilhelm I**. Pharmaceutical targeting of the brain. *Curr Pharm Des*. 22:5442-62 (2016). doi: 10.2174/1381612822666160726144203. (IF: 2,611, Q1, független idéző: 19)
5. **Wilhelm I**, Krizbai I. Effects of PACAP on biological barriers. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide — PACAP. (szerk.: D. Reglodi, A. Tamas), Springer-Verlag, 26. fejezet, pp. 433-47 (2016). doi: 10.1007/978-3-319-35135-3_26. (független idéző: 2)
6. **Wilhelm I**, Nyúl-Tóth Á, Kozma M, Farkas AE, Krizbai IA. Role of pattern recognition receptors of the neurovascular unit in inflamm-aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 313:H1000-H1012 (2017). doi: 10.1152/ajpheart.00106.2017. (IF: 3,569, Q1, független idéző: 32)
7. Mészáros Á, Molnár K, Nógrádi B, Hernádi Z, Nyúl-Tóth Á, **Wilhelm I**, Krizbai IA. Neurovascular inflammaging in health and disease. *Cells*. 9:E1614 (2020). doi: 10.3390/cells9071614. (IF: 6,6, Q1, független idéző: 39)
8. **Wilhelm I**, Molnár J, Fazakas C, Haskó J, Krizbai IA. Role of the blood-brain barrier in the formation of brain metastases. *Int J Mol Sci*. 14:1383-411 (2013). doi: 10.3390/ijms14011383. (IF: 2,339, Q2, független idéző: 125)
9. **Wilhelm I**, Krizbai IA. Functional characteristics of brain tumor vascularization. *Brain Mapping: An Encyclopedic Reference*. (szerk.: A.W. Toga), Elsevier, 134. fejezet, pp. 1075-9 (2015). doi: 10.1016/B978-0-12-397025-1.00134-2.
10. **Wilhelm I**, Fazakas C, Molnár K, Végh AG, Haskó J, Krizbai IA. Foe or friend? Janus-faces of the neurovascular unit in the formation of brain metastases. *J Cereb Blood Flow Metab*. 38:563-587 (2018). doi: 10.1177/0271678X17732025. (IF: 6,04, D1, független idéző: 16)
11. Sereno M, Videira M, **Wilhelm I**, Krizbai IA, Brito MA. miRNAs in health and disease: a focus on the breast cancer metastatic cascade towards the brain. *Cells*. 9:E1790. (2020). doi: 10.3390/cells9081790. (IF: 6,6, Q1, független idéző: 10)
12. **Wilhelm I**, Molnár K, Krizbai IA. Role of cerebral endothelial tight junctions in the formation of brain tumors. *Tight Junctions*. (szerk.: L. Gonzalez-Mariscal), Springer, 12. fejezet, pp. 271-97 (2022). doi: 10.1007/978-3-030-97204-2_12.
13. Mallareddy JR, Tóth G, Fazakas C, Molnár J, Nagyőszí P, Lipkowski AW, Krizbai IA, **Wilhelm I**. Transport characteristics of endomorphin-2 analogues in brain capillary endothelial cells. *Chem Biol Drug Des*. 79:507-13 (2012). doi: 10.1111/j.1747-0285.2011.01306.x. (IF: 2,469, Q2, független idéző: 7)
14. **Wilhelm I***, Fazakas C*, Tamás A, Tóth G, Reglődi D, Krizbai IA. PACAP enhances barrier properties of cerebral microvessels. *J Mol Neurosci*. 54:469-76 (2014). doi: 10.1007/s12031-014-0260-4. (IF: 2,343, Q1, független idéző: 6)

15. Nyúl-Tóth Á, Suciú M, Molnár J, Fazakas C, Haskó J, Herman H, Farkas AE, Kaszaki J, Hermenean A, **Wilhelm I**, Krizbai IA. Differences in the molecular structure of the blood-brain barrier in the cerebral cortex and white matter: an in silico, in vitro and ex vivo study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 310:H1702-14 (2016). doi: 10.1152/ajpheart.00774.2015. (IF: 3,348, Q1, független idéző: 35)
16. Molnár K, Lőrinczi B, Fazakas C, Szatmári I, Fülöp F, Kmetykó N, Berkecz R, Ilisz I, Krizbai IA, **Wilhelm I**[#], Vécsei L[#]. SZR-104, a novel kynurenic acid analogue with high permeability through the blood-brain barrier. *Pharmaceutics*. 13:E61 (2021) doi: 10.3390/pharmaceutics13010061. (IF: 6,525, Q1, független idéző: 2)
17. Nagyószai P, Nyúl-Tóth Á, Fazakas C, **Wilhelm I**, Kozma M, Molnár J, Haskó J, Krizbai IA. Regulation of NOD-like receptors and inflammasome activation in cerebral endothelial cells. *J Neurochem*. 135:551-64 (2015). doi: 10.1111/jnc.13197. (IF: 3,842, Q1, független idéző: 65)
18. Nyúl-Tóth Á, Kozma M, Nagyószai P, Nagy K, Fazakas C, Haskó J, Molnár K, Farkas AE, Végh AG, Váró G, Galajda P, **Wilhelm I**, Krizbai IA. Expression of pattern recognition receptors and activation of the non-canonical inflammasome pathway in brain pericytes. *Brain Behav Immun*. 64:220-231 (2017). doi: 10.1016/j.bbi.2017.04.010. (IF: 6,306, D1, független idéző: 38)
19. Nógrádi B, Nyúl-Tóth Á, Kozma M, Molnár K, Patai R, Siklós L, **Wilhelm I**, Krizbai IA. Upregulation of Nucleotide-binding oligomerization domain-, LRR- and Pyrin domain-containing protein 3 in motoneurons following peripheral nerve injury in mice. *Front Pharmacol*. 11:584184 (2020). doi: 10.3389/fphar.2020.584184. (IF: 5,811, Q1, független idéző: 3)
20. Kozma M, Mészáros Á, Nyúl-Tóth Á, Molnár K, Costea L, Hernádi Z, Fazakas C, Farkas AE, **Wilhelm I**[#], Krizbai IA[#]. Cerebral pericytes and endothelial cells communicate through inflammasome-dependent signals. *Int J Mol Sci*. 22:6122 (2021). doi: 10.3390/ijms22116122. (IF: 6,208, D1, független idéző: 2)
21. Molnár K, Nógrádi B, Kristóf R, Mészáros Á, Pajer K, Siklós L, Nógrádi A, **Wilhelm I**[#], Krizbai IA[#]. Motoneuronal inflammasome activation triggers excessive neuroinflammation and impedes regeneration after sciatic nerve injury. *J Neuroinflammation*. 19:68 (2022). doi: 10.1186/s12974-022-02427-9. (IF: 9,3, D1, független idéző: 10)
22. **Wilhelm I**^{*}, Fazakas C^{*}, Molnár J, Haskó J, Végh AG, Cervenak L, Nagyószai P, Nyúl-Tóth Á, Farkas AE, Bauer H, Guillemin GJ, Bauer HC, Váró G, Krizbai IA. Role of Rho/ROCK signaling in the interaction of melanoma cells with the blood-brain barrier. *Pigment Cell Melanoma Res*. 27:113-23 (2014). doi: 10.1111/pcmr.12169. (IF: 4,619, D1, független idéző: 10)
23. Haskó J, Fazakas C, Molnár J, Nyúl-Tóth Á, Herman H, Hermenean A, **Wilhelm I**, Persidsky Y, Krizbai IA. CB2 receptor activation inhibits melanoma cell transmigration through the blood-brain barrier. *Int J Mol Sci*. 15:8063-74 (2014). doi: 10.3390/ijms15058063. (IF: 2,862, Q1, független idéző: 29)
24. Molnár J, Fazakas C, Haskó J, Sipos O, Nagy K, Nyúl-Tóth Á, Farkas AE, Végh AG, Váró G, Galajda P, Krizbai IA, **Wilhelm I**. Transmigration characteristics of breast cancer and melanoma cells through the brain endothelium: role of Rac and PI3K. *Cell Adh Migr*. 10:269-81 (2016). doi: 10.1080/19336918.2015.1122156. (IF: 3,872, Q2, független idéző: 21)
25. Herman H, Fazakas C, Haskó J, Molnár K, Mészáros Á, Nyúl-Tóth Á, Szabó G, Erdélyi F, Ardelean A, Hermenean A[#], Krizbai IA[#], **Wilhelm I**[#]. Paracellular and transcellular migration of metastatic cells through the cerebral endothelium. *J Cell Mol Med*. 23:2619-31 (2019). doi: 10.1111/jcmm.14156. (IF: 4,486, Q1, független idéző: 27)
26. Haskó J, Fazakas C, Molnár K, Mészáros Á, Patai R, Szabó G, Erdélyi F, Nyúl-Tóth Á, Győri F, Kozma M, Farkas AE, Krizbai IA[#], **Wilhelm I**[#]. Response of the neurovascular unit to brain metastatic breast cancer cells. *Acta Neuropathol Commun*. 7:133 (2019). doi: 10.1186/s40478-019-0788-1. (IF: 6,27, D1, független idéző: 18)

27. Sereno M, Haskó J, Molnár K, Medina SJ, Reisz Z, Malhó R, Videira M, Tiszlavicz L, Booth SA, **Wilhelm I**, Krizbai IA, Brito MA. Downregulation of circulating miR 802-5p and miR 194-5p and upregulation of brain MEF2C along breast cancer brain metastasization. *Mol Oncol*. 14:520-538 (2020). doi: 10.1002/1878-0261.12632. (IF: 6,603, D1, független idéző: 17)
28. Molnár K, Mészáros Á, Fazakas C, Kozma M, Győri F, Reisz Z, Tiszlavicz L, Farkas AE, Nyúl-Tóth Á, Haskó J, Krizbai IA[#], **Wilhelm I**[#]. Pericyte-secreted IGF2 promotes breast cancer brain metastasis formation. *Mol Oncol*. 14:2040-2057 (2020). doi: 10.1002/1878-0261.12752. (IF: 6,603, D1, független idéző: 25)
29. Magnussen SN, Toraskar J, **Wilhelm I**, Haskó J, Figenschau SL, Molnar J, Seppola M, Steigen SE, Steigedal TS, Hadler-Olsen E, Krizbai IA, Svineng G. Nephronectin promotes breast cancer brain metastatic colonization via its integrin-binding domains. *Sci Rep*. 10:12237 (2020). doi: 10.1038/s41598-020-69242-1. (IF: 4,38, D1, független idéző: 8)
30. Figueira I, Galego S, Custódio-Santos T, Vicente R, Molnár K, Haskó J, Malhó R, Videira M, **Wilhelm I**, Krizbai I, Brito MA. Picturing breast cancer brain metastasis development to unravel molecular players and cellular crosstalk. *Cancers (Basel)*. 13:910 (2021). doi: 10.3390/cancers13040910. (IF: 6,575, Q1, független idéző: 6)
31. Figueira I, Godinho-Pereira J, Galego S, Maia J, Haskó J, Molnár K, Malhó R, Costa-Silva B, **Wilhelm I**, Krizbai IA, Brito MA. MicroRNAs and extracellular vesicles as distinctive biomarkers of precocious and advanced stages of breast cancer brain metastases development. *Int J Mol Sci*. 22:5214 (2021). doi: 10.3390/ijms22105214. (IF: 6,208, D1, független idéző: 10)
32. Mészáros Á, Molnár K, Fazakas C, Nógrádi B, Lüvi A, Dudás T, Tiszlavicz L, Farkas AE, Krizbai IA[#], **Wilhelm I**[#]. Inflammasome activation in peritumoral astrocytes is a key player in breast cancer brain metastasis development. *Acta Neuropathol Commun*. 11:155 (2023). doi: 10.1186/s40478-023-01646-2. (IF: 7,1, D1)

(*megosztott első szerzők)

(#megosztott utolsó/levelező szerzők)

Publikációs mutatók (MTMT szerint)

2024. február 9.

Az értekezésben tárgyalt közlemények összesített impakt faktora: 137,873

Az értekezésben tárgyalt első, utolsó és levelező szerzős közlemények összesített impakt faktora: 78,738

Összesített impakt faktor: 245,695

Az értekezésben tárgyalt közleményekre kapott független idézetek száma: 885

Az értekezésben tárgyalt első, utolsó és levelező szerzős közleményekre kapott független idézetek száma: 625

Független idézetek száma: 1988

Idézetek száma összesen: 2372

Köszönetnyilvánítás

Elsőként Dr. Krizbai Istvánnak szeretnék köszönetet mondani, aki bevezetett a tudományos kutatás rejtelmeibe, aki mentorként és társként is mindig mellettem állt, és aki nélkül biztosan nem jutottam volna el idáig. István, nem tudok elég hálás lenni Neked!

Köszönettel tartozom a Neurovaszkuláris Egység Kutatócsoport tagjainak, akikkel együtt oldottuk meg a laboratóriumi munka rengeteg kihívását. Külön kiemelném Dr. Farkas Attila, Dr. Fazakas Csilla és Dr. Mészáros-Molnár Kinga nevét. Hálával tartozom továbbá Dr. Haskó Jánosnak, Dr. Nyúl-Tóth Ádámnak, Dr. Molnár Juditnak, a néhai NTK Dungalnak, Dr. Nagyőrsi Péternek, Kozma Mihálynak, Győri Fanninak, Mészáros Ádámnak és Dudás Tamásnak. Köszönöm az együtt töltött időt a volt és jelenlegi hallgatóinknak, valamint csoportunk korábbi és új tagjainak. Szerencsésnek mondhatom magam, hiszen az összes szakmai sikeremet és kudarcomat a Szegedi Biológiai Kutatóközpontban élhettem meg. Hálás vagyok az SZBK és a Biofizikai Intézet mindenkori vezetőségének, különösen Dr. Ormos Pálnak, az MTA rendes tagjának és Dr. Zimányi Lászlónak.

Köszönetet szeretnék mondani kollaborációs partnereinknek az SZBK-ból (Dr. Végh Attila Gergelynek, Dr. Siklós Lászlónak és Dr. Nógrádi Bernátnak, Dr. Galajda Péternek és munkatársainak, valamint Dr. Tóth Gézánnak); a Szegedi Tudományegyetemről (Prof. Dr. Vécsei Lászlónak, az MTA rendes tagjának, Prof. Dr. Ilisz Istvánnak, Dr. Berkecz Róbertnek, Prof. Dr. Szatmári Istvánnak, Prof. Dr. Nógrádi Antalnak és munkatársainak, valamint Prof. Dr. Tiszlavicz Lászlónak); Magyarországról (Prof. Dr. Reglődi Dórának, az MTA levelező tagjának a Pécsi Tudományegyetemről és Dr. Erdélyi Ferencnek a Kísérletes Orvostudományi Kutatóintézetből) és a nagyvilágból (Dr. Alexandra Brito-nak és munkatársainak a Lisszaboni Egyetemről, Dr. Synnøve Magnussennek Tromsø-ből, Prof. Dr. Anca Hermeneannak és Dr. Herman Hildegardnak Aradról). Köszönöm a pályázati támogatásokat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatalnak, valamint a Magyar Tudományos Akadémiának, amely két Bolyai János Kutatási Ösztöndíjjal és a gyermeket nevelő kutatókat támogató KGYNK-ösztöndíjjal segítette munkámat.

Nem utolsósorban, köszönöm családom minden tagjának, hogy velem vannak, és fájdalommal őrzöm emlékét azoknak, akik már nincsenek.