MTA doktora pályázat

Doktori értekezés

A neurovaszkuláris egység szerepe agyi gyulladásos és metasztatikus folyamatokban

Dr. Wilhelm Imola







Neurovaszkuláris Egység Kutatócsoport

Szeged

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

Weöres Sándor: A teljesség felé

Tartalomjegyzék

R	övidítések j	egyzéke	5		
1	Irodalmi áttekintés				
1.1 A neurovaszkuláris egység					
	1.1.1	A neurovaszkuláris egység meghatározása	8		
	1.1.2	Az agyi erek sejtes felépítése	10		
	1.1.3	Az agyi endotélsejtek és a vér–agy gát	10		
	1.1.	3.1 Az interendoteliális junkciók	10		
	1.1.	3.2 Transzportfolyamatok a vér–agy gáton keresztül	12		
	1.1.	3.3 Az agyi endotélium heterogenitása	13		
	1.1.4	A periciták szerepe az agyi erek működésének szabályozásában	14		
	1.1.5	Az asztrociták jelentősége a vér–agy gát működésében	15		
	1.1.6	A neurovaszkuláris egység felépítésében és működésében résztvevő egyéb sejtek	16		
	1.2 Az	agyi erek szerepe neuroinflammációban	17		
	1.2.1	A neuroinflammáció agyi patológiás folyamatokban és öregedésben	17		
	1.2.2	A PRR-ek	19		
	1.2.	2.1 A TLR-ek szerepe neuroinflammációban	20		
	1.2.	2.2 Az NLR család	21		
	1.2.3	Az inflammaszómák	23		
	1.2.4	Az inflammaszómák szerepe agyi gyulladásos folyamatokban	26		
	1.3 Az	agyi metasztázisok kialakulása	27		
	1.3.1	Az agyi metasztázisok klinikai és epidemiológiai jellemzői	27		
	1.3.2	Az agyi metasztázisok kialakulásának sajátosságai	28		
	1.3.	2.1 A metasztatikus sejtek extravazációja a vér–agy gáton keresztül	28		
	1.3.	2.2 Az áttétképző sejtek túlélése az agyi környezetben	30		
	1.3.3	Az agyi áttétképző sejtek tulajdonságai. Az agyi metasztázisok potenciális biomarkerei	33		
	1.3.	3.1 A tumorsejtek által termelt proteázok szerepe az agyi metasztázisok kialakulásában	34		
	1.3.	3.2 A tumorsejtek által felszabadított miRNS-ek szerepe az agyi áttétképzésben	35		
	1.3.4	Az agyi áttétes tumorok vérellátása és a vér–tumor barrier	37		
2	Ké	rdésfelvetés, célkitűzések	38		
3	М	ódszerek	39		
	3.1 In	<i>vitro</i> módszerek	39		
	3.1.1	Primér sejtek izolálása és tenyésztése	39		
	3.1.2	A TEER és a permeabilitás mérése	40		
	3.1.3	Egyéb sejtek tenyésztése	41		
	3.1.4	A sejtek kezelése, az in vitro kísérletek kivitelezése	41		
	3.1.5	Az endotélsejtek és a periciták közötti interakciók vizsgálata	42		
	3.1.6	Az endotélsejtek és a tumorsejtek közötti interakciók vizsgálata	42		
	3.1.7	A periciták és a tumorsejtek közötti interakciók vizsgálata	44		
	3.2 In	<i>vivo</i> módszerek	44		
	3.2.1	Perifériás idegsérüléses modellek	45		
	3.2.2	Agyi metasztázis-modellek	45		
	3.3 RM	IS vizsgálati módszerek	46		
	3.4 Fe	hérje vizsgálati módszerek	46		

	3.4.3	1 Western-blot	46
	3.4.2	2 ELISA	47
	3.4.3	3 Immunfluoreszcencia és immunhisztokémia	47
	3.5	Mikroszkópos módszerek	48
	3.5.3	1 Transzmissziós elektronmikroszkópia	48
	3.5.2	2 Kétfoton-mikroszkópia	48
	3.5.3	3 Atomerő-mikroszkópia	48
	3.6	Adatbázis-elemzés, targetpredikció és statisztika	49
4		Eredmények	50
	4.1	A vér–agy gát működése és szabályozása	50
	4.1.:	1 Különbségek a vér–agy gát molekuláris felépítésében a szürkeállomány és a fehérállo között	omány 50
	4.1.2	2 A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid hatása a vér–agy gátra	53
	4.1.3	3 Potenciális terápiás molekulák átjutása a vér–agy gáton	54
	4.2	A PRR-ek és az inflammaszómák szerepe a neurovaszkuláris egység sejtjeiben	57
	4.2.3	1 A PRR-ek agyi endotélsejtekben és pericitákban	57
	4.2.2	2 Az inflammaszómák aktivációja agyi endotélsejtekben és pericitákban	60
	4.2.3	3 Az agyi endotélsejtek és periciták közötti inflammaszóma-függő kommunikáció	64
	4.2.4	4 Inflammaszóma-aktiváció a neurovaszkuláris egység sejtjeiben patológiás körülm között	1ények 66
	4.3	Az agyi áttétes tumorok kialakulásának mechanizmusai	71
	4.3.3	A metasztatikus sejtek elakadása az agyi erekben és átvándorlása a vér–agy gáton	72
	4.3.2	2 Jelátviteli folyamatok a daganatos sejtek vér-agy gáton való transzmigrációja során	77
	4.3.3	3 A periciták szerepe az agyi metasztatikus környezetben	81
	4.3.4	4 A miRNS-ek szerepe az agyi áttétek kialakulásában	90
	4.3.	5 Az inflammaszómák aktiválódása az agyi áttétek kialakulása során	92
5		Megbeszélés	94
	5.1	A vér–agy gát működése és szabályozása	94
	5.1.3	1 A vér–agy gát regionális heterogenitása	94
	5.1.2	2 A vér–agy gát integritásának védelme	95
	5.1.3	3 Gyógyszerbejuttatás az agyba a vér–agy gáton keresztül	96
	5.2	A PRR-ek és az inflammaszómák szerepe a neurovaszkuláris egység sejtjeiben	97
	5.2.3	1 A vaszkuláris sejtek aktív szerepe a gyulladásos reakciókban	98
	5.2.2	2 A vaszkuláris sejtek közvetítő szerepe a gyulladásos reakciókban	99
	5.3	Az agyi áttétes tumorok kialakulásának mechanizmusai	101
	5.3.3	1 A metasztatikus sejtek átjutása a vér–agy gáton	101
	5.3.2	2 Az agyi környezet hatása a metasztázisokra	103
6		Összefoglalás, legfontosabb eredmények	106
7		Klinikai hasznosíthatóság, további tervek	109
8		Irodalomjegyzék	110
9		Az értekezésben felhasznált közlemények	140
Kċ	öszönetn	nyilvánítás	143

Rövidítések jegyzéke

ABC	adenozin-trifoszfát-kötő kazetta (ATP-binding cassette)
AD	Alzheimer kór (<i>Alzheimer's disease</i>)
AFM	atomerő-mikroszkóp (atomic force microscope)
AIM2	absent in melanoma 2
ALCAM	aktivált leukocita sejtadhéziós molekula (<i>activated leukocyte cell adhesion molecule</i>)
Ang1	angiopoietin-1
ANOVA	varianciaanalízis (analysis of variance)
AQP4	aquaporin-4
ASC	apoptózis-asszociált és CARD domént tartalmazó speckszerű fehérje (apoptosis- associated speck-like protein containing a CARD)
ATP	adenozin-trifoszfát (adenosine triphosphate)
BIR	bakulovírus apoptózist gátló ismétlődések (baculovirus inhibitor of apoptosis repeats)
BSA	marhasavó albumin (bovine serum albumin)
cAMP	ciklikus adenozin monofoszfát (cyclic adenosine monophosphate)
CARD	kaszpáz toborzási domén (caspase recruitment domain)
ChAT	kolin-acetil-transzferáz (choline acetyltransferase)
CIITA	II. osztályú MHC transzaktivátor (class II MHC transactivator)
CLR	C-típusú lektin receptor
CSC	daganatos őssejt (cancer stem-like cell)
DHA	dokozahexaénsav (<i>docosahexaenoic acid</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	dezoxiribonukleinsav
EBA	Evans kékkel jelölt albumin (<i>Evans blue albumin</i>)
ECM	extracelluláris mátrix
EdU	5-etinilil-2-dezoxiuridin
ELISA	enzimhez kötött immunszorbens próba (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EM	endomorfin
EndMT	endoteliális-mezenchimális tranzíció
EV	extracelluláris vezikula
FBS	magzati marhasavó (<i>fetal bovine serum</i>)
GFAP	gliális fibrilláris savas fehérje (glial fibrillary acidic protein)
GLUT1	1-es glükóz transzporter (glucose transporter 1)
HBVP	humán agyi vaszkuláris pericita (human brain vascular pericyte)
HER2	human epidermális növekedési faktor receptor 2
HRP	tormaperoxidáz (horseradish peroxidase)
ICAM	intercelluláris adhéziós molekula
IF	immunfluoreszcencia
IFN-γ	interferon-y
IGF-1R/IGF-2R	inzulinszerű növekedési faktor receptor 1/2 (insulin-like growth factor receptor 1/2)
lgf2, IGF2	inzulinszerű növekedési faktor 2 (insulin-like growth factor 2)
IHC	immunhisztokémia (immunohistochemistry)

II, IL	interleukin
ISH	<i>in situ</i> hibridizáció
JAM	junkcionális adhéziós molekula
KYNA	kinurénsav (<i>kynurenic acid</i>)
LFA-1	leukocyte function associated protein-1
LPS	lipopoliszacharid
LRR	leucinban gazdag ismétlődés (<i>leucine-rich repeat</i>)
MDP	muramil-dipeptid
MEF2C	myocyte enhancer factor 2C
MFSD2A	major facilitator superfamily domain-containing protein 2A
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)
miR, miRNS	mikro-RNS
MMP	mátrix metalloproteináz
mRNS	hírvivő (<i>messenger</i>) RNS
MS	sclerosis multiplex (<i>multiple sclerosis</i>)
NAIP	neuronális apoptózist gátló fehérje (neuronal apoptosis inhibitory protein)
NF-κB	nukleáris faktor-κB
NOD	nukleotid oligomerizációs domén
NPNT	nefronektin (<i>nephronectin</i>)
NLR	NOD-szerű receptor (NOD-like receptor)
OMV	külső membrán vezikulák (<i>outer membrane vesicles</i>)
OG	Oregon Green 488
OPC	oligodendrocita prekurzor sejt (oligodendrocyte precursor cell)
РАСАР	hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (<i>pituitary adenylate cyclase activating polypeptide</i>)
Рарр	látszólagos áteresztőképesség (apparent permeability)
PBEC	sertés agyi endotélsejt (porcine brain endothelial cell)
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
· qPCR	valós idejű PCR (quantitative PCR)
PD	Parkinson kór (Parkinson's disease)
PDGF-BB	vérlemezke eredetű növekedési faktor BB (platelet-derived growth factor BB)
PDGFRβ	PDGF receptor β
PDS	plazma eredetű borjúsavó (<i>plasma-derived serum</i>)
Ре	endoteliális permeabilitás
PECAM-1	vérlemezke endoteliális sejttapadási molekula (<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>)
PFA	paraformaldehid
P-gp	P-glikoprotein
РІЗК	foszfatidilinozitol 3-kináz (phosphoinositide 3-kinase)
PM	pericita médium
PPP	pikropodofillin (<i>picropodophyllin</i>)
PRR	mintázatfelismerő receptor (pattern recognition receptor)
PTEN	foszfatáz és tenzin homológ (phosphatase and tensin homolog)
PYD	pirin domén (<i>pyrin domain</i>)
RBEC	patkány agyi endotélsejt (<i>rat brain endothelial cell</i>)
RIPA	radioimmunoprecipitation assay

- RNS ribonukleinsav
- ROS reaktív oxigéngyökök (reactive oxygen species)
- SF Na-fluorescein (sodium fluorescein)
- SFI ülőideg funkcionális index (sciatic functional index)
- SLC solute carrier
- SMA simaizom aktin (smooth muscle actin)
 - $\cdot \alpha$ -SMA α -simaizom aktin
- TBI traumás agyi sérülés (traumatic brain injury)
- TEER transzendoteliális elektromos ellenállás (transendothelial electric resistance)
- TEM transzmissziós elektron mikroszkóp
- TGF-β transzformáló növekedési faktor-β (*transforming growth factor-*β)
- TLR Toll-szerű receptor (*Toll-like receptor*)
- TNF-α tumor nekrózis faktor-α
- VCAM-1 vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1 (vascular cell adhesion molecule-1)
- VLA-4 very late activation antigen-4
- WB western-blot
- ZO zonula occludens

1 Irodalmi áttekintés

1.1 A neurovaszkuláris egység

1.1.1 A neurovaszkuláris egység meghatározása

A neurovaszkuláris egységet a központi idegrendszerben található idegsejtek és gliasejtek, valamint az erek falát alkotó endotélsejtek és az őket körülvevő simaizomsejtek és periciták alkotják, amelyek szoros morfológiai és funkcionális kapcsolatban állnak egymással (**1. A ábra**). A fogalmat a *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* által rendezett 2001. évi *Stroke Progress Review Group meeting*en vezették be,¹ hogy hangsúlyozzák az agy sejtjeinek és ereinek összehangolt működését. A neurovaszkuláris egységnek két fő funkciója van, a neurovaszkuláris kapcsolás és a vér–agy gát.

A neurovaszkuláris kapcsolás a neuronális aktivitás és az agyi véráramlás térben és időben való összehangolását jelenti. Ennek következtében az idegsejtek aktivitásának növekedése a véráramlás tranziens és lokális fokozódásához vezet.² A neurovaszkuláris kapcsolás az idegsejtek, az asztrociták, a simaizomsejtek, a periciták és az agyi endotélsejtek koordinált működése által valósul meg. A szinaptikus aktivitás során a neuronokból és az asztrocitákból felszabaduló metabolikus termékek (például a laktát, az adenozin vagy a CO₂) és vazoaktív anyagok (például a NO és a prosztanoidok) a simaizomsejtek, illetve a periciták tónusának változtatása révén okoznak vazodilatációt, amely az endotélsejtek közvetítésével retrográd irányba terjed.³ Bár korábban megkérdőjelezték a kapillárisok és a periciták szerepét az agyi véráramlás szabályozásában,⁴ egyre több adat utal arra, hogy nemcsak az arteriolákat borító simaizomsejtek képesek az érátmérő szabályozására, hanem a periciták is aktívan részt vesznek ebben a folyamatban.^{5,6}

A neurovaszkuláris egység másik alapvető szerepe a vér–agy gát kialakítása. A vér–agy gát az agy legfontosabb barrier rendszere, amely megakadályozza a potenciálisan káros anyagok és sejtes elemek bejutását a vérből az agyi parenchimába.⁷ Az agyi endotélsejtek specifikus barrier tulajdonságai az idegrendszeri környezet – elsősorban a periciták és az asztrociták – jelenlétében alakulnak ki és maradnak fenn.^{8,9} Ennek legfontosabb elemei a folytonosan

elhelyezkedő szoros kapcsolatok, amelyek szinte teljesen átjárhatatlanná teszik a sejtek közötti (paracelluláris) útvonalat.





1. ábra. A neurovaszkuláris egység sejtjei és a vér–agy gát.

A: Az agyi hajszálerek sejtes felépítése és az endoteliális szoros kapcsolatok legfontosabb fehérjéi. B: A vér–agy gát szállító és barrier funkciója. A gátat egy négyszeres védvonal határozza meg: a folytonos szoros kapcsolatok által biztosított paracelluláris barrier, az efflux transzporterek, az enzimatikus barrier, illetve a vastag glikokálix és az alacsony számú transzcitotikus vezikula által meghatározott transzcelluláris barrier. A szállító funkció az SLC transzporterek, vagyis a karrier-mediált endocitózis, valamint receptor-mediált és adszorptív endocitózis révén valósul meg. A kisméretű gáznemű és lipofil anyagok passzívan jutnak át a vér–agy gáton. TJs = szoros kapcsolatok (*tight junctions*).

Az értekezés elsősorban a neurovaszkuláris egység sejtjeire és vér-agy gát szerepére összpontosít.

1.1.2 Az agyi erek sejtes felépítése

Az agyi érhálózat kialakításában elsősorban a penetráló arteriolákból kiágazó és tovább osztódó mikroerek, kapillárisok vesznek részt. A penetráló arteriolát az őt közvetlenül követő elsőrendű mikroértől az esetek 20-50%-ában egy szfinkter választja el, amely a véráramlást szabályozza.¹⁰ A penetráló arteriolától számított 1.-4. elágazások alkotják a arterioláris-kapilláris tranzíciós zónát, amelyet a valódi kapilláris elágazódások követnek.¹¹ Egér agyban ezeknek átmérője 7 µm-nél kisebb, és a teljes érpálya hosszának 96%-át alkotják.^{11,12}

Az agyi hajszálerek egy olyan sűrű hálózatot hoznak létre, amelynek egérben kb. 300 m,¹² az emberi agyban pedig 600-650 km a teljes hossza. A kapillárisok lumen felé néző összfelszíne emberben kb. 12-18 m²,^{7,13} és a neuronok maximális távolsága a legközelebbi kapilláristól kb. 20-40 μm-re becsülhető.^{14,15} Egér agykéregben ez a szám átlagosan 15-20 μm.^{16,17} Tehát gyakorlatilag minden idegsejt "saját" hajszálérrel rendelkezik.^{18,19}

Az agyi erek felépítésében az erek falát bélelő endotélsejtek, az ún. murális sejtek (simaizomsejtek és periciták) és az asztrocita végtalpak vesznek részt (**1. A ábra**).

1.1.3 Az agyi endotélsejtek és a vér-agy gát

Az agyi endotélsejtek az arteriolák és a kapillárisok szintjén lapos, elnyúlt, míg a venulákban romboid alakú sejtek, amelyek az erek lumenét határolják.²⁰ Endoteliális jellemzőik mellett rendelkeznek ún. gát (barrier) tulajdonságokkal is, amelyek az epitélsejtekhez teszik őket hasonlóvá, és amelyek alapvető szerepet játszanak az agyi homeosztázis fenntartásában.

Az agyi endotélsejtek barrier tulajdonságai a vér–agy gát négyszeres védvonalát határozzák meg (**1. B ábra**).²¹ Ezek közül az első és legfontosabb a folytonos szoros kapcsolatok jelenléte a sejtek között. A szoros kapcsolatok (*tight junctions*) képezik a paracelluláris (sejtek közötti) gátat, amely megakadályozza az anyagok szabad áramlását az agyi endotélsejtek luminális (vér felőli/apikális) és az abluminális (agyszövet felőli/bazolaterális) oldala között.

1.1.3.1 Az interendoteliális junkciók

Az agyi endotélsejteket összekötő szoros kapcsolatok egy fizikai barriert képeznek a sejtek közötti útvonal szinte teljes lezárására. Mivel ezek a struktúrák még az ionok átjutását is korlátozzák, elektromos ellenállás alakul ki a sejtréteg két oldalán. A TEER (transzendoteliális elektromos ellenállás, *transendothelial electric resistance*) jól jellemzi a junkciók szorosságát. *In vivo* mérések alapján ennek értéke 1000-2000 $\Omega \times \text{cm}^{2,22,23}$ A TEER-t azonban elsősorban *in vitro* modellek jellemzésére szokták használni, ahol számos impedancia mérési módszer áll a kutatók rendelkezésére a paracelluláris és a teljes ellenállás meghatározására.²⁴

A szoros kapcsolatok felépítésében transzmembrán és citoplazmatikus fehérjék vesznek részt. A transzmembrán fehérjék extracelluláris doménjei a szomszédos sejtekben található hasonló doménekhez kapcsolódnak (transz-interakciók formájában), így kötve össze azokat. Az intracelluláris domének pedig a citoplazmatikus, más néven plakkfehérjék közvetítésével vannak az aktin-citoszkeletonhoz kihorgonyozva. A sejtmembránban a szoros kapcsolatokat felépítő fehérjék cisz-interakciói övszerű fonatokat hoznak létre, amelyeknek sűrűsége, és az általuk alkotott hálózat összetettsége határozza meg a paracelluláris gát szorosságát. A gát funkció mellett a szoros kapcsolatok a sejt polaritásának kialakulásáért is felelősek, mivel elválasztják egymástól az apikális és a bazolaterális membránt. Ezt nevezzük a szoros kapcsolatok *fence* (kerítés) szerepének. Ezeken kívül a szoros kapcsolatok fehérjéi a jelátvitelben és a génátírás szabályozásában is részt vehetnek.²⁵

Az agyi endotélsejtek szoros kapcsolatainak transzmembrán fehérjéi közül a legfontosabbak a négy transzmembrán doménnel rendelkező klaudin-5, illetve más klaudin fehérjék, valamint az okkludin és a tricellulin. Az immunoglobulin szupercsaládba tartozó, egy transzmembrán domént tartalmazó fehérjék közül pedig a JAM-ek (junkcionális adhéziós molekula) és az ESAM (endotélsejt-szelektív adhéziós molekula) vesznek részt a szoros kapcsolatok felépítésében. A plakkfehérjék közül a ZO (*zonula occludens*) fehérjéket lehet kiemelni, a ZO-1-et és a ZO-2-t (**1. A ábra**). A ZO fehérjék állványzatként működnek a szoros kapcsolatokban, hiszen számos junkcionális, citoszkeletális és szabályozó fehérjét tudnak megkötni, ugyanakkor képesek a sejtmagba is vándorolni, ahol a génátírás szabályozásában vehetnek részt.^{26,27}

A szoros kapcsolatok kialakulásában és fenntartásában alapvető fontosságúak az adherens junkciók, amelyek – az epitélsejtektől eltérően – nem a szoros kapcsolatoktól bazolaterálisan, hanem azokkal váltakozva helyezkednek el a szomszédos endotélsejtek egymásra fekvő membránjaiban.²⁸ Az adherens kapcsolatok, a szoros kapcsolatokhoz

hasonlóan, transzmembrán és plakk fehérjékből épülnek fel, amelyek összeköttetésben állnak a citoszkeletonnal és a ZO fehérjéken keresztül a szoros kapcsolatokkal is. Az adherens junkciók fő alkotóelemei a kadherin-katenin és a nestin-afadin komplexek, így az agyi endotélsejtekben a legfontosabb adherens junkcionális fehérjék a VE-kadherin (vaszkuláris endoteliális kadherin, kadherin-5), az α-katenin, a β-katenin, a γ-katenin (plakoglobin) és a p120-katenin, de ezek közelébe lokalizálódik a PECAM-1 (vérlemezke endoteliális sejttapadási molekula, *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*, CD31) is. Az adherens junkciók szerepét a szoros kapcsolatok szabályozásában az is igazolja, hogy a VE-kadherin fokozza a klaudin-5 expresszióját.²⁹

A kadherineknek fontos szerepe van a sejtek polaritásának megtartásában is. EMT (epiteliális-mezenchimális tranzíció), illetve EndMT (endoteliális-mezenchimális tranzíció) során a sejtek elveszítik apiko-bazális polaritásukat, valamint csökken az adhéziós képességük, illetve megnő a migrációs és az inváziós kapacitásuk. Ezeket a folyamatokat az E-kadherin (epiteliális kadherin, kadherin-1), illetve a VE-kadherin mennyiségének csökkenése és az N-kadherin (neurális kadherin, kadherin, adherin-2) mennyiségének növekedése jellemzi.³⁰

1.1.3.2 Transzportfolyamatok a vér–agy gáton keresztül

A szoros kapcsolatok, vagyis a paracelluláris útvonal nagyfokú átjárhatatlansága előtérbe helyezi a transzcelluláris (sejten keresztüli) transzportot az agyi endotélsejtekben. Ezt azonban három védvonal szabályozza: a transzcelluláris barrier, amelyet a vastag glikokálix és a transzcitotikus vezikulák alacsony száma határoz meg; az enzimatikus barrier, amely az acetilkolin-észteráz, alkalikus foszfatáz, γ-glutamil-transzpeptidáz, monoamin-oxidáz és egyéb enzimatikus aktivitások következménye; illetve az efflux transzporterek (**1. B ábra**).

Ezek közül kiemelkedő az efflux transzporterek jelentősége, mivel számos terápiás szer agyba való bejutását akadályozzák meg. Az efflux pumpák az ABC (adenozin-trifoszfát-kötő kazetta, *ATP-binding cassette*) transzporterek családjába tartoznak, és energia felhasználásával különböző szerkezetű szubsztrátokat kötnek meg és távolítanak el a sejtből. Az agyi endotélsejtek luminális membránjában elhelyezkedő ABCB1 (P-gp, P-glikoprotein vagy MDR1, *multidrug resistance protein 1*), az ABCC (MRP, *multidrug resistance-associated*

protein) család tagjai és az ABCG2 (BCRP, breast cancer resistance protein) számos kemoterápiás szer és más gyógyszermolekula vér–agy gáton való átjutását akadályozza meg. Ennek megfelelően az ABC transzporterek alapvető szerepet játszanak a központi idegrendszeri patológiás folyamatok gyógyszeres terápiával szembeni rezisztenciájában.

A vér–agy gátnak van egy szállító szerepe is, amely biztosítja a tápanyagok bejutását az agyba, illetve hozzájárul a metabolitok eltávolításához (1. B ábra). Ennek elemei: a kisméretű, lipofil és gáznemű anyagok (például az O₂, a CO₂, az etanol, a koffein vagy a nikotin) passzív átjutása; az SLC (solute carrier) transzporter fehérjék működése; a receptormediált és az adszorptív transzcitózis. Az SLC szupercsalád tagjai közül a legfontosabbak a glükózt szállító GLUT1 (1-es glükóz transzporter, glucose transporter 1, SLC2A1), illetve számos aminosav, monokarboxilát, nukleozid és nukleotid, neurotranszmitter, valamint szerves anion és kation transzportere, mint például a LAT1 (large neutral amino acid transporter 1, SLC7A5), a CAT1 (cationic amino acid transporter 1, SLC7A1) és az MCT1 (monocarboxylic acid transporter 1, SLC16A1). Az agyi endotélsejtekben specifikusan kifejeződő, atipikus SLC transzporter az MFSD2A (major facilitator superfamily domaincontaining protein 2A) a transzcitózis gátlásával járul hozzá a vér–agy gát integritásához. Ugyanez a fehérje uptake transzporterként is működik a DHA (dokozahexaénsav, docosahexaenoic acid) számára.^{31,32} A receptor-mediált transzcitózis elsősorban az inzulin, a transzferrin és az LDL (low density lipoprotein) vér–agy gáton való áthaladásában játszik szerepet, míg adszorptív transzcitózissal az albumin és más pozitív töltésű plazmafehérjék juthatnak át.

1.1.3.3 Az agyi endotélium heterogenitása

Néhány kivételes területtől eltekintve – mint a cirkumventrikuláris szervek és a *plexus choroideus* – a vér–agy gát tulajdonságok a teljes agyi endotéliumra érvényesek. Az agyi endotélsejtek azonban nem képeznek egy homogén populációt, és ennek megfelelően a vér–agy gát áteresztőképessége sem egyforma az agy minden területén.³³

Egyrészt a barrier a hajszálerek szintjén a legzártabb, míg a nagyobb átmérőjű mikroerekben, elsősorban a venulákban, csökken a transzporterek mennyisége és a szoros kapcsolatok komplexitása.³⁴ Másrészt a különböző agyterületek között is lehetnek különbségek, bár a

korábbi eredmények csak a gerincvelő és az agyszövet közötti eltérések leírására korlátozódtak. Ezek alapján a vér–gerincvelő gát endotélsejtjei kevesebb szoros kapcsolati fehérjét expresszálnak, és magasabb permeabilitással, valamint alacsonyabb rezisztenciával bírnak, mint az agyi endotélsejtek.^{35,36} Ez a gerincvelői erek alacsonyabb pericita lefedettségének lehet a következménye,³⁷ hiszen a gát tulajdonságok a központi idegrendszeri endotélsejtekben csak a megfelelő környezet, elsősorban a periciták és az asztrociták hatására alakulnak ki és maradnak fenn.

1.1.4 A periciták szerepe az agyi erek működésének szabályozásában

A periciták egy nem folytonos sejtréteget alkotnak az erek alaphártyájába beágyazva, és legnagyobb sűrűségben a központi idegrendszeri kapillárisok szintjén találhatók meg.³⁸ Folyamatos átmenetet képeznek az arteriolák és a venulák simaizomsejtjei között, így morfológiájukat tekintve három csoportba sorolhatók: *ensheathing, mesh* és *thin-strand* típusokba.³⁹ Az *ensheathing* periciták átmeneti sejtek a simaizomsejtek és a periciták között, és a prekapilláris arteriolákra jellemzők. A valódi kapilláris periciták *mesh* és *thin-strand* típusúak, jellemzően a negyedrendű kapillárisoktól kezdődően jelennek meg, és *in vivo* Neurotrace 500/525 fluoreszcens markerrel jelölhetők,⁴⁰ valamint alacsony az α-SMA (α-simaizom aktin, *α-smooth muscle actin*) expressziójuk.^{41,42} A továbbiakban a pericita elnevezést csak a kapilláris pericitákra fogjuk alkalmazni. Ezek a sejtek az erek lefutásával párhuzamos és arra merőleges nyúlványokkal rendelkeznek, amelyek hálózatosan (*mesh* periciták) vagy helikálisan (*thin-strand* periciták) veszik körül a hajszálereket.

Az agyi periciták szerepét a vér–agy gát tulajdonságok kialakításában, illetve az agyi véráramlás szabályozásában az elmúlt húsz évben kezdték el feltérképezni. A periciták részt vesznek az erek stabilizálásában,⁴³ az alaphártya alkotóelemeinek szintézisében⁴⁴ és az agyi endotélsejtek vér–agy gát tulajdonságainak kialakításában.^{45,46} Az agyi véráramlás szabályozásában betöltött szerepük sokáig vita tárgya volt,^{4,5} a legfrissebb adatok azonban arra engednek következtetni, hogy a gyors véráramlás változásokat inkább az átmeneti, *ensheathing* sejtek szabályozzák, míg a kapilláris periciták a kisebb és lassabb változásokért, valamint az alaptónus fenntartásáért felelősek.¹¹

A periciták már embrionális korban szabályozzák a vér–agy gát integritásának fenntartását, és hatással vannak a szoros kapcsolatokra, a vezikuláris transzportra, valamint az adhéziós molekulák expressziójára.⁴⁶ Felnőtt egerekben az agyi periciták az endotélsejtek permeabilitását és az asztrociták polarizációját is nagymértékben meghatározzák.⁴⁵ Ennek megfelelően *in vitro* vér–agy gát kokultúra modellekben egyre gyakrabban használják a pericitákat az endotélsejtek barrier tulajdonságainak javítása érdekében.⁴⁷

A periciták és az endotélsejtek kesztyűujjszerűen (*peg-and-socket* struktúrákkal) kapcsolódnak egymáshoz integrin és N-kadherin molekulákon, illetve réskapcsolatokon keresztül, és számos szolubilis faktor révén befolyásolják egymás működését.³⁸ Ezek közül az egyik legfontosabb az endotélsejtek által felszabadított PDGF-BB (vérlemezke eredetű növekedési faktor BB, *platelet-derived growth factor BB*), amelynek receptora, a PDGFRβ (PDGF receptor β), a periciták egyik markere. Ezenkívül a Notch, a TGF-β (transzformáló növekedési faktor-β, *transforming growth factor-*β), az Ang1 (*angiopoietin-1*)–Tie2 és más szignalizációs utak biztosítják a megfelelő pericita-endotél kommunikációt az agyban.

1.1.5 Az asztrociták jelentősége a vér–agy gát működésében

Az asztrociták csillag alakú makroglia sejtek a központi idegrendszer szürke- és fehérállományában, amelyek alapvető szerepet töltenek be az idegrendszer működésében és homeosztázisának fenntartásában. Heterogén sejtek, amelyek közül kiemelkedik a szürkeállományi protoplazmás és a fehérállományi rostos asztrociták jelentősége. Ezekben eltérő mennyiségű GFAP (gliális fibrilláris savas fehérje, *glial fibrillary acidic protein*) található, amely az asztrociták egyik fő marker fehérjéje.⁴⁸ A GFAP mennyisége jelentősen megnő reaktív asztrogliózisban, amely az asztrociták különböző patológiás folyamatokra adott válaszreakcióját jelenti.⁴⁹

Az asztrociták szerepét úgy a vér–agy gát, mint a neurovaszkuláris kapcsolás szabályozásában már a 80-as években felfedezték.^{50,51} Az asztrociták az erekhez az ún. végtalpak (*endfeet*) útján kapcsolódnak, ugyanakkor nyúlványokat bocsátanak az idegsejtek, az axonok és a szinapszisok felé is,⁵² így biztosítva a neuronok számára a megfelelő környezetet és vérellátást. Ezáltal az asztrociták egy stratégiai pozíciót foglalnak el a központi idegrendszerben.

A posztnatális életkorban az asztrociták nélkülözhetetlenek a vér–agy gát fenntartásában, hiszen a hiányuk által okozott vér–agy gát megnyílást a periciták nem tudják kompenzálni.⁵³ Az asztrociták tehát meghatározó jelentőséggel bírnak az agyi endotélsejtek vér–agy gát fenotípusának megtartásában, amely magában foglalja a paracelluláris barriert, a transzporterek megfelelő expresszióját és lokalizációját, valamint a metabolikus barriert is.⁸ Ezt először *in vitro* modellekben igazolták, hiszen az agyi endotélsejt–asztrocita kolkultúrák a 90-es évek elejétől kezdve széles körben elterjedtek,⁵⁴ a használt állatfajtól függetlenül.⁵⁵

Az asztrociták szekretált faktorok és közvetlen kontaktusok révén kommunikálnak az endotélsejtekkel. A közvetlen kapcsolatokat a végtalpak biztosítják, amelyek szinte teljes mértékben lefedik a vérerek külső felszínét,⁵⁶ és szükség esetén gyorsan helyettesítődnek.⁵⁷ A végtalpakba lokalizálódik, és azok specifikus markerének tekinthető az AQP4 (*aquaporin-4*), amely a Kir4.1 *inward rectifier* (befelé egyenirányító) K⁺ csatornákkal együtt OAP-k (*orthogonal arrays of particles*) formájában jelenik meg. Az asztrociták által felszabadított szolubilis faktorok közül az FGF (*fibroblast growth factor*) és GDNF (*glia-derived neurotrophic factor*) növekedési faktorok, az Ang1 és AGT (*angiotensinogen*), valamint az Shh (*Sonic hedgehog*) a legfontosabbak.⁵⁸

Fontos megjegyezni, hogy az endotélsejtek is befolyásolják az asztrociták tulajdonságait, például a LIF (*leukemia inhibitory factor*) által, amely az asztrociták differenciációját indukálja.⁵⁹ Ugyanakkor az asztrociták nemcsak az endotélsejtekkel, hanem a pericitákkal is kommunikálnak, és közösen koordinálják a vér–agy gát működését.⁶⁰ Ezeken kívül az asztrociták termelik az agyi erek alaphártyájának parenchimális rétegét,⁴⁴ amely a vér–agy gát alkotóelemének tekinthető.⁶¹

1.1.6 A neurovaszkuláris egység felépítésében és működésében résztvevő egyéb sejtek

A gliasejtek közül a mikrogliasejtek az agy rezidens immunsejtjei, amelyek a gyulladásos folyamatokat koordinálják. A mikrogliasejtek depléciója önmagában nem okoz jelentős változást a vér–agy gát áteresztőképességében,⁶² azonban a neuroinflammáció és a mikroglia aktiváció annak megnyílásához vezet. A mikroglia aktiváció és a vér–agy gát diszfunkció kölcsönösen indukálhatják egymást számos agyi patológiás folyamat során,⁶³ bár

szisztémás gyulladásban, főleg annak kezdeti szakaszában, a mikrogliasejtek védőhatást is kifejthetnek a vér–agy gátra.⁶⁴

A legfrissebb eredmények alapján a mikrogliasejtek a purinerg szignalizáción keresztül a neuronokat és a véráramlást is szabályozzák. Úgy a neuroprotekcióban, mint a neurovaszkuláris kapcsolásban a mikrogliális P2Y12 receptorok kitüntetett szerepe igazolódott.^{65,66}

Viszonylag kevéssé ismert a többi agyi sejt szerepe a neurovaszkuláris funkciók szabályozásában. A fehérállományban elhelyezkedő oligodendrociták segíthetik a vér–agy gát működését, azonban erről keveset tudunk,⁶⁷ míg az OPC-k (oligodendrocita prekurzor sejt, *oligodendrocyte precursor cell*) felhalmozódása az asztrocita végtalpak leszorítását és a vér–agy gát megnyílását eredményezheti.⁶⁸ Még ennél is kevésbé ismert a nagyobb erek mentén elhelyezkedő fibroblasztok szerepe az agyban, amelyek patológiás esetekben a fibrózis kialakulásáért lehetnek felelősek.⁶⁹

A neuronokat csak tágabb értelemben szokták a neurovaszkuláris egység sejtjeinek tekinteni, noha iniciáló szerepük a neurovaszkuláris kapcsolásban megkérdőjelezhetetlen,¹ míg a neuronális aktivitás vér–agy gátra kifejtett hatása már inkább csak indirekt lehet.⁷⁰ Az embrionális fejlődés során a vér–agy gát kialakulásában a neurális progenitor sejteknek lehet fontos szerepe azáltal, hogy a Wnt útvonalon keresztül indukálják a kialakuló erek barrier tulajdonságait, míg a perictiták, majd az asztrociták hatása csak később fog érvényesülni.^{71,72}

1.2 Az agyi erek szerepe neuroinflammációban

1.2.1 A neuroinflammáció agyi patológiás folyamatokban és öregedésben

A neuroinflammáció, amely a központi idegrendszer gyulladásos válaszreakciója a homeosztázis megváltozására, számos agyi patológiás folyamat velejárója. Ugyanakkor szisztémás gyulladásos és metabolikus betegségekben is megjelenik, valamint fiziológiás folyamatokban, mint az embrionális fejlődés vagy az öregedés. Az öregedés egyik fő jellegzetessége az alacsony fokú, steril gyulladás (*inflammaging*), amely hozzájárul a neurovaszkuláris funkciók sérüléséhez^{73,74} és az időskori agyi patológiás folyamatok kialakulásához is, mint az iszkémiás *stroke* vagy a neurodegeneratív megbetegedések.

A neuroinflammáció fő résztvevői a mikroglia- és a bevándorló immunsejtek, az asztrociták és a vér–agy gát, valamint a különböző gyulladásos citokinek.⁷⁵ Bár a gyulladásos reakció az idegszövet védelme és a káros sejtek eltávolítása céljából alakul ki, a folyamat gyakran elhúzódik és kontrollálatlanná, károssá válik.

Az agy egy immunprivilegizált szerv, és a leukociták vér–agy gáton való átvándorlását számos mechanizmus korlátozza.⁷⁶ Gyulladásos körülmények között azonban különböző típusú fehérvérsejtek juthatnak be az agyszövetbe akár a vér–agy gáton, akár a vér–liquor gáton keresztül,⁷⁷ illetve az agyhártyák felől is.⁷⁸ MS-ben (sclerosis multiplex, *multiple sclerosis*) elsősorban T sejtek és B sejtek,⁷⁹ de neutrofil granulociták is bevándorolnak az agyszövetbe, akárcsak AD-ben (Alzheimer kór, *Alzheimer's disease*).⁸⁰ Iszkémiás folyamatokban és TBI-ban (traumás agyi sérülés, *traumatic brain injury*) neutrofilek, monociták és limfociták is megjelennek az agyban.^{81,82} Ugyanakkor aktiválódnak a perivaszkuláris makrofágok, a mikrogliasejtek és az asztrociták is.

Az agyi endotélsejtek is részt vesznek a gyulladásos reakciókban, hiszen a felszabaduló citokinek diszruptív és nem diszruptív változásokat okoznak a vér-agy gát szintjén.83 A diszruptív változások, azaz a vér-agy gát permeabilitásának fokozódása, a glikokálix lebontását, az endotélsejtek apoptózisát és legfőképp a szoros kapcsolatok sérülését jelenti. A nem diszruptív változások a sejtfelszíni adhéziós molekulák expressziójának fokozódását, valamint a citokinek felszabadítását foglalja magába. Az agyi endotélsejtek tehát nemcsak célpontjai, hanem forrásai is a gyulladásos faktoroknak, hiszen számos proinflammatorikus IL-t (interleukin) szekretálnak, mint az IL-1α, IL-6 és IL-10, valamint más citokineket és kemokineket is, mint a TNF- α (tumor nekrózis faktor- α), a G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), a GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), a CCL5 (RANTES, regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted) vagy a CX3CL1.^{84,85} Az endotélsejtek felszínén megjelenő adhéziós molekulák, mint az E-szelektin, a P-szelektin, az ICAM-1 és ICAM-2 (intercelluláris adhéziós molekula-1 és -2), valamint a VCAM-1 (vaszkuláris sejtadhéziós molekula-1, vascular cell adhesion molecule 1), és a szekretált gyulladásos mediátorok is segítik a fehérvérsejtek agyba való bejutását, tovább erősítve a gyulladást.⁸⁶

Az endotélsejtekhez hasonlóan a periciták is az adhéziós molekulák expressziójának fokozásával, valamint citokinek és kemokinek szekréciójával válaszolnak a gyulladásos faktorok jelenlétére. A periciták elsősorban IL-6, IL-8, CCL2, CXCL1, CXCL2, CXCL3 és MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1 α) felszabadítására képesek.^{85,87,88}

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*) ismerhetnek fel.

1.2.2 A PRR-ek

A PRR-ek a veleszületett immunitás sejtjeinek receptorai, amelyek konzervált molekuláris mintázatokat ismernek fel. Ezek a mintázatok egyrészt mikrobiális patogénekre jellemzők (PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*), másrészt szöveti károsodás kapcsán szabadulhatnak fel, illetve exogén úton juthatnak be steril gyulladást okozva (DAMP, *damage-associated molecular pattern*).^{89,90} A legfontosabb mikrobiális mintázatok a Gramnegatív baktériumok külső membránjában levő LPS (lipopoliszacharid), a bakteriális és virális nukleinsavak, a baktériumok ostoraiban megtalálható flagellin, a Gram-pozitív és Gramnegatív baktériumokban egyaránt jelen levő MDP (muramil-dipeptid) vagy a gombák sejtfalában található *zymosan*. A sérült sejtekből felszabaduló alarminok közé tartozik az extracelluláris ATP, RNS (ribonukleinsav) és DNS (dezoxiribonukleinsav), a húgysav és sói, a ROS (reaktív oxigéngyökök, *reactive oxygen species*) és a HMGB1 (*high mobility group box* 1). Az exogén DAMP-ok közé tartoznak egyes nanopartikulumok, a SiO₂ vagy az Al(OH)₃.

A PRR-ek öt családba tartoznak. Ezek a membránban elhelyezkedő TLR-ek (Toll-szerű receptor, *Toll-like receptor*) és CLR-ek (C-típusú lektin receptorok), valamint a citoplazmatikus NLR-ek (NOD-szerű receptor, *NOD-like receptor*, *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor*), RLR-ek (*RIG-I-like receptor*, *retinoic acid-inducible gene-I-like receptor*) és ALR-ek (*AIM2-like receptor*, *absent in melanoma 2-like receptor*).⁹¹

A CLR-ek, mint például a mannóz receptorok és a *dectin-1* és *dectin-2* (*dendritic cell-associated C-type lectin-1* és -2), elsősorban karbohidrát motívumokat ismernek fel.⁹² Az RLR-ek RNS szenzorok, míg az ALR-ek főként a szabad DNS-t ismerik fel, és ezek

leggyakrabban vírusfertőzés során aktiválódnak.^{93,94} Jelen munkában a TLR-ekre és az NLRekre koncentrálunk.

1.2.2.1 A TLR-ek szerepe neuroinflammációban

A TLR-ek I-es típusú transzmembrán fehérjék, amelyek elsősorban dendritikus sejtekben és makrofágokban expresszálódnak, de jelen vannak nem immunsejtekben, például fibroblasztokban és epitélsejtekben is. A TLR családnak 13 tagja van, amelyek közül emberben az első tíz expresszálódik, míg egérben hiányzik a TLR10. A TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 és TLR10 a sejtmembránban helyezkedik el, míg a TLR3, TLR7, TLR8 és TLR9 intracelluláris vezikulák membránjában. A TLR-ek elsősorban mikrobiális ligandokat ismernek fel. A TLR4 legfontosabb aktivátora az LPS, míg aTLR3 a kettős szálú RNS-t, a TLR5 a flagellint, a TLR2 és TLR6 a diacilált lipoproteineket, a lipoteikolsavat és *zymosan*t, míg a TLR9 a CpG (nem-metilált citozin-guanin dinukleotid) motívumokat köti (**2. ábra**).⁹⁵ Ugyanakkor számos endogén alarmin is lehet TLR ligand.⁹⁶



2. ábra. A TLR-ek és legfontosabb ligandjaik.

A TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 és TLR6 a plazmamembránban expresszálódik, míg a TLR3, TLR7/8 és a TLR9 endoszomális membránokban. Elsősorban baktériumokban és vírusokban található molekuláris mintázatokat ismernek fel. Ligandkötés után a receptorok homo- vagy heterodimereket képeznek.

A ligand felismeréséért az extracelluláris régióban található LRR (leucinban gazdag ismétlődés, *leucine-rich repeat*) domének felelősek. A TLR-ek ligandkötést követő

dimerizációja után a jelátvitel a TIR (Toll/IL-1 receptor) intracelluláris doménről indul, amelyhez különböző adapter fehérjék kapcsolódhatnak. Ezek közül a leggyakoribb a MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), amely az IRAK (*interleukin-1 receptor-associated kinase*) kinázon keresztül aktiválhatja az NF-κB (nukleáris faktor-κB) és a MAPK (mitogén-aktivált protein kináz) útvonalakat gyulladásos mediátorok átírásának fokozódását okozva.⁹⁷

Az agyi sejtek közül a mikrogliasejtek expresszálják a legtöbbféle TLR-t (TLR1-TLR9), de számos TLR van jelen az asztrocitákon, az oligodendrogliákon és az idegsejteken is.⁹⁸ Csoportunk kimutatta, hogy az agyi endotélsejtek TLR2-t, TLR3-at, TLR4-et és TLR6-ot expresszálnak.⁹⁹ Oxidatív stressz hatására vagy gyulladásos körülmények között megnő a TLR-ek mennyisége, és aktiválódásuk a vér–agy gát megnyílásához vezet.^{99–102} Az agyi pericitákban korábban csak a TLR4 jelenléte volt ismert.⁸⁷

A TLR-ek aktiválódása kulcsszerepet játszik úgy a fertőzéses, mint a steril neuroinflammáció kialakulásában, így a *meningoencephalitis*, illetve a *stroke*, az AD, a PD (Parkinson kór, *Parkinson's disease*) vagy az MS kialakulásában.¹⁰³

1.2.2.2 Az NLR család

Az NLR-ek erősen konzervált, citoszolikus PRR-ek, amelyeknek felépítésében három fontos domén vesz részt. Ezek közül centrálisan helyezkedik el a NACHT (más néven NOD vagy NBD, nukleotid oligomerizációs/kötő domén, *nucleotide oligomerization/binding domain*), amely az ATP-függő oligomerizációért felelős. A NACHT egy mozaikszó, amely a NAIP (neuronális apoptózist gátló fehérje, *neuronal apoptosis inhibitory protein*), a CIITA (II. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex transzaktivátor, *class II major histocompatibility complex transactivator*), a HET-E (*heterokaryon incompatibility protein-E*) és a TP-1 (*telomerase associated protein-1*) kezdőbetűiből áll össze. Az NLR-ek C-terminális részén található LRR domének a ligandkötés helyszínei, míg a variábilis N-terminális a fehérje-fehérje interakciókért felelős régió. Az N-terminális domén lehet CARD (kaszpáz toborzási domén, *caspase recruitment domain*), PYD (pirin domén, *pyrin domain*) vagy BIR (bakulovírus apoptózist gátló ismétlődések, *baculovirus inhibitor of apoptosis repeats*), és ezek határozzák meg az alcsaládot, amelybe az adott NLR tartozik.¹⁰⁴

Humánban jelenleg 23, míg egérben 34 NLR-t írtak le, amelyek öt alcsaládot alkotnak.¹⁰⁵ Az NLRA alcsaládnak egyetlen tagja a CIITA, amely N-terminális részén CARD és "AD" (*acidic transactivation domain*) régiókat tartalmaz. A BIR doménnel rendelkező NLR-ek az NLRB alcsaládba tartoznak, ezek a NAIP (egérben NAIP1-7) fehérjék. Az NLRX alcsaládba szintén egy fehérje tartozik, amelynek N-terminális doménje ismeretlen, míg a legnépesebb csoportot az NLRC és NLRP alcsaládok alkotják, amelyek CARD, illetve PYD N-terminális domént tartalmaznak (**3. ábra**).



3. ábra. Az NLR-ek felépítése.

Az NLR család tagjait úgy patogén eredetű, mint endogén ligandok aktiválhatják. A NOD1/NLRC1 és NOD2/NLRC2 fehérjék peptidoglikán szenzorok, így aktiválhatók MDP-vel, amely a minimális bioaktív peptidoglikán motívum.¹⁰⁶ A NAIP az NLRC4-gyel együttműködve a bakteriális a flagellin és 3-as típusú szekréciós rendszer felismerésében játszik szerepet.¹⁰⁷ Ez utóbbiban az NLRP3-nak is fontos szerepe lehet,¹⁰⁸ bár az NLRP3 elsősorban endogén molekulákkal aktiválható, mint az ATP, a ROS vagy a K⁺ ionok beáramlása a sejtbe, azonban feltételezhetően ezek nem kapcsolódnak közvetlenül a receptorhoz.¹⁰⁹

Az NLR-ek elsősorban a veleszületett immunválasz mieloid sejtjeiben vannak jelen, de limfoid sejtekben és nem hemopoetikus sejtekben is expresszálódhatnak.¹¹⁰ Az agyban a mikrogliasejtek, asztrociták, oligodendrogliák és neuronok az NLRC és NLRP alcsalád számos tagját expresszálják, amelyek neurodegeneratív és pszichiátriai kórképekben játszhatnak szerepet.¹¹¹ Agyi endotélsejtekben korábban csak a CIIta és az NIrp3 mRNS indukálható expresszióját mutatták ki,^{112,113} míg agyi pericitákban a NOD1 jelenléte volt ismert.¹¹⁴

Az NLR-ek funkciójukat tekintve is osztályozhatók. Egyes NLR-ek az NF-κB szignalizációt aktiválják (a NOD1 és a NOD2) vagy gátolják (az NLRP12 és az NLRX1). Mások az MHC II (II. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex, *major histocompatibility complex II*) expressziót szabályozzák, ilyenek a CIITA és az NLRC5. A harmadik csoport inflammaszómák kialakításában vesz részt.¹¹⁵

1.2.3 Az inflammaszómák

Az inflammaszómák olyan intracelluláris multiprotein komplexek, amelyek platformként szolgálnak a gyulladásos kaszpázok aktivációjához (**4. ábra**). 2002-ben írták le őket,¹¹⁶ és azóta nagy fontosságot tulajdonítanak nekik nemcsak immunsejtekben, hanem egyéb sejtekben is. Az inflammaszómában az NLR (vagy más receptor) az ASC (apoptózis-asszociált és CARD domént tartalmazó *speck*szerű fehérje, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*, más néven PYCARD) adapter fehérjén keresztül kapcsolódik a kaszpázhoz, amely autokatalitikusan aktiválódik, és hasítja, ezáltal aktiválja az IL-1β-t, az IL-18-at, illetve a piroptózist okozó gasdermin D-t.¹⁰⁹ A piroptózis a programozott sejthalál egy speciális formája, amelynek során pórusok keletkeznek a plazmamembránon, amelyeken keresztül citokinek és intracelluláris molekulák kerülnek az extracelluláris térbe fokozva a gyulladásos folyamatokat.¹¹⁷ Az IL-1 család tagjai közül a gyulladáscsökkentő hatású IL-37 érése is inflammaszóma-függő,¹¹⁸ míg az IL-33-é – a korábbi elképzelésekkel ellentétben – nem.¹¹⁹

Az inflammaszómaképző NLR-ek az NLRP1, az NLRP3 és a NAIP-NLRC4, amelyek az NLRP1 inflammaszóma, az NLRP3 inflammaszóma, illetve az NLRC4 inflammaszóma kialakításában vesznek részt. Ezeken kívül leírtak még NLRP2, NLRP6, NLRP7, NLRP9b, NLRP12, NLRC5, pyrin, CARD8, AIM2 és IFI16 (*interferon γ-inducible protein 16*) inflammaszómákat is.¹²⁰



4. ábra. Az inflammaszómák aktivációja.

Az inflammaszómák NLR fehérjéből, ASC adapter molekulából és kaszpázokból felépülő molekuláris platformok, amelyek bizonyos citokinek (IL-1β és IL-18) érését, illetve a piroptózist mediálják. Az első gyulladásos jel a *priming* folyamatot indítja el, amely az inflammaszóma komponensek átírásának fokozódását jelenti. Ezt a lépést egy vagy több TLR vagy citokin receptor aktivációja váltja ki. Az inflammaszóma alkotóelemei egy második gyulladásos jel hatására szerelődnek össze, és ennek eredményeképpen az aktiválódó kaszpázok hasítják az IL-1β citokint. A kanonikus aktiváció során az inflammaszóma-képző NLR-ek vagy más receptorok játszanak kulcsszerepet, míg a nem kanonikus útvonal aktiválódását a baktériumok vagy az OMV-k (külső membrán vezikula, *outer membrane vesicle*) bekebelezésével a citoplazmába jutott LPS váltja ki. CASP = kaszpáz (*caspase*). (Az ábrát Nyúl-Tóth Ádám készítette.)

Az ASC PYD- és CARD-domént is tartalmaz. Előbbivel az NLR-hez, utóbbival a gyulladásos kaszpázhoz kapcsolódik. Az ASC PYD-doménje nemcsak az NLR-hez kötődik, hanem az ASC filamentummá történő polimerizációját is koordinálja, míg a CARD-domén felelős a filamentumok háromdimenzós struktúrába való aggregálódásáért, amit ASC *speck*-képződésnek nevezünk. A *speck* átmérője mikroszkopikus méretű (1-2 μm) lehet.¹²¹ Ennek a jelerősítő mechanizmusnak a citokinek érésében van szerepe, míg a piroptózisban nincs.¹²²

Az inflammaszóma-aktivált kaszpázok közül elsőként a kaszpáz-1-et írták le, amely úgy az IL-1β és az IL-18, mint a gasdermin D hasítását végzi humánban és egérben egyaránt. A gasdermin D hasításában, valamint a nem kanonikus inflammaszóma-aktivációban azonban más kaszpázok is részt vesznek: emberben a kaszpáz-4 és a kaszpáz-5, egérben pedig a kaszpáz-11.¹²³

Az NLRP3 inflammaszóma esetében, amely a legjobban ismert inflammaszóma,¹²⁴ az aktiváció jellemzően két lépésben történik (**4. ábra**). Az első lépés a *priming*, amelynek során indukálódik az NLRP3 és a pro-IL-1 β átíródása, illetve lezajlanak a szükséges poszttranszlációs módosítások. Ezt a lépést gyakran egy TLR aktivációja váltja ki, például a TLR4-é LPS hatására, de a NOD2 vagy bizonyos citokin receptorok is (TNFR1/2, 1-es és 2-es TNF receptor vagy IL-1R1, 1-es típusú IL-1 receptor) beindíthatják a *priming* folyamatot. Az inflammaszóma összeszerelődését egy második szignál váltja ki, amely az NLRP3-at aktiválja. Az NLRP3 aktivátorok közé számos mikrobiális és nem fertőző exogén, valamint szöveti molekuláris mintázat tartozik, mint például az ATP, a koleszterin kristályok, az urát kristályok, a ROS, a β -amiloid fibrillumok, az MDP, az LPS, a SiO₂, stb., amelyek általában K⁺ effluxot okoznak. A K⁺ efflux önmagában képes aktiválni az NLRP3-at – így hat például a nigericin is –, azonban K⁺ effluxtól független NLRP3 aktiváció is ismert.¹²⁵ Az NLRP3 aktivációjához szükséges még a NEK7 (*NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 7*), amely a K⁺ effluxtól *downstream* szabályozza az NLRP3 oligomerizációját.¹²⁶

Az előbbiekben ismertetett kanonikus inflammaszóma-aktiváción kívül létezik egy nem kanonikus útvonal is (**4. ábra**). Ennek során a citoplazmába jutó LPS a kaszpáz-11-hez, illetve a kaszpáz-4/5-höz kapcsolódik.^{127,128} Ezek a kaszpázok hasítják a gasdermin D-t, azonban az IL-1 β -t és az IL-18-at csak közvetve aktiválják, míg az IL-1 α a kaszpáz-5 és a kaszpáz-11 szubsztrátja lehet.¹²⁹

A *priming* és aktiváció elkülönülése elsősorban az NLRP3 inflammaszóma sajátossága, bár a *priming* lépés itt sem mindig szükséges.¹³⁰ Fontos ugyanakkor azt is megjegyezni, hogy az IL-1β érésének nem az inflammaszóma általi hasítás az egyetlen útja. Számos más, inflammaszómától független proteáz is részt vehet a pro-IL-1β hasításában, mint például különböző szerin proteázok vagy metalloproteinázok,¹³¹ ám ezen folyamat jelentősége agyi sejtekben nem ismert.

1.2.4 Az inflammaszómák szerepe agyi gyulladásos folyamatokban

Az inflammaszómák az agyi sejtekben is aktiválódhatnak, elsősorban neurodegeneratív megbetegedésekben, de fertőző vagy traumás agyi folyamatokban, valamint öregedés során is. Az agyi sejtek közül a mikrogliasejtek, az asztrociták és a neuronok is számos inflammaszóma-képző NLR-t expresszálnak, mint az NLRP1, az NLRP3 vagy az NLRC4, és az inflammaszómák egyéb résztvevői, mint az ASC vagy a gyulladásos kaszpázok is megtalálhatók bennük.^{132,133} Arról, hogy az agyi vaszkuláris sejtekben (endotélsejtekben és pericitákban) aktiválódhatnak-e az inflammaszómák, a 2010-es évek közepéig nem voltak adatok. A perifériás endotélsejtekben sem sokkal előbb írták le először az NLRP3 inflammaszómát,¹³⁴ míg perifériás pericitákban néhány évvel később.¹³⁵

Az agyban is az NLRP3 inflammaszómáról van a legtöbb adatunk. Elsősorban mikrogliasejtekben aktiválódhat neurodegeneratív megbetegedésekben, de stroke-ban, TBIban és fertőzésekben is.¹³³ AD-ben főként a β -amiloid,¹³⁶ PD-ben az α -szinuklein,¹³⁷ MS-ben valószínűleg a ROS felszaporodás, ¹³⁸ míg iszkémiás stroke-ban az elpusztuló sejtekből citoszolikus alarminok¹³⁹ felszabaduló aktiválják az NLRP3 inflammaszómát mikrogliasejtekban. А neurodegeneratív kórképekben felszaporodó LPC (lysophosphatidylcholine) az NLRP3 és NLRC4 inflammaszómákat aktiválja mikroglia- és asztrogliasejtekben,¹⁴⁰ míg stroke modellben az NLRC4 és az AIM2 inflammaszómák szerepe bizonyult meghatározónak a gyulladás és az agyi sérülés fokozásában.¹⁴¹ Ezeken kívül asztrocitákban az NLRP2, míg neuronokban az NLRP1 inflammaszómákat írták le in vitro, illetve különböző betegségmodellekben.142-145

Az inflammaszóma-aktiváció az *inflammaging*ben is szerepet játszhat,¹⁴⁶ amely az öregedés során jelentkező alacsony fokú, elhúzódó gyulladást jelenti. Az inflammaszóma-aktiváció hozzájárulhat a kognitív hanyatláshoz¹⁴⁷ és az öregedéshez köthető patológiás folyamatok (az AD, a PD vagy a *stroke*) kialakulásához. Az inflammaszómák aktivációja ugyanakkor olyan vaszkuláris érintettséggel járó szisztémás megbetegedésekre is jellemző, mint a 2-es típusú diabétesz, az ateroszklerózis, az elhízás vagy a magas vérnyomás, amelyek agyi patológiás folyamatok rizikófaktorai vagy velejárói lehetnek.¹³² A metabolikus zavarok mellett a rosszindulatú daganatokban is fontos szereppel bír az inflammaszómák aktivációja.¹⁴⁸ Az agyi daganatok közül a glioblasztómában ismerték fel ennek jelentőségét, ahol az

inflammaszóma útvonal gátlása potenciális, jövőbeni terápiás lehetőségként merült fel.¹⁴⁹ Agyi metasztázisokban azonban nem volt ismert az inflammaszómák szerepe.

1.3 Az agyi metasztázisok kialakulása

1.3.1 Az agyi metasztázisok klinikai és epidemiológiai jellemzői

Az agyi áttétes daganatok az életet fenyegető kórképek, korlátozott terápiás lehetőségekkel.¹⁵⁰ Prevalenciájuk 8,3-14,3/100 000 lakos,¹⁵¹ és csak az Amerikai Egyesült Államokban évente 170 000 új esetet diagnosztizálnak, 2010. évi adatok alapján.¹⁵² Ez a szám folyamatosan nő egyrészt a javuló diagnosztikai eljárások miatt, másrészt az elsődleges daganatokat, illetve a nem agyi áttéteket célzó terápiás lehetőségek kibővülése kapcsán, hiszen a betegek életének meghosszabbodása megnöveli a tumorsejtek agyi szóródásának esélyét.

Bár számos daganatsejttípus képes megtelepedni az agyban (vesekarcinóma, vastagbéldaganat vagy petefészekrák sejtek), az agyi metasztázisok döntő többsége tüdőrák, mellrák, illetve melanóma eredetű.¹⁵¹ Az agyi áttétek 39-56%-áért a tüdőkarcinómák felelősek, elsősorban a tüdő adenokarcinóma, illetve a kissejtes tüdőrák.^{151,153} Az agyi áttétek második leggyakoribb forrása az emlőkarcinóma, amely az estek 13-30%-át teszi ki. A központi idegrendszeri érintettség főként a tripla negatív (ösztrogén, illetve progeszteron receptort és HER2-t sem expresszáló), illetve a HER2-túlexpresszáló altípusokra jellemző, 154 bár az agyi tumorsejteken a receptor expresszió gyakran megváltozik.¹⁵⁵ A HER2/ERBB2/neu a human epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusát jelöli (human epidermal growth factor receptor 2). A tripla negatív és HER2-túlexpresszáló emlőkarcinóma típusokban a metasztázissal rendelkező betegek csaknem 1/3-ában alakul ki központi idegrendszeri daganat.¹⁵⁶ A melanóma eredetű agyi másodlagos tumorok ugyan ritkábbak, mint a tüdő- vagy mellrák eredetűek, az agyi áttétek 6-11%-át teszik ki, azonban ez csupán a primér daganatok alacsonyabb számának köszönhető, hiszen a melanómasejtek rendelkeznek a legnagyobb központi idegrendszeri affinitással,157 és a IV. stádiumú melanómás betegek legalább 3/4-ében eljutnak az agyba.¹⁵⁸

Melanómában és tüdőkarcinómában az agyi áttétek jellemzően a betegség korai fázisaiban, a primér daganat diagnózisa után kevesebb mint két évvel alakulnak ki.^{159–161} Emlőkarcinóma

esetén inkább később, átlagosan 32 hónappal az elsődleges tumor felfedezése után szokták az agyi áttétet diagnosztizálni.¹⁶² A tünetek jellemzően nem specifikusak,¹⁶³ a lézió lokalizációjától függnek, amely kérgi és infratentoriális területeket egyaránt érinthet.¹⁶⁴ Az agyi áttétek gyakran egyéb szervi áttétekkel együtt fordulnak elő, lehetnek egyszeresek vagy többszörösek, gyakran éles kontúrral és ödémás szövettel körülvéve.

Klinikai szempontból az agyi áttétekre a nagyon rossz prognózis (csupán hónapokban mérhető túlélés) és a hatékony terápiás lehetőségek hiánya jellemző. A szupportív kezelések mellett a tumorok sebészi eltávolítása és a radioterápia (teljes agyi sugárterápia, sztereotaktikus radiosebészet vagy brachyterápia) képezik az elsődleges terápiás eszközöket, mivel a kemoterápiás és egyéb tumorellenes szereknek a keringésből az agyba való bejutását a vér–agy gát, illetve a vér–tumor barrier jelentősen gátolja.¹⁶⁵

1.3.2 Az agyi metasztázisok kialakulásának sajátosságai

A metasztázisok kialakulásának első lépései az agyban is ugyanazok, mint a többi szervben. A metasztatikus kaszkád öt fő lépése a daganatsejtek helyi inváziója az elsődleges tumorban, az intravazáció az érfalon keresztül, a tumorsejtek keringése az érpályában, az extravazáció és a metasztatikus kolonizáció. Ezek közül az utolsó kettő az, amelyikben az agyi erek és az agyi sejtek érintettek. A többi lépés esetén az az egyetlen különlegesség, hogy az agyi metasztázisok csak hematogén úton alakulhatnak ki, hiszen az agyi parenchima nem rendelkezik nyirokerekkel, bár a legfrissebb kutatások azt mutatják, hogy nemcsak a *dura mater*ben vannak ilyen képletek,^{166–168} hanem a perivaszkuláris tér is tartalmaz limfatikus endotélsejteket.¹⁶⁹

Az agyi metasztázisok kialakulásának két fő sajátos lépése van, a daganatsejtek átvándorlása a vér–agy gáton és túlélése az agyi környezetben.

1.3.2.1 A metasztatikus sejtek extravazációja a vér–agy gáton keresztül

Az agyi metasztázisok kialakulásának egyik feltétele, hogy a tumorsejteknek át kell jutniuk a vér–agy gátat képző agyi mikroerek falán. Bár az extravazáció történhet a *plexus choroideus*¹⁷⁰ vagy a cirkumventrikuláris szervek fenesztrált hajszálerein is, a metasztatikus

léziók lokalizációja arra utal, hogy a daganatsejtek döntő többsége a vér–agy gáton keresztül lép ki a keringésből az agyba.

Az extravazáció lépései a következők: a tumorsejtek elakadása az agyi érhálózatban, letapadása (adhéziója) az agyi endotélsejtek luminális felszínére, majd átvándorlása (transzmigrációja) az érfalon (**5. ábra**). Ezeket a folyamatokat állatkísérletekben és *in vitro* modellekben vizsgálták. Az elakadásban, amely gyakran a kapillárisok elágazásaiban történik, a hemodinamikai viszonyok és a méretbeli korlátok is szerepet játszhatnak.¹⁷¹



5. ábra. A metasztatikus sejtek átvándorlása a vér-agy gáton.

Az extravazáció három fő lépése az elakadás, az adhézió és a transzmigráció. Az ábra a folyamatban szerepet játszó sejteket, fő jelátviteli utakat és szekretált faktorokat mutatja be. TJs = szoros kapcsolatok (*tight junctions*), COX-2 = ciklooxigenáz 2, ? = ismeretlen/feltételezett.

Az adhéziót a glikokálix és a sejtadhéziós molekulák szabályozzák. A metasztatikus sejtek a glikokálix lebontásával teszik szabaddá az endoteliális adhéziós molekulákat,^{172,173} amelyek alapesetben alacsony szinten expresszálódnak az agyi endotéliumon.⁹ Ezeknek mennyisége azonban szignifikánsan emelkedik a tumorsejtek hatására, hiszen egérmodellben az E-szelektin, a VCAM-1, az ALCAM (aktivált leukocita sejtadhéziós molekula, *activated leukocyte cell adhesion molecule*), az ICAM-1, a VLA-4 (*very late activation antigen 4*, α4β1 integrin) és a β4 integrin expressziójának növekedését mutatták ki emlőkarcinóma-sejtek hatására.¹⁷⁴ Ennek megfelelően az ALCAM–ALCAM és VLA-4–VCAM-1 interakcióknak lehet fontos

szerepe a tumorsejtek és az endotélsejtek közötti kapcsolódásban. *In vitro* modellben, a melanómasejtek és az agyi endotélsejtek közötti adhéziós erő néhány száz pN nagyságrendűnek bizonyult, amely ~20 pN-os egységekből épült fel.¹⁷⁵

Egérmodellekben végzett kísérletek alapján az átvándorlás az erek falán csak napokkal a tumorsejtek elakadása után történik meg.^{171,176} A hajszálerek lumenében eltöltött hosszú idő csak az agyra jellemző, más szervekben a daganatsejtek sokkal hamarabb jutnak ki az érpályából, bár ez attól is függ, hogy milyen szöveti affinitással rendelkezik az illető tumorsejt.¹⁷⁷ Ennek következtében az agyi metasztatikus sejtek számára alapvető fontosságú a keringésben való túlélési képesség, ahol le kell győzniük a véráramlás okozta mechanikai stresszt, az immunsejtek támadását és akár a kitapadás hiányában fellépő programozott sejthalált, az *anoikis*-t is.¹⁷⁸

Az endotéliumon való átvándorlás történhet a paracelluláris útvonalon keresztül, az endotélsejtek közötti junkciók felbontásával, illetve a transzcelluláris útvonalon, egyedi endotélsejteken keresztül, bár ezt az agyban korábban csak fehérvérsejtek esetében tanulmányozták.^{179,180} Tumormodellben pedig emlőkarcinóma-sejtek nem agyi endotélrétegen való átvándorlása során írták le.^{181,182}

1.3.2.2 Az áttétképző sejtek túlélése az agyi környezetben

Miután átjutottak az agyi hajszálerek falán, a tumorsejtek egy *Janus*-arcú közegbe kerülnek, ahol egyszerre vannak jelen az anti- és a protumorális mechanizmusok (**6. ábra**). A behatoló sejtek túlélésének egyik kulcseleme, hogy közvetlen kapcsolatban maradjanak az erek extraluminális felszínével, elsősorban az alaphártyával.^{176,183} Az agyi parenchimába vándorolt tumorsejtek és az endotélsejtek között az LFA-1 (*leukocyte function associated protein-1*, α L β 2 integrin) és a réskapcsolatok biztosítják az interakciót,^{184,185} míg a bazális membránhoz a tumorsejtek az α 3 β 1 integrin és az L1CAM molekulákkal kapcsolódhatnak.^{186,187}

A daganatsejtek az erek mentén kezdenek el szaporodni és vándorolni is. Ezeket a folyamatokat érbekebelezésnek (vaszkuláris koopciónak) és angiotrop extravaszkuláris vándorlásnak, más néven pericita mimikrinek nevezték el.¹⁸⁸ A növekedő tumor nemcsak az erek falát alkotó endotélsejteket, hanem a pericitákat is bekebelezheti,¹⁸⁹ azonban a

pericita-tumor interakcióról az agyban keveset lehet tudni. Humán agyi metasztatikus szöveteket vizsgálva mutatták ki, hogy a pericitáknak fontos szerepe van az ECM (extracelluláris mátrix) termelésében a tumoros lézióban és annak környezetében.¹⁹⁰ Állatkísérletes modellben pedig a dezmin-pozitív periciták vér–tumor barrier szabályozásában betöltött szerepét igazolták.¹⁹¹



6. ábra. A metasztatikus sejtek sorsa az agyi környezetben.

A vér–agy gáton átvándorolt tumorsejteket számos mechanizmus gátolja, illetve segíti a túlélésben. Ennek eredményeképp a metasztatikus sejtek vagy elpusztulnak, vagy szaporodásnak indulnak, illetve "alvó" állapotba kerülnek, amelyből később aktiválódhatnak. Az ábra a metasztatikus sejtek és neurovaszkuláris sejtek közötti kommunikáció legfontosabb mechanizmusait mutatja be. TJs = szoros kapcsolatok (*tight junctions*), GJ = réskapcsolat (*gap junction*), GFs = növekedési faktorok (*growth factors*), ET-1 = endotelin-1, ETR = endotelin receptor, ? = ismeretlen/feltételezett.

Sokkal jobban ismert az asztrociták szerepe az agyi metasztázisokban. A peritumorális asztrogliózist úgy egérmodellben, mint humán mintákon megfigyelték.^{171,192} Ezekben a reaktív asztrocitákban megnő a GFAP, az MMP-9 (mátrix metalloproteináz-9) és az endotelin-1 expresszió, és plazminogén aktivátorokat kezdenek el szekretálni, amelyek aktív plazminná hasítják a neuronokból felszabaduló plazminogént. A plazmin egyrészt mobilizálja az asztrociták felszínéről a FasL-t (Fas ligand), amely apoptózist indukál a tumorsejtekben, másrészt hasítja a tumorsejtek felszínén az L1CAM adhéziós molekulát, megakadályozva kapcsolódásukat az erekhez. Ennek megfelelően a sikeres túléléshez az agyi metasztatikus

emlő- és tüdőkarcinóma sejtek plazminogén aktivátor inhibitorokat termelnek, mint amilyen a *neuroserpin/serpin I1* és a *serpin B2*,¹⁸⁷ így semlegesítve az asztrociták tumorellenes hatásait.

Ezzel párhuzamosan az asztrociták olyan mechanizmusokat is aktiválnak, amelyekkel segítik a daganatsejtek túlélését az agyban.¹⁹³ Ez a folyamat megvalósulhat egyrészt szolubilis faktorok (gyulladásos mediátorok, proteázok, illetve növekedési faktorok) révén,^{194–196} másrészt vezikulák felszabadításával, harmadrészt pedig közvetlen kapcsolatok útján. Exoszómákon keresztül az asztrociták miR-19a-t adnak át a mellráksejteknek, amely a PTEN (foszfatáz és tenzin homológ, *phosphatase and tensin homolog*) gátlásával a PI3K (foszfatidilinozitol 3-kináz, *phosphoinositide 3-kinase*)–Akt túlélési útvonalat aktiválja.¹⁹⁷ Az asztrociták és a metasztatikus sejtek JAG1-Notch1 interakción, illetve réskapcsolatokon keresztül közvetlenül is kapcsolódhatnak. A Notch1-en keresztül a tumorsejtekben túlélési útvonalak aktiválódnak, és ennek hatására megnő a CSC-k (*cancer stem-like cell*), azaz őssejt fenotípusú tumorsejtek száma.¹⁹⁸ A protokadherin-7 interakciók segítségével fenntartott, Cx-43 (*connexin-43*) egységekből felépülő réskapcsolatokon történő anyagáramlás pedig a kemorezisztencia kialakulását segíti elő melanóma-, emlőkarcinóma és tüdőkarcinóma

A mikroglia/makrofág rendszer és az immunmechanizmusok is fontos szerepet játszanak az agyi metasztatikus környezetben. A mikrogliasejteknek számos prometasztatikus hatása van. Elősegíthetik a transzendoteliális migrációt,^{201,202} illetve fontos elemei lehetnek a tumor mikrokörnyezetnek.²⁰³ A metasztatikus tumorok növekedését elsősorban az antiinflammatorikus fenotípusú mikroglia/makrofág típusú sejtek segítik.²⁰⁴

Ami a tumorasszociált egyéb immunsejteket illeti, bár az adatok nem teljesen egyértelműek, a limfociták magas száma alapvetően jobb prognózist jelent.^{205,206} Ennek megfelelően az immunellenőrzőpont gátlószerek (*checkpoint* inhibitorok) – amelyek a T sejteken expresszálódó PD-1 (*programmed cell death-1*) receptor, illetve a tumorsejtek felszínén levő PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) közötti interakciók, valamint a CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) gátlásával reaktiválják az antitumorális választ – nagy reményekkel kecsegtetnek az agyi metasztázisok terápiájában.²⁰⁷

1.3.3 Az agyi áttétképző sejtek tulajdonságai. Az agyi metasztázisok potenciális biomarkerei

Számos tanulmány próbált választ találni arra a kérdésre, hogy milyen tulajdonságokkal, molekuláris mintázatokkal kell rendelkezniük azoknak a tumorsejteknek, amelyek képesek legyőzni a vér–agy gát és az agyi parenchima antitumorális hatásait. Ezen tulajdonságok egy része az alacsony differenciáltság és az általános metasztatikus mintázat része,^{208,209} míg mások valóban az agyi affinitással hozhatók összefüggésbe, bár a legtöbb esetben nem kizárólagosan. Ilyenek a ST6GALNAC5 (N-acetilgalaktozaminid α -2,6-szialiltranszferáz 5, *Nacetylgalactosaminide* α -2,6-sialyltransferase 5), az S katepszin vagy az α B-crystallin magas expressziója emlőkarcinóma-sejtekben,^{210–212} illetve a TGF- β 2 vagy a PLEKHA5 (*pleckstrin homology domain containing A5*) melanómában.^{213,214} A legfrissebb eredmények inkább nagyszámú génre és szignalizációs útvonalra kiterjedő agyi metasztatikus profilt feltételeznek,^{215,216} és a keringő tumorsejtekkel kapcsolatos vizsgálatok is összetett mintázatokkal jellemzik az agyi metasztatikus potenciált.²¹⁷

Ennek egyik fő eleme a túlélési útvonalak, elsősorban a PI3K–Akt szignalizáció fokozott aktivitása az agyi metasztatikus sejtekben.^{218–220} A másik a metabolikus adaptáció az agyi környezethez. Az agyi metasztatikus emlőkarcinóma-sejtekben a glükoneogenézisnek, illetve bizonyos aminosavak és a GABA (*γ-aminobutyric acid*) lebontásának aktiválódását írták le.^{221–223} Ezek a folyamatok egy glükóztól független túlélést biztosítanak a daganatsejteknek az agyban. Az agyi metasztatikus sejtekben a lipidek metabolizmusa is megváltozik, amely a PI3K aktivációval és a 8p kromoszomális delécióval lehet összefüggésben. Az agyi áttétképző tumorsejtekre a trigliceridek alacsony szintje, valamint a koleszterin és a diacilglicerinek emelkedett szintézise jellemző. Ennek hátterében az SREBF1 (*sterol regulatory element binding transcription factor 1*) áll, amelynek fokozott működése egy egyedi, agyi metasztatikus mintázatot hoz létre.²²⁴

Ezen szignalizációs és metabolikus mintázatok mellett a proteolitikus enzimeknek, valamint az EV-knek (extracelluláris vezikula) és miRNS-eknek (mikro-RNS) van kitüntetett szerepe a tumorsejtek agyi áttétképzésében.

1.3.3.1 A tumorsejtek által termelt proteázok szerepe az agyi metasztázisok kialakulásában

A proteolitikus folyamatok a vér–agy gáton való átvándorlás folyamatában és az agyi környezet, elsősorban az ECM átalakításában vesznek részt. A tumorsejtek számos MMP-t, valamint szerin, cisztein és egyéb típusú proteázt termelnek, ugyanakkor az agyi rezidens sejtek proteolitikus aktivitása is fokozódhat a metasztatikus sejtek hatására.

A proteázok közül az MMP-k szerepe a legismertebb az agyi áttétképzés folyamatában. Az MMP-k Ca²⁺-függő Zn²⁺-endopeptidázok, amelyek számos fiziológiás és patológiás folyamatot szabályoznak a szervezet számos pontján, többek között az agyban és a vér–agy gát szintjén is.²²⁵ Állatkísérletekkel bizonyították, hogy az agyi metasztázisképzésben elsősorban az MMP-1, MMP-2 és MMP-9 játszik fontos szerepet,^{226–228} amelyek feltehetőleg a glikokálix, a junkcionális fehérjék, illetve az ECM lebontásával segítik a tumorsejtek előrehaladását.

Nemcsak a metasztatikus sejtek, hanem az asztrociták is termelnek MMP-2-t és MMP-9-et, segítve a daganatos inváziót.¹⁹⁵ Ehhez hasonlóan a heparanáz – amely a heparán szulfátot, az ECM egyik fontos komponensét bontja²²⁹ – szintén nagy mennyiségben expresszálódhat nemcsak az agyi áttétképző sejtekben,^{230,231} hanem asztrocitákban is.²³² Az S katepszin cisztein proteázt pedig az agyi metasztatikus emlőkarcinóma-sejteken kívül a tumor sztrómában levő makrofágok termelik. Ennek megfelelően, az S katepszin az agyi endotélsejtek szoros kapcsolataiban megtalálható JAM-B hasítása, vagyis a vér–agy gáton való átjutás szabályozása mellett az agyi kolonizáció lépését is befolyásolja.²¹¹

Melanómasejtek esetében a vér–agy gáton való átjutást a plazminogén aktivátor hatással rendelkező uPA és tPA (*urokinase* és *tissue plasminogen activator*) határozhatja meg.²³³ Ezen túl a plazminogén aktivátorok és aktivátor inhibitorok az agyi metasztatikus környezet kialakításában is alapvető szerepet játszanak, elsősorban a tüdő-, illetve emlőkarcinómasejtek és az asztrociták közötti kapcsolatok szabályozásával.¹⁸⁷

Összességében a tumorsejtek és az agyi rezidens sejtek által termelt proteázok egy kaszkádszerú proteolitikus hálózatot alkotnak, amely jelentős mértékben meghatározza a tumorsejtek túlélését és terjedését az agyi környezetben.²¹¹

1.3.3.2 A tumorsejtek által felszabadított miRNS-ek szerepe az agyi áttétképzésben

Az EV-k – amelyek méretük és biogenézisük alapján lehetnek exoszómák (50-150 nm átmérővel), mikrovezikulák (100-1000 nm), apoptotikus testek (100-5000 nm) vagy nagy onkoszómák (1000-10 000 nm) – a sejtek által kibocsátott, membránnal körülvett vezikulák, amelyek a sejtek közötti kommunikáció fontos elemei. Proteineket, lipideket és nukleinsavakat tartalmaznak és adnak át a célsejteknek, befolyásolva azok működését.²³⁴ Tartalmuk tekintetében kiemelkedik az RNS-ek, és különösen a miRNS-ek szerepe, amelyeket az EV-k védenek a lebomlástól az extracelluláris térben.²³⁵ A miRNS-ek 19-25 nukleotid hosszú, nem kódoló, egyszálú RNS-ek, amelyek bázispárosodással kapcsolódnak cél-mRNS-eikhez (hírvivő, *messenger* RNS), általában poszttranszkripciós repressziót okozva. A miRNS-ek kiemelkedő szerepet töltenek be a génexpresszió szabályozásában, a tumorigenézisben és a metasztázis folyamatában.²³⁶

A tumorsejtek és a környezeti sejtek kölcsönösen befolyásolják egymást az EV-k, illetve azok miRNS-ei által,²³⁷ amelyek fontos szerepet töltenek be a premetasztatikus *niche* előkészítésében. Ez utóbbi egy receptív és támogató környezetet, egy megfelelő, termékeny "talajt" (*soil*) jelent a tumorsejtek ("mag", *seed*) számára, elősegítve azok megtapadását a távoli szervben.²³⁸ A metasztatikus sejtek által felszabadított EV-k bejuthatnak az agyi endotélsejtekbe, majd transzcitózissal átjuthatnak az agyba, ahol az agyi sejteket befolyásolhatják.²³⁹ AZ EV-k és a miRNS-ek a tumor mikorkörnyezeten belüli kommunikációban is alapvető fontosságúak a metasztatikus sejtek és az agyi sejtek közötti interakcióban.²⁴⁰

Kísérletes modellekben, illetve humán primér és áttétes tumormintákat összehasonlítva számos miRNS megváltozott expresszióját mutatták ki az agyi metasztatikus sejtekben.^{241–243} Az *in vitro* és *in vivo* modellekben végzett kísérletek fényt derítettek azokra a folyamatokra is, amelyeket az egyes miRNS-ek szabályoznak, így biztosítva a tumorsejtek számára az agyi metasztatikus képességet. Az agyi metasztatikus emlőkarcinóma CSC-kben például az alacsony miR-7 expresszió magas KLF4 (*Kruppel-like factor 4*) szintet tart fenn, amely elősegíti a vér–agy gáton való átvándorlást.²⁴⁴ Ugyanakkor az agyi metasztatikus emlőkarcinóma-sejtek miR-181c-tartalmú exoszómákat bocsátanak ki, amelyek eljutnak az agyi endotélsejtekbe, ahol a PDPK1 (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) és a

kofilin szabályozásán keresztül a vér–agy gát megnyílásához vezetnek.²⁴⁵ A melanóma- és emlőkarcinóma-sejtvonalak exoszómáiban a magas miR-210, valamint az alacsony miR-19a és miR-29c jellemzi az agyi metasztatikus sejteket.²⁴⁶

Humán emlőkarcinóma tumormintákban négy olyan miRNS-t találtak, amely eltérően expresszálódik a primér tumorban és az agyi áttétekben. Ezek, az agyi metasztatikus léziókban alacsony szinten jelenlevő miR-132-3p és magas expressziót mutató miR-150-5p, miR-155-5p és miR-199a-5, többek között a cMET onkogén szabályozásában vesznek részt, és a kiújuló agyi metasztázis prognosztikai markerei lehetnek emlőkarcinómában.²⁴⁷ Az alacsony miR-509 pedig az agyi endoteliális RhoC és TNF-α szabályozása révén járulhat hozzá az emlőkarcinóma-sejtek agyi áttétképzéséhez.²⁴⁸ Nem kissejtes tüdőkarcinómában az agyi áttétekben alacsony szintet mutató miR-375 szint hozható összefüggésbe az agyi tumorok kialakulásával,²⁴⁹ bár más adatok alapján ez a mintázat inkább az általános invazivitással és metasztatikus potenciállal állhat összefüggésben.²⁵⁰

Az agyi metasztatikus folyamatokban a vérben keringő miRNS-ek is jellemző mintázatot mutathatnak, és diagnosztikus vagy akár prognosztikus biomarkerek is lehetnek. Melanóma agyi áttétben szenvedő betegek plazmájában hat olyan miRNS-t találtak (miR-5694, miR-6796-3p, miR-6741-3p, miR-4664-3p, miR-4665-5p és miR-671-5p), amelyek elkülönítették ezeket a betegeket egészséges egyénektől és más agyi tumorral rendelkező betegektől.²⁵¹ Emlőkarcinóma esetében a betegek véréből izolált exoszómákban az emelkedett miR-576-3p, valamint a csökkent miR-130a-3p lehet prognosztikus értékű, előrevetítve az agyi metasztázisok kialakulását ezekben a betegekben.²⁵² Tüdődaganatokban pedig a keringő exoszómák magas miR-550a-3-5p tartalma mutatott korrelációt az agyi áttétekkel.²⁵³

Összességében az agyi metasztázisképződéssel kapcsolatba hozható miRNS-ek száma folyamatosan nő, azonban a különböző tanulmányok eredményei kevés átfedést mutatnak. Így további vizsgálatok szükségesek, hogy megértsük, melyek a kulcsfontosságú miRNS-ek a tumorsejtek agyi metasztatikus képességének kialakításában, illetve hogy melyek azok, amelyek diagnosztikus vagy prognosztikus markerként használhatók a klinikumban.
1.3.4 Az agyi áttétes tumorok vérellátása és a vér–tumor barrier

A vér–agy gáton átvándorolt metasztatikus sejtek az erek közelében maradnak és szaporodnak, bekebelezve azokat. Ez a vaszkuláris koopció, amely a melanóma és emlőkarcinóma áttétek fő vérellátási módja az agyban, míg tüdődaganatokban a korai angiogenézis kaphat fontos szerepet.^{176,254} Ennek megfelelően, az angiogenézist gátló, VEGF (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor, *vascular endothelial growth factor*) ellenes terápiák tüdődaganatok esetében tűnnek a leghatékonyabbnak az agyi áttétek kialakulásának megakadályozásában.^{255,256}

A tumoros léziók növekedésével párhuzamosan kialakuló érhálózat a vér–tumor barriert hozza létre,²⁵⁷ amely sejtes felépítésében és tulajdonságaiban hasonlít a vér–agy gátra, ám permeabilitása heterogén és átlagban magasabb az intakt vér–agy gáténál. Ez vezet a peritumorális vazogén ödéma kialakulásához. Arról, hogy van-e összefüggés a metasztatikus léziók mérete és a vér–tumor gát áteresztőképessége között ellentmondásosak az adatok.^{258–263} Az viszont ismert, hogy emlőkarcinóma agyi metasztázisokban a vér–tumor barrier kevésbé permeábilis, mint glioblasztómában,²⁶⁴ és bár általában nyitottabb, mint a vér–agy gát, sokkal szorosabb barriert képez, mint a perifériás erek, megakadályozva számos potenciális terápiás szer bejutását a metasztatikus tumorba.²⁵⁹ így általános szabályként elmondható, hogy az erek permeabilitása a következő sorrendben nő: vér–agy gát, vér–tumor barrier a metasztázisokban, vér–tumor barrier primér agyi daganatokban, perifériás erek. Azt is leírták, hogy a vér–tumor barrier (de nem az intakt vér–agy gát) áteresztőképessége TNF-α és limfotoxin segítségével szelektíven növelhető.^{265,266}

A vér–tumor barriernek az egészséges agyi ereknél magasabb permeabilitása elsősorban a paracelluláris gátat érinti, és az okkludin és a ZO-1 mennyiségi csökkenésével jár.^{191,267} Ezzel párhuzamosan az MFSD2A expressziója is csökken, amely a DHA transzport és a lipid metabolizmus zavarához vezet.²⁶⁸ A GLUT1 szintjének csökkenése pedig a glükóz metabolizmus átalakulásában játszhat szerepet.¹⁹²

A bazális membrán, a periciták és az asztrociták is változást szenvednek a tumorban, illetve a tumorok közelében. Csökken az erek alaphártyájában a laminin-α2 és a IV. típusú kollagén mennyisége, nő a dezmin-pozitív periciták aránya, az asztrociták végtalpaiban pedig csökken

az AQP4 expressziója.^{191,269} Gyulladásos folyamatok is beindulnak, amelynek részeként az asztrocitákban nő az S1P3 (*sphingosine-1 phosphate receptor 3*) expressziója, amely a CCL2 és az IL-6 szekréció fokozásával hozzájárul a vér–tumor barrier megnyitásához.²⁷⁰ A rezidens mikrogliasejtek és a csontvelői makrofágok pedig pro- és antiinflammatorikus citokineket is termelnek az áttétek közelében, jelentősen befolyásolva azok sorsát.^{271–273} Összességében az immunfolyamatok az agyi metasztázisokban egyre nagyobb figyelmet kapnak, és várhatóan az immunterápiák jelentősége is nőni fog a következő években.²⁷⁴

2 Kérdésfelvetés, célkitűzések

Munkánk során a neurovaszkuláris egység, illetve a vér–agy gát működését szerettük volna minél jobban megérteni fiziológiás és patológiás körülmények között. Ezen fő célkitűzés megvalósítása érdekében kísérleteinket három tematikus pillérre építettük, amelyeken belül több kérdésre kerestünk válaszokat.

1. pillér: A vér–agy gát működését és szabályozását érintő alapvető mechanizmusok feltárása

- Vannak-e regionális különbségek a vér–agy gát felépítésében és működésében?

 Hogyan védenek az endogén molekulák az agyi endoteliális szoros kapcsolatok károsodása ellen?

- Hogyan módosíthatjuk a gyógyszerjelölteket, hogy átjussanak a vér-agy gáton?

2. pillér: A neurovaszkuláris sejtek szerepének feltérképezése gyulladásos folyamatokban

 Részt vesznek-e az agyi vaszkuláris sejtek a gyulladásos reakciók kiváltásában és közvetítésében?

- Milyen patológiás folyamatokban játszanak szerepet ezek a mechanizmusok?

3. pillér: A neurovaszkuláris egység szerepének tisztázása az agyi metasztázisok kialakulásában

- Hogyan képesek a tumorsejtek átvándorolni a vér–agy gáton?

 Hogyan képesek a tumorsejtek túlélni és szaporodni a nagyon egyedülálló agyi környezetben?

3 Módszerek

3.1 In vitro módszerek

3.1.1 Primér sejtek izolálása és tenyésztése

Az **RBEC** (patkány agyi endotélsejt, *rat brain endothelial cell*) sejteket 2-3 hetes Wistar patkányokból, a **PBEC** (sertés agyi endotélsejt, *porcine brain endothelial cell*) sejteket fiatal (~18 kg tömegű) vietnámi csüngőhasú sertésekből nyertük. Az agyhártyák eltávolítása után az agyszövetet két lépésben emésztettük kollagenáz, illetve kollagenáz-diszpáz enzimekkel. A mielint 20% BSA (marhasavó albumin, *bovine serum albumin*) segítségével választottuk el, majd a mikroér fragmentumokat 33%-os Percollból készített gradiensről gyűjtöttük össze, és 4-es típusú kollagénnel, valamint fibronektinnel bevont tenyésztőedényekben tenyészettük 10% PDS (plazma eredetű borjúsavó, *plasma-derived serum*) tartalmú DMEM/F-12 (*F-12 Ham nutriens* keverékkel kiegészített *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) tápfolyadékban. A szennyező sejtektől puromicinnel szabadultunk meg, amely P-gp szubsztrát lévén nem tudta toxikus hatását kifejteni az agyi endotélsejtekre.

A **patkány és egér agyi periciták**at 2-3 hetes Wistar patkányokból, illetve 6-8 hetes BALB/c egerekből izoláltuk kollagenáz emésztéssel, majd 20% BSA-n történő elválasztással. A mikroerekből kivándorló pericitákat 4-szer passzáltuk 1-es típusú kollagénnel bevont csészékre, amíg tiszta tenyészeteket kaptunk. A sejteket 10% FBS-t (magzati marhasavó, *fetal bovine serum*) tartalmazó DMEM-ben tenyésztettük. A **patkány asztrociták**at újszülött állatokból izoláltuk az agy mechanikai disszociációjával. A szövetdarabokat poli-L-lizinnel bevont tenyésztőedényekbe helyeztük, és a gliasejteket 10% FBS-t tartalmazó DMEM-ben tenyészettük. A mikrogliasejteket mosással távolítottuk el. Az asztrocita tenyészetekről hetente kétszer gyűjtöttünk kondicionált médiumot.

Az *in vitro* vér–agy gát kokultúra modell kialakításához a pericitákat a félig áteresztő membránok alsó felszínére szélesztettük, majd néhány óra után az inszerteket megfordítottuk, és így tettük ki az endotélsejteket a membránok felső felszínére. 24 óra eltelte után a tenyészetek hidrokortizont, egy sejtpermeábilis cAMP (ciklikus adenozin monofoszfát, *cyclic adenosine monophosphate*) analógot és foszfodieszteráz inhibitort

kaptak az apikális irányból, míg a bazolaterális kompartimentumba asztrocita-kondicionált tápfolyadékot tettünk (**7. A ábra**). Ez a modell alkalmas TEER és permeabilitás mérések elvégzésére.



7. ábra. Az in vitro vér–agy gát modell.

A: Az *in vitro* modell sematikus rajza és a felhasznált sejttenyészetekről készült IF képek. **B**: A TEER mérése. **C**: A permeabilitás mérése.

3.1.2 A TEER és a permeabilitás mérése

Az agyi endotélsejteket és pericitákat tartalmazó inszerteket a cellZscope (nanoAnalytics) készülékbe helyeztük, amely folyamatosan mérte a TEER-t, vagyis a junkciók által meghatározott elektromos ellenállást az endotélréteg apikális és bazolaterális oldala között (**7. B ábra**). A készülék a frekvencia-függő impedancia adatokból számolja ki a TEER-t.²⁴ A plató elérése után, amely kísérleteinkben RBEC sejtek esetén 150-300 Ω × cm² volt, végeztük el a kísérleteket, és monitoroztuk tovább a TEER-t.

A permeabilitási kísérletekben az EM-2 (endomorfin-2) és KYNA (kinurénsav, *kynurenic acid*) analógok átjutását vizsgáltuk a vér–agy gát *in vitro* modelljén. A tesztanyagokat (a tríciált EM-2 analógokat, a KYNA analógokat, illetve a kontrollként használt SF (Na-fluorescein, *sodium fluorescein*) és EBA (Evans kékkel jelölt albumin, *Evans blue albumin*) oldatokat) Ringer-HEPES-ben helyeztük a felső kamrába, majd 30, illetve 60 perc után mintákat vettünk az alsó kompartimentumból (**7. C ábra**). Az átjutott anyagok koncentrációját egy TRICARB 2100TR szcintillációs detektorral, egy UHPLC-MS/MS rendszerrel, illetve egy BMG Labtech FLUOstar OPTIMA készülékkel végeztük. A Papp (látszólagos áteresztőképesség, *apparent permeability*) az ájutott anyagmennyiséget jelenti az idő, a felszín és a kiinduló koncentráció függvényében, míg a Pe-t (endoteliális permeabilitás) úgy számoltuk, hogy a látszólagos permeabilitást az üres (endotélsejteket nem tartalmazó) filter áteresztőképességével korrigáltuk.

3.1.3 Egyéb sejtek tenyésztése

Az Institut Cochinből származó hCMEC/D3 (rövidítve **D3**) humán agyi endotélsejteket²⁷⁵ mikrovaszkuláris endoteliális növekedési médiumban (EGM-2MV-vel kiegészített EBM-2, Lonza) tenyésztettük 2% FBS jelenlétében, és P30-P40 közötti passzázsszámnál használtuk. A ScienCell-től vásárolt **HBVP** (humán agyi vaszkuláris pericita, *human brain vascular pericyte*) sejteket a forgalmazó által ajánlott PM-ben (pericita médium) tenyésztettük 5% FBS-sel, és P2-P4 között használtuk.

Az MDA-MB-231 (röviden **MDA**) humán tripla negatív emlőkarcinóma-sejteket DMEM + 5% FBS médiumban, az egér **4T1** tripla negatív emlőkarcinóma és a **B16/F10** melanóma sejteket 5% FBS-t tartalmazó RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium-1640*) tápfolyadékban, míg az **A2058** sejteket szintén 5% szérumban és EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) tápoldatban tartottuk.

3.1.4 A sejtek kezelése, az in vitro kísérletek kivitelezése

A sejteket, ha másképp nem jelöltük, szérummentes médiumban kezeltük. Kísérleteinkhez a Merck-Sigma, a Thermo Fisher Scientific, az InvivoGen és más laboratóriumi vegyszergyártók termékeit használtuk. A sejttenyésztéshez a Corning és a TPP műanyagáruit alkalmaztuk.

A fluoreszcens fehérjéket expresszáló tumorsejteket (EGFP-MDA, tdTomato-4T1, illetve EmGFP-4T1) a megfelelő plazmidok TurboFect vagy Lipofectamine 2000 reagenssel, illetve retrovírussal történő transzfekciójával állítottuk elő.

Az LPS sejtbe juttatására a nem kanonikus inflammaszóma útvonal aktivációja céljából, 2 μg/ml LPS-t kevertünk össze Lipofectamine 2000-rel, majd ezt helyeztük a sejtekre. Az Igf2 géncsendesítést a HBVP sejtekben szintén Lipofectamine 2000-rel végeztük Stealth siRNS duplex oligoribonukleotidokkal a gyártó (Thermo Fisher Scientific) utasításai szerint.

3.1.5 Az endotélsejtek és a periciták közötti interakciók vizsgálata

A pericita–endotélsejt kommunikáció vizsgálatához a HBVP sejteket addig tenyésztettük, amíg benőtték a csészék felszínét. Ezután adtuk hozzájuk a gyulladásos faktorokat tartalmazó koktélokat (IFN- γ (interferon- γ)+TNF- α = *priming*, illetve IFN- γ +TNF- α +LPS (Lipofectamine) = nem-kanonikus inflammaszóma-aktiváció) szérummentes PM médiumban. A kontroll sejtek szérummentes PM médiumot kaptak. Ezzel párhuzamosan, abszolút kontrollként, sejteket nem tartalmazó csészékbe szérummentes PM médiumot helyeztünk gyulladásos faktorokkal vagy azok nélkül, amelyeket a sejteket tartalmazó csészékkel együtt az inkubátorban tartottunk. A kondicionált és a sejtmentes csészékben tartott médiumokat 4 óra után gyűjtöttük be, és a szemipermeábilis filtereken tenyésztett D3 sejtekhez adtuk bazolaterális irányból (az alsó kamrába helyezve) EBM-2 tápfolyadékkal 1:1 arányban hígítva. Az endotélsejtekben történt változásokat 24 óra után vizsgáltuk.

Az endotélsejt–pericita kommunikáció vizsgálatához a szemipermeábilis filtereken tenyésztett D3 sejteket az apikális kompartimentumba adott gyulladásos koktéllal kezeltük (IFN-γ+TNF-α+LPS = kanonikus inflammaszóma-aktiváció) szérummentes PM médiumban. Abszolút kontrollként olyan filtereket használtunk, amelyekre nem tettünk endotélsejteket, és az apikális kompartimentumba kontroll médiumot, illetve gyulladásos faktorokat adagoltunk. 24 óra után az alsó kamrákból gyűjtöttünk kondicionált, illetve kontroll médiumokat, amelyeket PM médiummal 1:1 arányban hígítva a csészékben tenyésztett HBVP sejtekre helyeztük 4 óra időtartamra.

3.1.6 Az endotélsejtek és a tumorsejtek közötti interakciók vizsgálata

Az impedancia változásának meghatározásához az RBEC sejteket aranyelektródával ellátott 96-lyukú *E-plate*-ekben konfluenciáig tenyésztettük, majd hidrokortizonnal, egy sejtpermeábilis cAMP analóggal és foszfodieszteráz inhibitorral kezeltük, amíg az impedancia – amelynek értékét jelentős mértékben a szoros kapcsolatok által meghatározott reszisztencia határozza meg – elérte a platót. Ezután 2 × 10⁴ tumorsejtet helyeztünk az endotélsejtekre 2,5% szérumot tartalmazó tápfolyadékban. Az impedanciát, amelyet a sejtindex fejez ki, 8 órán keresztül követtük nyomon.

Az adhéziós kísérletek során a 24-lyukú lemezen tenyésztett konfluens D3 agyi endotélrétegre 5 × 10⁴, OG (*Oregon Green 488*) festékkel jelölt tumorsejtet helyeztünk, majd 90 perc után eltávolítottuk az úszó sejteket. Fixálás után fluoreszcens mikroszkóban fotóztuk le a letapadt tumorsejteket, majd megszámoltuk őket.

A transzmigrációs kísérletekhez az RBEC sejteket 8 μm pórusméretű filtereken tenyésztettük. A konfluens endotélrétegre 10⁵, OG-jelölt melanómasejtet helyeztünk 5 órára. Ezután letöröltük a sejteket a filter felső felszínéről, és megszámoltuk az endotélrétegen, valamint a filter pórusain átvándotolt melanómasejteket (**8. A ábra**).



8. ábra. Transzmigrációs modellek.

(Az ábrafelirat a következő oldalon található.)

8. ábra. Transzmigrációs modellek.

(Az ábra az előző oldalon található.)

A: A transzmigráció vizsgálata nagy pórusméretű filteren tenyésztett RBEC endotélsejteken. A 8 μm pórusméretű filterekre patkány agyból izolált hajszálér fragmentumokat helyeztünk. Az ezekből kinövő RBEC sejtekre, a konfluencia elérése után, OG-jelölt melanómasejtet szélesztettünk 5 órára. Ezután a filter felső felszínéről letöröltük a sejteket, és megszámoltuk az endotélrétegen, valamint a filter pórusain átvándotolt melanómasejteket. **B**: A transzmigráció vizsgálata humán sejttenyészeteken. A D3 sejteket 12-lyukú lemezekben tenyésztettük a konfluencia eléréséig. Ezután tumorsejteket helyeztünk az endotélsejtekre, amelyeket egy inverz mikroszkópban követtünk nyomon úgy, hogy az 5 percenként készült képekből *time-lapse* videót készítettünk. Az ábra egy reprezentatív felvételsorozat, amely négy tumorsejtet mutat be, amelyek közül egy ("2") osztódik, és három ("1", "2a" és "3") beékelődik az endotélrétegbe. Ezt tekintettük transzmigrációnak.

A humán transzmigrációs modellben a D3 sejteket 12-lyukú lemezekben tenyésztettük a konfluencia eléréséig. A tumorsejteket 2 × 10⁴ sejt/lyuk mennyiségben helyeztük az endotélsejtekre L-15 tápfolyadékban. A sejttenyészeteket 6 órán keresztül egy inverz mikroszkópban követtük nyomon úgy, hogy az 5 percenként készült képekből *time-lapse* videót készítettünk, és megszámoltuk az átvándorló sejteket (**8. B ábra**).

3.1.7 A periciták és a tumorsejtek közötti interakciók vizsgálata

A rövid távú vándorlás vizsgálatához az MDA és HBVP, illetve MDA és D3sejteket 3-lyukú Ibidi lemezekben tenyésztettük. A szilikon választófalak eltávolítása után a sejtek mozgását 1% FBS-t tartalmazó L-15 tápfolyadékban 24 óráig követtük nyomon fáziskontraszt mikroszkópos felvételeket készítve.

A hosszú távú migrációhoz 12-lyukú Ibidi lemezeket használtunk minden második lyukba helyezve a sejteket a következő sorrendben: HBVP, EGFP-MDA, D3. A választófalak feltépése után 5 nappal fáziskontraszt és fluoreszcens felvételeket készítettünk a sejtekről és a közöttük levő területekről, amelyekből egy átnézeti képet szerkesztettünk össze.

Az egér és humán pericita-kondicionált médium előállításához a sejteket két napig PM-ben tenyésztettük 5% FBS jelenlétében. Az EV-k depletálása 150 000 × g-n történő centrifugálással, majd 0,1 µm pórusméretű filteren való szűréssel történt.

3.2 In vivo módszerek

Az összes kísérlet az etikai szabályok betartásával, etikai engedély birtokában, megfelelő altatás és fájdalomcsillapítás mellett történt.

3.2.1 Perifériás idegsérüléses modellek

A kísérletekhez 8-12 hetes hím BALB/c egereket használtunk. A *n. occulomotorius* sérülését enukleációval értük el, a *n. hypoglossus* esetében pedig az ideg feltárása után egy 2-3 mm hosszú szakaszt vágtunk ki az idegből a nyelvcsont alatt. A *n. ischiadicus* axotómia során is kivágtunk egy 3 mm-es idegrészt a comb középső szakaszán, míg a regenerációs kísérletekben az átvágást követően az idegcsonkokat epineurális öltésekkel varrtuk össze (koaptáció).

Az MCC950 kezelést 10 mg/kg-os intraperitoneális injekció formájában alkalmaztuk 1 órával az axotómia után, majd 24 óránként ismételve. Az 5-BDBD-t 5 mg/kg mennyiségben kapták az állatok intraperitoneális injekcióban 30 perccel a műtét után, majd 24 óránként. Az IL-1β neutralizáló ellenanyagot intratekális injekció formájában alkalmaztuk 20 µg/kg mennyiségben 1 órával az axotómia után, majd 24 óránként ismételve.

Az SFI (ülőideg funkcionális index, *sciatic functional index*) méréséhez az állatok talpát egy nem toxikus festékbe mártottuk, hogy meg tudjuk mérni a talp hosszát és szélességét az axotómia előtt, majd a koaptációt követően 8 héten keresztül. Az SFI értékeket a kezdeti hosszra normált szélesség- és hosszúságváltozás közötti különbségből számoltuk ki egy széles körben használt képlettel.²⁷⁶

3.2.2 Agyi metasztázis-modellek

A kísérletekhez 8 hetes nőstény BALB/c, illetve FVB/Ant:TgCAGyfp_sb #27 egereket használtunk. Ez utóbbiak az endotélsejtjeikben Venus-YFP sárga fluoreszcens fehérjét expresszálnak. A kétfoton-mikroszkópos nyomon követéshez az egereken egy 3,5 mm átmérőjű koponyaablakot készítettünk, amelyet egy hónapig hagytunk gyógyulni. Akut koponyaablakot az asztrociták vizsgálatához használtunk, amikor 10 nappal a tumorsejtek beoltása után fúrtuk át a parietális csontot, és ezen adagoltuk az SR101-et. Az állatokat az SR101 beadása utáni 30. és 120. perc közötti időablakban vizsgáltuk, amikor az asztrociták felvették a festéket, a koponyaablakon keresztül.

A 4T1, tdTomato-4T1, illetve EmGFP-4T1 sejteket a jobb *a. carotis communis*-ba, illetve a szív bal kamrájába oltottuk. Intraarteriálisan 10^6 sejtet adtunk be 100-200 µl Ringer-HEPES

oldatban, míg intrakardiálisan 3 × 10⁶ sejtet 200 µl-ben. A proliferáció vizsgálatához használt EdU-ból (5-etinilil-2-dezoxiuridin) 100 mg/kg-ot adagoltunk intraperitoneálisan 24 órával a szövetek fixálása előtt, amelyet a metszeteken a Click-iT EdU detekciós reagenssel (Thermo Fisher Scientific) mutattunk ki. A PPP-t (pikropodofillin, *picropodophyllin*) az intrakardiális tumorsejt inokuláció utáni 5. és 6. napon adtuk az állatoknak 40 mg/kg mennyiségben intraperitoneálisan. Az MCC950-et 10 mg/kg-os intraperitoneális injekció formájában alkalmaztuk naponta az 5.-7. napok között.

3.3 RNS vizsgálati módszerek

A sejtekből, egér agyszövetből és egér plazmából történő mRNS izoláláshoz és cDNS átíráshoz standard módszereket használtuk. A *primer*eket a National Center for Biotechnology Information Primer-BLAST eszközével terveztük. A PCR-t (polimeráz láncreakció, *polymerase chain reaction*) egy Bio-Rad iQ5 készüléken végeztük. Végpont PCR esetén a mintákat DNS festéket tartalmazó agaróz gélen választottuk el. A qPCR (valós idejű, *quantitative* PCR) reakciókhoz kereskedelmi forgalomban kapható Sybr Green Master Mixeket használtunk.

Az ISH (*in situ* hibridizáció) kivitelezéséhez RNAscope kitet (Advanced Cell Diagnostics) használtunk az IL1B kimutatására, míg a miRNS-ek detektálásához digoxigeninnel jelölt miRCURY LNA (*locked nucleic acid*) miRNS próbákat (Qiagen). Mindkét esetben a gyártó utasításai szerint jártunk el.

3.4 Fehérje vizsgálati módszerek

3.4.1 Western-blot

A WB (*western*-blot) vizsgálatokhoz a sejtfelülúszóból, illetve a szövetmintákból metanolos precipitációval nyertük ki a fehérjéket, amelyeket RIPA (*radioimmunoprecipitation assay*) pufferben oldottunk vissza, amely nemionos és anionos detergenseket, proteáz és foszfatáz gátlószereket, NaCl-ot és pufferoldatot tartalmaz. A sejteket közvetlenül RIPA-ban lizáltuk. A koncentráció megmérése után a fehérjemintákat Laemmli pufferben készítettük elő, és standard SDS–PAGE (*sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*) módszerrel választottuk el. A blottolás Bio-Rad készülék segítségével standard módszerekkel történt. A

membránokat rendszerint egy éjszakán át inkubáltuk a kereskedelmi forgalomban kapható elsődleges ellenanyagokkal, majd többszöri mosás után a HRP-vel (tormaperoxidáz, *horseradish peroxidase*) jelölt másodlagos ellenanyagokat 1-2 órán keresztül hagytuk a membránokon. A jelek előhívása kemilumineszcens szubsztráttal történt.

3.4.2 ELISA

Az ELISA (enzimhez kötött immunszorbens próba, *enzyme-linked immunosorbent assay*) módszert az IL-1β, valamint az IGF2 (inzulinszerű növekedési faktor 2, *insulin-like growth factor 2*) mennyiségi kimutatására alkalmaztuk a kereskedelmi forgalomban kapható kitek gyártói leírása alapján (BioTechne, illetve Cusabio). A detekciós limit 0,063 pg/ml, illetve 15,6 pg/ml volt.

3.4.3 Immunfluoreszcencia és immunhisztokémia

Az IF (immunfluoreszcencia) és IHC (immunhisztokémia) protokollokhoz az egereket előbb PBS (foszfáttal pufferelt sóoldat, *phosphate buffered saline*), majd 4% PFA (paraformaldehid) oldattal perfundáltuk, végül az agyakat egy éjszakán át posztfixáltuk. A metszeteket kriosztáttal, vibratómmal, illetve szukrózos krioprotekció után mikrotómmal készítettük. A humán mintákat paraffinos metszetek formájában kaptuk a Szegedi Tudományegyetem Pathológiai Intézetéből. Ezeket deparaffináltuk, majd rehidratáltuk. A sejttenyészeteket etanol–ecetsav keverékével vagy 4% PFA jelenlétében fixáltuk.

Antigénfeltárás után a nem specifikus kötőhelyek blokkolása BSA-val, illetve fajspecifikus szérummal történt, miután IHC esetén előbb az endogén peroxidáz aktivitást is blokkoltuk. Az elsődleges ellenanyagokkal történő inkubáció, majd többszöri PBS-es mosás után a fluoreszcensen, illetve biotinnal jelölt másodlagos ellenanyagokat adtuk a mintákhoz. IF esetén a mosóoldatba Hoechst 33342 DNS festéket adagoltunk a sejtmagok jelölésére, majd következett a beágyazás és a fedés. Az IHC protokoll szerint a másodlagos ellenanyaggal való inkubáció utáni mosást követően az avidint és biotinilált HRP-t tartalmazó komplexet adtuk a mintához, majd a DAB (3,3'-diaminobenzidin) és NiCl₂ keverékét. Mosás, beágyazás és fedés után következett a mikroszkópos analízis.

3.5 Mikroszkópos módszerek

Fáziskontraszt és IF felvételeinket, valamint a *time-lapse* videókat egy Spot RT digitális kamerával felszerelt Nikon Eclipse TE2000U mikroszkóppal, egy 37°C-os inkubátorral ellátott Nikon Eclipse Ti-E inverz mikroszkóppal és Andor NEO sCMOS kamerával, illetve Leica SP5 és SP8 konfokális mikroszkópokkal készítettük.

3.5.1 Transzmissziós elektronmikroszkópia

A kísérlet végeztével a filtereket 2,7% glutáraldehiddel fixáltuk. Ezután a mintákat OsO₄-dal kezeltük, dehidratáltuk és Epon 812 gyantába ágyaztuk be. Leica EM UC7 ultramikrotómmal 50 nm vastagságú szeleteket készítettünk, amelyeket egy Tecnai 12 biotwin TEM (transzmissziós elektronmikroszkóp) segítségével vizsgáltunk meg.

3.5.2 Kétfoton-mikroszkópia

Az élő egerek agyában zajló folyamatokat megfelelő altatás és immobilizálás után koponyaablakon keresztül vizsgáltuk egy FEMTO 2D Alba mikroszkóp segítségével, amelyhez egy Mai Tai HP Ti-zafír lézer fényforrás volt kapcsolva.

3.5.3 Atomerő-mikroszkópia

Az Asylum MFP-3D AFM (atomerő-mikroszkóp, *atomic force microscope*) segítségével egyrészt deflekciós képeket készítettünk az *E. coli* baktériumok felülúszójából ultracentrifugálással kinyert OMV-kről (külső membrán vezikula, *outer membrane vesicle*).

Másrészt a tumorsejtek és az endotélsejtek közötti adhéziós erőt (pontosabban a deadhéziós erőt) mértük meg úgy, hogy a tű nélküli konzolra BSA–biotin–sztreptavidin– *Concanavalin-A* kötéssor segítségével egy OG-jelölt melanómasejtet vettünk fel, amelyet az endotélréteghez közelítettünk (**9. ábra**). A méréseket L-15 médiumban végeztük. Az adhéziós erőt a visszahúzási görbéből számoltuk ki.



9. ábra. Az adhéziós erők mérése AFM-mel.

A: A mérés sematikus rajza. **B**: Az erőmérés lépései. A tumorsejteket tartalmazó konzolt az endotélréteghez közelítettük, majd az adhéziós erőt a melanómasejtet tartalmazó konzol emelése során regisztráltuk, amikor a két sejt elszakadt egymástól. Az inszert a deadhézió során látható ~20 pN-os szakadásokat mutatja. (Az ábra Végh Attila Gergely képeinek felhasználásával készült.)

3.6 Adatbázis-elemzés, targetpredikció és statisztika

A vér–agy gát heterogenitásának vizsgálata során az *Allen Brain Atlas* génexpressziós adatait dolgoztuk fel (*http://human.brain-map.org/*).²⁷⁷ A periciták által szekretált faktorok azonosításához pedig a *http://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html* oldalon közzétett egér transzkriptomikai adatokat használtuk.⁴¹

A miRNS-ek cél-mRNS-einek azonosításához a *TargetScanMouse v.7.2* és a *DIANA Tools microT-CDS v.5.0* eszközöket használtuk.^{278,279} Csak azokat a targeteket vettük figyelembe, amelyek mindkét módszerrel és irodalmi adatok alapján is relevánsnak bizonyultak.

A statisztikai analíziseket standard módszerekkel Excel, R, GraphPad vagy egyéb környezetben végeztük. Több minta összehasonlítására az ANOVA (varianciaanalízis, *analysis of variance*) módszert használtuk.

4 Eredmények

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 fiziológiás és patológiás körülmények között.

4.1.1 Különbségek a vér–agy gát molekuláris felépítésében a szürkeállomány és a fehérállomány között

A vér–agy gát általános működését és felépítését vizsgálva, felmerült bennünk a kérdés, hogy vannak-e különbségek a vér–agy gát molekuláris felépítésében a különböző agyi régiók szintjén. A vér–agy gát heterogenitásával kapcsolatban igen korlátozottak voltak az ismereteink, ezért nagyobb agyi területeket hasonlítottunk össze. Így azt szerettük volna megvizsgálni, hogy vannak-e különbségek az agyi endotélsejtek barrier tulajdonságaiban a szürke-, illetve a fehérállományban.

Kísérleti eredményeink azt mutatták, hogy a szoros kapcsolatok fehérjéi, az okkludin és a klaudin-5 nagyobb mennyiségben expresszálódnak a fehérállományi endotélsejtekben úgy mRNS, mint fehérje szinten, míg az *adherens junction* fehérjék közül csak az α-katenin esetében találtunk ilyen különbséget, a β-katenin esetében nem (**10. A, B ábra**). Eredményeinket összehasonlítottuk az *Allen Brain Atlas* humán génexpressziós adataival, és azt tapasztaltuk, hogy az okkludin, a klaudin-5 és az α-katenin nagyobb mennyiségben van jelen a fehérállományban úgy a saját PBEC mRNS és fehérje szintjeit, mint az *Allen Brain Atlas* humán agyszöveti mRNS szinteket tekintve (**10. C ábra**). A klaudin-5 magasabb expresszióját a fehérállományi agyi ereken immunfluoreszcens vizsgálatokkal is igazoltuk úgy sertés agyszöveten, mint a sertés agyszövetből izolált endotélsejtek tenyészetén (PBEC sejteken) (**11. A, B ábra**). Ennek megfelelően a fehérállományi PBEC sejtek TEER-je szignifikánsan magasabbra emelkedett, mint a szürkeállományi PBEC-ké (**11. C ábra**).

Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a fehérállományban szorosabban zár a vér–agy gát, mint a szürkeállományban. Ennek okai és következményei azóta sem teljesen ismertek, azonban valószínűleg fontos szerepet játszik a fiziológiás agyi funkciók fenntartásában. A

fehérállományt érintő megbetegedésekben pedig (például MS-ben vagy agyi kisér betegségben) fontos szerepet játszhat ennek a nagyon erős barriernek a sérülése.²⁸⁰



10. ábra. A kortikális és fehérállományi agyi endotélsejtek közötti különbségek.

A: Szoros és adherens junkcionális fehérjék mRNS expressziója agykéregből és fehérállományból izolált PBEC sejtekben. A génexpresszió változását a GAPDH-hoz normalizáltuk és a CX mintákban mért értékekhez viszonyítottuk. N = 3, átlag ± standard hiba, *P < 0,05 (CX-hez viszonyítva, Student *t*-teszt). **B**: Szoros és adherens junkcionális fehérjék expressziója agykéregből és fehérállományból izolált PBEC sejtekben. Reprezentatív WB képek N = 3 független kísérletből. **C**: Szoros és adherens junkcionális fehérjék expressziójának összehasonlítása az *Allen Brain Atlas*-ból nyert (humán agyi génexpressziós) és a saját kísérleti eredményeinkből származó (PBEC gén- és fehérjeexpressziós) adatok alapján. Az összes adatot *z*-score formájában ábrázoltuk úgy, hogy a saját kísérleti eredményekből származó génexpressziós változásokat GAPDH-hoz, míg a fehérjeexpressziót β-aktinhoz normalizáltuk. CX = agykéreg (*cortex*), WM = fehérállomány (*white matter*), occl = okkludin (*occludin*), clau-5 = klaudin-5 (*claudin-5*), cat = katenin (*catenin*), ABA = *Allen Brain Atlas*, GAPDH = gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*).

A sertés agyszeletek







A: Sertés agyszeletekből származó reprezentatív klaudin-5 (clau-5) IF képek N = 3 független kísérletből. B: Agykéregből és fehérállományból izolált PBEC sejtek klaudin-5 (clau-5) expressziója. Reprezentatív IF képek N = 3 független kísérletből. C: A TEER plató kialakulása agykérgi (CX) és fehérállományi (WM) PBEC *in vitro* modellben. N = 4, átlag ± szórás,***P < 0,001 a görbe alatti területeket összehasonlítva.

4.1.2 A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid hatása a vér-agy gátra

Következő kísérleteinkben arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen endogén molekulák járulhatnak hozzá a vér–agy gát tulajdonságok fenntartásához fiziológiás és patológiás körülmények között. A PACAP (hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid, *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*) egy neuroprotektív, sejttúlélést segítő, gyulladáscsökkentő, értágító és számos más tulajdonsággal rendelkező neuropeptid,²⁸¹ amely a cAMP útvonalat aktiválja a sejtekben. A cAMP-ről már régóta ismert, hogy javítja az agyi endotélsejtek barrier tulajdonságait, elsősorban a szoros kapcsolati fehérjék megfelelő lokalizációjának elősegítésével.²⁸²







A: A TEER emelkedése PACAP jelenlétében a kiindulási érték százalékában ábrázolva. N = 4, átlag ± szórás, *P < 0,01 (ANOVA és Bonferroni *post-hoc* teszt). A használt *in vitro* modell az RBEC–pericita–asztrocitakondicionált médium volt. **B**: 100 nM PACAP hatása D3 agyi endotélsejtek szoros kapcsolataira 90 perc kezelés után. ZO-1 IF reprezentatív képek N = 3 független kísérletből. DMNQ = 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone. Ennek fényében megvizsgáltuk a PACAP hatását a vér–agy gátra, és azt tapasztaltuk, hogy kontroll körülmények között csak kis mértékben emeli az agyi endotélsejtek TEER-jét, illetve növeli a ZO-1 mennyiségét a sejt–sejt kapcsolatokban, azonban glükózhiány, illetve DMNQ (2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone) segítségével kiváltottt oxidatív stressz jelenlétében kifejezettebb védőhatást fejt ki a szoros kapcsolatokra (**12. ábra**).

4.1.3 Potenciális terápiás molekulák átjutása a vér-agy gáton

A vér–agy gát nemcsak a potenciálisan káros molekulák, hanem a terápiás szerek agyba való bejutását is megnehezíti, így a gyógyszermolekulák több mint 90%-a nem tud terápiás koncentrációt elérni a központi idegrendszerben.¹³ Erre a problémára az egyik megoldás a hatóanyagok kémiai módosítása lehet.

A μ-opioid receptor a morfin alapú fájdalomcsillapítók egyik fő célpontja.²⁸³ Az EM-1 és EM-2 ennek a receptornak a nagy affinitású és szelektivitású peptid ligandja, amelyek a morfinhoz hasonló fájdalomcsillapító hatással bírnak, viszont kevesebb mellékhatással rendelkeznek, ugyanakkor kevéssé jutnak át a vér–agy gáton.²⁸⁴

A KYNA egy endogén neuromodulátor, amely az NMDA (N-metil-D-aszpartát) receptor nemkompetitív antagonistájaként csökkenti az excitotoxicitást az agyban és neuroprotektív hatással bír. Ezt számos központi idegrendszeri megbetegedés kezelésében ki lehetne használni, azonban a KYNA agyba való bejutását a vér–agy gát jelentősen korlátozza.²⁸⁵

Mindezeknek tükrében szükségesnek éreztük olyan EM-2, illetve KYNA analógok előállítását, amelyek megtartják biológiai aktivitásukat, azonban jobban átjutnak a vér–agy gáton.

Az általunk vizsgált három EM-2 analógról (**13. A ábra**) kollaborációs partnereink már korábban bebizonyították, hogy magas affinitással és szelektivitással kötődnek a μ-opioid receptorhoz, és jó ellenállóképességgel rendelkeznek proteázokkal szemben.²⁸⁶ Mivel mindhárom peptid zsíroldékonyabbnak bizonyult, mint az EM-2, feltételeztük, hogy vér–agy gáton való permeabilitásuk is jobb lesz. Ezt *in vitro* modellen igazoltuk, hiszen mindhárom peptid esetében egy közel kétszeres permeabilitási értéket mértünk az EM-2-höz viszonyítva (**13. B ábra**).





A: Az EM-2 és a három tesztelt analóg szerkezeti képlete. **B**: Az EM-2 és az analóg peptidek permeabilitása a vér–agy gát *in vitro* modelljén (RBEC–asztrocita kokuktúrában) 60 perc alatt. A tríciummal jelölt peptideket 0,01 μ M koncentrációban adagoltuk a felső kompartimentumba, amely 0,381-0,775 μ Ci/ml aktivitásnak felelt meg. N = 3, átlag ± standard hiba,*P < 0,05 (EM-2-höz viszonyítva, ANOVA és Bonferroni *post-hoc* teszt).

A KYNA aminoalkilált amid származékait az SZTE Gyógyszerkémiai Intézetében szintetizálták (**14. A ábra**), és vér–agy gáton való permeabilitásukat nemcsak a KYNA molekuláéhoz hasonlítottuk, hanem a xanturénsavéhoz is, amely a kinurenin metabolikus útvonal egyik terméke, illetve analógjának, a 39B-nek a permeabilitásához is (**14. B ábra**).









14. ábra. KYNA analógok átjutása a vér-agy gáton. A: A KYNA analógok szintézise és szerkezeti képlete. B: A KYNA, a Xant. ac. és a 39B szerkezeti képlete. C: A **KYNA** analógok permeabilitása a vér-agy gát in vitro modelljén (RBEC-pericitaasztrocita-kondicionált médium) SF-hez viszonyítva 60 perc után. Az analógokat 10 µM koncentrációban adagoltuk а felső kompartimentumba. N = 2, átlag ± szórás,*P < 0,05 (SZR-104 és SZR-105 esetében bármely másik analóghoz viszonyítva, ANOVA és Bonferroni post-hoc teszt). D: A KYNA analógok permeabilitása a vér-agy gát in vitro modelljén KYNA-hoz viszonyítva. N = átlag szórás, 3, ± **P < 0,01 (KYNA-hoz viszonyítva, ANOVA és Bonferroni post-hoc teszt). Xant. ac. = xanturénsav (xanturenic acid).

A hat KYNA analóg közül az SZR-104 és az SZR-105 rendelkezett a legnagyobb permeabilitással az *in vitro* modellen vizsgálva (**14. C ábra**). Ez a két molekula a C3 szénatomon morfolinometil csoporttal szubsztituált KYNA analóg. Az SZR-104 korábban neuroprotektív és gyulladáscsökkentő hatásúnak bizonyult,^{287,288} ezért ezt a molekulát vizsgáltuk tovább. Megállapítottuk, hogy magasabb permeabilitással rendelkezik a vér–agy gát *in vitro* modelljén úgy a KYNA-hoz, mint a xanturénsavhoz vagy a 39B-hez viszonyítva (**14. D ábra**). Ez utóbbi a C3 szénatomon morfolinometil csoporttal szubsztituált szubsztituált xanturénsav analóg, tehát szerkezetében hasonló az SZR-104-hez.

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

Ebben a fejezetben azokat a kísérleket foglalom össze, amelyek arra irányultak, hogy megértsük, hogyan vesznek részt a neurovaszkuláris egység sejtjei a gyulladásos reakciókban.

4.2.1 A PRR-ek agyi endotélsejtekben és pericitákban

A PRR-ek a veleszületett immunsejtek saját receptorai, azonban más sejtekben is gyakran jelen vannak. Az agyi sejtek közül a mikrogliasejtek, az asztrociták és a neuronok TLR és NLR készletéről számos adat állt rendelkezésre,^{98,132,142,289} azonban a vaszkuláris sejtekéről sokkal kevesebb. Munkacsoportunk korábban jellemezte az agyi endotélsejtek TLR expressziós mintázatát, és kimutattuk, hogy ezekben a sejtekben a TLR2, a TLR3, a TLR4 és a TLR6 van jelen konstitutívan.⁹⁹ Mivel az agyi endotélsejtek és periciták is részt vesznek gyulladásos és immunfolyamatokban, szerettük volna átfogóan megismerni ezen két sejttípus TLR és NLR expresszióját, illetve ezen receptorok szabályozását is. Ezért humán agyi endotélsejtekben és pericitákban PCR reakcióval vizsgáltuk meg 22 NLR, 9 egyéb inflammaszóma komponens és IL, valamint 10 TLR mRNS expresszióját.

A **15. ábra** azokat az mRNS-eket mutatja, amelyeket legalább az egyik sejttípusban detektáltuk alapállapotban. A NOD1, NOD2, NLRC5, NLRP1 és NLRX1, valamint a TLR4 magas szinten és hasonlóan expresszálódott agyi endotélsejtekben és pericitákban. Alacsonyabb expressziós szintet mutatott, de hasonló mennyiségben volt jelen a két sejttípusban az NLRP3. Az NLRP5, a kaszpázok, az ASC, valamint a TLR6 mennyisége az endotélsejtekben volt

kissé nagyobb, míg az NLRP9 és a TLR2 esetében ez a különbség még nyilvánvalóbb volt. Az IL mRNS-ek közül az IL1B és az IL33 a pericitákban, az IL18 és az IL37 az endotélsejtekben volt nagyobb mennyiségben jelen a másik sejttípushoz viszonyítva. NLRC4-et, NLRP12-t, NLRA-t, AIM2-t és TLR3-at csak az endotélsejtekben találtunk, a pericitákban nem, míg az NLRP2, a TLR5 és a TLR10 épp fordítva, csak a pericitákban jelent meg.



15. ábra. Az NLR-ek, inflammaszóma komponensek és TLR-ek expressziója agyi endotélsejtekben és pericitákban.

D3 humán agyi endotélsejtek és HBVP humán agyi periciták inflammaszóma komponenseinek, illetve NLR/TLR mintázatfelismerő receptorainak génexpressziója alapállapotban GAPDH-hoz viszonyítva. N = 3, átlag \pm standard hiba. A sötétszürke keretek az endotélsejtekben expresszálódó, de a pericitákban nem kimutatható mRNS-eket jelölik. Világosszürkével a pericitákban jelen levő, de az endotélsejtekben nem expresszálódó mRNS-eket kereteztük be, míg szaggatott vonallal a pericitákban alapállapotban nem expresszálódó, de indukálható géneket. CASP = kaszpáz (*caspase*).

Ezen gének expresszióját gyulladásos faktorok és az oxidatív stressz is befolyásolni képesek (**16. ábra**) olyannyira, hogy az NLRC4, az NLRA és a TLR9 is megjelenhet a pericitákban gyulladásos citokinek hatására.





Az ábrafelirat a következő oldalon található.

16. ábra. Az NLR-ek és inflammaszóma komponensek szabályozása agyi endotélsejtekben és pericitákban oxidatív stressz és gyulladásos mediátorok hatására.

(Az ábra az előző oldalon található.)

A: A D3 humán agyi endotélsejteket 600 μM H₂O₂ kezelésnek vetettük alá 30 percig, illetve TNF-α-t (10 ng/ml), IFN-γ-t (100 ng/ml) vagy IL-1β-t (10 ng/ml) adtunk hozzájuk 24 óráig. **B**: A D3 humán agyi endotélsejteket LPSsel (1 μg/ml) vagy MDP-vel (100 μg/ml) kezeltük 24 óráig, illetve 6 óra LPS kezelés után 18 óra MDP kezelésnek vetettük alá őket. **C**: A HBVP humán agyi pericitákat 600 μM H₂O₂ kezelésnek vetettük alá 60 percig, illetve TNFα-t (10 ng/ml), IFN-γ-t (100 ng/ml), IL-1β-t (10 ng/ml), LPS-t (1 μg/ml), MDP-t (100 μg/ml) vagy LPS-t és MDP-t adtunk hozzájuk 24 óráig. A hőtérképen ábrázolt génexpresszió-változást GAPDH-ra normáltuk és a kontrollhoz viszonyítottuk (N = 3). A piros szín az expresszió-fokozódást, a zöld a csökkenést jelzi. A bal felső inszertek az adatok normál eloszlását mutatják. CASP = kaszpáz (*caspase*).

Számos gén regulációja hasonló volt a két sejttípusban, például a NOD2 vagy az NLRP10 upregulációja IL-1 β vagy TNF- α hatására, vagy a NOD2 és IL1B szintjének emelkedése LPS és MDP jelenlétében. Ugyanakkor az NLRP9 esetében az oxidatív stressz kissé csökkentette, míg a gyulladásos citokinek kissé növelték az expressziót az endotélsejtekben, míg pericitákban épp ellenkezőleg, az oxidatív stressz emelte meg az expressziót, míg a gyulladásos jelek annak csökkenését okozták. Az NLRP9 sejtspecifikus regulációjának oka nem ismert, hiszen erről a fehérjéről azóta is kevés adat áll rendelkezésünkre.²⁹⁰

4.2.2 Az inflammaszómák aktivációja agyi endotélsejtekben és pericitákban

Az agyi endotélsejtekben és pericitákban tehát számos PRR van jelen, amelyek közül egyesek inflammaszómák kialakítására is képesek. Ezért megvizsgáltuk, hogy összeszerelődhetnek-e az inflammaszómák ezekben a sejtekben.

Eredményeink alapján az agyi endotélsejt tenyészetekben LPS vagy MDP kezelés, illetve LPS *priming*ot követő MDP aktiváció (LPS \rightarrow MDP) hatására megnőtt a pro-IL-1 β mennyisége a sejtekben, és fokozódott a szekretált aktív IL-1 β mennyisége a felülúszóban (**17. A ábra**).



17. ábra. Inflammaszóma-aktiváció agyi endotélsejtekben.

A: A pro-IL-1β expressziója D3 sejtlizátumban, illetve az aktív IL-1β fehérje mennyisége a tápfolyadékban 24 óra LPS vagy MDP, illetve 6 óra LPS-t követő 18 óra MDP kezelés után (WB). Az alsó két panelen bemutatott denzitometrálást N = 3 független kísérlet alapján β-aktinra normálva végeztük el és a kontrollhoz viszonyítottuk (átlag ± standard hiba, *P < 0,05 a kontrollhoz viszonyítva, ANOVA és Bonferroni *post-hoc* teszt). **B**: Az aktív IL-1β fehérje mennyisége a tápfolyadékban ELISA-val mérve. N = 3, átlag ± standard hiba, *P < 0,05 a kontrollhoz viszonyítva, 4NOVA és Bonferroni *post-hoc* teszt). **C**: A pro-IL-1β, klaudin-5 (clau-5) és okkludin (occl) expressziója D3 sejtlizátumban, illetve az aktív IL-1β fehérje mennyisége a tápfolyadékban kanonikus (24 óra LPS+MDP, LPS+ATP vagy LPS+nigericin kezelés), illetve nem-kanonikus (1 μg/ml LPS 24 óráig + az utolsó 6 órában 2 μg/ml LPS Lipofectamine 2000-rel együtt) inflammaszóma-aktiváció hatására. Az alsó panel a β-aktinra normált és a kontrollhoz viszonyított denzitometrálás eredményét mutatja be (N = 3, átlag ± standard hiba, *P < 0,05, **P < 0,01 a kontrollhoz viszonyítva, ANOVA és Bonferroni *post-hoc* teszt). Alkalmazott koncentrációk: 1 μg/ml LPS, 100 μg/ml MDP, 5 mM ATP, 10 μM nigericin.Lipof. = Lipofectamine. **D**: Reprezentatív IF képek kontroll és LPS+MDP-vel kezelt PBEC sejtekről. A nyilak a klaudin-5 (clau-5) szakadozottságát, a nyílhegyek az NLRP3 feldúsulását mutatják.

A legerősebb hatást az LPS-t követő MDP kezelés (LPS \rightarrow MDP) váltotta ki, amikor két különböző *priming* és aktivátor ágens hatott a sejtekre. A szekretált IL-1 β mennyisége viszonylag alacsony volt, de a kontrollhoz képest (0,48 pg/ml) az LPS \rightarrow MDP-kezelt sejtekben 10-szeresre emelkedett (4,82 pg/ml) (**17. B ábra**). Mivel a Z-VAD-FMK kaszpáz gátlószer teljes mértékben megakadályozta az LPS \rightarrow MDP által indukált aktív IL-1 β megjelenését a felülúszóban, nagy valószínűséggel kijelenthetjük, hogy inflammaszóma-aktiváció történt az agyi endotélsejtekben.

A *priming* és/vagy aktiváció jelenségét más gyulladásos mediátorokkal is ki tudtuk váltani, ugyanakkor a nem kanonikus útvonalat is aktiválni tudtuk ezekben a sejtekben úgy, hogy Lipofectamine 2000-rel LPS-t juttattunk a sejtekbe (LPS+LPS (Lipofectamine)) (**17. C ábra**). Az endotélsejtek úgy az apikális, mint a bazolaterális stimulusokra reagáltak, és mindkét irányba képesek voltak IL-1β-t szekretálni.

Azt is megfigyeltük, hogy az inflammaszóma-aktiváció hatására csökkent a sejtekben a szoros kapcsolatok fehérjéinek mennyisége, leginkább LPS+LPS (Lipofectamine) hatására (**17. C ábra**). Immunfluoreszcens vizsgálatokkal a junkciók szakadozottságát figyeltük meg LPS+MDP jelenlétében, illetve az NLRP3 megjelenését a sejtmagok körül (**17. D ábra**). Ezzel párhuzamosan az itt nem bemutatásra kerülő TEER vizsgálataink is azt igazolták, hogy inflammaszóma-aktivációt indukáló jelek hatására sérül a paracelluláris barrier.

Az agyi pericitákban nem tudtunk kimutatni kanonikus inflammaszóma-aktivációt (**18.** A ábra). A legerősebb *priming* hatást az IFN- γ +TNF- α kombinációval tudtuk elérni, azonban sem az MDP, sem az ATP (**18.** A ábra), sem a flagellin, sem az LPS nem indukálta az IL-1 β hasítását. Azonban amikor az IFN- γ +TNF- α *priming* mellett Lipofectamine 2000-rel LPS-t juttattunk a sejtekbe (IFN- γ +TNF- α +LPS (Lipofectamine)), 2 óra után jelentős mennyiségű aktív IL-1 β -t tudtunk kimutatni a sejtek felülúszójában (**18.** B ábra), amely 4 óránál már csökkenni kezdett. Ebben az időpontban 14,35 pg/ml volt az IL-1 β koncentrációja a tápfolyadékban, míg a kontrollban nem volt detektálható mennyiség.



18. ábra. Inflammaszóma-aktiváció agyi pericitákban.

A: A kanonikus inflammaszóma-aktiváció hiánya agyi pericitákban. HBVP sejteket kezeltünk IFN-γ (100 ng/ml), TNF-α (10 ng/ml) és MDP (100 µg/ml) vagy ATP (5 mM) kombinációjával. A pro-IL-1β-t a sejtlizátumban, az aktív formát a tápfolyadékban vizsgáltuk. Reprezentatív WB N = 3 független kísérletből. **B**: Nem-kanonikus inflammaszóma-aktiváció HBVP sejtekben Lipofectamine 2000-rel a citoplazmába juttatott LPS hatására. A pro-IL-1β-t a sejtlizátumban, az aktív formát a tápfolyadékban vizsgáltuk. Reprezentatív WB N = 3 független kísérletből. Lipof. = Lipofectamine. **C**: Nem-kanonikus inflammaszóma-aktiváció HBVP sejtekben OMV-k, illetve *E. coli* baktériumok hatására. i: Konfokális mikroszkópos kép a zölddel jelölt *E. coli* internalizációjáról HBVP sejtekben. A vízszintes és függőleges vonalak mentén készült z-irányú felvételek igazolják, hogy a baktériumok a sejtekben helyezkednek el. ii: Az *E. coli* baktériumok tápfolyadékából izolált OMV-k atomerő mikroszkópos deflekciós képe. A nyilak az OMV-ket jelölik a PBS kristályok között. iii: Az IL-1β felszabadulása az OMV-k és a baktériumok hatására. Az OMV-ket 0,3 mg/ml, 3 mg/ml, 30 mg/ml és 150 mg/ml fehérje koncentrációban adtuk a sejtekhez. Az *E. coli*-t 10⁷ CFU/lyuk sűrűségben adtuk a 6-lyukú lemezben tenyésztett HBVP sejtekhez. Minden reprezentatív WB N = 3 független kísérletből származik. CFU = telepképző egység (*colony forming unit*). Mindez azt jelenti, hogy ezekben a sejtekben az inflamaszómák csak nem kanonikus úton aktiválhatók. Az agyi periciták fagocitózisra képes sejtek,²⁹¹ így baktériumok vagy bakteriális vezikulák bekebelezésével vehetik fel az LPS-t, amely intracellulárisan beindíthatja a nem kanonikus inflammaszóma útvonalat. Igazoltuk, hogy a periciták képesek *E. coli* baktériumokat fagocitálni (**18. C/i ábra**). Ezután baktérium tenyészeteket, illetve az ezekből izolált OMV-ket (**18. C/ii ábra**) adtunk a pericitákhoz, és megvizsgáltuk az IL-1β szekréciót. Kísérleteink igazolták, hogy úgy a vezikulák, mint a baktériumok indukálják az inflammaszóma-aktivációt agyi pericitákban (**18. C/ii ábra**).

4.2.3 Az agyi endotélsejtek és periciták közötti inflammaszóma-függő kommunikáció

Az agyban a gyulladásos reakciókban résztvevő legfontosabb sejtek a mikrogliasejtek és az asztrociták; a vaszkuláris sejteknek, feltételezésünk szerint, inkább moduláló és közvetítő szerepe lehet ezekben a folyamatokban. Ezért megvizsgáltuk, hogy az inflammaszóma aktivációja az agyi endotélsejtekban vagy pericitákban indukál-e bármilyen változást a másik sejttípusban, azaz közvetítik-e egymásnak a gyulladásos jeleket ezek a sejtek.

Első lépésben a pericitákban indukáltunk inflammaszóma-aktivációt, majd a szekretált faktorokat tartalmazó felülúszóval (peri.-kond. IFN- γ +TNF- α +LPS (Lipofectamine)) az agyi endotélsejteket bazolaterális irányból kezeltük, a két sejttípus in vivo elhelyezkedésének megfelelően (19. A ábra). Kontrollként egy üres, pericitákat nem tartalmazó csészébe helyeztük az indukáló koktélt (IFN- γ +TNF- α +LPS (Lipofectamine)), majd ezt adtuk az endotélsejtek bazolaterális oldalához. Ahogy korábbi eredményeink alapján vártuk, a gyulladásos mediátorok önmagukban is megnövelték az IL1B mRNS mennyiségét az endotélsejtekben, azonban a gyulladásos mediátorokkal kezelt pericitákról származó tápfolyadék még nagyobb mértékű IL1B felszaporodást okozott az endotélsejtekben (19. B ábra). Ezzel párhuzamosan sérült az endoteliális barrier, hiszen csökkent a klaudin-5 és az okkludin mennyisége, legnagyobb mértékben a peri.-kond. IFN- γ +TNF- α +LPS (Lipofectamine) hatására (19. C ábra). Ezen eredmények igazolták azt a feltevést, hogy a periciták közvetítik az érzékelt gyulladásos jeleket az endotélsejteknek, illetve a szoros kapcsolatok megnyitásával valószínűleg a periféria felé is.



19. ábra. Az agyi endotélsejtek válasza a pericita inflammaszóma-aktivációra.

A: A kísérleti felállás sematikus ábrája. **B**: Az IL1B mRNS expressziója D3 agyi endotélsejtekben citokinek, illetve citokinekkel aktivált HBVP pericitákról származó kondicionált médium hatására. N = 3, átlag ± szórás, **P < 0,01 a kontrollhoz viszonyítva, ##P < 0,01 az IFN- γ +TNF- α koktéllal kezelt endotélsejtekhez viszonyítva, ‡‡P < 0,01 az IFN- γ +TNF- α +LPS (Lipof.) kezelést kapott endotélsejtekhez viszonyítva (ANOVA és Bonferroni *post-hoc* teszt). **C**: A szoros kapcsolatok fehérjéinek mennyiségének változása D3 agyi endotélsejtekben citokinek, illetve citokinekkel aktivált HBVP pericitákról származó kondicionált médium hatására. A grafikon N = 3 független kísérletből WB módszerrel kimutatott fehérjemennyiségek denzitometrálási adatait tartalmazza. Átlag ± szórás, *P < 0,05, **P < 0,01 a kontrollhoz viszonyítva (ANOVA és Bonferroni *post-hoc* teszt). Peri.-kond. kontroll = nem aktivált pericitákról származó kondicionált médiummal kezelt endotélsejtek. Peri.-kond. IFN- γ +TNF- α +LPS (Lipof.) = nem-kanonikus inflammaszóma-aktiváció után a pericitákról származó kondicionált médiummal kezelt endotélsejtek. Lipof. = Lipofectamine.

A fordított irányban történő jelátvitelt is megvizsgáltuk, azaz az endotélsejtekben aktiváltuk az inflammaszóma útvonalat, apikális irányból, majd a bazolaterális tápfolyadékot gyűjtöttük be (kond. IFN-γ+TNF-α+LPS) és helyeztük a pericitákra (**20. A ábra**).





20. ábra. Az agyi periciták válasza az endoteliális inflammaszóma-aktivációra.

A: A kísérleti felállás sematikus ábrája. **B**: Az NLRP3 fehérje expressziója HBVP agyi pericitákban citokinek, illetve citokinekkel aktivált D3 endotélsejtekről származó kondicionált médium hatására. Reprezentatív IF képek N = 2 független kísérletből. Kond. IFN-γ+TNF-α+LPS = IFN-γ+TNF-α+LPS koktéllal aktivált endotélsejtekről származó kondicionált médiummal kezelt periciták.

Kontrollként üres filtereket használtunk, amelyekre nem szélesztettünk endotélsejteket, és az apikális kompartimentumba helyeztük az aktiváló koktélt, majd a bazolaterális oldalról gyűjtöttünk tápfolyadékot a periciták számára (IFN-γ+TNF-α+LPS). A pericitákban az NLRP3 megjelenését követtük nyomon, és jelentős mértékű *upreguláció*t csak az aktivált endotélsejtekről begyűjtött médium hatására láttunk (**20. B ábra**). Igazoltuk tehát azt a hipotézisünket, miszerint az endotélsejtek az apikális irányból (tehát a perifériáról) jövő gyulladásos szignálok hatására aktiválják a pericitákat az agyban.

4.2.4 Inflammaszóma-aktiváció a neurovaszkuláris egység sejtjeiben patológiás körülmények között

Végül arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen szerepet játszanak a neurovaszkuláris egység sejtjeiben aktiválódó inflammaszómák különböző patológiás folyamatokban. Ehhez perifériás idegsérüléses modelleket használtunk, illetve agyi metasztázisokban is megvizsgáltuk az inflammaszómák szerepét – utóbbit a 4.3.5 fejezetben ismertetjük. Bár ezekben a modellekben nem elsősorban a vaszkuláris sejtekben jelentek meg az inflammaszómák, érdekes megállapításokat tettünk a neurovaszkuláris egység neuronális és gliális elemeinek gyulladásos folyamatokban betöltött szerepéről.

A perifériás idegek közül a III. és a XII. agyideget, valamint az ülőideget roncsoltuk enukleáció, illetve a *n. hypoglossus*, valamint a *n. ischiadicus* szintjén végzett axotómiával. Az említett agyidegek magjaiban az NLRP3 fehérje mennyiségének növekedését észleltük az idegsérülés hatására (**21. A ábra**). Az NLRP3 szintjének emelkedése azonban nem az ereket érintette és nem is a gliasejteket, hanem a mozgató idegsejteket.

Az inflammaszóma-aktivációt a *n. hypoglossus*-ban vizsgáltuk először, amelyet az IL-1β aktív formájának felszaporodása igazolt (**21. B ábra**).

A *n. ischiadicus* sérülése után az IL1B mRNS már egy nap után megjelent a motoneuronokban a sérülés oldalán (**22. A ábra**). Az NLRP3 fehérje is korán *upregulálódott* ezekben a sejtekben, majd expressziója tovább fokozódott 3, illetve 7 nap elteltétvel (**22. B ábra**). A ChAT (kolinacetil-transzferáz, *choline acetyltransferase*) fehérjével való kolokalizációja arra utalt, hogy az NLRP3 itt is a motoneuronokban szaporodott fel, ráadásul ugyanazokban a sejtekben, amelyekben az ASC adapter fehérje is megjelent (**22. C ábra**). Ez az inflammaszóma összeszerelődéséhez volt szükséges, amelynek eredményeként az IL-1β aktív formává hasítódott (**22. D ábra**). Ezt a folyamatot nemcsak az NLRP3 inflammaszóma specifikus inhibitorával, az MCC950-nel,²⁹² hanem 5-BDBD-vel is gátolni tudtuk, amely a P2X4 purinerg receptor antagonistája. Ez ATP-függő folyamatokra utalt, az ATP pedig a traumás sérülés következtében juthatott ki az extracelluláris térbe.



21. ábra. Centrális inflammaszóma-aktiváció perifériás idegsérülést követően.

A: Az NLRP3 fehérje mennyiségének fokozódása a III. és a XII. agyidegi mag neuronjaiban a megfelelő ideg átvágásának hatására 4 nappal a műtét után. Reprezentatív IHC képek N \geq 3 kísérletből. Az agyidegi magok határát a metszeteken szaggatott vonal jelzi. **B**: Az IL-1 β fehérje expressziójának változása axotómia hatására a XII. agyideg magjában. Reprezentatív WB-ok és β -aktinra normált denzitometriás adatok N = 3 független kísérletből, 4 nappal az idegsérülés után. Átlag ± szórás, *P < 0,05, ***P < 0,005 a kontrollhoz viszonyítva (ANOVA és Fisher LSD *post-hoc* teszt).

Azt is igazoltuk, hogy a neuronokban aktiválódó inflammaszómák hozzájárulnak a mikrogliózis kialakulásához. Későbbi időpontokban az inflammaszóma komponensek a mikrogliasejtekben is megjelentek, ám inflammaszóma-aktivációra utaló jeleket ezekben a sejtekben nem találtunk.



22. ábra. Axotómia-indukálta inflammaszóma-aktiváció gerincvelői motoneuronokban.

A: Az IL1B mRNS detektálása gerincvelői motoneuronokban a *n. ischiadicus* átvágása után. Reprezentatív ISH képek 1 nappal az axotómia után. Az IL1B-t a fekete precipitátumok jelzik, kék = hematoxilin festés. A jobboldali kép a középső kép inszertjének nagyítása. A szaggatott vonalak a mellső szarv határát, a nyilak az erősen IL1B-pozitív idegsejteket jelölik. **B**: Reprezentatív NLRP3 IF képek 1, 3 és 7 nappal az axotómia után a gerincvelő lumbáris régiójában. A szaggatott vonalak a fehérállomány és a mellső szarvi szürkeállomány határát jelölik. N = 3. **C**: Reprezentatív IF képek 3 nappal az axotómia után a lumbáris régió mellső szarvában. N = 3. A nyilak az NLRP3 és az ASC kolokalizációját jelölik a motoneuronokban. **D**: Reprezentatív WB a gerincvelő lumbáris szakaszából a *n. ischiadicus* átvágása után 3 nappal, hordozóanyaggal (DMSO kontroll), illetve naponta 5 mg/kg 5-BDBD-vel vagy 10 mg/kg MCC950-nel kezelt állatokban. Az oszlopdiagram a denzitometrálás adatait mutatja be (β-aktinra normálva, kontroll oldalhoz viszonyítva). N = 3, átlag ± standard hiba, **P < 0,01 a kontroll oldalhoz viszonyítva, #P < 0,05, ##P < 0,01 az ax. DMSO kontrollhoz viszonyítva (ANOVA és Bonferroni *post-hoc* teszt). Ax. = axotómia.



В



23. ábra. Az axotómia-indukálta inflammaszóma-aktiváció funkcionális következményei.

A: Az SFI időbeni változása a *n. ischiadicus* átvágása és az azt követő koaptáció után. N = 5, átlag ± standard hiba, *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,005 a hordozóanyaggal kezelt állathoz (koapt. DMSO kontroll) viszonyítva az adott időpontban.

(Az ábrafelirat a következő oldalon folytatódik.)

23. ábra. (folytatás az előző oldalról) **B**: A *n. ischiadicus* regenerációja MCC950 kezelés, illetve az IL-1β intratekális neutralizációjának hatására 5 nappal a koaptáció után. A kezeléseket az állatok az első három napban kapták. Reprezentatív IF képek N = 3-4 állatból. A szaggatott vonal a koaptációs zónát jelöli. p75 = p75 neurotrofin receptor (Schwann-sejt marker), NEFM = neurofilamentum köztes lánc fehérje (*neurofilament medium chain*; axonális marker). Koapt. = axotómia + koaptáció.

Felmerült a kérdés, hogy milyen funkcionális következménnyel jár a perifériás idegsérülést követő motoneuronális inflammaszóma-aktiváció. Ehhez az idegátvágást követően összevarrtuk az ülőideg csonkjait, majd az állatokat inflammaszóma, illetve P2X4 gátlószerrel kezeltük. Az SFI, amely az ideg funkcionális regenerációját mutatja, szignifikánsan meredekebben emelkedett az MCC950-nel, valamint az 5-BDBD-vel kezelt állatokban, mint a megfelelő kontrollokban (**23. A ábra**). Ez azt jelenti, hogy az inflammaszóma-aktiváció gátolja a regenerációt. Ezt igazolta a koaptációs zónába benövő axonok jelentősen magasabb száma az inflammaszóma gátlószerrel kezelt állatokban, illetve az IL-1β intratekális neutralizációja után (**23. B ábra**).

Az MCC950, mivel szisztémásan adagoltuk, úgy a periférián – például a sérült idegben –, mint centrálisan gátolni tudta az NLRP3 inflammaszóma-aktivációt. Az IL-1β neutralizáló ellenanyagok intratekális adminisztrációja azonban csak lokálisan, a gerincvelőben fejtette ki hatását, így bebizonyítottuk, hogy a központi idegrendszeri inflammaszóma gátlás az, amely elősegíti az axonok regenerációját. Mivel a kezeléseket csak az első három napon kapták az egerek, amikor csak a motoneuronokban láttunk NLRP3 jelet, az is nagy valószínűséggel kijelenthető, hogy a motoneuronális inflammaszóma gátlás játszott szerepet az idegregeneráció javulásában.

Összességében tehát megállapítottuk, hogy perifériás idegsérülések során aktiválódik az NLRP3 inflammaszóma az érintett mozgató idegsejtekben, amely gátolja az ideg regenerációját. Így az inflammaszóma gátlószereknek, amelyeknek fejlesztése nagy erőkkel folyik,²⁹³ fontos szerep juthat nemcsak központi idegrendszeri vagy szisztémás gyulladásos betegségek kezelésében, hanem perifériás idegrendszeri patológiákban is.

4.3 Az agyi áttétes tumorok kialakulásának mechanizmusai

Munkám legnagyobb része az agyi metasztázisok kialakulásának megértésére irányult. Megvizsgáltuk, hogy a daganatsejtek hogyan jutnak át a vér–agy gáton, illetve azt, hogy hogyan képesek túléni az agyi környezetben. Elsősorban azok a mechanizmusok érdekeltek bennünket, amelyek a neurovaszkuláris egység sejtjeihez kötődnek. Ezért feltérképeztük, hogy milyen változásokon megy át az agyi endotélium a tumorsejtek elakadásától az érfalon való átjutásig. Miután felmértük a transzmigrációban szerepet játszó legfontosabb jelátviteli útvonalakat, a metasztatikus sejtek és a periciták, illetve az asztrociták közötti kölcsönhatásokat tanulmányoztuk.

4.3.1 A metasztatikus sejtek elakadása az agyi erekben és átvándorlása a vér– agy gáton

A metasztázisok képződésének agyi sajátosságaként a kiserekben elakadó tumorsejtek napokig a lumenben maradnak anélkül, hogy átvándorolnának az érfalon.¹⁷¹ A mi emlőkarcinóma agyi metasztázis egérmodellünkben is azt tapasztaltuk, hogy maga az átvándorlás rendszerint a tumorsejtek keringésbe jutása utáni 4. nap környékén következik be a legnagyobb valószínűséggel. Kísérleteinkkel először arra a kérdésre kerestük a választ, hogy mi történik ez alatt a négy nap alatt az agyi erekkel, amíg a tumorsejtek az agyi erek lumenében tartózkodnak.

Megfigyeltük, hogy a kapillárisfalon való transzmigráció előtt és alatt az endotélsejtek izolálták az emlőkarcinóma-sejteket a keringő vértől. Ezt egyrészt érösszehúzódással, másrészt endoteliális dugók kialakításával érték el (**24. A, B ábra**). A lumen obstruálása leggyakrabban a tumorsejt mindkét oldalán bekövetkezett úgy, hogy az endotéldugók teljes elzáródást okoztak az esetek 61%-ában, 24%-ban láttunk részleges elzárást, 9%-ban figyeltünk meg vazokonstrikciót, míg csupán 6%-ot tett ki az átjárható erek aránya a metasztatikus sejtek közelében. Feltételezésünk szerint az ilyen jellegű izolálás hozzájárulhat a metasztatikus sejtek védelméhez az immunsejtekkel, valamint a nyíróerőkkel szemben, amelyek a keringő tumorsejtek pusztulását okozhatnák.¹⁷⁸

Az endotéldugókat a kapillárisok falát bélelő endotélsejtek sejtmagjai alakították ki (**24. C** ábra), amelyek minden irányban elzárhatták a lument az elágazódásokban levő tumorsejtek körül (**24. D ábra**). Felmerült bennünk, hogy a dugók az endotélsejtek szaporodásával alakulnak ki, azonban EdU festéssel nem láttunk endoteliális proliferációt a tumorsejtek közelében, míg maguk a daganatsejtek akár az erek lumenében is osztódtak (**24. E ábra**).
Tehát az endotélsejtek sejtmagjai nem proliferáció, hanem endoteliális átrendeződés révén türemkedtek be az érbe.



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

FVB/Ant:TgCAGyfp_sb #27 egerekbe tdTomato-4T1 emlőkarcinóma-sejteket injektáltunk, majd 3-4 nap után kétfoton-, illetve konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk a tumorsejt–endotélsejt interakciókat az agyban. Zöld/zöldessárga = endotélsejtek, piros = tumorsejtek, kék = sejtmagok (Hoechst jelölés). A nyilak az endotéldugót, a szaggatott nyilak az érösszehúzódást, a nyílhegyek az átvándorló tumorsejtet jelölik. A: Reprezentatív kétfoton-mikroszkópos felvétel (*z*-projekció). B: Reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek (*z*-projekció, illetve egy optikai szelet). C: Konfokális mikroszkópos felvételek (*z*-projekciók) annak bizonyítására, hogy az endotéldugókat az endotélsejtek magjai alakítják ki. D: Reprezentatív konfokális mikroszkópos felvétele (*z*-projekció) több irányban megjelenő endotéldugókról. Clau-5 = klaudin-5. E: A szaporodó sejtek EdU jelölése (konfokális mikroszkópos *z*-projekció). A kettős nyílhegy a lumenben található, EdU-pozitív tumorsejtet mutatja, míg a tripla nyílhegy egy bazolaterális endoteliális membránhólyagot.

Azt is megfigyeltük, hogy a lumenben elakadt tumorsejtekkel kapcsolatba kerülő endotélsejteken bazolaterális hólyagok kezdtek megjelenni (**24. E ábra**), amelyek klaudin-5pozitívak voltak (**25. A ábra**). Az endoteliális hólyagok száma gyakran jelentősen megnőtt az átvándorlás alatt (**25. B ábra**), akár teljes endoteliális reorganizációt okozva (**25. C ábra**). A tumorsejtek átvándorlása után azonban, a kapillárishálózat szerkezete rövid idő alatt visszarendeződött (**25. C ábra**), míg endotélsejt-pusztulást csak nagyon ritkán tapasztaltunk. Az, hogy milyen jelentősége van a nem-apoptotikus endoteliális hólyagosodásnak a daganatos transzmigrációban, jelenleg nem ismert.





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

FVB/Ant:TgCAGyfp_sb #27 egerekbe tdTomato-4T1 emlőkarcinóma-sejteket injektáltunk, majd 3-4 nap után kétfoton-, illetve konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk a tumorsejt—endotélsejt interakciókat az agyban. Zöld/zöldessárga = endotélsejtek, piros = tumorsejtek, kék = sejtmagok (Hoechst jelölés). A nyilak az endoteliális hólyagokat, a szaggatott nyíl az átvándorló, a nyílhegy az átvándorolt tumorsejtet jelöli. **A**: Reprezentatív konfokális mikroszkópos felvétel (*z*-projekció) a klaudin-5-pozitív hólyagokról. Clau-5 = klaudin-5. **B**: Reprezentatív kétfoton-mikroszkópos felvétel (*z*-projekció) az endoteliális hólyagosodásról az átvándorló tumorsejt közelében. **C**: Kétfoton-mikroszkópos felvétel egy átvándorló tumorsejt körüli intenzív endoteliális hólyagosodásról, amely szinte teljesen megszűnt a transzmigráció befejezése után. A számok az azonos ereket jelölik a két képen.

Azt is észrevettük, hogy az elakadt tumorsejtek körül többszörös lumennel rendelkező erek alakultak ki az átvándorlás előtt (26. A ábra), valószínűleg a véráramlás biztosítása érdekében. Maga a transzmigráció – az in vivo modellben végzett megfigyeléseink alapján – egy szűk póruson keresztül (26. A ábra), máskor szélesebb nyíláson át valósult meg (24. B ábra, 26. B ábra). Ami az átjutási útvonalat illeti, szerettük volna tisztázni, hogy a paracelluláris átvándorlás mellett a transzcelluláris transzmigráció is szerepet játszik-e a tumorsejtek vér–agy gáton való diapedézisében. Ezekhez а kísérletekhez összehasonlításképpen melanómasejteket is használtunk, amelyekről korábban leírtuk, hogy képesek károsítani a szoros kapcsolatokat és így paracellulárisan átvándorolni az agyi endotélsejtek rétegén.²⁹⁴ In vitro modellben azt figyeltük meg, hogy az emlőkarcinómasejtek nem szakították fel az agyi endotélsejtek szoros kapcsolatait, míg a melanómasejtek – korábbi eredményeinkkel összhangban – nagy területeken károsították azokat (26. C ábra). Ez arra utalt, hogy az emlőkarcinóma-sejtek a melanómasejtekhez viszonyítva kevésbé hatékonyan nyitják meg a paracelluláris útvonalat.

A transzcelluláris migrációs útvonal lehetőségét nagy felbontású, elektronmikroszkópos felvételeken vizsgáltuk tovább. Technikai okokból ezt is in vitro modellben tudtuk megvalósítani. Eredményeink alapján az emlőkarcinómasejtek képesek voltak az agyi endotélsejtek közé beékelődni (26. D ábra), azonban nemcsak a paracelluláris útvonalat használták az átvándorláshoz, hanem az endotélsejtek citoplazmáján keresztüli transzcelluláris útvonalat, amelynek során épek maradtak a szoros kapcsolatok (26. E ábra). Melanómasejtek esetében nem láttunk transzcelluláris átvándorlást, a tumorsejtek mindig két endotélsejt közé interkalálódtak, és a szoros kapcsolatok károsításával paracellulárisan vándoroltak át (**26. F, G ábra**). Ennek megfelelően az agyi endotélsejtek sejtindexét – amely a sejtek impedanciájának mérőszáma, és amelyet nagyban meghatároz a szoros kapcsolatok által biztosított ellenállás – a melanómasejtek szignifikánsan csökkentették, míg a különböző emlőkarcinóma-sejtek nem (26. H ábra). Emlőkarcinóma-sejtek esetében állatmodellben is láttunk transzcelluláris transzmigrációra utaló jeleket, azaz az átvándorló sejt körül épen maradtak a junkciók (26. B ábra). Összességében tehát elsőként igazoltuk, hogy az emlőkarcinóma-sejtek képesek átjutni a vér-agy gáton a transzcelluláris útvonalat használva.



26. ábra. A tumorsejtek paracelluláris és transzcelluláris átvándorlása az agyi endotéliumon.

A: FVB/Ant:TgCAGyfp_sb #27 egerekbe tdTomato-4T1 emlőkarcinóma-sejteket injektáltunk, majd 4 nap után kétfoton-mikroszkópiával vizsgáltuk a tumorsejtek átvándorlását. A képek két optikai szeletet ábrázolnak ugyanabból a régióból. Zöld/zöldessárga = endotélsejtek, piros = tumorsejtek. A nyíl az átvándorlási pórust jelöli. A nyílhegyek a többcsatornás kapillárist mutatják. **B**: Reprezentatív konfokális mikroszkópos felvétel (*z*-projekció) egy tdTomato-4T1 emlőkarcinóma-sejtekkel beoltott állatból származó agyszeletről, amely az átvándorló tumorsejt közelében az intakt klaudin-5 jelet mutatja. A nyíl az átvándorlás helyét mutatja, a nyílhegy egy endoteliális hólyagot jelöl. **C**: Konfluens RBEC sejtrétegre *Cell tracker red*del jelölt emlőkarcinóma (MDA-MB-231), illetve melanóma (A2058) sejteket helyeztünk, majd 5 óra után a tenyészeteket fixáltuk. A nyilak a klaudin-5 jel hiányát mutatják. **D**: MDA-MB-231 sejteket szélesztettünk konfluens RBEC sejtrétegre, majd 8 óra után fixáltuk a tenyészeteket. Reprezentatív TEM felvétel egy emlőkarcinóma-sejtről, amely két endotélsejt közé interkalálódik. A nyíl a szoros kapcsolatokat mutatja, a nyílhegy egy endoteliális membránprotrúzióra mutat. **E**: MDA-MB-231 sejteket szélesztettünk konfluens RBEC sejtrétegre, majd 8 óra után fixáltuk a tenyészeteket. Sorozatmetszetből származó TEM felvételek egy transzcellulárisan átvándorló emlőkarcinóma-sejtről. A nyilak a szoros kapcsolatokat jelölik.

(Az ábrafelirat a következő oldalon folytatódik.)

26. ábra. (folytatás az előző oldalról) F: Reprezentatív TEM kép egy paracellulárisan átvándorló B16/F10 melanómasejtről 8 órával a konfluens RBEC sejtekre való szélesztés után. A nyíl a két endotélsejt közötti határt, míg a nyílhegy egy endoteliális membránprotrúziót jelöl. G: RBEC endotélsejtek közé interkalálódott B16/F10 melanómasejt. Reprezentatív TEM kép 8 órával a tumorsejteknek a konfluens RBEC sejtekre való kirakása után.
H: Az RBEC sejtindex időbeni változása különböző tumorsejtek hatására. 0 időpont = a tumorsejtek ráhelyezése az endotélrétegre. Átlag ± standard hiba, **P < 0,01 a kontrollhoz viszonyítva az egyes időpontokban (ANOVA és Bonferroni *post-hoc* teszt). Endot = endotélsejt, tu = tumorsejt, clau-5 = klaudin-5.

4.3.2 Jelátviteli folyamatok a daganatos sejtek vér–agy gáton való transzmigrációja során

A transzendoteliális migrációban szerepet játszó jelátviteli utakat szintén *in vitro* modellekben tudtuk tanulmányozni úgy melanómasejtek, mint emlőkarcinóma-sejtek esetén. Kísérleteinkben a Rho/ROCK és Rac, valamint a PI3K szignalizáció szerepére fókuszáltunk. Az előbbiekre a citoszkeleton, és ezáltal a sejtek mozgásának szabályozása miatt.^{295,296} A Rho GTP-ázok a tumorsejtek vándorlását is meghatározzák: a magas Rac és alacsony Rho aktivitás a mezenchimális, proteolitikus mozgásra jellemző, míg alacsony Rac aktivitás mellett a Rho/ROCK útvonal a tumorsejtek amőboid típusú morfológiájának és háromdimenziós haladásának a szabályozója.²⁹⁷ A PI3K/Akt/mTOR jelátvitel pedig azért került az érdeklődésünk középpontjába, mert a daganatellenes terápia egyik legfontosabb célpontja,²⁹⁸ másrészt a Rac szabályozója.²⁹⁹

Az átvándorlás előtt a tumorsejteknek le kell tapadniuk az endotélrétegre, így elsőként ezt a lépést vizsgáltuk meg. A ROCK gátlószerek, az Y27632 és a *fasudil*, jelentősen megnövelték az endotélrétegre letapadt melanómasejtek számát, elsősorban a lapos, mezenchimális morfológiájúakét (**27. A ábra**). Az EHT1864 Rac inhibitor nem szignifikánsan csökkentette az agyi endotésejtekre tapadó melanómasejtek számát, míg mindkét útvonal gátlása esetén a ROCK gátlószerek hatása érvényesült jobban (**27. A ábra**). Az Y27632 jelentősen megnövelte az adhéziós erőt is a melanómasejtek és az agyi endotélsejtek között, amit AFM-mel tudtunk mérni (**27. B ábra**). Az LY294002 PI3K gátlószer ugyanakkor jelentősen csökkentette az endotélrétegre letapadó melanómasejtek számát (**27. C ábra**). Emlőkarcinóma-sejtek esetén a ROCK gátlószerek nem növelték az adhéziót, azonban a Rac inhibitor szignifikánsan csökkentette az endotélrétegre letapadó melanómasejtek számát (**27. C ábra**).



27. ábra. A Rho/ROCK, Rac és PI3K útvonalak szerepe a tumorsejtek agyi endotélsejtekhez való letapadásában.

A: OG-jelölt A2058 melanómasejteket adtunk konfluens D3 tenyészetekhez ROCK (Y27632, fasudil) vagy Rac inhibitor (EHT1864), illetve ezek kombinációjának jelenlétében, majd 90 perc után eltávolítottuk az úszó sejteket. A letapadt kerek és lapos melanómasejteket fluoreszcens mikroszkópban számoltuk meg, és a kezeletlen (kontroll) mintához viszonyítottuk. N = 3, átlag ± szórás, *P <0,05 a kontrollhoz viszonyítva, #P < 0,05 az Y27632-vel kezelt sejtekhez viszonyítva, †P < 0,05 a fasudillal kezelt mintákhoz képest (a lapos és kerek sejteket összesítve; ANOVA és Bonferroni post-hoc teszt). B: A funkcionalizált AFM konzolon levő OG-jelölt A2058 melanóma sejtet konfluens D3 sejtkultúrához közelítettük, majd nyomon követtük az adhéziós erőt. A t = 0 időpontban a tenyészeteken médiumot cseréltünk kontroll, illetve Y27632-t tartalmazó médiumra. N = 5, átlag ± szórás C: OG-jelölt A2058 sejteket adtunk konfluens D3 tenyészetekhez PI3K inhibitor (LY294002) jelenlétében, majd 90 perc után megszámoltuk a letapadt melanómasejteket. N = 3, átlag ± szórás, *P < 0,05 a kontrollhoz viszonyítva (a lapos és kerek sejteket összesítve; Student t-teszt). D: Az OG-jelölt MDA-MB-231 emlőkarcinóma-sejteket konfluens D3 tenyészetekre szélesztettük ROCK (Y27632, fasudil), Rac (EHT1864) vagy PI3K inhibitor (LY294002) jelenlétében, majd 90 perc után eltávolítottuk az úszó sejteket. Az ábra az endotélsejtekre tapadt tumorsejteket mutatja be. N = 3, átlag \pm szórás, **P < 0,01 a kontrollhoz viszonyítva, ##P < 0,01 az Y27632-vel kezelt sejtekhez viszonyítva, ++P < 0,01 a fasudillal kezelt mintákhoz képest (a lapos és kerek sejteket összesítve; ANOVA és Bonferroni post-hoc teszt). A tumorsejteket 2,5 × 10⁴ sejt/cm² sűrűségben helyeztük a 24-lyukú lemezen tenyésztett konfluens endotélrétegre (A, C, D). Alkalmazott koncentrációk: 10 μM Y27632, 10 μM *fasudil*, 20 μM EHT1864, 25 μM LY294002.



28. ábra. A Rho/ROCK, Rac és PI3K útvonalak szerepe a tumorsejtek agyi endotélsejteken való átvándorlásában.

A: OG-jelölt A2058 melanómasejteket adtunk a 8 µm pórusméretű membránokon tenyésztett konfluens RBEC tenyészetekhez Y27632 jelenlétében. 5 óra után a sejteket eltávolítottuk a membrán felszínéről, és megszámoltuk az endotélrétegen és a membrán pórusain átvándorolt tumorsejteket. N = 5, átlag ± szórás, **P < 0,01 a kontrollhoz viszonyítva (Student *t*-teszt). **B**: OG-jelölt A2058 melanómasejteket adtunk a 8 µm pórusméretű membránokon tenyésztett konfluens RBEC tenyészetekhez LY294002 jelenlétében. 5 óra után a sejteket eltávolítottuk a membrán felszínéről, és megszámoltuk az endotélrétegen és a membrán felszínéről, és megszámoltuk az endotélrétegen és a membrán felszínéről, és megszámoltuk az endotélrétegen és a membrán pórusain átvándorolt tumorsejteket. N = 2, átlag ± szórás, **P < 0,01 a kontrollhoz viszonyítva (Student *t*-teszt).

(Az ábrafelirat a következő oldalon folytatódik.)

28. ábra. (folytatás az előző oldalról) **C-F**: A tumorsejteket (A2058 melanóma, illetve MDA-MB-231 emlőkarcinóma) 12-lyukú lemezben tenyésztett D3 agyi endotélsejtekre szélesztettük EHT1864 vagy LY294002 jelenlétében, majd 5 percenként fáziskontraszt felvételt készítettünk róluk 6 órán keresztül. Az átvándorló sejteket megszámoltuk, és a kontroll függvényében ábrázoltuk. N = 3, átlag ± szórás, **P < 0,01 a kontrollhoz viszonyítva (Student *t*-teszt). A tumorsejteket 10⁵ sejt/cm² sűrűségben helyeztük a membránokon tenyésztett sejtekre (**A**, **B**), illetve 5 × 10³ sejt/cm² sűrűségben a lemezen tenyésztett endotélrétegre (**C-F**). Alkalmazott koncentrációk: 10 µM Y27632, 10 µM fasudil, 20 µM EHT1864, 25 µM LY294002.

Az adhéziós lépéshez hasonlóan alakult a transzendoteliális migráció is. A ROCK gátlószerek jelentősen megnövelték az agyi endotélrétegen átvándorló melanómasejtek számát (**28. A, B ábra**). Az Y27632 *in vivo* is szignifikánsan növelte az agyi parenchimában kialakuló melanóma metasztatikus lézók számát. Ezzel ellentétben a Rac, valamint a PI3K inhibitor jelenléte gátolta az átvándorlást úgy melanómasejtek, mint emlőkarcinóma-sejtek esetén (**28. C-F ábra**).

Ugyan a jelen dolgozatban nem mutatom be, de azt is igazoltuk, hogy a tumorsejtendotélsejt interakcióban elsősorban a daganatsejtekben, és nem az endotélsejtekben aktiválódó Rho/ROCK jelátviteli útnak lehet szerepe. Indirekt bizonyítékként szolgált erre az a tény, hogy a ROCK inhibitorok úgy segítették a tumorsejtek átvándorlását, hogy közben a TEER-t emelték, tehát szorosabbá tették a gátat, míg a Rac gátlószer, amely gátolta az átvándorlást, csökkentette az endotélsejtek impedanciáját. Közvetlen bizonyítékot pedig az irreverzibilis CT04 Rho gátlószer segítségével nyertünk, amellyel igazoltuk, hogy a melanómasejtek előkezelése elősegítette transzendoteliális migrációjukat, míg az endotélsejtek előkezelése nem volt hatással a folyamatra.

Számos más jelátviteli út játszhat még szerepet a tumorsejtek vér–agy gáton való átjutásában, amelyek közül mi a CB2 és az integrin szignalizációval foglalkoztunk.

Megállapítottuk, hogy a CB2 aktivációja – a tumorsejteken és az endotélsejteken is hatva – gátolta a melanómasejtek átvándorlását az agyi endotélsejteken. Mivel nincs pszichoaktív hatásuk, a CB2 agonisták és ligandok potenciális terápiás szereknek számítanak számos neuropszichiátriai kórképben.³⁰⁰ Lehetséges antimetasztatikus hatásuk a későbbiekben bővítheti a javallatok sorát.

Egy másik kísérletsorozatban azt igazoltuk, hogy az emlőkarcinóma-sejtekben expresszálódó NPNT (nefronektin, *nephronectin*) elősegítette a tumorsejtek átjutását a vér–agy gáton, de csak abban az esetben, ha integrinkötő régiói intaktak volt. Az NPNT egy ECM fehérje, amely az embrionális fejlődésben játszik fontos szerepet, ugyanakkor a daganatos progesszióban, elsősorban a metasztázisok kialakulásában is részt vesz.³⁰¹ Az NPNT integrinkötő motívumai kulcsfontosságúak a tumorsejtek túlélésének és metasztatikus képességének biztosításában, így az NPNT új terápiás célpont lehet az integrin szignalizáció gátlására.

4.3.3 A periciták szerepe az agyi metasztatikus környezetben

A vér–agy gáton való átvándorlás után az agyi parenchimába kerülő mellráksejtek az erek körül kezdenek el szaporodni, bekebelezve azokat. *In vivo* modellünkben azt figyeltük meg, hogy ezek a sejtek nemcsak az endotélrétegen vándoroltak át, hanem az asztrocita végtalpakon is, amelyeket az AQP4 megjelölésével tettünk láthatóvá. A tumorsejtek osztódásával az asztrociták egyre inkább visszahúzták végtalpaikat az erek közeléből a növekvő tumor felszínére. Így kisebb tumorok esetében egyszerre láttunk ér-asszociált AQP4 jelet, a tumorsejtek és az endotélsejtek között, és olyan régiókat, ahol az erek felszínén nem volt AQP4-pozitív asztrocita végtalp, csak a tumor külső szélén (**29. A ábra**).

Nagyobb metasztatikus léziókban az asztrociták teljesen kiszorultak a tumormasszából (**29. B ábra**).

Az asztrocitákkal ellentétben a periciták a bekebelezett erek felszínén maradtak, és a tumor az endotélsejtekkel együtt kooptálta őket (**29. C ábra**). Nemcsak egérmodellben láttuk ezt a jelenséget, hanem humán emlőkarcinóma agyi áttétekben is, ahol a periciták az erek mentén, a sztrómában voltak megfigyelhetők (**29. D ábra**). A nekrotikus zónák közelében pedig egyesével álló pericitaszerű sejteket láttunk, amelyek nem kapcsolódtak az erekhez, de pericita markereket expresszáltak (**29. E ábra**). Ezeknek sem eredete, sem funkciója nem ismert.



29. ábra. Az asztrociták és a periciták elhelyezkedése agyi emlőkarcinóma metasztázisokban.

A: FVB/Ant:TgCAGyfp_sb #27 egerekbe tdTomato-4T1 emlőkarcinóma-sejteket injektáltunk, majd 10 nap után konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk a metasztatikus léziókat az agyban. Zöld/zöldessárga = endotélsejtek, piros = tumorsejtek. Az AQP4 jelet a tumorban, a bekebelezett éren nyíllal jelöltük. Szaggatott nyíl jelzi az AQP4 hiányát a bekebelezett ér felszínéről. A nyílhegy a tumor külső felszínén megjelenő AQP4-et mutatja. **B**: BALB/c egerekbe EmGFP-4T1 emlőkarcinóma-sejteket injektáltunk, majd 10 nap után a koponyaablakon keresztül adagolt SR101-gyel jelöltük az asztrocitákat, és kétfoton-mikroszkóban vizsgáltuk az agyi metasztatikus léziókat. **C**: FVB/Ant:TgCAGyfp_sb #27 egerekbe tdTomato-4T1 emlőkarcinóma-sejteket injektáltunk, majd 11 nap után konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk a metasztatikus léziókat az agyban. Piros = tumorsejtek. A nyilak a bekebelezett pericitákat jelölik. **D**: Humán tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázis konfokális képe PDGFRβ/CD13-pozitív pericitaszerű sejtekkel a tumorsejtek között. A nyilak a pericitaszerű sejteket jelölik. A PDGFRβ/CD13-negatív sejtek a tumorsejtek. Kék = sejtmagok (Hoechst jelölés).

Ahhoz, hogy megértsük a pericta-tumorsejt interakciókat, először *in vitro* modellekben vizsgáltuk meg, hogy hogyan hatnak egymásra ezek a sejtek. Amikor a pericitákra emlőkarcinóma-sejteket szélesztettünk, a tumorsejtek előszeretettel tapadtak rá a pericitákra, elkerülve a szabad, pericitamentes felszíneket (**30. A ábra**). Ezzel ellentétben, ha endotélsejtekre helyeztük a tumorsejteket, azok az endotélsejtek közötti szabad felszínekre tapadtak le elsősorban, míg asztrocitákra helyezve őket, nem mutattak ilyen preferenciát, letapadtak úgy a sejtekre, mint a sejtek közé.



30. ábra. Az emlőkarcinóma-sejtek vándorlása az agyi periciták felé.

A: EGFP-MDA emlőkarcinóma-sejteket helyeztünk szubkonfluens HBVP sejtekre. Az első kép a zöld fluoreszcens tumorsejteket mutatja, a fáziskontraszt képen mindkét sejttípus látszik. **B**: MDA-MB-231 sejtek vándorlása HBVP-k és D3 sejtek felé 24 óra alatt. A türkiz vonal a kiindulási frontot jelöli. Peri = periciták, endot = endotélsejtek, tu = tumorsejtek. **C**: EGFP-MDA emlőkarcinómasejtek vándorlása HBVP-k és D3 endotélsejtek felé 5 nap alatt. Az inszertek a fáziskontraszt kép megjelölt részeit mutatják zöld fluoreszcens szűrővel (csak tumorsejtek).

A mellráksejtek vándorolni is sokkal gyorsabban vándoroltak az agyi periciták, mint az agyi endotélsejtek irányába (**30. B ábra**) olyannyira, hogy ha több mint 10 mm távolságra helyeztük őket a pericitákról, az emlőkarcinóma-sejtek néhány nap alatt kolóniákat tudtak kialakítani a periciták között (**30. C ábra**). Ugyanabból az emlőkarcinóma-sejtpopulációból nagyon kevés sejt mozgott az endotélsejtek irányába, és az endotélsejtek között nem alakultak ki tumorsejt telepek (**30. C ábra**).



31. ábra. A tumorsejtek adhéziója az agyi periciták által szekretált faktorok jelenlétében.

A: A humán emlőkarcinóma (MDA-MB-231), illetve melanómasejteket (A2058) kontroll, illetve HBVPkondicionált médiumban tettük ki a tenyésztőedénybe. Az egér emlőkarcinóma (4T1), illetve melanómasejteket (B16/F10) kontroll, illetve egér pericita-kondicionált médiumban tettük ki a tenyésztőedénybe. A letapadt sejtekről 120 (MDA-MB-231), illetve 20 perc (A2058, 4T1, B16/F10) után fáziskontraszt felvételt készítettünk. Az inszertek reprezentatív kerek, illetve lapos sejteket mutatnak. **B**: A letapadt sejtek kvantitatív analízise. N = 5, átlag ± szórás, **P < 0,01 (ANOVA és Bonferroni *post-hoc* teszt). Peri-kond. méd. = pericita-kondicionált médium.

Ezen eredmények alapján arra következtettünk, hogy a periciták olyan szolubilis faktorokat termelhetnek, amelyekkel befolyásolják a tumorsejtek működését. Ezért két napig tápfolyadékot kondicionáltunk a pericitákon, és ebben szélesztettük a tumorsejteket a tenyésztőedénybe. A humán pericitákról gyűjtött médiumban humán emlőkarcinóma-, illetve melanómasejteket, míg az egér pericitákon kondicionált tápfolyadékban az egér emlőkarcinóma-, illetve melanómasejteket melanómasejteket tenyésztettük. Azt tapasztaltuk, hogy a periciták által termelt faktorok jelenlétében úgy a mellrák-, mint a melanómasejtek sokkal gyorsabban

kitapadtak, mint a kontroll médiumban (**31. A ábra**). A különbség szignifikáns volt a humán és az egér modellekben is (**31. B ábra**). Ennek oka az lehet, hogy a periciták ECM fehérjéket, kollagént és fibronektint, termelnek. Valószínűleg ezek a fehérjék indukálták az adhézióban szerepet játszó szignálfolyamatokat (a fokális adhéziós kináz/FAK és az Src foszforilációját) is a tumorsejtekben.

Néhány óra alatt a kontroll sejtek is letapadtak, és ezután a tenyészeteket több napon át hagytuk növekedni. Azt tapasztaltuk hogy a humán és az egér emlőkarcinóma-sejtek is sokkal gyorsabban szaporodtak a pericitákról gyűjtött tápfolyadékban, mint a kontroll médiumban (**32. A ábra**). Ezzel szemben nem találtunk különbséget a pericita-kondicionált és a kontroll médiumban tenyészett melanómasejtek proliferációjában sem a humán, sem az egér modellben (**32. A ábra**). Ezzel párhuzamosan emelkedett a ciklin D1-nek – a sejtek szaporodási ciklusa egyik szabályozófehérjéjének – a mennyisége a pericita-kondicionált médiummal kezelt emlőkarcinóma-sejtekben, azonban a melanómasejtekben nem (**32. B ábra**). Annak eldöntésére, hogy szolubilis faktorok vagy EV-k közvetítik-e a pericták által indukált hiperproliferációt, depletáltuk az EV-ket a pericita-kondicionált médiumból, és azt láttuk, hogy ez ugyanolyan mértékben fokozza a mellráksejtek szaporodását (**32. C ábra**). Ebből azt a következtetést vontuk le, hogy a periciták szolubilis faktorok révén fokozhatják az emlőkarcinóma-sejtek proliferációját.

Annak kiderítésére, hogy milyen faktorokat termelnek a periciták, amelyekkel befolyásolhatják a tumorsejtek szaporodását, *in silico* adatbázis-elemzést végeztünk. A *http://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html* adatai alapján az egér agyi pericitákban 487,25-ször magasabb az Igf2 mRNS mennyisége, mint az endotélsejtekben. Az asztrocitákhoz viszonyítva ez az arány 86,62; az oligodendrocitákhoz képest 179,91.



32. ábra. A tumorsejtek szaporodása az agyi periciták által szekretált faktorok jelenlétében.

A: A humán emlőkarcinóma- (MDA-MB-231), illetve melanómasejteket (A2058) kontroll, illetve HBVPkondicionált médiumban tenyésztettük 4 napig, majd fáziskontraszt felvételeket készítettünk róluk. Az egér tumorsejteket (4T1 és B16/F10) egér pericita-kondicionált médiumban tenyésztettük, szintén 4 napig. **B**: Reprezentatív WB kép a ciklin D1 fehérje expressziójáról kontroll és pericita-kondicionált médiumban tenyésztett tumorsejtekben. Peri-kond. méd. = pericita-kondicionált médium, EV-depl. = EV-depletált, hu. = humán, emlőkarc. = emlőkarcinóma. **C**: Az MDA-MB-231 sejtek szaporodása kontroll, EV-depletált, pericitakondicionált, illetve EV-depletált pericita-kondicionált médiumban. N = 4, átlag ± szórás, **P < 0,01 (ANOVA és Bonferroni *post-hoc* teszt).

Valós idejű PCR vizsgálataink alapján az Igf2 mRNS mennyisége szignifikánsan magasabb volt az agyi pericitákban, mint az endotélsejtekben, az asztrocitákban, az emlőkarcinómasejtekben vagy a melanómasejtekben úgy humánban (**33. A ábra**), mint egérben.







kontroll humán agyszövet



humán tripla negatív emlőkarcinóma agyi áttét

33. ábra. Az agyi sejtek IGF2 expressziója.

A: Az Igf2 mRNS expressziója humán agyi endotélsejtekben (D3), pericitákban (HBVP), asztrocitákban (HA), emlőkarcinóma- (MDA-MB-231) és melanómasejtekben (A2058) qPCR analízissel vizsgálva, GAPDH-ra normálva, az endotélsejtekhez viszonyítva. N = 3, átlag ± szórás, *P < 0,05, **P < 0,01 az endotélsejtekhez viszonyítva, #P < 0,05 az asztrocitákhoz viszonyítva (ANOVA és Bonferroni *post-hoc* teszt). **B**: A tenyésztett periciták (HBVP) és asztrociták (HA) által a tápfolyadékba szekretált IGF2 mennyisége (ELISA). N = 3 (periciták), N = 2 (asztrociták), átlag ± szórás, #P < 0,05 az asztrocitákhoz viszonyítva (Student *t*-teszt). **C**: Az IGF2 expressziója humán agyban IF módszerrel vizsgálva. **D**: Az IGF2 expressziója humán tripla negatív emlőkarcinóma agyi áttétben IF módszerrel vizsgálva. Kék = sejtmagok (Hoechst festés). Ezzel párhuzamosan a periciták jelentős mennyiségű IGF2 fehérjét szekretáltak a tápfolyadékba (**33. B ábra**). Humán agyszövetben az IGF2 fehérje csak a pericitákon volt kimutatható kontroll agyban (**33. C ábra**) és emlőkarcinóma metasztázisban egyaránt (**33. D ábra**). Ezzel ellentétben az Igf1 mRNS és az IGF1 fehérje pericitákban és asztrocitákban is kimutatható volt.

Az emlőkarcinóma-sejtek nagy mennyiségben expresszálják az IGF1 és IGF2 közös receptorát, az IGF-1R-t (inzulinszerű növekedési faktor receptor 1, *insulin-like growth factor receptor 1*), amelynek specifikus inhibitora a PPP. A PPP jelenléte szinte teljes mértékben megakadályozta a pericita-kondicionált médium által okozott szaporodásnövekedést úgy humán emlőkarcinóma-sejtek esetében (**34. A ábra**), mint az egér *in vitro* modellben. Annak igazolására, hogy ez valóban egy IGF2-függő folyamat, csendesítettük az Igf2-t a pericitákban, és az ezen sejtekről gyűjtött kondicionált médiummal kezeltük az emlőkarcinóma-sejteket. Mivel a proliferáció-fokozódás a PPP kezeléshez hasonlóan elmaradt (**34. A ábra**), igazolást nyert, hogy a periciták által szekretált IGF2 felelős ezért a jelenségért. Melanómasejtekben a magas IGF-2R (inzulinszerű növekedési faktor receptor 2) expresszió lehet az oka annak, hogy a pericita-kondicionált médium nem okozott szaporodás-növekedést, hiszen ez egy "csali" receptor, amely megköti ugyan a ligandot, de szignalizációt nem indít a sejtben.

Mivel a PPP könnyen átjut a vér–agy gáton, állatkísérletes modellben is meg tudtuk vizsgálni hatását a tumornövekedésre (**34. B ábra**). PPP jelenlétében sokkal kevesebb tumor és kisebb léziók alakultak ki az egerek agyában, mint kontroll körülmények között (**34. C ábra**), és ez a különbség szignifikánsnak bizonyult (**34. D ábra**).

Ezek az eredmények azt igazolják, hogy a periciták nagymértékben támogatják a tumorsejteket az agyi környezetben. Egyrészt ECM fehérjék termelésével segítik elő, hogy az emlőkarcinóma-sejtek az erek külső felszínéhez tudjanak tapadni, ami alapfeltétele ezen sejtek túlélésének az agyban.¹⁸⁷ Másrészt szolubilis faktorok, elsősorban IGF2, által fokozzák a daganatsejtek proliferációs képességét az agyban.



34. 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-csendesített pericitákról származó kondicionált médiumban. N = 5, átlag ± 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-csendesített 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 tumorméretek N = 3 állatból származó 17 agyszelet kvantitatív analízise alapján. Átlag ± standard hiba, **P < 0,01 (ismétlés nélküli kétszempontú ANOVA).

4.3.4 A miRNS-ek szerepe az agyi áttétek kialakulásában

Az EV-k legnagyobb mennyiségben a tumorsejtekből szabadulnak fel, és számos egyéb anyag mellett miRNS-eket is szállítanak, amelyek befolyásolhatják a metasztatikus *niche* kialakulását. Mivel a tumor eredetű miRNS-ek a keringésben is megjelennek, akár biomarker szerepét is betölthetik, hiszen specifikusak lehetnek bizonyos tumortípusra vagy metasztázistípusra. A tumorsejtekkel kapcsolatba kerülő gazdasejtek EV-, illetve miRNSkibocsátása is megváltozhat, és ez is detektálható lehet akár a vérből is.

Ezért kísérleteinkben emlőkarcinóma agyi metasztázisos egerek vérplazmájából új generációs szekvenálással olyan miRNS-eket kerestünk, amelyeknek szintje jelentősen megváltozott a kontroll egerekhez képest. Miután meggyőződtünk arról, hogy modellünkben szinte kizárólag csak agyi áttétek alakultak ki, azokra a miRNS-ekre koncentráltunk, amelyeknek mennyisége a metasztázisképzés korai fázisában (a 3. napon) változott meg. Három olyat találtunk, amelynek szintje megnőtt, ezek a miR-92-1-5p, a miR-205-5p és a miR-181a-1-3p, míg kettőnek (miR-802-5p és miR-194-5p) csökkent a mennyisége. Ezeket a változásokat qPCR-rel is igazolni tudtuk. A miR-802-5p és miR-194-5p *downreguláció*ja nemcsak a vérben volt kimutatható (**35. A ábra**), hanem ISH-val agyszeleteken is (**35. B ábra**).

Ezután targetpredikciós módszerekkel (*TargetScanMouse v.7.2* és *DIANA Tools microT-CDS v.5.0*) olyan mRNS-eket és az általuk kódolt fehérjéket kerestünk, amelyeket mindkét miRNS szabályozhat mindkét bioinformatikai eszköz előrejelzése alapján, és amelyek onkogén szereppel rendelkezhetnek.

Ezen kritériumoknak a MEF2C (*myocyte enhancer factor 2C*) transzkripciós faktor felelt meg, amely embrionális korban az izom, a szív és az idegrendszer fejlődésében játszik fontos szerepet,³⁰² ugyanakkor onkogénként is működhet.³⁰³ A MEF2C fehérje nagy mennyiségben expresszálódott az emlőkarcinóma-sejtekben, és a metasztatikus léziók növekedésével transzlokálódott a citoplazmából a sejtmagba. Nemcsak a tumorsejtekben láttunk MEF2C jelet, hanem a peritumorális asztrocitákban is, azonban a tumortól távolabb elhelyezkedő gliasejtekben nem (**35. C ábra**). Mindez valószínűsíti, hogy a tumorsejtek jelenlétében csökkent az asztrocitákban a miR-802-5p és esetleg a miR-194-5p mennyisége, amelynek

hatására megnőtt a MEF2C mennyisége. Az agyi miRNS expresszió változás reflektálódott a vérplazmában is, ezért a csökkent miR-802-5p és miR-194-5p szintek akár biomarkerként is hasznosíthatók lesznek az agyi metasztázisok korai fázisában. Az emelkedett MEF2C expresszió szerepe a peritumorális asztrocitákban jelenleg még nem ismert, de valószínűleg az asztrociták "prometasztatikus átprogramozásának" része.



35. ábra. A miR-802-5p és a miR-194-5p miRNS-ek változása az agyi metasztázisképződés során.

BALB/c egerek jobb *a. carotis communis*-ába 4T1 sejteket injektáltunk, majd 3 nap után az állatokat feláldoztuk, hogy vérplazma-, illetve agyi mintákat gyűjtsünk. **A**: A vérplazmából qPCR-rel határoztuk meg a miR-802-5p és a miR-194-5p mennyiségét. Az ábra a kontrollhoz (Ringer-HEPES-injektált) viszonyított, miR-16-5p-re normált értékeket mutatja. N = 5 (miR-802-5p), N = 3 (miR-194-5p), átlag ± szórás, **P < 0,01, *P < 0,05 (Student *t*-teszt). **B**: 4T1 sejtekkel injektált egerekből származó agyi metszeteken ISH-val vizsgáltuk meg a miR-802-5p és a miR-194-5p expresszióját 3 nappal a tumorsejtek keringésbe juttatása után. A felvételek Alexandra Brito laboratóriumában készültek (Faculdade de Farmácia, Research Institute for Medicines (iMed.ULisboa), Universidade de Lisboa, Lisszabon, Portugália). **C**: 7 nappal a 4T1 sejtek injektálása után az agyi metszeteken IF-fel vizsgáltuk meg a MEF2C expresszióját, amely a miR-802-5p és a miR-194-5p prediktált target fehérjéje. A nyilak a MEF2C-pozitív peritumorális asztrocitákat, a szaggatott nyilak a metasztatikus léziótól távolabbi, MEF2C-negatív asztrocitákat jelölik, míg a nyílhegy a tumormasszát mutatja.

4.3.5 Az inflammaszómák aktiválódása az agyi áttétek kialakulása során

A tumor mikrokörnyezet számos gyulladásos fenotípusú sztromális sejtet tartalmaz, és nincs ez másképp az agyban sem.³⁰⁴ Az inflammaszómáknak alapvető szerepe van a peritumorális gyulladásos reakciókban,³⁰⁵ azonban agyi metasztázisok esetében nem volt ismert, hogy aktiválódnak-e az inflammaszómák, és ha igen, akkor milyen sejtekben, illetve milyen következményekkel jár ez a folyamat.



36. ábra. Az NLRP3 inflammaszóma aktiválódása a peritumorális asztrocitákban. BALB/c egerek jobb *a. carotis communis*-ába tdTomato-4T1 sejteket injektáltunk.

(Az ábrafelirat a következő oldalon folytatódik.)

36. ábra. (folytatás az előző oldalról) **A**: Reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek (*z*-projekciók) az NLRP3 és a GFAP és kolokalizációjáról. Az NLRP3-pozitív pixelek 95%-a GFAP-pozitívnak bizonyult. **B**: A kísérleti felállás sematikus ábrája. **C**: Reprezentatív WB a kontroll (bal), illetve a metasztatikus sejteket tartalmazó (jobb) agyféltekékből. **D**: Reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek (*z*-projekciók) az IL-1β és a GFAP expressziójáról és kolokalizációjáról a peritumorális asztrocitákban. Piros = tumorsejtek, kék = sejtmagok (Hoechst).

Humán és egér tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztatázis mintákat vizsgálva azt találtuk, hogy az NLRP3 és az IL-1β fehérjék a peritumorális asztrocitákban voltak jelen kimutatható mennyiségben, míg a tumorsejtekben vagy más sztromális sejtekben, illetve a tumoroktól távolabb elhelyezkedő gliasejtekben nem (**36. A ábra**). Az agyi metasztázismodellben, a daganatsejteket tartalmazó oldalon megnőtt az aktív IL-1β mennyisége az egerek agyában, amit meg tudtunk akadályozni az MCC950 NLRP3 gátlószer adagolásával (**36. B, C ábra**). Ezzel párhuzamosan, az MCC950-nel kezelt állatokban nemcsak csökkent az asztrogliózis és kevesebb IL-1β fehérje volt kimutatható az asztrocitákban (**36. D ábra**), hanem a metasztatikus léziók száma és mérete is szignifikánsan alacsonyabb volt az egerek agyában (**37. A, B ábra**). Mindez arra utalt, hogy az áttétes sejtek közelében levő asztrocitákban aktiválódnak az NLRP3 inflammaszómák, és az így termelődő aktív IL-1β 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.





FVB/Ant:TgCAGyfp_sb #27 egerek jobb *a. carotis communis*-ába tdTomato-4T1 sejteket és MCC950-et injektáltunk a 36. B ábrán bemutatott séma szerint. **A**: Reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek (*z*-projekciók). Piros = tumorsejtek, zöld = erek (Venus-YFP). **B**: A tumorméretek N = 3 állatból származó, állatonként 8 agyszelet kvantitatív analízise alapján. Átlag ± standard hiba, ***P < 0,001 (ANOVA és Fisher LSD *post-hoc* teszt).

5 Megbeszélés

Munkánk során a neurovaszkuláris egység szerepét próbáltuk minél jobban megérteni agyi fiziológiás és patológiás folyamatokban. Elsőként írtuk le a vér–agy gát regionális heterogenitását az agyi szürke- és fehérállományban, illetve új adatokat szolgáltattunk a neurovaszkuláris egység patológiás folyamatokban betöltött szerepéről is. Ez utóbbi tekintetében az agyi gyógyszerbejuttatási lehetőségek mellett vizsgáltuk a vér–agy gát integritásának védelmét, valamint az agyi erek szerepét a patológiás folyamatokkal járó gyulladásos folyamatokban és az agyi metasztázisok kialakulásában.

5.1 A vér–agy gát működése és szabályozása

A vér–agy gát működésének és szabályozásának minél pontosabb megértése klinikai szempontból is nagyon fontos. Egyrészt azért, mert a központi idegrendszeri patológiás folyamatokban a vér–agy gát érintettsége, megnyílása gyakran tovább súlyosbítja a betegség lefolyását. Másrészt azért, mert a vér–agy gát jelenti a legnagyobb akadályt ezen kórképek gyógyszeres kezelésében, hiszen a potenciális terápiás szerek nagy része nem tud megfelelő mennyiségben átjutni az agyi endoteliális barrieren.^{13,306}

5.1.1 A vér-agy gát regionális heterogenitása

A vér–agy gát – bár néhány kisebb területtől eltekintve a teljes agyterületen jelen van – nem egy egységes struktúra, valószínűleg annak megfelelően, hogy az agy felépítése és működése is különbözik az agyi régiók között. A vér–agy gáttal nem rendelkező területek a cirkumventrikuláris szervek, amelyek egyrészt monitorozzák a vérben bekövetkező változásokat, másrészt hormonokat szekretálnak a keringésbe. Ezen funkciók ellátásához ezeken a területeken fenesztrált kapillárisokra van szükség.³⁰⁷

Eredményeink alapján azonban a vér–agy gátat alkotó endotélsejtek között is lehetnek jelentős különbségek a barrier tulajdonságok tekintetében. Az *in silico, in vitro* és *ex vivo* mRNS és fehérje expressziós, valamint funkcionális adataink is azt mutatták, hogy az összefüggő fehérállomány szintjén szorosabb a paracelluláris barrier, mint az agykérgi szürkeállományban. Ennek egyik lehetséges oka a fehérállományi rostos asztrociták

magasabb GFAP expressziója lehet,³⁰⁸ hiszen a GFAP jelenléte a perivaszkuláris asztrocitákban elengedhetetlen fontosságú a vér–agy gát integritásának megtartásában.³⁰⁹

Kevéssé ismert, hogy más, kisebb agyterületek között vannak-e hasonló különbségek.³¹⁰ Azt sem tudjuk pontosan, hogy a vér–agy gát regionális heterogenitásának milyen funkcionális következményei vannak, azonban összefüggésben lehet a szürkeállományt, illetve a fehérállományt különbözőképpen érintő patológiás folyamatokkal.²⁸⁰ A fehérállományi erek károsodása kifejezetten jelentkezhet például MS-ben,³¹¹ TBI-ban,³¹² gyermekneurológiai kórképekben,³¹³ illetve bizonyos fertőzésekben.^{314,315} A kérdés fontosságát az is mutatja, hogy agyi kisérbetegségben a fehérállományi vér–agy gát sérülés jelzi előre a kognitív funkciók hanyatlását.³¹⁶ Hasonlóképpen *stroke* után is a vér–agy gát károsodása a fehérállomány strukturális integritásának megbomlásával és a betegség rosszabb kimenetelével párosul.³¹⁷

A fehérállományban a kapillárisok sűrűsége alacsonyabb, míg átmérőjük nagyobb, mint a szürkeállományban. Különböző demenciákban a fehérállományi erek további tágulása figyelhető meg, ami valószínűleg egy kompenzatorikus folyamat a hipoperfúzió ellensúlyozására.³¹⁸ A hipoperfúzió ugyanis az OPC-k aktiválása által vér–agy gát megnyílást okoz a fehérállományban, amely fokozza a demielinizációt.³¹⁹ A perivaszkuláris OPC-k szerepe MS-ben is felvetődött. A remielinizációhoz szükséges oligodendrociták kialakulása érdekében OPC-k vándorolnak a léziókhoz, azonban az erekről való lekapcsolódásuk zavara miatt perivaszkulárisan felszaporodnak, és a szoros kapcsolatok sérüléséhez, a fenesztrált endotéliumokra jellemző PLVAP (*plasmalemma vesicle-associated protein*) megjelenéséhez és a neuroinflammációhoz járulnak hozzá.⁶⁸

Összességében elmondható, hogy a fehérállományi vér–agy gát sérülése jelentősen hozzájárulhat a neurodegeneratív és neuroinflammációs folyamatok kialakulásához.

5.1.2 A vér–agy gát integritásának védelme

Bár a vér–agy gát alacsony áteresztőképessége komoly kihívást jelent a gyógyszerek agyba való bejuttatásában, a patológiás permeabilitásfokozódás is káros következményekkel jár.³²⁰ Ezért a vér–agy gát integritásának védelme is fontos szempont agyi kórfolyamatok során.³²¹ Az agyi endotélsejtek szoros kapcsolatainak egyik legfontosabb stabilizátora a cAMP jelátviteli útvonal, amely jelentősen megnöveli a klaudin-5 foszforilációját és junkcionális expresszióját.³²² Ennek megfelelően az intracelluláris cAMP szintet növelő adrenomedullin vagy *cilostazol* javítja az agyi endotélsejtek paracelluláris barrier tulajdonságait.^{323,324}

Kísérleteinkben ezért egy olyan endogén neuropeptid, a PACAP, hatását vizsgáltuk az agyi endotélsejtek barrier tulajdonságaira, amely citoprotektív és egyéb hatásait a cAMP útvonalon keresztül indítja el a sejtekben,²⁸¹ ráadásul a külső vér–retina barrier szoros kapcsolataira is védő hatásúnak bizonyult.^{325,326} Eredményeink azt igazolták, hogy a PACAP elsősorban patológiás állapotokban (a *stroke* állapotot *in vitro* körülmények között modellező oxidatív stresszben és glükóz-megvonásban) javította az agyi endotélsejtek barrier tulajdonságait. Azóta az is kiderült, hogy a PACAP nemcsak az agyi, hanem a perifériás endotélsejtekre is hasonló hatást képes kifejteni.³²⁷

5.1.3 Gyógyszerbejuttatás az agyba a vér–agy gáton keresztül

Ahogy a korábbiakban említettük, az agyi patológiás folyamatok gyógyszeres terápiájának egyik legfontosabb akadálya maga a vér-agy gát, amely jelentősen megnehezíti a gyógyszermolekulák bejutását a központi idegrendszerbe. Az agyi gyógyszerbejuttatásra a kutatók számos stratégiát dolgoztak ki, amelyek többfélék lehetnek: invazív és alternatív (a vér–agy megkerülő) útvonalak alkalmazása, а gátat vér–agy gát transzportmechanizmusainak kihasználása, karrierekkel (nanopartikulumok, exoszómák, virális vektorok vagy sejtek segítségével) történő szállítás, illetve a gyógyszermolekulák kémiai módosítása.^{328,329} Kísérleteinkben ez utóbbi módszert alkalmaztuk EM-2, illetve KYNA analógok szintézisével és a vér–agy gát in vitro modelljén való permeabilitásuk tesztelésével.

Az EM-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) – akárcsak az EM-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) – nagyon potens és szelektív μ-opioid receptor agonista, azonban fájdalomcsillapításra való alkalmazását megakadályozza gyors lebomlása és a vér–agy gáton való alacsony permeabilitása. Ezért kollaborációs partnereink olyan analógokat szintetizáltak, amelyeken olyan strukturális változtatásokat vittek véghez, amelyekkel először is növelték a biológiai aktivitásukat. Egyrészt az első Tyr-t Dmt-re (2', 6'-dimetiltirozin) cserélték (peptid 1), illetve a Pro helyére aliciklikus β-aminosavakat építettek be a láncba, Acpc-t (-amino-ciklopentán 1-karbonsav, *2aminocyclopentane-1-carboxylic acid*) (peptid 2) vagy Achc-t (2-amino-ciklohexán 1-

karbonsav, 2-aminocyclohexane-1-carboxylic acid) (peptid 3).^{330,331} Ezek a peptidek hosszabb élettartammal rendelkeznek, ugyanakkor zsíroldékonyságuk is növekedett. Ezért feltételeztük, hogy a vér–agy gáton való átjutásuk is jobb lehet, és ezt a hipotézist *in vitro* kísérletekkel igazolni is tudtuk. Kísérleteink jól illeszkednek az EM-alapú, új fájdalomcsillapítók kifejlesztése iránti magas igényhez, amely számos bioaktív analóg előállítását eredményezi azóta is.^{332–334}

A KYNA (4-hidroxikinolin-2-karbonsav) neuroprotektív szerként való alkalmazhatóságát szintén a központi idegrendszerbe való korlátozott bejutása akadályozza meg. Kollaborációs partnereink ezért számos analógot állítottak elő úgy, hogy az SZR-72 és SZR-81 KYNA-amidokat a C3 pozícióban aminoalkilálták piperidino-metil (SZR-100 és SZR-101), morfolino-metil (SZR-104 és SZR-105), illetve pirrolidino-metil (SZR-106 és SZR-107) csoportokkal.³³⁵ Eredményeink azt mutatták, hogy a KYNA-amid morfolino-metil származékok mutatták a legnagyobb permeabilitást, amely nagyobb volt a KYNA, az összes többi vizsgált analóg, valamint a xanturénsav és annak morfolino-metil származéka (a 39B) permeabilitásánál. Ugyanakkor ezen KYNA-analógoknak nemcsak az agyi penetrációja nőtt meg, de biológiai aktivitása is megmaradt, hiszen az SZR-104 és az SZR-105 is csökkenteni képes a TNF-α mennyiségét *S. aureus*-szal fertőzött limfóma sejtekben.²⁸⁸ Az SZR-104 pedig antiepileptikus hatásúnak is bizonyult.²⁸⁷ Mindezen adatok ismeretében jelenleg új szerkezetű C3-morfolino-metil-KYNA-amid származékok szintézisén és tesztelésén dolgozunk azzal a céllal, hogy megtaláljuk azt az ideális molekulát, amely a legjobb vér–agy gáton való permeabilitással és magas bioaktivitással rendelkezik.

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

A neuroinflammáció a központi idegrendszer gyulladásos reakciója, amelyben a neurovaszkuláris egység sejtjei, valamint perifériás immunsejtek vehetnek részt. Az alacsony fokú, kontroll alatt tartott neuroinflammáció fontos szerepet játszik a gyulladást kiváltó ok megszüntetésében, a szöveti regenerációban, valamint a megfelelő neuroprotekcióban, neuroplaszticitásban, fejlődésben, a kognitív funkciókban, stb. A megfelelő egyensúly azonban gyakran megbomlik, a gyulladás túl erőssé vagy elhúzódóvá, krónikussá válik, amelynek számos negatív következménye lesz, és végül neurodegenerációhoz vezethet.³³⁶

A neuroinflammáció legfőbb sejtes szereplői a mikrogliasejtek és az asztrociták, valamint az agyba bevándorló immunsejtek, azonban a neuronok és a vaszkuláris sejtek is részt vehetnek a folyamat modulálásában. Molekuláris szinten a PRR-ek alapvető szerepet játszanak úgy a fertőzéses, mint a steril gyulladásos reakciókban a mikrobiális és a szöveti károsodás során felszabaduló, konzervált molekuláris mintázatok felismerése és a gyulladásos reakció elindítása által. Egyes PRR-ek különleges jelentőséggel bírnak, mivel inflammaszómák kialakításában vesznek részt, és így nagyon szabályozott módon járulnak hozzá potens citokinek, elsősorban az IL-1β felszabadításához.

5.2.1 A vaszkuláris sejtek aktív szerepe a gyulladásos reakciókban

Kísérleteinkben azt a hipotézist is szerettük volna igazolni, hogy nemcsak a gliasejtek és az immunsejtek, de az agyi vaszkuláris sejtek is aktív szerepet játszanak a gyulladásos reakciókban az agyban.

Ehhez első lépésként bebizonyítottuk, hogy az agyi endotélsejtek és periciták számos PRR-t expresszálnak, és gyulladásos jelek hatására inflammaszómák összeszerelésére is képesek. Feltérképezve az agyi endotélsejtekben és pericitákban expresszálódó TLR-eket és NLR-eket, valamint tesztelve az inflammaszóma-aktiváció lehetséges útvonalait, irodalmi adatokkal kiegészítve, egy komplex képet kaptunk a neurovaszkuláris sejtek PRR mintázatáról és az inflammaszómák aktiválódásáról az agyban (**38. ábra**).

Érdekes módon kanonikus inflammaszóma-aktivációt csak az endotélsejtekben detektáltunk, míg nem-kanonikus úton a periciták és az endotélsejtek is képesek voltak aktiválni az inflammaszómákat. Ez utóbbi esetben a mintázatfelismerés intracellulárisan történik, az LPS (esetleg más PRR ligand) internalizálása után, amelyre mindkét sejttípus képes lehet.^{291,337–339}



38. ábra. TLR-ek, NLRC és NLRP receptorok, valamint inflammaszómák a neurovaszkuláris egység sejtjeiben. Az ábra a humán és egér asztrocitákban, mikrogliasejtekben, neuronokban, agyi endotélsejtekben és pericitákban mRNS szinten, alapállapotban expresszálódó TLR-eket, illetve NLRC és NLRP receptorokat ábrázolja. **(5)** = ugyanezen sejtekben különböző stimulusok hatására összeszerelődő inflammaszómák. A színkód a sejtekre utal (zöld = asztrocita, narancs = mikrogliasejt, kék = neuron, piros = endotélsejt, szürke = pericita). A jobb felső sarokban az egyes agyi patológiás folyamatokban aktiválódó inflammaszómák vannak feltüntetve. EAE = kísérleti autoimmun agy–gerincvelő-gyulladás (*experimental autoimmune encephalomyelitis*).

5.2.2 A vaszkuláris sejtek közvetítő szerepe a gyulladásos reakciókban

Fontos felismerés volt az is, hogy az agyi endotélsejtek úgy az apikális (vér felőli), mint a bazolaterális (agyi) stimulusok hatására aktiválhatnak inflammaszómákat, és mindkét irányba szekretálnak gyulladásos faktorokat. Ugyanakkor úgy tűnik, hogy a vaszkuláris sejtek kisebb mennyiségben termelnek IL-1 β -t, mint a mikrogliasejtek vagy az asztrociták, bár az adatok nem azonos kísérletes körülmények között születtek. Agyi endotélsejtekben 24 órás LPS *priming*ot követő MDP aktiváció hatására 5 pg/ml körüli IL-1 β -t tudtunk kimutatni a felülúszóban, pericitákban pedig 4 óra után körülbelül 15 pg/ml-t, ha IFN- γ +TNF- α priming mellett Lipofectamine 2000-rel LPS-t juttattunk a sejtekbe. Ezzel szemben 12-48 óra LPS kezelés hatására mikrogliasejtek felülúszójából akár 400 pg/ml-nél is több IL-1 β -t tudtak kimutatni, LPS+ATP hatására pedig körülbelül 2000 pg/ml-t.^{340–342} LPS kezeléssel asztrociták tápfolyadékában 150-250 pg/ml, LPS és amiloid- β_{42} kettős kezeléssel akár 3000 pg/ml IL-1 β is megjelenhet.^{343–345} Mindezek alapján azt feltételeztük, hogy az agyban az endotélsejtek és a periciták inkább a gyulladásos jelek közvetítésében, mint a gyulladás kiváltásában játszhatnak szerepet. Erre utal az a megfigyelés is, hogy ezek a sejtek együtt tenyésztve nagyobb mennyiségben termelnek gyulladásos citokineket, mint önmagukban.³⁴⁶ *In vitro* kísérletes modellekben sikerült igazolnunk, hogy gyulladásos jelek érzékelése kapcsán az agyi endotélsejtek és periciták kölcsönösen aktiválják egymást. Ennek nagy valószínűséggel az agy és a periféria közötti kommunikációban van szerepe gyulladásos körülmények között.

Végül idegsérüléses modellekben is azt tapasztaltuk, hogy az agyban nem elsősorban a vaszkuláris sejtek válaszolnak a sérülésre. Érdekes módon axotómia hatására nem is a gliasejtek, hanem az axonális léziót szenvedett idegsejtek voltak azok, amelyekben az inflammaszómák leghamarabb aktiválódtak. Neuronokban korábban az NLRP1 és AIM2 inflammaszómák aktivációját írták le,^{144,347} míg neurodegeneratív folyamatokban az NLRP3 inflammaszóma-aktiváció fő sejtjeinek elsősorban a mikrogliasejtek és az asztrociták bizonyultak, bár PD-ben feltételezhetően az érintett idegsejtekben is aktiválódhat az NLRP3 inflammaszóma.³⁴⁸ Eredményeink arra mutatnak rá, hogy az idegek sérülése valószínűsíthetően a felszabaduló ATP révén aktiválja az NLRP3 inflammaszómát az idegsejtekben, amelynek hatására idővel egy komplex gyulladásos folyamat indul el, amelynek része a mikrogliózis is. Azt is igazoltuk, hogy az inflammaszóma-aktiváció korai gátlása jótékonyan hat a regenerációra.

Az NLRP3 inflammaszóma kóros aktivációja számos patológiás folyamat lefolyását ronthatja, mint a neurodegeneratív megbetegedések, kardiovaszkuláris és metabolikus zavarok, így a farmakológiai gátlószerek fejlesztése nagy erőkkel folyik.³⁴⁹ Eredményeink alapján ezek a szerek traumás sérülésekben is jótékony hatásúak lehetnek. Ugyanakkor az inflammaszóma gátlószerek a különböző malignus daganatok terápiájában is fontos szerephez juthatnak a jövőben,³⁵⁰ és erre utalnak saját eredményeink is, amelyek azt igazolták, hogy az emlőkarcinóma agyi áttétek környezetében levő asztrocitákban aktiválódik az NLRP3 inflammaszóma, amelynek gátlása csökkenti a tumorsejtek szaporodását állatmodellben.

5.3 Az agyi áttétes tumorok kialakulásának mechanizmusai

Az agyi áttétes tumorok kialakulása során két olyan lépés van, amelyben érintettek a neurovaszkuláris egység sejtjei. Az első a vér–agy gáton való átvándorlás, a második pedig a tumorsejtek túlélése és szaporodása az agyi környezetben, az erek közvetlen közelében.

5.3.1 A metasztatikus sejtek átjutása a vér–agy gáton

Mivel a vér–agy gát képezi a legszorosabban záró endotélréteget a szervezetünkben, a daganatos sejteknek különleges stratégiákat kell alkalmazniuk, hogy áthatoljanak rajta és bejussanak az agyba. Ez a folyamat – egérben vizsgálva – napokat vesz igénybe, amely időszak alatt a tumorsejtek nagy része eltűnik az agyi kapillárisok lumenéből. Ezek a sejtek valószínűleg jórészt elpusztulnak a mechanikai stressz vagy az immunsejtek hatására, illetve a letapadás hiányában fellépő *anoikis* következtében.¹⁷⁸

Bár maga az átvándorlás néhány óra alatt lezajlik, annak előkészítése 3-5 vagy akár még több napig is eltarthat. Azt tapasztaltuk, hogy ezen időszak alatt az endotélsejtek számos változáson mennek át az érben elakadt tumorsejtek közelében. A kialakuló endotéldugók és érösszehúzódások elzárják, és ezáltal valószínűleg védik a tumorsejteket. A metasztatikus sejtek az endotélsejtek hólyagosodását és másodlagos lumenek kialakulását okozzák, amelyek feltételezhetően hozzájárulnak a transzmigrációhoz. Az endotélsejtek gyakran protrúziókat bocsátanak ki, amelyekkel mintegy körülölelik a daganatsejteket, biztosítva a többszörös lumenek kialakulását, illetve a korábban megfigyelt "endotelializációs" átvándorlást.^{351–353} Az érlumenben eltöltött hosszú idő az EndMT kialakulásához is szükséges, amely szintén hozzájárul a tumorsejtek átvándorlásának elősegítéséhez.³⁵⁴

Maga a diapedézis emlőkarcinóma-sejtek esetében gyakran transzcellulárisan, azaz egyedi endotélsejteken keresztül történik. Ez azonban kevésbé tűnik hatásosnak, mint a melanómasejtek által alkalmazott paracelluláris transzmigráció, bár ezt csak *in vitro* vizsgáltuk. Elképzelhető azonban, hogy a melanómasejtek fokozott vér–agy gáton való átjutási képessége szerepet játszhat nagyfokú neurotropizmusukban, amelyhez számos más molekuláris mechanizmus is hozzájárul.³⁵⁵

Eredményeink arra utalnak, hogy a Rac által szabályozott mezenchimális mozgástípus, amelyet a lapos, elnyúlt sejtmorfológia és a magas proteolitikus aktivitás jellemez, előnyösebb a tumorsejtek vér–agy gáton való átvándorlása során, mint a magas Rho aktivitáshoz társuló amőboid, citoszkeletális mozgásforma (**39. ábra**). Ugyanakkor PI3K útvonal aktiválása is segítheti a transzmigrációt.

A tumorsejtekben aktiválódó jelátviteli utak fontos terápiás célpontok lehetnek, és ezirányban számos gyógyszerjelölt vizsgálata zajlik preklinikai és klinikai szinten. Eredményeink alapján a PI3K gátlószereknek alapvető szerepe lehet nemcsak a primér daganatok kezelésében,³⁵⁶ hanem akár az agyi áttétek kialakulásának megakadályozásában is. Azonban a gyógyszerrezisztenciák kialakulása komoly problémát jelent ezen szerek terápiás alkalmazhatóságában.²⁹⁸



39. ábra. Az amőboid és a mezenchimális mozgástípus szerepe a tumorsejtek vér–agy gáton való átvándorlásában.

Az amőboid, citoszkeletális mozgásforma a kerek morfológiájú sejtekre jellemző, amelyekben magas a Rho/ROCK aktivitás. Ezek a sejtek elsősorban a citoszkeletális kontraktilitás révén tudnak haladni. Ez a morfológia a Rac útvonal gátlásával indukálható. Ezzel ellentétben a Rho/ROCK aktivitás gátlása a mezenchimális mozgásformának kedvez. Ezekre a sejtekre az elnyúlt, lapos morfológia jellemző, valamint a magas Rac és proteolitikus aktivitás. Eredményeink alapján a vér–agy gáton való átvándorlás esetén ez utóbbi a kedvezőbb a tumorsejtek számára.

A Rac1 is egy potenciális célmolekula különböző daganatos betegségek kezelésében.³⁵⁷ Ezzel ellentétben, a *fasudil* – amelyet a klinikumban agyi érgörcs kezelésére használnak a Távol-Keleten³⁵⁸ és koronária spazmusban is hatékony lehet³⁵⁹ – elősegítheti az agyi metasztázisok kialakulásárát annak ellenére, hogy a tumorsejtek migrációját gátolja.^{360,361} Az általunk

vizsgált további jelátviteli utak, a CB2 és az integrin szignalizáció, is rendelkeznek terápiás potenciállal úgy a daganatok, mint más patológiás folyamatok kezelésében.^{362,363}

Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy a primér tumorok kezelésére alkalmas számos terápiás szer az agyi áttétek kialakulását is gátolni fogja, azonban a ROCK gátlószerek akár növelhetik is az agyi áttétek kialakulásának kockázatát. A már kialakult agyi metasztázisok kezelésére azonban új stratégiákat kell kifejleszteni. Olyan terápiás szerekre lenne szükség, amelyek átjutnak a vér–agy gáton, és a tumorsejteket, illetve a metasztatikus környezetet veszik célba.

5.3.2 Az agyi környezet hatása a metasztázisokra

A mikrokörnyezetnek alapvető szerepe van a daganatok növekedésében és terjedésében nemcsak a primér, hanem a metasztatikus tumorok esetében is.^{364,365} A mikrokörnyezet összetételét nagyban befolyásolja a tumor lokalizációja, így az agyban az immunsejtek és a fibroblasztok mellett gliasejtek, illetve barrierképző endotélsejtek, valamint a nagy számban jelen levő periciták is részt vesznek a tumor környezetének sejtes felépítésében.³⁰⁴

A nem sejtes elemek közül az erek alaphártyájának van kiemelkedő szerepe, hiszen a véragy gáton átjutott tumorsejtek ehhez tapadnak hozzá, míg a perivaszkuláris kapcsolatok elvesztése a sejtek elpusztulását okozza.^{183,366} Az alaphártya termelésében az endotélsejtek, a periciták és az asztrociták is részt vesznek,⁴⁴ és saját adataink, illetve mások eredményei¹⁹⁰ is azt igazolják, hogy a periciták által kiválasztott ECM fehérjék fontos szerepet játszhatnak az agyi metasztázisok kialakulásában.

A periciták esetében más prometasztatikus funkciókat is találtunk. Nemcsak a kollagén, a fibronektin és a bazális membrán más elemeinek termelése segítheti a tumorsejteket az agyban, de egyéb azonosított és még azonosításra váró faktorok is, amelyek révén a periciták kemotaktikus, illetve migrációt, EMT-t, valamint proliferációt fokozó hatást fejtenek ki a tripla negatív emlőkarcinóma-sejtekre (**40. ábra**). Az IGF2 – amelyet specifikusan a periciták termelnek az agyban, és amelynek nagyon erős szaporodást segítő hatása volt a tumorsejtekre – egy őssejt növekedési faktor,³⁶⁷ amely a neuronális sztemsejtek, és valószínűleg a periciták fenntartását szolgálja normál körülmények között, hiszen a periciták maguk is rendelkeznek őssejt tulajdonságokkal.³⁶⁸ Egerekben végzett legfrissebb kutatások

szerint a periciták által termelt IGF2-nek a hosszútávú memória kialakulásában is fontos szerepe van, feltételezhetőleg az IGF-2R-en keresztül.³⁶⁹

Az IGF2 az IGF-1R-en keresztül fokozza a mellráksejtek szaporodását, metasztatikus képességét és kemorezisztenciáját.^{370,371} Ezért az IGF-ellenes terápiának nagy jelentősége lehet ebben a tumortípusban, bár az eddigi klinikai tesztek nem hoztak áttörést.³⁷² Érdemes lenne azonban az anti-IGF terápiát agyi áttétes emlőkarcinómában is megvizsgálni, hiszen kísérletes modellekben hatásosnak tűnik³⁷³ és a PPP/AXL1717 molekula nemcsak hatásosan gátolja az IGF-1R-t, de nem toxikus³⁷⁴ és átjut a vér–agy gáton is (**40. ábra**).



40. ábra. Az agyi periciták és peritumorális asztrociták hatása a metasztatikus tripla negatív emlőkarcinómasejtek proliferációjára.

A periciták IGF2-t termelnek, amellyel aktiválják az IGF-1R-t a tumorsejtekben, amely fokozott sejtszaporodáshoz vezet. Az IGF-1R-t PPP-vel tudtuk gátolni. Az asztrocitákban a metasztatikus sejtek hatására aktiválódik az NLRP3 inflammaszóma, amely az IL-1β érését és felszabadulását váltja ki. Az IL-1β szintén fokozza a tumorsejtek proliferációját az agyban. Az NLRP3 inflammaszómát MCC950-nel gátoltuk.

Ami az asztrocitákat illeti, két új mechanizmust azonosítottunk, amely a metasztázisokban szerepet játszhat. Az egyik a MEF2C expressziójának fokozódása a peritumorális asztrocitákban. A MEF2C egy transzkripciós faktor, amely a szövet- és szervfejlődésben játszik szerepet, de onkogénként is működhet.³⁷⁵ Nemcsak az asztrocitákban, hanem a tumorsejtekben is kimutattuk jelenlétét, sőt primér emlőtumorokban is expresszálódik.³⁷⁶ Bár kísérletesen nem igazoltuk, a MEF2C expressziójának fokozódása az agyi metasztatikus tumorokban összefüggésben lehet a miR-802-5p és miR-194-5p mennyiségének

csökkenésével. Ezen és más miRNS-ek megváltozott expressziója fontos szerepet játszhat a metasztázisok kialakulásában, és akár biomarkerként is szolgálhat a daganatok korai azonosításában.³⁷⁷

Az asztrocitákban figyeltük meg ugyanakkor az NLRP3 inflammaszóma fehérjéinek expresszió-fokozódását, valamint az NLRP3 inflammaszóma aktiválódását is. Az így kialakuló gyulladásos környezet egyrészt a daganatsejtek szaporodásának fokozódását, másrészt az immunsejtek aktiválódását és tumorba jutását okozza, tovább fokozva a gyulladást.³⁷⁸ Az MCC950 inflammaszóma inhibitorral hatásosan tudtuk gátolni a metasztatikus léziók növekedését az agyban (**40. ábra**).

Az MCC950 volt az első kismolekula, amelyről igazolták, hogy nagyon hatásosan és szelektíven gátolja az NLRP3 inflammaszómát,²⁹² annak ATP-kötő motívumához kapcsolódva.³⁷⁹ Mivel az NLRP3 inflammaszóma aktivációja számos patológiás folyamat kimenetelét rontja, a gátlószerek fejlesztése nagy erőkkel folyik, és több potenciális gyógyszermolekula jutott el a klinikai kipróbálásig.³⁸⁰ Bár hepatotoxikus hatásai miatt az MCC950 nem jutott túl a fázis II szinten,²⁹³ a hozzá hasonló szerkezetű kismolekulák óriási előnye, hogy átjutnak a vér–agy gáton.

Az inflammaszóma gátlószerek központi idegrendszeri megbetegedésekben³⁸¹ és különböző rosszindulatú daganatok ellen is hatásosak lehetnek.³⁵⁰ Az agyi metasztázisok a legagresszívebb és legnehezebben kezelhető daganatok közé tartoznak, így az inflammaszómák gátlása a perimetasztatikus asztrocitákban fontos előrelépést jelenthet a jövőben az agyi áttétes daganatok kezelésében.

6 Összefoglalás, legfontosabb eredmények

A neurovaszkuláris egység az idegsejtek és a gliasejtek, valamint a mikroerek falát alkotó endotélsejtek és periciták szoros morfológiai és funkcionális kapcsolatát jelenti, amelynek egyik legfontosabb szerepe a vér–agy gát kialakítása. A vér–agy gát az agy legfontosabb barrier rendszere, amely megakadályozza a vérben keringő potenciálisan káros anyagok (többek között a gyógyszermolekulák) és sejtek (immunsejtek és tumorsejtek) bejutását az agyi parenchimába. Ennek megfelelően az agyi erek meghatározó szereppel bírnak nemcsak a véráramlás, hanem a periféria és a központi idegrendszer közötti kommunikáció szabályozásában is úgy fiziológiás körülmények között, mint patológiás folyamatok során. Ez utóbbiak közül munkánkban a neuroinflammációt és az agyi áttétes daganatok kialakulását tanulmányoztuk.

Kísérleteink alapján elsőként állapítottuk meg, hogy a vér–agy gát felépítését és működését tekintve nem egységes a teljes agyszövetben, hanem regionális heterogenitást mutat, és érdekes módon a fehérállomány szintjén képez szorosabb barriert az agykérgi szürkeállományhoz viszonyítva. Ennek 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 hatásúnak bizonyult az agyi endotélsejtek szoros kapcsolataira.

Klinikai szempontból a vér–agy gát működésének ismerete többek között azért is fontos, mert az agyi endotélsejtek 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.

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 gyulladásos 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-1β-t szabadítanak fel. Ennek 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 egérmodellben.

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. A metasztatikus sejtek az endotélsejtek hólyagosodását és másodlagos lumenek kialakulását is kiváltották, feltételezhetően elősegítve transzmigrációjukat. Az endotélsejtek gyakran 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.

A mikrokörnyezetnek alapvető szerepe van a metasztatikus daganatok növekedésében és terjedésében. Az agyban a mellráksejtek jellemzően az erek mentén szaporodnak és vándorolnak. Ezen folyamat során nemcsak az endotélsejteket, de a pericitákat is bekebelezik, míg az asztrocitákat leszorítják az érfalról. 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 csökkentette a tumorok méretét az egerek agyában.

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.

Összefoglalva, olyan alapvető mechanizmusokat azonosítottunk az agyban, amelyek befolyásolják neurovaszkuláris egység, illetve a vér–agy gát működését fiziológiás, gyulladásos és metasztatikus körülmények között.
7 Klinikai hasznosíthatóság, további tervek

Bár munkánk elsősorban alapkutatás 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 patológiás folyamatok 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 erőkkel 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 érspazmus kezelésére – eredményeink szerint növelheti az agyi áttétek kialakulásának kockázatát.

• Eredményeink alapján az IGF2 jelátvitel gátlása kaphat még fontos szerepet az agyi metasztázisok kezelésében. Mivel még nagyon kevéssé ismert, hogy mi a fiziológiás szerepe az agyi pericitákban expresszálódó 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.

109

8 Irodalomjegyzék

- (1) Iadecola, C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron* **2017**, *96* (1), 17–42. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.030.
- (2) Stackhouse, T. L.; Mishra, A. Neurovascular Coupling in Development and Disease: Focus on Astrocytes. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 702832. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.702832.
- (3) Attwell, D.; Buchan, A. M.; Charpak, S.; Lauritzen, M.; MacVicar, B. A.; Newman, E. A. Glial and Neuronal Control of Brain Blood Flow. *Nature* 2010, 468 (7321), 232–243. https://doi.org/10.1038/nature09613.
- (4) Hill, R. A.; Tong, L.; Yuan, P.; Murikinati, S.; Gupta, S.; Grutzendler, J. Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes. *Neuron* 2015, *87* (1), 95–110. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.001.
- (5) Hall, C. N.; Reynell, C.; Gesslein, B.; Hamilton, N. B.; Mishra, A.; Sutherland, B. A.; O'Farrell, F. M.; Buchan, A. M.; Lauritzen, M.; Attwell, D. Capillary Pericytes Regulate Cerebral Blood Flow in Health and Disease. *Nature* **2014**, *508* (7494), 55–60. https://doi.org/10.1038/nature13165.
- (6) Cai, C.; Fordsmann, J. C.; Jensen, S. H.; Gesslein, B.; Lønstrup, M.; Hald, B. O.; Zambach, S. A.; Brodin, B.; Lauritzen, M. J. Stimulation-Induced Increases in Cerebral Blood Flow and Local Capillary Vasoconstriction Depend on Conducted Vascular Responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018, 115 (25). https://doi.org/10.1073/pnas.1707702115.
- (7) Abbott, N. J.; Patabendige, A. A. K.; Dolman, D. E. M.; Yusof, S. R.; Begley, D. J. Structure and Function of the Blood–Brain Barrier. *Neurobiol. Dis.* 2010, 37 (1), 13–25. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030.
- (8) Abbott, N. J.; Rönnbäck, L.; Hansson, E. Astrocyte–Endothelial Interactions at the Blood–Brain Barrier. Nat. Rev. Neurosci. 2006, 7 (1), 41–53. https://doi.org/10.1038/nrn1824.
- (9) Profaci, C. P.; Munji, R. N.; Pulido, R. S.; Daneman, R. The Blood–Brain Barrier in Health and Disease: Important Unanswered Questions. *J. Exp. Med.* **2020**, *217* (4), e20190062. https://doi.org/10.1084/jem.20190062.
- (10) Grubb, S.; Cai, C.; Hald, B. O.; Khennouf, L.; Murmu, R. P.; Jensen, A. G. K.; Fordsmann, J.; Zambach, S.; Lauritzen, M. Precapillary Sphincters Maintain Perfusion in the Cerebral Cortex. *Nat. Commun.* 2020, *11* (1), 395. https://doi.org/10.1038/s41467-020-14330-z.
- (11) Hartmann, D. A.; Coelho-Santos, V.; Shih, A. Y. Pericyte Control of Blood Flow Across Microvascular Zones in the Central Nervous System. *Annu. Rev. Physiol.* **2022**, *84* (1), 331–354. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-061121-040127.
- (12) Ji, X.; Ferreira, T.; Friedman, B.; Liu, R.; Liechty, H.; Bas, E.; Chandrashekar, J.; Kleinfeld, D. Brain Microvasculature Has a Common Topology with Local Differences in Geometry That Match Metabolic Load. *Neuron* **2021**, *109* (7), 1168-1187.e13. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.02.006.
- (13) Pardridge, W. M. The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development. *NeuroRX* 2005, 2
 (1), 3–14. https://doi.org/10.1602/neurorx.2.1.3.
- (14) Duvernoy, H. M.; Delon, S.; Vannson, J. L. Cortical Blood Vessels of the Human Brain. *Brain Res. Bull.* 1981, 7 (5), 519–579. https://doi.org/10.1016/0361-9230(81)90007-1.

- (15) Linninger, A. A.; Gould, I. G.; Marinnan, T.; Hsu, C.-Y.; Chojecki, M.; Alaraj, A. Cerebral Microcirculation and Oxygen Tension in the Human Secondary Cortex. *Ann. Biomed. Eng.* 2013, *41* (11), 2264–2284. https://doi.org/10.1007/s10439-013-0828-0.
- (16) Tsai, P. S.; Kaufhold, J. P.; Blinder, P.; Friedman, B.; Drew, P. J.; Karten, H. J.; Lyden, P. D.; Kleinfeld, D. Correlations of Neuronal and Microvascular Densities in Murine Cortex Revealed by Direct Counting and Colocalization of Nuclei and Vessels. *J. Neurosci.* 2009, 29 (46), 14553–14570. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3287-09.2009.
- (17) Gould, I. G.; Tsai, P.; Kleinfeld, D.; Linninger, A. The Capillary Bed Offers the Largest Hemodynamic Resistance to the Cortical Blood Supply. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2017, 37 (1), 52–68. https://doi.org/10.1177/0271678X16671146.
- (18) Pardridge, W. M. Drug and Gene Delivery to the Brain. *Neuron* **2002**, *36* (4), 555–558. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)01054-1.
- (19) Zlokovic, B. V. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron* 2008, 57 (2), 178–201. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003.
- (20) Grubb, S.; Lauritzen, M.; Aalkjær, C. Brain Capillary Pericytes and Neurovascular Coupling. Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 2021, 254, 110893. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110893.
- (21) Wilhelm, I.; Fazakas, C.; Krizbai, I. A. In Vitro Models of the Blood-Brain Barrier. *Acta Neurobiol. Exp.* (*Warsz.*) **2011**, *71* (1), 113–128.
- (22) Crone, C.; Olesen, S. P. Electrical Resistance of Brain Microvascular Endothelium. *Brain Res.* 1982, 241
 (1), 49–55. https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)91227-6.
- (23) Butt, A. M.; Jones, H. C.; Abbott, N. J. Electrical Resistance across the Blood-Brain Barrier in Anaesthetized Rats: A Developmental Study. J. Physiol. 1990, 429 (1), 47–62. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1990.sp018243.
- (24) Benson, K.; Cramer, S.; Galla, H.-J. Impedance-Based Cell Monitoring: Barrier Properties and Beyond. *Fluids Barriers CNS* **2013**, *10* (1), 5. https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-5.
- (25) Bauer, H. C.; 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.* 2011, *118* (1), 7–21. https://doi.org/10.1007/s00702-010-0484-6.
- (26) Traweger, A.; Toepfer, S.; Wagner, R. N.; Zweimueller-Mayer, J.; Gehwolf, R.; Lehner, C.; Tempfer, H.; Krizbai, I.; Wilhelm, I.; Bauer, H.-C.; Bauer, H. Beyond Cell-Cell Adhesion: Emerging Roles of the Tight Junction Scaffold ZO-2. *Tissue Barriers* **2013**, *1* (2), e25039. https://doi.org/10.4161/tisb.25039.
- (27) Bauer, H.-C.; Krizbai, I. A.; Bauer, H.; Traweger, A. "You Shall Not Pass"-Tight Junctions of the Blood Brain Barrier. *Front. Neurosci.* **2014**, *8*, 392. https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00392.
- (28) Dejana, E.; Orsenigo, F.; Molendini, C.; Baluk, P.; McDonald, D. M. Organization and Signaling of Endothelial Cell-to-Cell Junctions in Various Regions of the Blood and Lymphatic Vascular Trees. *Cell Tissue Res.* 2009, 335 (1), 17–25. https://doi.org/10.1007/s00441-008-0694-5.
- (29) Taddei, A.; Giampietro, C.; Conti, A.; Orsenigo, F.; Breviario, F.; Pirazzoli, V.; Potente, M.; Daly, C.; Dimmeler, S.; Dejana, E. Endothelial Adherens Junctions Control Tight Junctions by VE-Cadherin-Mediated Upregulation of Claudin-5. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10* (8), 923–934. https://doi.org/10.1038/ncb1752.

- (30) Gasparics, Á.; Rosivall, L.; Krizbai, I. A.; Sebe, A. When the Endothelium Scores an Own Goal: Endothelial Cells Actively Augment Metastatic Extravasation through Endothelial-Mesenchymal Transition. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 2016, 310 (9), H1055–H1063. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00042.2016.
- (31) Ben-Zvi, A.; Lacoste, B.; Kur, E.; Andreone, B. J.; Mayshar, Y.; Yan, H.; Gu, C. Mfsd2a Is Critical for the Formation and Function of the Blood–Brain Barrier. *Nature* **2014**, *509* (7501), 507–511. https://doi.org/10.1038/nature13324.
- (32) Nguyen, L. N.; Ma, D.; Shui, G.; Wong, P.; Cazenave-Gassiot, A.; Zhang, X.; Wenk, M. R.; Goh, E. L. K.; Silver, D. L. Mfsd2a Is a Transporter for the Essential Omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid. *Nature* 2014, 509 (7501), 503–506. https://doi.org/10.1038/nature13241.
- (33) Matsuoka, R. L.; Buck, L. D.; Vajrala, K. P.; Quick, R. E.; Card, O. A. Historical and Current Perspectives on Blood Endothelial Cell Heterogeneity in the Brain. *Cell. Mol. Life Sci.* **2022**, *79* (7), 372. https://doi.org/10.1007/s00018-022-04403-1.
- (34) Ge, S.; Song, L.; Pachter, J. S. Where Is the Blood-Brain Barrier ? Really? *J. Neurosci. Res.* **2005**, *79* (4), 421–427. https://doi.org/10.1002/jnr.20313.
- (35) Prockop, L. D.; Naidu, K. A.; Binard, J. E.; Ransohoff, J. Selective Permeability of [³ H]-D-Mannitol and [¹⁴ C]-Carboxyl-Lnulin Across the Blood-Brain Barrier and Blood-Spinal Cord Barrier in the Rabbit. *J. Spinal Cord Med.* **1995**, *18* (4), 221–226. https://doi.org/10.1080/10790268.1995.11719399.
- (36) Ge, S.; Pachter, J. S. Isolation and Culture of Microvascular Endothelial Cells from Murine Spinal Cord. *J. Neuroimmunol.* **2006**, *177* (1–2), 209–214. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.05.012.
- (37) Winkler, E. A.; Sengillo, J. D.; Bell, R. D.; Wang, J.; Zlokovic, B. V. Blood–Spinal Cord Barrier Pericyte Reductions Contribute to Increased Capillary Permeability. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2012**, *32* (10), 1841–1852. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.113.
- (38) Winkler, E. A.; Bell, R. D.; Zlokovic, B. V. Central Nervous System Pericytes in Health and Disease. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14* (11), 1398–1405. https://doi.org/10.1038/nn.2946.
- (39) Hartmann, D. A.; Underly, R. G.; Grant, R. I.; Watson, A. N.; Lindner, V.; Shih, A. Y. Pericyte Structure and Distribution in the Cerebral Cortex Revealed by High-Resolution Imaging of Transgenic Mice. *Neurophotonics* **2015**, *2* (4), 041402. https://doi.org/10.1117/1.NPh.2.4.041402.
- (40) Berthiaume, A.-A.; Hartmann, D. A.; Majesky, M. W.; Bhat, N. R.; Shih, A. Y. Pericyte Structural Remodeling in Cerebrovascular Health and Homeostasis. *Front. Aging Neurosci.* 2018, 10, 210. https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00210.
- (41) Vanlandewijck, M.; He, L.; Mäe, M. A.; Andrae, J.; Ando, K.; Del Gaudio, F.; Nahar, K.; Lebouvier, T.; Laviña, B.; Gouveia, L.; Sun, Y.; Raschperger, E.; Räsänen, M.; Zarb, Y.; Mochizuki, N.; Keller, A.; Lendahl, U.; Betsholtz, C. A Molecular Atlas of Cell Types and Zonation in the Brain Vasculature. *Nature* **2018**, *554* (7693), 475–480. https://doi.org/10.1038/nature25739.
- (42) Alarcon-Martinez, L.; Yilmaz-Ozcan, S.; Yemisci, M.; Schallek, J.; Kılıç, K.; Can, A.; Di Polo, A.; Dalkara, T. Capillary Pericytes Express α-Smooth Muscle Actin, Which Requires Prevention of Filamentous-Actin Depolymerization for Detection. *eLife* 2018, 7, e34861. https://doi.org/10.7554/eLife.34861.
- (43) Hellström, M.; Gerhardt, H.; Kalén, M.; Li, X.; Eriksson, U.; Wolburg, H.; Betsholtz, C. Lack of Pericytes Leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis. J. Cell Biol. 2001, 153 (3), 543–554. https://doi.org/10.1083/jcb.153.3.543.

- (44) Thomsen, M. S.; Routhe, L. J.; Moos, T. The Vascular Basement Membrane in the Healthy and Pathological Brain. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2017, 37 (10), 3300–3317. https://doi.org/10.1177/0271678X17722436.
- (45) Armulik, A.; Genové, G.; Mäe, M.; Nisancioglu, M. H.; Wallgard, E.; Niaudet, C.; He, L.; Norlin, J.; Lindblom, P.; Strittmatter, K.; Johansson, B. R.; Betsholtz, C. Pericytes Regulate the Blood–Brain Barrier. *Nature* **2010**, *468* (7323), 557–561. https://doi.org/10.1038/nature09522.
- (46) Daneman, R.; Zhou, L.; Kebede, A. A.; Barres, B. A. Pericytes Are Required for Blood–Brain Barrier Integrity during Embryogenesis. *Nature* 2010, 468 (7323), 562–566. https://doi.org/10.1038/nature09513.
- (47) Helms, H. C.; Abbott, N. J.; Burek, M.; Cecchelli, R.; Couraud, P.-O.; Deli, M. A.; Förster, C.; Galla, H. J.; Romero, I. A.; Shusta, E. V.; Stebbins, M. J.; Vandenhaute, E.; Weksler, B.; Brodin, B. In Vitro Models of the Blood–Brain Barrier: An Overview of Commonly Used Brain Endothelial Cell Culture Models and Guidelines for Their Use. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2016**, *36* (5), 862–890. https://doi.org/10.1177/0271678X16630991.
- (48) Sofroniew, M. V.; Vinters, H. V. Astrocytes: Biology and Pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **2010**, *119* (1), 7–35. https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8.
- (49) Escartin, C.; Galea, E.; Lakatos, A.; O'Callaghan, J. P.; Petzold, G. C.; Serrano-Pozo, A.; Steinhäuser, C.; Volterra, A.; Carmignoto, G.; Agarwal, A.; Allen, N. J.; Araque, A.; Barbeito, L.; Barzilai, A.; Bergles, D. E.; Bonvento, G.; Butt, A. M.; Chen, W.-T.; Cohen-Salmon, M.; Cunningham, C.; Deneen, B.; De Strooper, B.; Díaz-Castro, B.; Farina, C.; Freeman, M.; Gallo, V.; Goldman, J. E.; Goldman, S. A.; Götz, M.; Gutiérrez, A.; Haydon, P. G.; Heiland, D. H.; Hol, E. M.; Holt, M. G.; Iino, M.; Kastanenka, K. V.; Kettenmann, H.; Khakh, B. S.; Koizumi, S.; Lee, C. J.; Liddelow, S. A.; MacVicar, B. A.; Magistretti, P.; Messing, A.; Mishra, A.; Molofsky, A. V.; Murai, K. K.; Norris, C. M.; Okada, S.; Oliet, S. H. R.; Oliveira, J. F.; Panatier, A.; Parpura, V.; Pekna, M.; Pekny, M.; Pellerin, L.; Perea, G.; Pérez-Nievas, B. G.; Pfrieger, F. W.; Poskanzer, K. E.; Quintana, F. J.; Ransohoff, R. M.; Riquelme-Perez, M.; Robel, S.; Rose, C. R.; Rothstein, J. D.; Rouach, N.; Rowitch, D. H.; Semyanov, A.; Sirko, S.; Sontheimer, H.; Swanson, R. A.; Vitorica, J.; Wanner, I.-B.; Wood, L. B.; Wu, J.; Zheng, B.; Zimmer, E. R.; Zorec, R.; Sofroniew, M. V.; Verkhratsky, A. Reactive Astrocyte Nomenclature, Definitions, and Future Directions. *Nat. Neurosci.* 2021, *24* (3), 312–325. https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4.
- (50) Janzer, R. C.; Raff, M. C. Astrocytes Induce Blood–Brain Barrier Properties in Endothelial Cells. *Nature* **1987**, *325* (6101), 253–257. https://doi.org/10.1038/325253a0.
- (51) Paulson, O. B.; Newman, E. A. Does the Release of Potassium from Astrocyte Endfeet Regulate Cerebral Blood Flow? *Science* **1987**, *237* (4817), 896–898. https://doi.org/10.1126/science.3616619.
- (52) Allen, N. J.; Barres, B. A. Glia More than Just Brain Glue. *Nature* **2009**, *457* (7230), 675–677. https://doi.org/10.1038/457675a.
- (53) Heithoff, B. P.; George, K. K.; Phares, A. N.; Zuidhoek, I. A.; Munoz-Ballester, C.; Robel, S. Astrocytes Are Necessary for Blood–Brain Barrier Maintenance in the Adult Mouse Brain. *Glia* **2021**, *69* (2), 436– 472. https://doi.org/10.1002/glia.23908.
- (54) Dehouck, M.-P.; Méresse, S.; Delorme, P.; Fruchart, J.-C.; Cecchelli, R. An Easier, Reproducible, and Mass-Production Method to Study the Blood?Brain Barrier In Vitro. J. Neurochem. 1990, 54 (5), 1798– 1801. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb01236.x.

- (55) Thomsen, M. S.; Humle, N.; Hede, E.; Moos, T.; Burkhart, A.; Thomsen, L. B. The Blood-Brain Barrier Studied in Vitro across Species. *PLOS ONE* **2021**, *16* (3), e0236770. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236770.
- (56) Mathiisen, T. M.; Lehre, K. P.; Danbolt, N. C.; Ottersen, O. P. The Perivascular Astroglial Sheath Provides a Complete Covering of the Brain Microvessels: An Electron Microscopic 3D Reconstruction. *Glia* **2010**, *58* (9), 1094–1103. https://doi.org/10.1002/glia.20990.
- (57) Mills, W. A.; Woo, A. M.; Jiang, S.; Martin, J.; Surendran, D.; Bergstresser, M.; Kimbrough, I. F.; Eyo, U. B.; Sofroniew, M. V.; Sontheimer, H. Astrocyte Plasticity in Mice Ensures Continued Endfoot Coverage of Cerebral Blood Vessels Following Injury and Declines with Age. *Nat. Commun.* 2022, *13* (1), 1794. https://doi.org/10.1038/s41467-022-29475-2.
- (58) Lécuyer, M.-A.; Kebir, H.; Prat, A. Glial Influences on BBB Functions and Molecular Players in Immune Cell Trafficking. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **2016**, *1862* (3), 472–482. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.004.
- (59) Mi, H.; Haeberle, H.; Barres, B. A. Induction of Astrocyte Differentiation by Endothelial Cells. J. *Neurosci.* **2001**, *21* (5), 1538–1547. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-05-01538.2001.
- (60) Bonkowski, D.; Katyshev, V.; Balabanov, R. D.; Borisov, A.; Dore-Duffy, P. The CNS Microvascular Pericyte: Pericyte-Astrocyte Crosstalk in the Regulation of Tissue Survival. *Fluids Barriers CNS* 2011, 8 (1), 8. https://doi.org/10.1186/2045-8118-8-8.
- (61) Xu, L.; Nirwane, A.; Yao, Y. Basement Membrane and Blood–Brain Barrier. *Stroke Vasc. Neurol.* **2019**, 4 (2), 78–82. https://doi.org/10.1136/svn-2018-000198.
- (62) Parkhurst, C. N.; Yang, G.; Ninan, I.; Savas, J. N.; Yates, J. R.; Lafaille, J. J.; Hempstead, B. L.; Littman, D. R.; Gan, W.-B. Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* 2013, *155* (7), 1596–1609. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.030.
- (63) Thurgur, H.; Pinteaux, E. Microglia in the Neurovascular Unit: Blood–Brain Barrier–Microglia Interactions After Central Nervous System Disorders. *Neuroscience* **2019**, *405*, 55–67. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.06.046.
- (64) Haruwaka, K.; Ikegami, A.; Tachibana, Y.; Ohno, N.; Konishi, H.; Hashimoto, A.; Matsumoto, M.; Kato, D.; Ono, R.; Kiyama, H.; Moorhouse, A. J.; Nabekura, J.; Wake, H. Dual Microglia Effects on Blood Brain Barrier Permeability Induced by Systemic Inflammation. *Nat. Commun.* 2019, 10 (1), 5816. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13812-z.
- (65) Cserép, C.; Pósfai, B.; Lénárt, N.; Fekete, R.; László, Z. I.; Lele, Z.; Orsolits, B.; Molnár, G.; Heindl, S.; Schwarcz, A. D.; Ujvári, K.; Környei, Z.; Tóth, K.; Szabadits, E.; Sperlágh, B.; Baranyi, M.; Csiba, L.; Hortobágyi, T.; Maglóczky, Z.; Martinecz, B.; Szabó, G.; Erdélyi, F.; Szipőcs, R.; Tamkun, M. M.; Gesierich, B.; Duering, M.; Katona, I.; Liesz, A.; Tamás, G.; Dénes, Á. Microglia Monitor and Protect Neuronal Function through Specialized Somatic Purinergic Junctions. *Science* **2020**, *367* (6477), 528– 537. https://doi.org/10.1126/science.aax6752.
- (66) Császár, E.; Lénárt, N.; Cserép, C.; Környei, Z.; Fekete, R.; Pósfai, B.; Balázsfi, D.; Hangya, B.; Schwarcz, A. D.; Szabadits, E.; Szöllősi, D.; Szigeti, K.; Máthé, D.; West, B. L.; Sviatkó, K.; Brás, A. R.; Mariani, J.-C.; Kliewer, A.; Lenkei, Z.; Hricisák, L.; Benyó, Z.; Baranyi, M.; Sperlágh, B.; Menyhárt, Á.; Farkas, E.; Dénes, Á. Microglia Modulate Blood Flow, Neurovascular Coupling, and Hypoperfusion via Purinergic Actions. *J. Exp. Med.* 2022, *219* (3), e20211071. https://doi.org/10.1084/jem.20211071.

- (67) Kimura, I.; Dohgu, S.; Takata, F.; Matsumoto, J.; Watanabe, T.; Iwao, T.; Yamauchi, A.; Kataoka, Y. Oligodendrocytes Upregulate Blood-Brain Barrier Function through Mechanisms Other than the PDGF-BB/PDGFRα Pathway in the Barrier-Tightening Effect of Oligodendrocyte Progenitor Cells. *Neurosci. Lett.* **2020**, *715*, 134594. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134594.
- (68) Niu, J.; Tsai, H.-H.; Hoi, K. K.; Huang, N.; Yu, G.; Kim, K.; Baranzini, S. E.; Xiao, L.; Chan, J. R.; Fancy, S. P. J. Aberrant Oligodendroglial–Vascular Interactions Disrupt the Blood–Brain Barrier, Triggering CNS Inflammation. *Nat. Neurosci.* 2019, 22 (5), 709–718. https://doi.org/10.1038/s41593-019-0369-4.
- (69) Dorrier, C. E.; Jones, H. E.; Pintarić, L.; Siegenthaler, J. A.; Daneman, R. Emerging Roles for CNS Fibroblasts in Health, Injury and Disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2022, 23 (1), 23–34. https://doi.org/10.1038/s41583-021-00525-w.
- (70) Kaplan, L.; Chow, B. W.; Gu, C. Neuronal Regulation of the Blood–Brain Barrier and Neurovascular Coupling. *Nat. Rev. Neurosci.* **2020**, *21* (8), 416–432. https://doi.org/10.1038/s41583-020-0322-2.
- (71) Weidenfeller, C.; Svendsen, C. N.; Shusta, E. V. Differentiating Embryonic Neural Progenitor Cells Induce Blood?Brain Barrier Properties. J. Neurochem. 2007, 101 (2), 555–565. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04394.x.
- (72) Blanchette, M.; Daneman, R. Formation and Maintenance of the BBB. *Mech. Dev.* 2015, *138*, 8–16. https://doi.org/10.1016/j.mod.2015.07.007.
- (73) Costea, L.; Mészáros, Á.; Bauer, H.; Bauer, H.-C.; Traweger, A.; Wilhelm, I.; Farkas, A. E.; Krizbai, I. A. The Blood–Brain Barrier and Its Intercellular Junctions in Age-Related Brain Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20 (21), 5472. https://doi.org/10.3390/ijms20215472.
- (74) Nyúl-Tóth, Á.; Tarantini, S.; DelFavero, J.; Yan, F.; Balasubramanian, P.; Yabluchanskiy, A.; Ahire, C.; Kiss, T.; Csipo, T.; Lipecz, A.; Farkas, A. E.; Wilhelm, I.; Krizbai, I. A.; Tang, Q.; Csiszar, A.; Ungvari, Z. Demonstration of Age-Related Blood-Brain Barrier Disruption and Cerebromicrovascular Rarefaction in Mice by Longitudinal Intravital Two-Photon Microscopy and Optical Coherence Tomography. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2021, 320 (4), H1370–H1392. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00709.2020.
- (75) Ransohoff, R. M.; Schafer, D.; Vincent, A.; Blachère, N. E.; Bar-Or, A. Neuroinflammation: Ways in Which the Immune System Affects the Brain. *Neurotherapeutics* **2015**, *12* (4), 896–909. https://doi.org/10.1007/s13311-015-0385-3.
- (76) Engelhardt, B.; Vajkoczy, P.; Weller, R. O. The Movers and Shapers in Immune Privilege of the CNS. *Nat. Immunol.* **2017**, *18* (2), 123–131. https://doi.org/10.1038/ni.3666.
- (77) Shechter, R.; London, A.; Schwartz, M. Orchestrated Leukocyte Recruitment to Immune-Privileged Sites: Absolute Barriers versus Educational Gates. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13* (3), 206–218. https://doi.org/10.1038/nri3391.
- (78) Rustenhoven, J.; Kipnis, J. Brain Borders at the Central Stage of Neuroimmunology. *Nature* **2022**, *612* (7940), 417–429. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05474-7.
- (79) Engelhardt, B.; Comabella, M.; Chan, A. Multiple Sclerosis: Immunopathological Heterogeneity and Its Implications. *Eur. J. Immunol.* **2022**, *52* (6), 869–881. https://doi.org/10.1002/eji.202149757.
- (80) Rossi, B.; Santos-Lima, B.; Terrabuio, E.; Zenaro, E.; Constantin, G. Common Peripheral Immunity Mechanisms in Multiple Sclerosis and Alzheimer's Disease. *Front. Immunol.* 2021, 12, 639369. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.639369.

- (81) Planas, A. M. Role of Immune Cells Migrating to the Ischemic Brain. *Stroke* **2018**, *49* (9), 2261–2267. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.021474.
- (82) Alam, A.; Thelin, E. P.; Tajsic, T.; Khan, D. Z.; Khellaf, A.; Patani, R.; Helmy, A. Cellular Infiltration in Traumatic Brain Injury. *J. Neuroinflammation* **2020**, *17* (1), 328. https://doi.org/10.1186/s12974-020-02005-x.
- (83) Rochfort, K. D.; Cummins, P. M. The Blood–Brain Barrier Endothelium: A Target for pro-Inflammatory Cytokines. *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43* (4), 702–706. https://doi.org/10.1042/BST20140319.
- (84) Verma, S.; Nakaoke, R.; Dohgu, S.; Banks, W. A. Release of Cytokines by Brain Endothelial Cells: A Polarized Response to Lipopolysaccharide. *Brain. Behav. Immun.* 2006, 20 (5), 449–455. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2005.10.005.
- (85) Smyth, L. C. D.; Rustenhoven, J.; Park, T. I.-H.; Schweder, P.; Jansson, D.; Heppner, P. A.; O'Carroll, S. J.; Mee, E. W.; Faull, R. L. M.; Curtis, M.; Dragunow, M. Unique and Shared Inflammatory Profiles of Human Brain Endothelia and Pericytes. *J. Neuroinflammation* 2018, 15 (1), 138. https://doi.org/10.1186/s12974-018-1167-8.
- (86) Marchetti, L.; Engelhardt, B. Immune Cell Trafficking across the Blood-Brain Barrier in the Absence and Presence of Neuroinflammation. *Vasc. Biol.* 2020, 2 (1), H1–H18. https://doi.org/10.1530/VB-19-0033.
- (87) Guijarro-Muñoz, I.; Compte, M.; Álvarez-Cienfuegos, A.; Álvarez-Vallina, L.; Sanz, L. Lipopolysaccharide Activates Toll-like Receptor 4 (TLR4)-Mediated NF-κB Signaling Pathway and Proinflammatory Response in Human Pericytes. J. Biol. Chem. 2014, 289 (4), 2457–2468. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.521161.
- (88) Matsumoto, J.; Takata, F.; Machida, T.; Takahashi, H.; Soejima, Y.; Funakoshi, M.; Futagami, K.; Yamauchi, A.; Dohgu, S.; Kataoka, Y. Tumor Necrosis Factor-α-Stimulated Brain Pericytes Possess a Unique Cytokine and Chemokine Release Profile and Enhance Microglial Activation. *Neurosci. Lett.* **2014**, *578*, 133–138. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.06.052.
- (89) Chen, G. Y.; Nuñez, G. Sterile Inflammation: Sensing and Reacting to Damage. *Nat. Rev. Immunol.* 2010, 10 (12), 826–837. https://doi.org/10.1038/nri2873.
- (90) Denk, S.; Perl, M.; Huber-Lang, M. Damage- and Pathogen-Associated Molecular Patterns and Alarmins: Keys to Sepsis? *Eur. Surg. Res.* **2012**, *48* (4), 171–179. https://doi.org/10.1159/000338194.
- (91) Li, D.; Wu, M. Pattern Recognition Receptors in Health and Diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6* (1), 291. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00687-0.
- (92) Geijtenbeek, T. B. H.; Gringhuis, S. I. Signalling through C-Type Lectin Receptors: Shaping Immune Responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9* (7), 465–479. https://doi.org/10.1038/nri2569.
- (93) Rehwinkel, J.; Gack, M. U. RIG-I-like Receptors: Their Regulation and Roles in RNA Sensing. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20* (9), 537–551. https://doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3.
- (94) Brunette, R. L.; Young, J. M.; Whitley, D. G.; Brodsky, I. E.; Malik, H. S.; Stetson, D. B. Extensive Evolutionary and Functional Diversity among Mammalian AIM2-like Receptors. J. Exp. Med. 2012, 209 (11), 1969–1983. https://doi.org/10.1084/jem.20121960.
- (95) Kawasaki, T.; Kawai, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* **2014**, *5*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461.

- (96) Piccinini, A. M.; Midwood, K. S. DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators Inflamm.* **2010**, *2010*, 1–21. https://doi.org/10.1155/2010/672395.
- (97) Deguine, J.; Barton, G. M. MyD88: A Central Player in Innate Immune Signaling. *F1000Prime Rep.* **2014**, *6*. https://doi.org/10.12703/P6-97.
- (98) Lee, H.; Lee, S.; Cho, I.-H.; Joong Lee, S. Toll-Like Receptors: Sensor Molecules for Detecting Damage to the Nervous System. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2013, 14 (1), 33–42. https://doi.org/10.2174/1389203711314010006.
- (99) Nagyőszi, P.; Wilhelm, I.; Farkas, A. E.; Fazakas, C.; Dung, N. T. K.; Haskó, J.; Krizbai, I. A. Expression and Regulation of Toll-like Receptors in Cerebral Endothelial Cells. *Neurochem. Int.* 2010, 57 (5), 556– 564. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.07.002.
- (100) Veszelka, S.; Pásztói, M.; Farkas, A. E.; Krizbai, I.; Dung, N. T. K.; Niwa, M.; Ábrahám, C. S.; Deli, M. A. Pentosan Polysulfate Protects Brain Endothelial Cells against Bacterial Lipopolysaccharide-Induced Damages. *Neurochem. Int.* 2007, *50* (1), 219–228. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.08.006.
- (101) Fischer, S.; Nishio, M.; Peters, S. C.; Tschernatsch, M.; Walberer, M.; Weidemann, S.; Heidenreich, R.; Couraud, P. O.; Weksler, B. B.; Romero, I. A.; Gerriets, T.; Preissner, K. T. Signaling Mechanism of Extracellular RNA in Endothelial Cells. *FASEB J.* 2009, 23 (7), 2100–2109. https://doi.org/10.1096/fj.08-121608.
- (102) Johnson, R. H.; Kho, D. T.; O' Carroll, S. J.; Angel, C. E.; Graham, E. S. The Functional and Inflammatory Response of Brain Endothelial Cells to Toll-Like Receptor Agonists. *Sci. Rep.* 2018, 8 (1), 10102. https://doi.org/10.1038/s41598-018-28518-3.
- (103) Kumar, V. Toll-like Receptors in the Pathogenesis of Neuroinflammation. *J. Neuroimmunol.* **2019**, *332*, 16–30. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.03.012.
- (104) Shaw, M. H.; Reimer, T.; Kim, Y.-G.; Nuñez, G. NOD-like Receptors (NLRs): Bona Fide Intracellular Microbial Sensors. *Curr. Opin. Immunol.* 2008, 20 (4), 377–382. https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.06.001.
- (105) Danis, J.; Mellett, M. Nod-Like Receptors in Host Defence and Disease at the Epidermal Barrier. Int. J. Mol. Sci. **2021**, 22 (9), 4677. https://doi.org/10.3390/ijms22094677.
- (106) Keestra-Gounder, A. M.; Tsolis, R. M. NOD1 and NOD2: Beyond Peptidoglycan Sensing. *Trends Immunol.* 2017, 38 (10), 758–767. https://doi.org/10.1016/j.it.2017.07.004.
- (107) Reyes Ruiz, V. M.; Ramirez, J.; Naseer, N.; Palacio, N. M.; Siddarthan, I. J.; Yan, B. M.; Boyer, M. A.; Pensinger, D. A.; Sauer, J.-D.; Shin, S. Broad Detection of Bacterial Type III Secretion System and Flagellin Proteins by the Human NAIP/NLRC4 Inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017, 114 (50), 13242–13247. https://doi.org/10.1073/pnas.1710433114.
- (108) Naseer, N.; Egan, M. S.; Reyes Ruiz, V. M.; Scott, W. P.; Hunter, E. N.; Demissie, T.; Rauch, I.; Brodsky, I. E.; Shin, S. Human NAIP/NLRC4 and NLRP3 Inflammasomes Detect Salmonella Type III Secretion System Activities to Restrict Intracellular Bacterial Replication. *PLOS Pathog.* 2022, 18 (1), e1009718. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009718.
- (109) Broz, P.; Dixit, V. M. Inflammasomes: Mechanism of Assembly, Regulation and Signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16* (7), 407–420. https://doi.org/10.1038/nri.2016.58.

- (110) Gasteiger, G.; D'Osualdo, A.; Schubert, D. A.; Weber, A.; Bruscia, E. M.; Hartl, D. Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. J. Innate Immun. 2017, 9 (2), 111–125. https://doi.org/10.1159/000453397.
- (111) Kong, X.; Yuan, Z.; Cheng, J. The Function of NOD-like Receptors in Central Nervous System Diseases: NLRs in the CNS Diseases. J. Neurosci. Res. 2017, 95 (8), 1565–1573. https://doi.org/10.1002/jnr.24004.
- (112) Girvin, A. M.; Gordon, K. B.; Welsh, C. J.; Clipstone, N. A.; Miller, S. D. Differential Abilities of Central Nervous System Resident Endothelial Cells and Astrocytes to Serve as Inducible Antigen-Presenting Cells. *Blood* **2002**, *99* (10), 3692–3701. https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0229.
- Reimer, T.; Shaw, M. H.; Franchi, L.; Coban, C.; Ishii, K. J.; Akira, S.; Horii, T.; Rodriguez, A.; Núñez, G. Experimental Cerebral Malaria Progresses Independently of the NIrp3 Inflammasome. *Eur. J. Immunol.* 2010, 40 (3), 764–769. https://doi.org/10.1002/eji.200939996.
- (114) Navarro, R.; Delgado-Wicke, P.; Nuñez-Prado, N.; Compte, M.; Blanco-Toribio, A.; Nuñez, G.; Álvarez-Vallina, L.; Sanz, L. Role of Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1 (NOD1) in Pericyte-Mediated Vascular Inflammation. *J. Cell. Mol. Med.* **2016**, *20* (5), 980–986. https://doi.org/10.1111/jcmm.12804.
- (115) Gharagozloo, M.; Gris, K. V.; Mahvelati, T.; Amrani, A.; Lukens, J. R.; Gris, D. NLR-Dependent Regulation of Inflammation in Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* **2018**, *8*, 2012. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.02012.
- (116) Martinon, F.; Burns, K.; Tschopp, J. The Inflammasome. *Mol. Cell* **2002**, *10* (2), 417–426. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3.
- (117) Yu, P.; Zhang, X.; Liu, N.; Tang, L.; Peng, C.; Chen, X. Pyroptosis: Mechanisms and Diseases. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6* (1), 128. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00507-5.
- (118) Bulau, A.-M.; Nold, M. F.; Li, S.; Nold-Petry, C. A.; Fink, M.; Mansell, A.; Schwerd, T.; Hong, J.; Rubartelli, A.; Dinarello, C. A.; Bufler, P. Role of Caspase-1 in Nuclear Translocation of IL-37, Release of the Cytokine, and IL-37 Inhibition of Innate Immune Responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014, 111 (7), 2650–2655. https://doi.org/10.1073/pnas.1324140111.
- (119) Talabot-Ayer, D.; Lamacchia, C.; Gabay, C.; Palmer, G. Interleukin-33 Is Biologically Active Independently of Caspase-1 Cleavage. J. Biol. Chem. 2009, 284 (29), 19420–19426. https://doi.org/10.1074/jbc.M901744200.
- (120) Carriere, J.; Dorfleutner, A.; Stehlik, C. NLRP7: From Inflammasome Regulation to Human Disease. *Immunology* **2021**, *163* (4), 363–376. https://doi.org/10.1111/imm.13372.
- (121) Sborgi, L.; Ravotti, F.; Dandey, V. P.; Dick, M. S.; Mazur, A.; Reckel, S.; Chami, M.; Scherer, S.; Huber, M.; Böckmann, A.; Egelman, E. H.; Stahlberg, H.; Broz, P.; Meier, B. H.; Hiller, S. Structure and Assembly of the Mouse ASC Inflammasome by Combined NMR Spectroscopy and Cryo-Electron Microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015, *112* (43), 13237–13242. https://doi.org/10.1073/pnas.1507579112.
- (122) Dick, M. S.; Sborgi, L.; Rühl, S.; Hiller, S.; Broz, P. ASC Filament Formation Serves as a Signal Amplification Mechanism for Inflammasomes. *Nat. Commun.* 2016, 7 (1), 11929. https://doi.org/10.1038/ncomms11929.

- (123) Lamkanfi, M.; Dixit, V. M. The Inflammasome Turns 15. *Nature* **2017**, *548* (7669), 534–535. https://doi.org/10.1038/548534a.
- (124) Swanson, K. V.; Deng, M.; Ting, J. P.-Y. The NLRP3 Inflammasome: Molecular Activation and Regulation to Therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* **2019**, *19* (8), 477–489. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0.
- (125) Groß, C. J.; Mishra, R.; Schneider, K. S.; Médard, G.; Wettmarshausen, J.; Dittlein, D. C.; Shi, H.; Gorka, O.; Koenig, P.-A.; Fromm, S.; Magnani, G.; Ćiković, T.; Hartjes, L.; Smollich, J.; Robertson, A. A. B.; Cooper, M. A.; Schmidt-Supprian, M.; Schuster, M.; Schroder, K.; Broz, P.; Traidl-Hoffmann, C.; Beutler, B.; Kuster, B.; Ruland, J.; Schneider, S.; Perocchi, F.; Groß, O. K + Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity* 2016, *45* (4), 761–773. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.010.
- (126) He, Y.; Zeng, M. Y.; Yang, D.; Motro, B.; Núñez, G. NEK7 Is an Essential Mediator of NLRP3 Activation Downstream of Potassium Efflux. *Nature* **2016**, *530* (7590), 354–357. https://doi.org/10.1038/nature16959.
- (127) Kayagaki, N.; Warming, S.; Lamkanfi, M.; Walle, L. V.; Louie, S.; Dong, J.; Newton, K.; Qu, Y.; Liu, J.; Heldens, S.; Zhang, J.; Lee, W. P.; Roose-Girma, M.; Dixit, V. M. Non-Canonical Inflammasome Activation Targets Caspase-11. *Nature* 2011, 479 (7371), 117–121. https://doi.org/10.1038/nature10558.
- (128) Shi, J.; Zhao, Y.; Wang, Y.; Gao, W.; Ding, J.; Li, P.; Hu, L.; Shao, F. Inflammatory Caspases Are Innate Immune Receptors for Intracellular LPS. *Nature* **2014**, *514* (7521), 187–192. https://doi.org/10.1038/nature13683.
- (129) Chan, A. H.; Schroder, K. Inflammasome Signaling and Regulation of Interleukin-1 Family Cytokines. J. Exp. Med. 2020, 217 (1), e20190314. https://doi.org/10.1084/jem.20190314.
- (130) Carvalho, R. V. H.; Silva, A. L. N.; Santos, L. L.; Andrade, W. A.; Sá, K. S. G.; Zamboni, D. S. Macrophage Priming Is Dispensable for NLRP3 Inflammasome Activation and Restriction of *Leishmania Amazonensis* Replication. *J. Leukoc. Biol.* **2019**, *106* (3), 631–640. https://doi.org/10.1002/JLB.MA1118-471R.
- (131) Netea, M. G.; van de Veerdonk, F. L.; van der Meer, J. W. M.; Dinarello, C. A.; Joosten, L. A. B. Inflammasome-Independent Regulation of IL-1-Family Cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* **2015**, *33* (1), 49–77. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112306.
- (132) Lénárt, N.; Brough, D.; Dénes, Á. Inflammasomes Link Vascular Disease with Neuroinflammation and Brain Disorders. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2016, 36 (10), 1668–1685. https://doi.org/10.1177/0271678X16662043.
- (133) Heneka, M. T.; McManus, R. M.; Latz, E. Inflammasome Signalling in Brain Function and Neurodegenerative Disease. Nat. Rev. Neurosci. 2018, 19 (10), 610–621. https://doi.org/10.1038/s41583-018-0055-7.
- (134) Xiao, H.; Lu, M.; Lin, T. Y.; Chen, Z.; Chen, G.; Wang, W.-C.; Marin, T.; Shentu, T.; Wen, L.; Gongol, B.; Sun, W.; Liang, X.; Chen, J.; Huang, H.-D.; Pedra, J. H. F.; Johnson, D. A.; Shyy, J. Y.-J. Sterol Regulatory Element Binding Protein 2 Activation of NLRP3 Inflammasome in Endothelium Mediates Hemodynamic-Induced Atherosclerosis Susceptibility. *Circulation* 2013, *128* (6), 632–642. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002714.

- (135) Leaf, I. A.; Nakagawa, S.; Johnson, B. G.; Cha, J. J.; Mittelsteadt, K.; Guckian, K. M.; Gomez, I. G.; Altemeier, W. A.; Duffield, J. S. Pericyte MyD88 and IRAK4 Control Inflammatory and Fibrotic Responses to Tissue Injury. J. Clin. Invest. 2016, 127 (1), 321–334. https://doi.org/10.1172/JCl87532.
- (136) Ising, C.; Venegas, C.; Zhang, S.; Scheiblich, H.; Schmidt, S. V.; Vieira-Saecker, A.; Schwartz, S.; Albasset, S.; McManus, R. M.; Tejera, D.; Griep, A.; Santarelli, F.; Brosseron, F.; Opitz, S.; Stunden, J.; Merten, M.; Kayed, R.; Golenbock, D. T.; Blum, D.; Latz, E.; Buée, L.; Heneka, M. T. NLRP3 Inflammasome Activation Drives Tau Pathology. *Nature* 2019, *575* (7784), 669–673. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1769-z.
- (137) Scheiblich, H.; Bousset, L.; Schwartz, S.; Griep, A.; Latz, E.; Melki, R.; Heneka, M. T. Microglial NLRP3 Inflammasome Activation upon TLR2 and TLR5 Ligation by Distinct α-Synuclein Assemblies. J. Immunol. 2021, 207 (8), 2143–2154. https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100035.
- (138) Govindarajan, V.; de Rivero Vaccari, J. P.; Keane, R. W. Role of Inflammasomes in Multiple Sclerosis and Their Potential as Therapeutic Targets. J. Neuroinflammation 2020, 17 (1), 260. https://doi.org/10.1186/s12974-020-01944-9.
- (139) Gülke, E.; Gelderblom, M.; Magnus, T. Danger Signals in Stroke and Their Role on Microglia Activation after Ischemia. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2018**, *11*, 175628641877425. https://doi.org/10.1177/1756286418774254.
- (140) Freeman, L.; Guo, H.; David, C. N.; Brickey, W. J.; Jha, S.; Ting, J. P.-Y. NLR Members NLRC4 and NLRP3 Mediate Sterile Inflammasome Activation in Microglia and Astrocytes. *J. Exp. Med.* 2017, 214 (5), 1351–1370. https://doi.org/10.1084/jem.20150237.
- (141) Denes, A.; Coutts, G.; Lénárt, N.; Cruickshank, S. M.; Pelegrin, P.; Skinner, J.; Rothwell, N.; Allan, S. M.; Brough, D. AIM2 and NLRC4 Inflammasomes Contribute with ASC to Acute Brain Injury Independently of NLRP3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015, 112 (13), 4050–4055. https://doi.org/10.1073/pnas.1419090112.
- (142) Minkiewicz, J.; de Rivero Vaccari, J. P.; Keane, R. W. Human Astrocytes Express a Novel NLRP2 Inflammasome: The NLRP2 Inflammasome Activated by ATP. *Glia* **2013**, *61* (7), 1113–1121. https://doi.org/10.1002/glia.22499.
- (143) Ducza, L.; Szücs, P.; Hegedűs, K.; Bakk, E.; Gajtkó, A.; Wéber, I.; Holló, K. NLRP2 Is Overexpressed in Spinal Astrocytes at the Peak of Mechanical Pain Sensitivity during Complete Freund Adjuvant-Induced Persistent Pain. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (21), 11408. https://doi.org/10.3390/ijms222111408.
- (144) Kaushal, V.; Dye, R.; Pakavathkumar, P.; Foveau, B.; Flores, J.; Hyman, B.; Ghetti, B.; Koller, B. H.; LeBlanc, A. C. Neuronal NLRP1 Inflammasome Activation of Caspase-1 Coordinately Regulates Inflammatory Interleukin-1-Beta Production and Axonal Degeneration-Associated Caspase-6 Activation. *Cell Death Differ.* 2015, *22* (10), 1676–1686. https://doi.org/10.1038/cdd.2015.16.
- (145) Yap, J. K. Y.; Pickard, B. S.; Chan, E. W. L.; Gan, S. Y. The Role of Neuronal NLRP1 Inflammasome in Alzheimer's Disease: Bringing Neurons into the Neuroinflammation Game. *Mol. Neurobiol.* 2019, 56 (11), 7741–7753. https://doi.org/10.1007/s12035-019-1638-7.
- (146) Mejias, N. H.; Martinez, C. C.; Stephens, M. E.; de Rivero Vaccari, J. P. Contribution of the Inflammasome to Inflammaging. J. Inflamm. 2018, 15 (1), 23. https://doi.org/10.1186/s12950-018-0198-3.

- (147) Mawhinney, L. J.; de Rivero Vaccari, J. P.; Dale, G. A.; Keane, R. W.; Bramlett, H. M. Heightened Inflammasome Activation Is Linked to Age-Related Cognitive Impairment in Fischer 344 Rats. *BMC Neurosci.* 2011, *12* (1), 123. https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-123.
- (148) Sharma, B. R.; Kanneganti, T.-D. NLRP3 Inflammasome in Cancer and Metabolic Diseases. *Nat. Immunol.* **2021**, *22* (5), 550–559. https://doi.org/10.1038/s41590-021-00886-5.
- (149) Rolim, G. B.; Dantas Lima, A. J. P.; dos Santos Cardoso, V. I.; de Fátima Machado Soares, É.; Nunes, D. N.; Barros, H. C. S.; Leite, A. B.; Alexandre-Moreira, M. S.; Duarte, A. W. F.; de Sales Marques, C.; de Carvalho Fraga, C. A.; de Queiroz, A. C. Can Inflammasomes Promote the Pathophysiology of Glioblastoma Multiforme? A View about the Potential of the Anti-Inflammasome Therapy as Pharmacological Target. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2022**, *172*, 103641. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103641.
- (150) Gondi, V.; Mehta, M. P. Novel Insights into the Management of Brain Metastases: *Curr. Opin. Neurol.* 2010, 23 (6), 556–562. https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32833f8cb5.
- (151) Nayak, L.; Lee, E. Q.; Wen, P. Y. Epidemiology of Brain Metastases. *Curr. Oncol. Rep.* 2012, 14 (1), 48–54. https://doi.org/10.1007/s11912-011-0203-y.
- (152) Platta, C. S.; Khuntia, D.; Mehta, M. P.; Suh, J. H. Current Treatment Strategies for Brain Metastasis and Complications From Therapeutic Techniques: A Review of Current Literature. Am. J. Clin. Oncol. 2010, 33 (4), 398–407. https://doi.org/10.1097/COC.0b013e318194f744.
- (153) Péchoux, C. L.; Sun, A.; Slotman, B. J.; De Ruysscher, D.; Belderbos, J.; Gore, E. M. Prophylactic Cranial Irradiation for Patients with Lung Cancer. *Lancet Oncol.* **2016**, *17* (7), e277–e293. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30065-1.
- (154) Rostami, R.; Mittal, S.; Rostami, P.; Tavassoli, F.; Jabbari, B. Brain Metastasis in Breast Cancer: A Comprehensive Literature Review. J. Neurooncol. 2016, 127 (3), 407–414. https://doi.org/10.1007/s11060-016-2075-3.
- (155) Sperduto, P. W.; Mesko, S.; Li, J.; Cagney, D.; Aizer, A.; Lin, N. U.; Nesbit, E.; Kruser, T. J.; Chan, J.; Braunstein, S.; Lee, J.; Kirkpatrick, J. P.; Breen, W.; Brown, P. D.; Shi, D.; Shih, H. A.; Soliman, H.; Sahgal, A.; Shanley, R.; Sperduto, W.; Lou, E.; Everett, A.; Boggs, D. H.; Masucci, L.; Roberge, D.; Remick, J.; Plichta, K.; Buatti, J. M.; Jain, S.; Gaspar, L. E.; Wu, C.-C.; Wang, T. J. C.; Bryant, J.; Chuong, M.; Yu, J.; Chiang, V.; Nakano, T.; Aoyama, H.; Mehta, M. P. Estrogen/Progesterone Receptor and HER2 Discordance between Primary Tumor and Brain Metastases in Breast Cancer and Its Effect on Treatment and Survival. Neuro-Oncol. 2020, 22 1359-1367. (9), https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa025.
- (156) Kuksis, M.; Gao, Y.; Tran, W.; Hoey, C.; Kiss, A.; Komorowski, A. S.; Dhaliwal, A. J.; Sahgal, A.; Das, S.; Chan, K. K.; Jerzak, K. J. The Incidence of Brain Metastases among Patients with Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuro-Oncol.* 2021, 23 (6), 894–904. https://doi.org/10.1093/neuonc/noaa285.
- (157) Cohen, J. V.; Tawbi, H.; Margolin, K. A.; Amravadi, R.; Bosenberg, M.; Brastianos, P. K.; Chiang, V. L.; de Groot, J.; Glitza, I. C.; Herlyn, M.; Holmen, S. L.; Jilaveanu, L. B.; Lassman, A.; Moschos, S.; Postow, M. A.; Thomas, R.; Tsiouris, J. A.; Wen, P.; White, R. M.; Turnham, T.; Davies, M. A.; Kluger, H. M. Melanoma Central Nervous System Metastases: Current Approaches, Challenges, and Opportunities. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016, 29 (6), 627–642. https://doi.org/10.1111/pcmr.12538.

- (158) Sloan, A. E.; Nock, C. J.; Einstein, D. B. Diagnosis and Treatment of Mela-Noma Brain Metastasis:
 A Literature Review. *Cancer Control* 2009, 16 (3), 248–255. https://doi.org/10.1177/107327480901600307.
- (159) Tas, F. Metastatic Behavior in Melanoma: Timing, Pattern, Survival, and Influencing Factors. J. Oncol. **2012**, 2012, 1–9. https://doi.org/10.1155/2012/647684.
- (160) D'Antonio, C.; Passaro, A.; Gori, B.; Del Signore, E.; Migliorino, M. R.; Ricciardi, S.; Fulvi, A.; de Marinis, F. Bone and Brain Metastasis in Lung Cancer: Recent Advances in Therapeutic Strategies. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2014**, *6* (3), 101–114. https://doi.org/10.1177/1758834014521110.
- (161) Steindl, A.; Schlieter, F.; Klikovits, T.; Leber, E.; Gatterbauer, B.; Frischer, J. M.; Dieckmann, K.; Widhalm, G.; Zöchbauer-Müller, S.; Hoda, M. A. R.; Preusser, M.; Berghoff, A. S. Prognostic Assessment in Patients with Newly Diagnosed Small Cell Lung Cancer Brain Metastases: Results from a Real-Life Cohort. J. Neurooncol. 2019, 145 (1), 85–95. https://doi.org/10.1007/s11060-019-03269x.
- (162) Leone, J. P.; Lee, A. V.; Brufsky, A. M. Prognostic Factors and Survival of Patients with Brain Metastasis from Breast Cancer Who Underwent Craniotomy. *Cancer Med.* 2015, *4* (7), 989–994. https://doi.org/10.1002/cam4.439.
- (163) Noh, T.; Walbert, T. Brain Metastasis: Clinical Manifestations, Symptom Management, and Palliative Care. In *Handbook of Clinical Neurology*; Elsevier, 2018; Vol. 149, pp 75–88. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811161-1.00006-2.
- (164) Dou, Z.; Wu, J.; Wu, H.; Yu, Q.; Yan, F.; Jiang, B.; Li, B.; Xu, J.; Xie, Q.; Li, C.; Sun, C.; Chen, G. The Infratentorial Localization of Brain Metastases May Correlate with Specific Clinical Characteristics and Portend Worse Outcomes Based on Voxel-Wise Mapping. *Cancers* **2021**, *13* (2), 324. https://doi.org/10.3390/cancers13020324.
- (165) Franchino, F.; Rudà, R.; Soffietti, R. Mechanisms and Therapy for Cancer Metastasis to the Brain. Front. Oncol. 2018, 8, 161. https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00161.
- (166) Andres, K. H.; Doring, M.; Muszynski, K.; Schmidt, R. F. Nerve Fibres and Their Terminals of the Dura Mater Encephali of the Rat. *Anat. Embryol. (Berl.)* **1987**, *175* (3), 289–301. https://doi.org/10.1007/BF00309843.
- (167) Aspelund, A.; Antila, S.; Proulx, S. T.; Karlsen, T. V.; Karaman, S.; Detmar, M.; Wiig, H.; Alitalo, K. A Dural Lymphatic Vascular System That Drains Brain Interstitial Fluid and Macromolecules. *J. Exp. Med.* 2015, *212* (7), 991–999. https://doi.org/10.1084/jem.20142290.
- Louveau, A.; Smirnov, I.; Keyes, T. J.; Eccles, J. D.; Rouhani, S. J.; Peske, J. D.; Derecki, N. C.; Castle, D.; Mandell, J. W.; Lee, K. S.; Harris, T. H.; Kipnis, J. Structural and Functional Features of Central Nervous System Lymphatic Vessels. *Nature* 2015, 523 (7560), 337–341. https://doi.org/10.1038/nature14432.
- (169) Mezey, É.; Szalayova, I.; Hogden, C. T.; Brady, A.; Dósa, Á.; Sótonyi, P.; Palkovits, M. An Immunohistochemical Study of Lymphatic Elements in the Human Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2021, 118 (3), e2002574118. https://doi.org/10.1073/pnas.2002574118.
- (170) Vandenhaute, E.; Stump-Guthier, C.; Losada, M. L.; Tenenbaum, T.; Rudolph, H.; Ishikawa, H.; Schwerk, C.; Schroten, H.; Dürken, M.; März, M.; Karremann, M. The Choroid Plexus May Be an Underestimated Site of Tumor Invasion to the Brain: An in Vitro Study Using Neuroblastoma Cell Lines. *Cancer Cell Int.* **2015**, *15* (1), 102. https://doi.org/10.1186/s12935-015-0257-2.

- (171) Lorger, M.; Felding-Habermann, B. Capturing Changes in the Brain Microenvironment during Initial Steps of Breast Cancer Brain Metastasis. Am. J. Pathol. 2010, 176 (6), 2958–2971. https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090838.
- (172) Rai, S.; Nejadhamzeeigilani, Z.; Gutowski, N. J.; Whatmore, J. L. Loss of the Endothelial Glycocalyx Is Associated with Increased E-Selectin Mediated Adhesion of Lung Tumour Cells to the Brain Microvascular Endothelium. J. Exp. Clin. Cancer Res. 2015, 34 (1), 105. https://doi.org/10.1186/s13046-015-0223-9.
- (173) Fan, J.; Fu, B. M. Quantification of Malignant Breast Cancer Cell MDA-MB-231 Transmigration Across Brain and Lung Microvascular Endothelium. Ann. Biomed. Eng. 2016, 44 (7), 2189–2201. https://doi.org/10.1007/s10439-015-1517-y.
- (174) Soto, M. S.; Serres, S.; Anthony, D. C.; Sibson, N. R. Functional Role of Endothelial Adhesion Molecules in the Early Stages of Brain Metastasis. *Neuro-Oncol.* 2014, 16 (4), 540–551. https://doi.org/10.1093/neuonc/not222.
- (175) Végh, A. G.; Fazakas, C.; Nagy, K.; Wilhelm, I.; Molnár, J.; Krizbai, I. A.; Szegletes, Z.; Váró, G. Adhesion and Stress Relaxation Forces between Melanoma and Cerebral Endothelial Cells. *Eur. Biophys. J.* **2012**, *41* (2), 139–145. https://doi.org/10.1007/s00249-011-0765-5.
- Kienast, Y.; von Baumgarten, L.; Fuhrmann, M.; Klinkert, W. E. F.; Goldbrunner, R.; Herms, J.; Winkler, F. Real-Time Imaging Reveals the Single Steps of Brain Metastasis Formation. *Nat. Med.* 2010, *16* (1), 116–122. https://doi.org/10.1038/nm.2072.
- (177) Paku, S.; Döme, B.; Tóth, R.; Timár, J. Organ-Specificity of the Extravasation Process: An Ultrastructural Study. *Clin. Exp. Metastasis* 2000, 18 (6), 481–492. https://doi.org/10.1023/A:1011858925376.
- (178) Strilic, B.; Offermanns, S. Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. *Cancer Cell* 2017, 32 (3), 282–293. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.001.
- (179) Wolburg, H.; Wolburg-Buchholz, K.; Engelhardt, B. Diapedesis of Mononuclear Cells across Cerebral Venules during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Leaves Tight Junctions Intact. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 2005, 109 (2), 181–190. https://doi.org/10.1007/s00401-004-0928-x.
- (180) Abadier, M.; Haghayegh Jahromi, N.; Cardoso Alves, L.; Boscacci, R.; Vestweber, D.; Barnum, S.; Deutsch, U.; Engelhardt, B.; Lyck, R. Cell Surface Levels of Endothelial ICAM-1 Influence the Transcellular or Paracellular T-Cell Diapedesis across the Blood-Brain Barrier: Cellular Immune Response. *Eur. J. Immunol.* 2015, 45 (4), 1043–1058. https://doi.org/10.1002/eji.201445125.
- (181) Khuon, S.; Liang, L.; Dettman, R. W.; Sporn, P. H. S.; Wysolmerski, R. B.; Chew, T.-L. Myosin Light Chain Kinase Mediates Transcellular Intravasation of Breast Cancer Cells through the Underlying Endothelial Cells: A Three-Dimensional FRET Study. *J. Cell Sci.* **2010**, *123* (3), 431–440. https://doi.org/10.1242/jcs.053793.
- (182) Arvanitis, C.; Khuon, S.; Spann, R.; Ridge, K. M.; Chew, T.-L. Structure and Biomechanics of the Endothelial Transcellular Circumferential Invasion Array in Tumor Invasion. *PLoS ONE* 2014, 9 (2), e89758. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089758.
- (183) Carbonell, W. S.; Ansorge, O.; Sibson, N.; Muschel, R. The Vascular Basement Membrane as "Soil" in Brain Metastasis. *PLoS ONE* **2009**, *4* (6), e5857. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005857.

- (184) Soto, M. S.; O'Brien, E. R.; Andreou, K.; Scrace, S. F.; Zakaria, R.; Jenkinson, M. D.; O'Neill, E.; Sibson, N. R. Disruption of Tumour-Host Communication by Downregulation of LFA-1 Reduces COX-2 and e-NOS Expression and Inhibits Brain Metastasis Growth. *Oncotarget* **2016**, 7 (32), 52375– 52391. https://doi.org/10.18632/oncotarget.10737.
- (185) Stoletov, K.; Strnadel, J.; Zardouzian, E.; Momiyama, M.; Park, F. D.; Kelber, J. A.; Pizzo, D. P.; Hoffman, R.; VandenBerg, S. R.; Klemke, R. L. Role of Connexins in Metastatic Breast Cancer and Melanoma Brain Colonization. *J. Cell Sci.* **2013**, jcs.112748. https://doi.org/10.1242/jcs.112748.
- (186) 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 Alpha3beta1 in Highly Brain Metastatic Subclone of a Human Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line. *Cancer Sci.* 2004, 95 (2), 142–148. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03195.x.
- (187) Valiente, M.; Obenauf, A. C.; Jin, X.; Chen, Q.; Zhang, X. H.-F.; Lee, D. J.; Chaft, J. E.; Kris, M. G.; Huse, J. T.; Brogi, E.; Massagué, J. Serpins Promote Cancer Cell Survival and Vascular Co-Option in Brain Metastasis. *Cell* **2014**, *156* (5), 1002–1016. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.040.
- (188) Lugassy, C.; Vermeulen, P. B.; Ribatti, D.; Pezzella, F.; Barnhill, R. L. Vessel Co-Option and Angiotropic Extravascular Migratory Metastasis: A Continuum of Tumour Growth and Spread? *Br. J. Cancer* 2022, *126* (7), 973–980. https://doi.org/10.1038/s41416-021-01686-2.
- Bugyik, E.; Dezső, K.; Reiniger, L.; László, V.; Tóvári, J.; Tímár, J.; Nagy, P.; Klepetko, W.; Döme, B.;
 Paku, S. Lack of Angiogenesis in Experimental Brain Metastases. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2011, 70 (11), 979–991. https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318233afd7.
- (190) Téglási, V.; Csűry, D. T.; Dezső, K.; Bugyik, E.; Szabó, V.; Szállási, Z.; Paku, S.; Reiniger, L. Origin and Distribution of Connective Tissue and Pericytes Impacting Vascularization in Brain Metastases With Different Growth Patterns. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2019, 78 (4), 326–339. https://doi.org/10.1093/jnen/nlz007.
- (191) Lyle, L. T.; Lockman, P. R.; Adkins, C. E.; Mohammad, A. S.; Sechrest, E.; Hua, E.; Palmieri, D.; Liewehr, D. J.; Steinberg, S. M.; Kloc, W.; Izycka-Swieszewska, E.; Duchnowska, R.; Nayyar, N.; Brastianos, P. K.; Steeg, P. S.; Gril, B. Alterations in Pericyte Subpopulations Are Associated with Elevated Blood–Tumor Barrier Permeability in Experimental Brain Metastasis of Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22* (21), 5287–5299. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1836.
- (192) Zhang, M.; Olsson, Y. Hematogenous Metastases of the Human Brain Characteristics of Peritumoral Brain Changes: A Review. J. Neurooncol. 1997, 35 (1), 81–89. https://doi.org/10.1023/A:1005799805335.
- (193) Wasilewski, D.; Priego, N.; Fustero-Torre, C.; Valiente, M. Reactive Astrocytes in Brain Metastasis. *Front. Oncol.* **2017**, *7*, 298. https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00298.
- (194) Seike, T.; Fujita, K.; Yamakawa, Y.; Kido, M. A.; Takiguchi, S.; Teramoto, N.; Iguchi, H.; Noda, M. Interaction between Lung Cancer Cells and Astrocytes via Specific Inflammatory Cytokines in the Microenvironment of Brain Metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **2011**, *28* (1), 13–25. https://doi.org/10.1007/s10585-010-9354-8.
- (195) Wang, L.; Cossette, S. M.; Rarick, K. R.; Gershan, J.; Dwinell, M. B.; Harder, D. R.; Ramchandran, R. Astrocytes Directly Influence Tumor Cell Invasion and Metastasis In Vivo. *PLoS ONE* 2013, *8* (12), e80933. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080933.

- (196) Sartorius, C. A.; Hanna, C. T.; Gril, B.; Cruz, H.; Serkova, N. J.; Huber, K. M.; Kabos, P.; Schedin, T. B.; Borges, V. F.; Steeg, P. S.; Cittelly, D. M. Estrogen Promotes the Brain Metastatic Colonization of Triple Negative Breast Cancer Cells via an Astrocyte-Mediated Paracrine Mechanism. *Oncogene* 2016, *35* (22), 2881–2892. https://doi.org/10.1038/onc.2015.353.
- (197) Zhang, L.; Zhang, S.; Yao, J.; Lowery, F. J.; Zhang, Q.; Huang, W.-C.; Li, P.; Li, M.; Wang, X.; Zhang, C.; Wang, H.; Ellis, K.; Cheerathodi, M.; McCarty, J. H.; Palmieri, D.; Saunus, J.; Lakhani, S.; Huang, S.; Sahin, A. A.; Aldape, K. D.; Steeg, P. S.; Yu, D. Microenvironment-Induced PTEN Loss by Exosomal microRNA Primes Brain Metastasis Outgrowth. *Nature* 2015, *527* (7576), 100–104. https://doi.org/10.1038/nature15376.
- (198) Xing, F.; Kobayashi, A.; Okuda, H.; Watabe, M.; Pai, S. K.; Pandey, P. R.; Hirota, S.; Wilber, A.; Mo, Y.; Moore, B. E.; Liu, W.; Fukuda, K.; Iiizumi, M.; Sharma, S.; Liu, Y.; Wu, K.; Peralta, E.; Watabe, K. Reactive Astrocytes Promote the Metastatic Growth of Breast Cancer Stem-like Cells by Activating Notch Signalling in Brain. *EMBO Mol. Med.* 2013, 5 (3), 384–396. https://doi.org/10.1002/emmm.201201623.
- (199) Lin, Q.; Balasubramanian, K.; Fan, D.; Kim, S.-J.; Guo, L.; Wang, H.; Bar-Eli, M.; Aldape, K. D.; Fidler,
 I. J. Reactive Astrocytes Protect Melanoma Cells from Chemotherapy by Sequestering Intracellular Calcium through Gap Junction Communication Channels. *Neoplasia* 2010, *12* (9), 748–754. https://doi.org/10.1593/neo.10602.
- (200) Chen, Q.; Boire, A.; Jin, X.; Valiente, M.; Er, E. E.; Lopez-Soto, A.; S. Jacob, L.; Patwa, R.; Shah, H.; Xu, K.; Cross, J. R.; Massagué, J. Carcinoma–Astrocyte Gap Junctions Promote Brain Metastasis by cGAMP Transfer. *Nature* **2016**, *533* (7604), 493–498. https://doi.org/10.1038/nature18268.
- (201) Pukrop, T.; Dehghani, F.; Chuang, H.-Ning.; Lohaus, R.; Bayanga, K.; Heermann, S.; Regen, T.; Rossum, D. V.; Klemm, F.; Schulz, M.; Siam, L.; Hoffmann, A.; Trümper, L.; Stadelmann, C.; Bechmann, I.; Hanisch, U.-K.; Binder, C. Microglia Promote Colonization of Brain Tissue by Breast Cancer Cells in a Wnt-Dependent Way: Microglia Promote Brain Metastasis. *Glia* 2010, *58* (12), 1477–1489. https://doi.org/10.1002/glia.21022.
- (202) Klein, A.; Sagi-Assif, O.; Meshel, T.; Telerman, A.; Izraely, S.; Ben-Menachem, S.; Bayry, J.; Marzese, D. M.; Ohe, S.; Hoon, D. S. B.; Erez, N.; Witz, I. P. CCR4 Is a Determinant of Melanoma Brain Metastasis. *Oncotarget* 2017, *8* (19), 31079–31091. https://doi.org/10.18632/oncotarget.16076.
- (203) You, H.; Baluszek, S.; Kaminska, B. Immune Microenvironment of Brain Metastases—Are Microglia and Other Brain Macrophages Little Helpers? *Front. Immunol.* 2019, 10, 1941. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01941.
- (204) Andreou, K. E.; Soto, M. S.; Allen, D.; Economopoulos, V.; de Bernardi, A.; Larkin, J. R.; Sibson, N. R. Anti-Inflammatory Microglia/Macrophages As a Potential Therapeutic Target in Brain Metastasis. *Front. Oncol.* 2017, 7, 251. https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00251.
- Harter, P. N.; Bernatz, S.; Scholz, A.; Zeiner, P. S.; Zinke, J.; Kiyose, M.; Blasel, S.; Beschorner, R.; Senft, C.; Bender, B.; Ronellenfitsch, M. W.; Wikman, H.; Glatzel, M.; Meinhardt, M.; Juratli, T. A.; Steinbach, J. P.; Plate, K. H.; Wischhusen, J.; Weide, B.; Mittelbronn, M. Distribution and Prognostic Relevance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs) and PD-1/PD-L1 Immune Checkpoints in Human Brain Metastases. *Oncotarget* 2015, 6 (38), 40836–40849. https://doi.org/10.18632/oncotarget.5696.
- (206) Téglási, V.; Reiniger, L.; Fábián, K.; Pipek, O.; Csala, I.; Bagó, A. G.; Várallyai, P.; Vízkeleti, L.; Rojkó,
 L.; Tímár, J.; Döme, B.; Szállási, Z.; Swanton, C.; Moldvay, J. Evaluating the Significance of Density,

Localization, and PD-1/PD-L1 Immunopositivity of Mononuclear Cells in the Clinical Course of Lung Adenocarcinoma Patients with Brain Metastasis. *Neuro-Oncol.* **2017**, *19* (8), 1058–1067. https://doi.org/10.1093/neuonc/now309.

- (207) Berghoff, A. S.; Venur, V. A.; Preusser, M.; Ahluwalia, M. S. Immune Checkpoint Inhibitors in Brain Metastases: From Biology to Treatment. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2016**, No. 36, e116–e122. https://doi.org/10.1200/EDBK_100005.
- (208) Harrell, J. C.; Prat, A.; Parker, J. S.; Fan, C.; He, X.; Carey, L.; Anders, C.; Ewend, M.; Perou, C. M. Genomic Analysis Identifies Unique Signatures Predictive of Brain, Lung, and Liver Relapse. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012, *132* (2), 523–535. https://doi.org/10.1007/s10549-011-1619-7.
- (209) Lee, J. Y.; Park, K.; Lee, E.; Ahn, T.; Jung, H. H.; Lim, S. H.; Hong, M.; Do, I.-G.; Cho, E. Y.; Kim, D.-H.; Kim, J.-Y.; Ahn, J. S.; Im, Y.-H.; Park, Y. H. Gene Expression Profiling of Breast Cancer Brain Metastasis. *Sci. Rep.* 2016, *6* (1), 28623. https://doi.org/10.1038/srep28623.
- Bos, P. D.; Zhang, X. H.-F.; Nadal, C.; Shu, W.; Gomis, R. R.; Nguyen, D. X.; Minn, A. J.; van de Vijver, M. J.; Gerald, W. L.; Foekens, J. A.; Massagué, J. Genes That Mediate Breast Cancer Metastasis to the Brain. *Nature* 2009, 459 (7249), 1005–1009. https://doi.org/10.1038/nature08021.
- Sevenich, L.; Bowman, R. L.; Mason, S. D.; Quail, D. F.; Rapaport, F.; Elie, B. T.; Brogi, E.; Brastianos, P. K.; Hahn, W. C.; Holsinger, L. J.; Massagué, J.; Leslie, C. S.; Joyce, J. A. Analysis of Tumour- and Stroma-Supplied Proteolytic Networks Reveals a Brain-Metastasis-Promoting Role for Cathepsin S. *Nat. Cell Biol.* 2014, *16* (9), 876–888. https://doi.org/10.1038/ncb3011.
- (212) Malin, D.; Strekalova, E.; Petrovic, V.; Rajanala, H.; Sharma, B.; Ugolkov, A.; Gradishar, W. J.; Cryns, V. L. ERK-Regulated αB-Crystallin Induction by Matrix Detachment Inhibits Anoikis and Promotes Lung Metastasis in Vivo. *Oncogene* **2015**, *34* (45), 5626–5634. https://doi.org/10.1038/onc.2015.12.
- (213) Zhang, C.; Zhang, F.; Tsan, R.; Fidler, I. J. Transforming Growth Factor-B2 Is a Molecular Determinant for Site-Specific Melanoma Metastasis in the Brain. *Cancer Res.* 2009, 69 (3), 828–835. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2588.
- (214) Jilaveanu, L. B.; Parisi, F.; Barr, M. L.; Zito, C. R.; Cruz-Munoz, W.; Kerbel, R. S.; Rimm, D. L.; Bosenberg, M. W.; Halaban, R.; Kluger, Y.; Kluger, H. M. PLEKHA5 as a Biomarker and Potential Mediator of Melanoma Brain Metastasis. *Clin. Cancer Res.* 2015, *21* (9), 2138–2147. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0861.
- (215) Kamer, I.; Steuerman, Y.; Daniel-Meshulam, I.; Perry, G.; Izraeli, S.; Perelman, M.; Golan, N.; Simansky, D.; Barshack, I.; Nun, A. B.; Gottfried, T.; Onn, A.; Gat-Viks, I.; Bar, J. Predicting Brain Metastasis in Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer Patients by Gene Expression Profiling. *Transl. Lung Cancer Res.* 2020, 9 (3), 682–692. https://doi.org/10.21037/tlcr-19-477.
- (216) Koh, Y. W.; Han, J.-H.; Haam, S.; Lee, H. W. An Immune-Related Gene Expression Signature Predicts Brain Metastasis in Lung Adenocarcinoma Patients after Surgery: Gene Expression Profile and Immunohistochemical Analyses. *Transl. Lung Cancer Res.* 2021, 10 (2), 802–814. https://doi.org/10.21037/tlcr-20-1056.
- (217) Klotz, R.; Yu, M. Insights into Brain Metastasis: Recent Advances in Circulating Tumor Cell Research. *Cancer Rep.* **2022**, *5* (4). https://doi.org/10.1002/cnr2.1239.
- (218) Davies, M. A.; Stemke-Hale, K.; Lin, E.; Tellez, C.; Deng, W.; Gopal, Y. N.; Woodman, S. E.; Calderone, T. C.; Ju, Z.; Lazar, A. J.; Prieto, V. G.; Aldape, K.; Mills, G. B.; Gershenwald, J. E. Integrated

Molecular and Clinical Analysis of AKT Activation in Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (24), 7538–7546. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1985.

- (219) Wei, C.; Dong, X.; Lu, H.; Tong, F.; Chen, L.; Zhang, R.; Dong, J.; Hu, Y.; Wu, G.; Dong, X. LPCAT1 Promotes Brain Metastasis of Lung Adenocarcinoma by Up-Regulating PI3K/AKT/MYC Pathway. J. Exp. Clin. Cancer Res. 2019, 38 (1), 95. https://doi.org/10.1186/s13046-019-1092-4.
- (220) Ippen, F. M.; Grosch, J. K.; Subramanian, M.; Kuter, B. M.; Liederer, B. M.; Plise, E. G.; Mora, J. L.; Nayyar, N.; Schmidt, S. P.; Giobbie-Hurder, A.; Martinez-Lage, M.; Carter, S. L.; Cahill, D. P.; Wakimoto, H.; Brastianos, P. K. Targeting the PI3K/Akt/mTOR Pathway with the Pan-Akt Inhibitor GDC-0068 in PIK3CA-Mutant Breast Cancer Brain Metastases. *Neuro-Oncol.* 2019, *21* (11), 1401–1411. https://doi.org/10.1093/neuonc/noz105.
- (221) Neman, J.; Termini, J.; Wilczynski, S.; Vaidehi, N.; Choy, C.; Kowolik, C. M.; Li, H.; Hambrecht, A. C.; Roberts, E.; Jandial, R. Human Breast Cancer Metastases to the Brain Display GABAergic Properties Niche. in the Neural Proc. Natl. Acad. Sci. 2014, 111 (3), 984-989. https://doi.org/10.1073/pnas.1322098111.
- (222) Chen, J.; Lee, H.-J.; Wu, X.; Huo, L.; Kim, S.-J.; Xu, L.; Wang, Y.; He, J.; Bollu, L. R.; Gao, G.; Su, F.; Briggs, J.; Liu, X.; Melman, T.; Asara, J. M.; Fidler, I. J.; Cantley, L. C.; Locasale, J. W.; Weihua, Z. Gain of Glucose-Independent Growth upon Metastasis of Breast Cancer Cells to the Brain. *Cancer Res.* **2015**, *75* (3), 554–565. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2268.
- (223) Liu, B.; Zhang, X. Metabolic Reprogramming Underlying Brain Metastasis of Breast Cancer. *Front. Mol. Biosci.* **2022**, *8*, 791927. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.791927.
- Jin, X.; Demere, Z.; Nair, K.; Ali, A.; Ferraro, G. B.; Natoli, T.; Deik, A.; Petronio, L.; Tang, A. A.; Zhu, C.; Wang, L.; Rosenberg, D.; Mangena, V.; Roth, J.; Chung, K.; Jain, R. K.; Clish, C. B.; Vander Heiden, M. G.; Golub, T. R. A Metastasis Map of Human Cancer Cell Lines. *Nature* 2020, *588* (7837), 331–336. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2969-2.
- (225) Rempe, R. G.; Hartz, A. M.; Bauer, B. Matrix Metalloproteinases in the Brain and Blood–Brain Barrier: Versatile Breakers and Makers. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2016, 36 (9), 1481–1507. https://doi.org/10.1177/0271678X16655551.
- (226) Stark, A. M.; Anuszkiewicz, B.; Mentlein, R.; Yoneda, T.; Mehdorn, H. M.; Held-Feindt, J. Differential Expression of Matrix Metalloproteinases in Brain- and Bone-Seeking Clones of Metastatic MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *J. Neurooncol.* 2006, *81* (1), 39–48. https://doi.org/10.1007/s11060-006-9207-0.
- (227) Liu, H.; Kato, Y.; Erzinger, S. A.; Kiriakova, G. M.; Qian, Y.; Palmieri, D.; Steeg, P. S.; Price, J. E. The Role of MMP-1 in Breast Cancer Growth and Metastasis to the Brain in a Xenograft Model. *BMC Cancer* 2012, *12* (1), 583. https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-583.
- (228) Izraely, S.; Ben-Menachem, S.; Sagi-Assif, O.; Meshel, T.; Marzese, D. M.; Ohe, S.; Zubrilov, I.; Pasmanik-Chor, M.; Hoon, D. S. B.; Witz, I. P. ANGPTL4 Promotes the Progression of Cutaneous Melanoma to Brain Metastasis. *Oncotarget* 2017, *8* (44), 75778–75796. https://doi.org/10.18632/oncotarget.19018.
- (229) Jayatilleke, K. M.; Hulett, M. D. Heparanase and the Hallmarks of Cancer. J. Transl. Med. 2020, 18
 (1), 453. https://doi.org/10.1186/s12967-020-02624-1.

- (230) Roy, M.; Marchetti, D. Cell Surface Heparan Sulfate Released by Heparanase Promotes Melanoma Cell Migration and Angiogenesis. J. Cell. Biochem. 2009, 106 (2), 200–209. https://doi.org/10.1002/jcb.22005.
- (231) Zhang, L.; Sullivan, P.; Suyama, J.; Marchetti, D. Epidermal Growth Factor–Induced Heparanase Nucleolar Localization Augments DNA Topoisomerase I Activity in Brain Metastatic Breast Cancer. *Mol. Cancer Res.* 2010, 8 (2), 278–290. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0375.
- (232) Marchetti, D.; Li, J.; Shen, R. Astrocytes Contribute to the Brain-Metastatic Specificity of Melanoma Cells by Producing Heparanase. *Cancer Res.* **2000**, *60* (17), 4767–4770.
- (233) Perides, G.; Zhuge, Y.; Lin, T.; Stins, M. F.; Bronson, R. T.; Wu, J. K. The Fibrinolytic System Facilitates Tumor Cell Migration across the Blood-Brain Barrier in Experimental Melanoma Brain Metastasis. *BMC Cancer* **2006**, *6* (1), 56. https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-56.
- (234) Minciacchi, V. R.; Freeman, M. R.; Di Vizio, D. Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015, 40, 41–51. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.010.
- (235) O'Brien, K.; Breyne, K.; Ughetto, S.; Laurent, L. C.; Breakefield, X. O. RNA Delivery by Extracellular Vesicles in Mammalian Cells and Its Applications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21* (10), 585–606. https://doi.org/10.1038/s41580-020-0251-y.
- (236) Kim, J.; Yao, F.; Xiao, Z.; Sun, Y.; Ma, L. MicroRNAs and Metastasis: Small RNAs Play Big Roles. *Cancer Metastasis Rev.* **2018**, *37* (1), 5–15. https://doi.org/10.1007/s10555-017-9712-y.
- (237) Vu, L. T.; Gong, J.; Pham, T. T.; Kim, Y.; Le, M. T. N. microRNA Exchange via Extracellular Vesicles in Cancer. *Cell Prolif.* **2020**, *53* (11). https://doi.org/10.1111/cpr.12877.
- (238) Liu, Y.; Cao, X. Characteristics and Significance of the Pre-Metastatic Niche. *Cancer Cell* 2016, 30 (5), 668–681. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.011.
- (239) Morad, G.; Carman, C. V.; Hagedorn, E. J.; Perlin, J. R.; Zon, L. I.; Mustafaoglu, N.; Park, T.-E.; Ingber, D. E.; Daisy, C. C.; Moses, M. A. Tumor-Derived Extracellular Vesicles Breach the Intact Blood– Brain Barrier via Transcytosis. ACS Nano 2019, 13 (12), 13853–13865. https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04397.
- (240) Morad, G.; Moses, M. A. Brainwashed by Extracellular Vesicles: The Role of Extracellular Vesicles in Primary and Metastatic Brain Tumour Microenvironment. *J. Extracell. Vesicles* **2019**, *8* (1), 1627164. https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1627164.
- (241) Alsidawi, S.; Malek, E.; Driscoll, J. MicroRNAs in Brain Metastases: Potential Role as Diagnostics and Therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (6), 10508–10526. https://doi.org/10.3390/ijms150610508.
- (242) Kanchan, R. K.; Siddiqui, J. A.; Mahapatra, S.; Batra, S. K.; Nasser, M. W. microRNAs Orchestrate Pathophysiology of Breast Cancer Brain Metastasis: Advances in Therapy. *Mol. Cancer* 2020, *19* (1), 29. https://doi.org/10.1186/s12943-020-1140-x.
- (243) Karimpour, M.; Ravanbakhsh, R.; Maydanchi, M.; Rajabi, A.; Azizi, F.; Saber, A. Cancer Driver Gene and Non-Coding RNA Alterations as Biomarkers of Brain Metastasis in Lung Cancer: A Review of the Literature. *Biomed. Pharmacother.* 2021, 143, 112190. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112190.

- (244) Okuda, H.; Xing, F.; Pandey, P. R.; Sharma, S.; Watabe, M.; Pai, S. K.; Mo, Y.-Y.; liizumi-Gairani, M.; Hirota, S.; Liu, Y.; Wu, K.; Pochampally, R.; Watabe, K. miR-7 Suppresses Brain Metastasis of Breast Cancer Stem-Like Cells By Modulating KLF4. *Cancer Res.* 2013, 73 (4), 1434–1444. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2037.
- (245) Tominaga, N.; Kosaka, N.; Ono, M.; Katsuda, T.; Yoshioka, Y.; Tamura, K.; Lötvall, J.; Nakagama, H.; Ochiya, T. Brain Metastatic Cancer Cells Release microRNA-181c-Containing Extracellular Vesicles Capable of Destructing Blood–Brain Barrier. *Nat. Commun.* 2015, 6 (1), 6716. https://doi.org/10.1038/ncomms7716.
- (246) Camacho, L.; Guerrero, P.; Marchetti, D. MicroRNA and Protein Profiling of Brain Metastasis Competent Cell-Derived Exosomes. *PLoS ONE* **2013**, *8* (9), e73790. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073790.
- (247) Giannoudis, A.; Clarke, K.; Zakaria, R.; Varešlija, D.; Farahani, M.; Rainbow, L.; Platt-Higgins, A.; Ruthven, S.; Brougham, K. A.; Rudland, P. S.; Jenkinson, M. D.; Young, L. S.; Falciani, F.; Palmieri, C. A Novel Panel of Differentially-Expressed microRNAs in Breast Cancer Brain Metastasis May Predict Patient Survival. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 18518. https://doi.org/10.1038/s41598-019-55084-z.
- (248) Xing, F.; Sharma, S.; Liu, Y.; Mo, Y.-Y.; Wu, K.; Zhang, Y.-Y.; Pochampally, R.; Martinez, L. A.; Lo, H.-W.; Watabe, K. miR-509 Suppresses Brain Metastasis of Breast Cancer Cells by Modulating RhoC and TNF-α. *Oncogene* **2015**, *34* (37), 4890–4900. https://doi.org/10.1038/onc.2014.412.
- (249) Chen, L.; Li, X.; Zhao, Y.; Liu, W.; Wu, H.; Liu, J.; Mu, X.; Wu, H. Down-Regulated microRNA-375 Expression as a Predictive Biomarker in Non-Small Cell Lung Cancer Brain Metastasis and Its Prognostic Significance. *Pathol. - Res. Pract.* **2017**, *213* (8), 882–888. https://doi.org/10.1016/j.prp.2017.06.012.
- (250) Yu, H.; Jiang, L.; Sun, C.; Guo, L.; Lin, M.; Huang, J.; Zhu, L. Decreased Circulating miR-375: A Potential Biomarker for Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer. *Gene* **2014**, *534* (1), 60–65. https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.024.
- Bustos, M. A.; Tran, K. D.; Rahimzadeh, N.; Gross, R.; Lin, S. Y.; Shoji, Y.; Murakami, T.; Boley, C. L.; Tran, L. T.; Cole, H.; Kelly, D. F.; O'Day, S.; Hoon, D. S. B. Integrated Assessment of Circulating Cell-Free MicroRNA Signatures in Plasma of Patients with Melanoma Brain Metastasis. *Cancers* 2020, *12* (6), 1692. https://doi.org/10.3390/cancers12061692.
- (252) Curtaz, C. J.; Reifschläger, L.; Strähle, L.; Feldheim, J.; Feldheim, J. J.; Schmitt, C.; Kiesel, M.; Herbert, S.-L.; Wöckel, A.; Meybohm, P.; Burek, M. Analysis of microRNAs in Exosomes of Breast Cancer Patients in Search of Molecular Prognostic Factors in Brain Metastases. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23 (7), 3683. https://doi.org/10.3390/ijms23073683.
- (253) Wei, L.; Wang, G.; Yang, C.; Zhang, Y.; Chen, Y.; Zhong, C.; Li, Q. MicroRNA-550a-3-5p Controls the Brain Metastasis of Lung Cancer by Directly Targeting YAP1. *Cancer Cell Int.* **2021**, *21* (1), 491. https://doi.org/10.1186/s12935-021-02197-z.
- (254) Berghoff, A. S.; Ilhan-Mutlu, A.; Dinhof, C.; Magerle, M.; Hackl, M.; Widhalm, G.; Hainfellner, J. A.; Dieckmann, K.; Pichler, J.; Hutterer, M.; Melchardt, T.; Bartsch, R.; Zielinski, C. C.; Birner, P.; Preusser, M. Differential Role of Angiogenesis and Tumour Cell Proliferation in Brain Metastases According to Primary Tumour Type: Analysis of 639 Cases: Differential Role of Angiogenesis and Tumor Cell Proliferation in Brain Metastases. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2015, *41* (2), e41–e55. https://doi.org/10.1111/nan.12185.

- (255) Ilhan-Mutlu, A.; Osswald, M.; Liao, Y.; Gömmel, M.; Reck, M.; Miles, D.; Mariani, P.; Gianni, L.; Lutiger, B.; Nendel, V.; Srock, S.; Perez-Moreno, P.; Thorsen, F.; von Baumgarten, L.; Preusser, M.; Wick, W.; Winkler, F. Bevacizumab Prevents Brain Metastases Formation in Lung Adenocarcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15* (4), 702–710. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0582.
- (256) Berghoff, A. S.; Preusser, M. Anti-Angiogenic Therapies in Brain Metastases. *Memo Mag. Eur. Med. Oncol.* **2018**, *11* (1), 14–17. https://doi.org/10.1007/s12254-018-0384-2.
- (257) Arvanitis, C. D.; Ferraro, G. B.; Jain, R. K. The Blood–Brain Barrier and Blood–Tumour Barrier in Brain Tumours and Metastases. *Nat. Rev. Cancer* **2020**, *20* (1), 26–41. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0205-x.
- (258) Fidler, I. J. The Role of the Organ Microenvironment in Brain Metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **2011**, *21* (2), 107–112. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.12.009.
- (259) Lockman, P. R.; Mittapalli, R. K.; Taskar, K. S.; Rudraraju, V.; Gril, B.; Bohn, K. A.; Adkins, C. E.; Roberts, A.; Thorsheim, H. R.; Gaasch, J. A.; Huang, S.; Palmieri, D.; Steeg, P. S.; Smith, Q. R. Heterogeneous Blood–Tumor Barrier Permeability Determines Drug Efficacy in Experimental Brain of Breast Clin. Cancer 2010, 16 Metastases Cancer. Res. (23), 5664-5678. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1564.
- (260) Adkins, C. E.; Mohammad, A. S.; Terrell-Hall, T. B.; Dolan, E. L.; Shah, N.; Sechrest, E.; Griffith, J.; Lockman, P. R. Characterization of Passive Permeability at the Blood–Tumor Barrier in Five Preclinical Models of Brain Metastases of Breast Cancer. *Clin. Exp. Metastasis* **2016**, *33* (4), 373–383. https://doi.org/10.1007/s10585-016-9784-z.
- (261) Murrell, D. H.; Hamilton, A. M.; Mallett, C. L.; van Gorkum, R.; Chambers, A. F.; Foster, P. J. Understanding Heterogeneity and Permeability of Brain Metastases in Murine Models of HER2-Positive Breast Cancer Through Magnetic Resonance Imaging: Implications for Detection and Therapy. *Transl. Oncol.* 2015, *8* (3), 176–184. https://doi.org/10.1016/j.tranon.2015.03.009.
- (262) Osswald, M.; Blaes, J.; Liao, Y.; Solecki, G.; Gömmel, M.; Berghoff, A. S.; Salphati, L.; Wallin, J. J.; Phillips, H. S.; Wick, W.; Winkler, F. Impact of Blood–Brain Barrier Integrity on Tumor Growth and Therapy Response in Brain Metastases. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22* (24), 6078–6087. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1327.
- Bejarano, L.; Kauzlaric, A.; Lamprou, E.; Lourenco, J.; Fournier, N.; Ballabio, M.; Colotti, R.; Maas, R.; Galland, S.; Massara, M.; Soukup, K.; Lilja, J.; Brouland, J.-P.; Hottinger, A. F.; Daniel, R. T.; Hegi, M. E.; Joyce, J. A. Interrogation of Endothelial and Mural Cells in Brain Metastasis Reveals Key Immune-Regulatory Mechanisms. *Cancer Cell* **2024**, S1535610823004464. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.12.018.
- (264) Mittapalli, R. K.; Adkins, C. E.; Bohn, Kaci. A.; Mohammad, A. S.; Lockman, J. A.; Lockman, P. R. Quantitative Fluorescence Microscopy Measures Vascular Pore Size in Primary and Metastatic Brain Tumors. *Cancer Res.* **2017**, *77* (2), 238–246. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1711.
- (265) Connell, J. J.; Chatain, G.; Cornelissen, B.; Vallis, K. A.; Hamilton, A.; Seymour, L.; Anthony, D. C.; Sibson, N. R. Selective Permeabilization of the Blood–Brain Barrier at Sites of Metastasis. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 2013, 105 (21), 1634–1643. https://doi.org/10.1093/jnci/djt276.
- Munoz Pinto, M. F.; Campbell, S. J.; Simoglou Karali, C.; Johanssen, V. A.; Bristow, C.; Cheng, V.
 W. T.; Zarghami, N.; Larkin, J. R.; Pannell, M.; Hearn, A.; Chui, C.; Brinquis Nunez, B.; Bokma, E.;
 Holgate, R.; Anthony, D. C.; Sibson, N. R. Selective Blood-Brain Barrier Permeabilization of Brain

Metastases by a Type 1 Receptor-Selective Tumor Necrosis Factor Mutein. *Neuro-Oncol.* **2022**, *24* (1), 52–63. https://doi.org/10.1093/neuonc/noab177.

- (267) Park, M.-W.; Kim, C.-H.; Cheong, J.-H.; Bak, K.-H.; Kim, J.-M.; Oh, S.-J. Occludin Expression in Brain Tumors and Its Relevance to Peritumoral Edema and Survival. *Cancer Res. Treat.* 2006, 38 (3), 139. https://doi.org/10.4143/crt.2006.38.3.139.
- (268) Tiwary, S.; Morales, J. E.; Kwiatkowski, S. C.; Lang, F. F.; Rao, G.; McCarty, J. H. Metastatic Brain Tumors Disrupt the Blood-Brain Barrier and Alter Lipid Metabolism by Inhibiting Expression of the Endothelial Cell Fatty Acid Transporter Mfsd2a. *Sci. Rep.* 2018, *8* (1), 8267. https://doi.org/10.1038/s41598-018-26636-6.
- (269) Uzunalli, G.; Dieterly, A. M.; Kemet, C. M.; Weng, H.-Y.; Soepriatna, A. H.; Goergen, C. J.; Shinde, A. B.; Wendt, M. K.; Lyle, L. T. Dynamic Transition of the Blood-Brain Barrier in the Development of Non-Small Cell Lung Cancer Brain Metastases. *Oncotarget* 2019, 10 (59), 6334–6348. https://doi.org/10.18632/oncotarget.27274.
- (270) Gril, B.; Paranjape, A. N.; Woditschka, S.; Hua, E.; Dolan, E. L.; Hanson, J.; Wu, X.; Kloc, W.; Izycka-Swieszewska, E.; Duchnowska, R.; Pęksa, R.; Biernat, W.; Jassem, J.; Nayyar, N.; Brastianos, P. K.; Hall, O. M.; Peer, C. J.; Figg, W. D.; Pauly, G. T.; Robinson, C.; Difilippantonio, S.; Bialecki, E.; Metellus, P.; Schneider, J. P.; Steeg, P. S. Reactive Astrocytic S1P3 Signaling Modulates the Blood–Tumor Barrier in Brain Metastases. *Nat. Commun.* 2018, *9* (1), 2705. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05030-w.
- (271) Soto, M. S.; Sibson, N. R. The Multifarious Role of Microglia in Brain Metastasis. *Front. Cell. Neurosci.* **2018**, *12*, 414. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00414.
- (272) Qiao, S.; Qian, Y.; Xu, G.; Luo, Q.; Zhang, Z. Long-Term Characterization of Activated Microglia/Macrophages Facilitating the Development of Experimental Brain Metastasis through Intravital Microscopic Imaging. J. Neuroinflammation 2019, 16 (1), 4. https://doi.org/10.1186/s12974-018-1389-9.
- (273) Jin, Y.; Kang, Y.; Wang, M.; Wu, B.; Su, B.; Yin, H.; Tang, Y.; Li, Q.; Wei, W.; Mei, Q.; Hu, G.; Lukacs-Kornek, V.; Li, J.; Wu, K.; Yuan, X.; Wang, W. Targeting Polarized Phenotype of Microglia via IL6/JAK2/STAT3 Signaling to Reduce NSCLC Brain Metastasis. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, 7 (1), 52. https://doi.org/10.1038/s41392-022-00872-9.
- (274) Di Giacomo, A. M.; Valente, M.; Cerase, A.; Lofiego, M. F.; Piazzini, F.; Calabrò, L.; Gambale, E.; Covre, A.; Maio, M. Immunotherapy of Brain Metastases: Breaking a "Dogma." J. Exp. Clin. Cancer Res. 2019, 38 (1), 419. https://doi.org/10.1186/s13046-019-1426-2.
- (275) Weksler, B.; Romero, I. A.; Couraud, P.-O. The hCMEC/D3 Cell Line as a Model of the Human Blood Brain Barrier. *Fluids Barriers CNS* **2013**, *10* (1), 16. https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-16.
- (276) Inserra, M. M.; Bloch, D. A.; Terris, D. J. Functional Indices for Sciatic, Peroneal, and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Mouse. *Microsurgery* **1998**, *18* (2), 119–124. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2752(1998)18:2<119::AID-MICR10>3.0.CO;2-0.
- (277) Hawrylycz, M. J.; Lein, E. S.; Guillozet-Bongaarts, A. L.; Shen, E. H.; Ng, L.; Miller, J. A.; van de Lagemaat, L. N.; Smith, K. A.; Ebbert, A.; Riley, Z. L.; Abajian, C.; Beckmann, C. F.; Bernard, A.; Bertagnolli, D.; Boe, A. F.; Cartagena, P. M.; Chakravarty, M. M.; Chapin, M.; Chong, J.; Dalley, R. A.; Daly, B. D.; Dang, C.; Datta, S.; Dee, N.; Dolbeare, T. A.; Faber, V.; Feng, D.; Fowler, D. R.; Goldy, J.; Gregor, B. W.; Haradon, Z.; Haynor, D. R.; Hohmann, J. G.; Horvath, S.; Howard, R. E.; Jeromin, A.; Jochim, J. M.; Kinnunen, M.; Lau, C.; Lazarz, E. T.; Lee, C.; Lemon, T. A.; Li, L.; Li, Y.; Morris, J. A.; Overly,

C. C.; Parker, P. D.; Parry, S. E.; Reding, M.; Royall, J. J.; Schulkin, J.; Sequeira, P. A.; Slaughterbeck, C. R.; Smith, S. C.; Sodt, A. J.; Sunkin, S. M.; Swanson, B. E.; Vawter, M. P.; Williams, D.; Wohnoutka, P.; Zielke, H. R.; Geschwind, D. H.; Hof, P. R.; Smith, S. M.; Koch, C.; Grant, S. G. N.; Jones, A. R. An Anatomically Comprehensive Atlas of the Adult Human Brain Transcriptome. *Nature* **2012**, *489* (7416), 391–399. https://doi.org/10.1038/nature11405.

- (278) Agarwal, V.; Bell, G. W.; Nam, J.-W.; Bartel, D. P. Predicting Effective microRNA Target Sites in Mammalian mRNAs. *eLife* 2015, 4, e05005. https://doi.org/10.7554/eLife.05005.
- (279) Paraskevopoulou, M. D.; Georgakilas, G.; Kostoulas, N.; Vlachos, I. S.; Vergoulis, T.; Reczko, M.; Filippidis, C.; Dalamagas, T.; Hatzigeorgiou, A. G. DIANA-microT Web Server v5.0: Service Integration into miRNA Functional Analysis Workflows. *Nucleic Acids Res.* 2013, *41* (W1), W169–W173. https://doi.org/10.1093/nar/gkt393.
- (280) Noumbissi, M. E.; Galasso, B.; Stins, M. F. Brain Vascular Heterogeneity: Implications for Disease Pathogenesis and Design of in Vitro Blood–Brain Barrier Models. *Fluids Barriers CNS* 2018, 15 (1), 12. https://doi.org/10.1186/s12987-018-0097-2.
- (281) Vaudry, D.; Falluel-Morel, A.; Bourgault, S.; Basille, M.; Burel, D.; Wurtz, O.; Fournier, A.; Chow, B. K. C.; Hashimoto, H.; Galas, L.; Vaudry, H. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: 20 Years after the Discovery. *Pharmacol. Rev.* 2009, *61* (3), 283–357. https://doi.org/10.1124/pr.109.001370.
- (282) Wolburg, H.; Lippoldt, A. Tight Junctions of the Blood–Brain Barrier. *Vascul. Pharmacol.* 2002, *38*(6), 323–337. https://doi.org/10.1016/S1537-1891(02)00200-8.
- (283) Janecka, A.; Fichna, J.; Janecki, T. Opioid Receptors and Their Ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4* (1), 1–17. https://doi.org/10.2174/1568026043451618.
- (284) Perlikowska, R.; Janecka, A. Bioavailability of Endomorphins and the Blood-Brain Barrier- A Review. Med. Chem. 2013, 10 (1), 2–17. https://doi.org/10.2174/15734064113099990040.
- (285) Vécsei, L.; Szalárdy, L.; Fülöp, F.; Toldi, J. Kynurenines in the CNS: Recent Advances and New Questions. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12* (1), 64–82. https://doi.org/10.1038/nrd3793.
- (286) Mallareddy, J. R.; Borics, A.; Keresztes, A.; Kövér, K. E.; Tourwé, D.; Tóth, G. Design, Synthesis, Pharmacological Evaluation, and Structure–Activity Study of Novel Endomorphin Analogues with Multiple Structural Modifications. *J. Med. Chem.* 2011, 54 (5), 1462–1472. https://doi.org/10.1021/jm101515v.
- (287) Demeter, I.; Nagy, K.; Gellért, L.; Vécsei, L.; Fülöp, F.; Toldi, J. A Novel Kynurenic Acid Analog (SZR104) Inhibits Pentylenetetrazole-Induced Epileptiform Seizures. An Electrophysiological Study: Special Issue Related to Kynurenine. *J. Neural Transm.* **2012**, *119* (2), 151–154. https://doi.org/10.1007/s00702-011-0755-x.
- (288) Mándi, Y.; Endrész, V.; Mosolygó, T.; Burián, K.; Lantos, I.; Fülöp, F.; Szatmári, I.; Lőrinczi, B.; Balog, A.; Vécsei, L. The Opposite Effects of Kynurenic Acid and Different Kynurenic Acid Analogs on Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) Production and Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-6 (TSG-6) Expression. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1406. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01406.
- (289) Burm, S. M.; Zuiderwijk-Sick, E. A.; 't Jong, A. E. J.; van der Putten, C.; Veth, J.; Kondova, I.; Bajramovic, J. J. Inflammasome-Induced IL-1β Secretion in Microglia Is Characterized by Delayed Kinetics and Is Only Partially Dependent on Inflammatory Caspases. J. Neurosci. 2015, 35 (2), 678– 687. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2510-14.2015.

- (290) Mullins, B.; Chen, J. NLRP9 in Innate Immunity and Inflammation. *Immunology* **2021**, *162* (3), 262–267. https://doi.org/10.1111/imm.13290.
- (291) Pieper, C.; Marek, J. J.; Unterberg, M.; Schwerdtle, T.; Galla, H.-J. Brain Capillary Pericytes Contribute to the Immune Defense in Response to Cytokines or LPS in Vitro. *Brain Res.* 2014, 1550, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.01.004.
- (292) Coll, R. C.; Robertson, A. A. B.; Chae, J. J.; Higgins, S. C.; Muñoz-Planillo, R.; Inserra, M. C.; Vetter, I.; Dungan, L. S.; Monks, B. G.; Stutz, A.; Croker, D. E.; Butler, M. S.; Haneklaus, M.; Sutton, C. E.; Núñez, G.; Latz, E.; Kastner, D. L.; Mills, K. H. G.; Masters, S. L.; Schroder, K.; Cooper, M. A.; O'Neill, L. A. J. A Small-Molecule Inhibitor of the NLRP3 Inflammasome for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Nat. Med.* 2015, *21* (3), 248–255. https://doi.org/10.1038/nm.3806.
- (293) Mullard, A. NLRP3 Inhibitors Stoke Anti-Inflammatory Ambitions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2019, *18* (6), 405–407. https://doi.org/10.1038/d41573-019-00086-9.
- (294) Fazakas, C.; Wilhelm, I.; Nagyőszi, P.; Farkas, A. E.; Haskó, J.; Molnár, J.; Bauer, H.; Bauer, H.-C.; Ayaydin, F.; Dung, N. T. K.; Siklós, L.; Krizbai, I. A. Transmigration of Melanoma Cells through the Blood-Brain Barrier: Role of Endothelial Tight Junctions and Melanoma-Released Serine Proteases. *PLoS ONE* **2011**, *6* (6), e20758. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020758.
- (295) Burridge, K.; Wennerberg, K. Rho and Rac Take Center Stage. *Cell* **2004**, *116* (2), 167–179. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00003-0.
- (296) Crosas-Molist, E.; Samain, R.; Kohlhammer, L.; Orgaz, J. L.; George, S. L.; Maiques, O.; Barcelo, J.; Sanz-Moreno, V. Rho GTPase Signaling in Cancer Progression and Dissemination. *Physiol. Rev.* 2022, 102 (1), 455–510. https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2020.
- (297) Symons, M.; Segall, J. E. Rac and Rho Driving Tumor Invasion: Who's at the Wheel? *Genome Biol.* **2009**, *10* (3), 213. https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-213.
- (298) Yang, J.; Nie, J.; Ma, X.; Wei, Y.; Peng, Y.; Wei, X. Targeting PI3K in Cancer: Mechanisms and Advances in Clinical Trials. *Mol. Cancer* **2019**, *18* (1), 26. https://doi.org/10.1186/s12943-019-0954x.
- (299) Campa, C. C.; Ciraolo, E.; Ghigo, A.; Germena, G.; Hirsch, E. Crossroads of PI3K and Rac Pathways. *Small GTPases* **2015**, *6* (2), 71–80. https://doi.org/10.4161/21541248.2014.989789.
- (300) Chen, D.; Gao, M.; Gao, F.; Su, Q.; Wu, J. Brain Cannabinoid Receptor 2: Expression, Function and Modulation. *Acta Pharmacol. Sin.* **2017**, *38* (3), 312–316. https://doi.org/10.1038/aps.2016.149.
- (301) Magnussen, S. N.; Toraskar, J.; Hadler-Olsen, E.; Steigedal, T. S.; Svineng, G. Nephronectin as a Matrix Effector in Cancer. *Cancers* 2021, 13 (5), 959. https://doi.org/10.3390/cancers13050959.
- (302) Potthoff, M. J.; Olson, E. N. MEF2: A Central Regulator of Diverse Developmental Programs. *Development* **2007**, *134* (23), 4131–4140. https://doi.org/10.1242/dev.008367.
- (303) Canté-Barrett, K.; Pieters, R.; Meijerink, J. P. P. Myocyte Enhancer Factor 2C in Hematopoiesis and Leukemia. *Oncogene* **2014**, *33* (4), 403–410. https://doi.org/10.1038/onc.2013.56.
- (304) Lorger, M. Tumor Microenvironment in the Brain. *Cancers* **2012**, *4* (1), 218–243. https://doi.org/10.3390/cancers4010218.
- (305) Jang, J.-H.; Kim, D.-H.; Surh, Y.-J. Dynamic Roles of Inflammasomes in Inflammatory Tumor Microenvironment. Npj Precis. Oncol. 2021, 5 (1), 18. https://doi.org/10.1038/s41698-021-00154-7.

- (306) Terstappen, G. C.; Meyer, A. H.; Bell, R. D.; Zhang, W. Strategies for Delivering Therapeutics across the Blood–Brain Barrier. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (5), 362–383. https://doi.org/10.1038/s41573-021-00139-y.
- (307) Verheggen, I. C. M.; de Jong, J. J. A.; van Boxtel, M. P. J.; Postma, A. A.; Verhey, F. R. J.; Jansen, J. F. A.; Backes, W. H. Permeability of the Windows of the Brain: Feasibility of Dynamic Contrast-Enhanced MRI of the Circumventricular Organs. *Fluids Barriers CNS* 2020, *17* (1), 66. https://doi.org/10.1186/s12987-020-00228-x.
- (308) Lundgaard, I.; Osório, M. J.; Kress, B. T.; Sanggaard, S.; Nedergaard, M. White Matter Astrocytes in Health and Disease. *Neuroscience* 2014, 276, 161–173. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.10.050.
- (309) Liedtke, W.; Edelmann, W.; Bieri, P. L.; Chiu, F.-C.; Cowan, N. J.; Kucherlapati, R.; Raine, C. S. GFAP Is Necessary for the Integrity of CNS White Matter Architecture and Long-Term Maintenance of Myelination. *Neuron* **1996**, *17* (4), 607–615. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80194-4.
- (310) Ha, I. H.; Lim, C.; Kim, Y.; Moon, Y.; Han, S.-H.; Moon, W.-J. Regional Differences in Blood-Brain Barrier Permeability in Cognitively Normal Elderly Subjects: A Dynamic Contrast-Enhanced MRI-Based Study. *Korean J. Radiol.* **2021**, *22* (7), 1152. https://doi.org/10.3348/kjr.2020.0816.
- (311) Cramer, S. P.; Simonsen, H.; Frederiksen, J. L.; Rostrup, E.; Larsson, H. B. W. Abnormal Blood– Brain Barrier Permeability in Normal Appearing White Matter in Multiple Sclerosis Investigated by MRI. *NeuroImage Clin.* **2014**, *4*, 182–189. https://doi.org/10.1016/j.nicl.2013.12.001.
- Wendel, K. M.; Lee, J. B.; Affeldt, B. M.; Hamer, M.; Harahap-Carrillo, I. S.; Pardo, A. C.; Obenaus,
 A. Corpus Callosum Vasculature Predicts White Matter Microstructure Abnormalities after Pediatric
 Mild Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma* 2019, *36* (1), 152–164.
 https://doi.org/10.1089/neu.2018.5670.
- (313) Zammit, C.; Muscat, R.; Sani, G.; Pomara, C.; Valentino, M. Cerebral White Matter Injuries Following a Hypoxic/Ischemic Insult During the Perinatal Period: Pathophysiology, Prognostic Factors, and Future Strategy of Treatment Approach. A Minireview. *Curr. Pharm. Des.* 2015, *21* (11), 1418– 1425. https://doi.org/10.2174/1381612821666150105122008.
- (314) Dallasta, L. M.; Pisarov, L. A.; Esplen, J. E.; Werley, J. V.; Moses, A. V.; Nelson, J. A.; Achim, C. L. Blood-Brain Barrier Tight Junction Disruption in Human Immunodeficiency Virus-1 Encephalitis. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155* (6), 1915–1927. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65511-3.
- (315) Taylor, T. E.; Fu, W. J.; Carr, R. A.; Whitten, R. O.; Mueller, J. G.; Fosiko, N. G.; Lewallen, S.; Liomba, N. G.; Molyneux, M. E. Differentiating the Pathologies of Cerebral Malaria by Postmortem Parasite Counts. *Nat. Med.* 2004, *10* (2), 143–145. https://doi.org/10.1038/nm986.
- (316) Wardlaw, J. M.; Makin, S. J.; Valdés Hernández, M. C.; Armitage, P. A.; Heye, A. K.; Chappell, F. M.; Muñoz-Maniega, S.; Sakka, E.; Shuler, K.; Dennis, M. S.; Thrippleton, M. J. Blood-brain Barrier Failure as a Core Mechanism in Cerebral Small Vessel Disease and Dementia: Evidence from a Cohort Study. *Alzheimers Dement.* 2017, *13* (6), 634–643. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.09.006.
- Rost, N. S.; Cougo, P.; Lorenzano, S.; Li, H.; Cloonan, L.; Bouts, M. J.; Lauer, A.; Etherton, M. R.; (317) Karadeli, H. H.; Musolino, P. L.; Copen, W. A.; Arai, K.; Lo, E. H.; Feske, S. K.; Furie, K. L.; Wu, O. Diffuse Microvascular Dysfunction and Loss of White Matter Integrity Predict Poor Outcomes in Patients with Acute Ischemic Stroke. J. Cereb. Blood Flow Metab. 2018, 38 75-86. (1), https://doi.org/10.1177/0271678X17706449.

- (318) Hase, Y.; Ding, R.; Harrison, G.; Hawthorne, E.; King, A.; Gettings, S.; Platten, C.; Stevenson, W.; Craggs, L. J. L.; Kalaria, R. N. White Matter Capillaries in Vascular and Neurodegenerative Dementias. *Acta Neuropathol. Commun.* **2019**, *7* (1), 16. https://doi.org/10.1186/s40478-019-0666-x.
- (319) Seo, J. H.; Miyamoto, N.; Hayakawa, K.; Pham, L.-D. D.; Maki, T.; Ayata, C.; Kim, K.-W.; Lo, E. H.; Arai, K. Oligodendrocyte Precursors Induce Early Blood-Brain Barrier Opening after White Matter Injury. J. Clin. Invest. 2013, JCI65863. https://doi.org/10.1172/JCI65863.
- (320) Sweeney, M. D.; Zhao, Z.; Montagne, A.; Nelson, A. R.; Zlokovic, B. V. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol. Rev.* 2019, 99 (1), 21–78. https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017.
- (321) Archie, S. R.; Al Shoyaib, A.; Cucullo, L. Blood-Brain Barrier Dysfunction in CNS Disorders and Putative Therapeutic Targets: An Overview. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (11), 1779. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111779.
- (322) Ishizaki, T.; Chiba, H.; Kojima, T.; Fujibe, M.; Soma, T.; Miyajima, H.; Nagasawa, K.; Wada, I.; Sawada, N. Cyclic AMP Induces Phosphorylation of Claudin-5 Immunoprecipitates and Expression of Claudin-5 Gene in Blood–Brain-Barrier Endothelial Cells via Protein Kinase A-Dependent and Independent Pathways. *Exp. Cell Res.* 2003, 290 (2), 275–288. https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00354-9.
- Kis, B.; Deli, M. A.; Kobayashi, H.; Ábrahám, C. S.; Yanagita, T.; Kaiya, H.; Isse, T.; Nishi, R.; Gotoh, S.; Kangawa, K.; Wada, A.; Greenwood, J.; Niwa, M.; Yamashita, H.; Ueta, Y. Adrenomedullin Regulates Blood–Brain Barrier Functions in Vitro: *Neuroreport* 2001, *12* (18), 4139–4142. https://doi.org/10.1097/00001756-200112210-00055.
- Horai, S.; Nakagawa, S.; Tanaka, K.; Morofuji, Y.; Couraud, P.-O.; Deli, M. A.; Ozawa, M.; Niwa, M.
 Cilostazol Strengthens Barrier Integrity in Brain Endothelial Cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2013, *33* (2), 291–307. https://doi.org/10.1007/s10571-012-9896-1.
- (325) Scuderi, S.; D'Amico, A. G.; Castorina, A.; Imbesi, R.; Carnazza, M. L.; D'Agata, V. Ameliorative Effect of PACAP and VIP against Increased Permeability in a Model of Outer Blood Retinal Barrier Dysfunction. *Peptides* **2013**, *39*, 119–124. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.11.015.
- (326) Fabian, E.; Reglodi, D.; Horvath, G.; Opper, B.; Toth, G.; Fazakas, C.; Vegh, A. G.; Wilhelm, I.; Krizbai, I. A. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Acts against Neovascularization in Retinal Pigment Epithelial Cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2019, 1455 (1), 160–172. https://doi.org/10.1111/nyas.14189.
- (327) Maugeri, G.; D'Amico, A. G.; Amenta, A.; Saccone, S.; Federico, C.; Reibaldi, M.; Russo, A.; Bonfiglio, V.; Avitabile, T.; Longo, A.; D'Agata, V. Protective Effect of PACAP against Ultraviolet B Radiation-Induced Human Corneal Endothelial Cell Injury. *Neuropeptides* 2020, 79, 101978. https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.101978.
- (328) Dong, X. Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics* **2018**, *8* (6), 1481–1493. https://doi.org/10.7150/thno.21254.
- (329) Pardridge, W. M. A Historical Review of Brain Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (6), 1283. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061283.
- (330) Tóth, G.; Keresztes, A.; Tömböly, Cs.; Péter, A.; Fülöp, F.; Tourwé, D.; Navratilova, E.; Varga, É.; Roeske, W. R.; Yamamura, H. I.; Szucs, M.; Borsodi, A. New Endomorphin Analogs with Mu-Agonist

and Delta-Antagonist Properties. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76* (5), 951–957. https://doi.org/10.1351/pac200476050951.

- (331) Keresztes, A.; Szűcs, M.; Borics, A.; Kövér, K. E.; Forró, E.; Fülöp, F.; Tömböly, C.; Péter, A.; Páhi, A.; Fábián, G.; Murányi, M.; Tóth, G. New Endomorphin Analogues Containing Alicyclic β-Amino Acids: Influence on Bioactive Conformation and Pharmacological Profile. *J. Med. Chem.* 2008, *51* (14), 4270–4279. https://doi.org/10.1021/jm800223t.
- (332) Shi, S.; Xu, J.; Feng, L.; Fan, X.; Chen, Z.; Qin, Y.; Chung, N. N.; Li, T.; Schiller, P. W. Novel μ Opioid Antagonists Derived from the μ Opioid Agonists Endomorphin and [Dmt¹]DALDA (H-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂). Chem. Biol. Drug Des. **2020**, 96 (5), 1305–1314. https://doi.org/10.1111/cbdd.13743.
- (333) Zhao, L.; Luo, K.; Wang, Z.; Wang, Y.; Zhang, X.; Yang, D.; Ma, M.; Zhou, J.; Cui, J.; Wang, J.; Han, C.; Liu, X.; Wang, R. Design, Synthesis, and Biological Activity of New Endomorphin Analogs with Multi-Site Modifications. *Bioorg. Med. Chem.* 2020, 28 (9), 115438. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115438.
- (334) Zhang, Y.; Wang, M.; Wang, S.; Wang, X.; Yang, W.; Zhao, Y.; Han, F.; Zhang, Y.; Gu, N.; Wang, C. Novel Cyclic Endomorphin Analogues with Multiple Modifications and Oligoarginine Vector Exhibit Potent Antinociception with Reduced Opioid-like Side Effects. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (22), 16801– 16819. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01631.
- (335) Lőrinczi, B.; Szatmári, I. KYNA Derivatives with Modified Skeleton; Hydroxyquinolines with Potential Neuroprotective Effect. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22 (21), 11935. https://doi.org/10.3390/ijms222111935.
- (336) DiSabato, D. J.; Quan, N.; Godbout, J. P. Neuroinflammation: The Devil Is in the Details. J. Neurochem. 2016, 139, 136–153. https://doi.org/10.1111/jnc.13607.
- Ma, Q.; Zhao, Z.; Sagare, A. P.; Wu, Y.; Wang, M.; Owens, N. C.; Verghese, P. B.; Herz, J.; Holtzman, D. M.; Zlokovic, B. V. Blood-Brain Barrier-Associated Pericytes Internalize and Clear Aggregated Amyloid-B42 by LRP1-Dependent Apolipoprotein E Isoform-Specific Mechanism. *Mol. Neurodegener.* 2018, *13* (1), 57. https://doi.org/10.1186/s13024-018-0286-0.
- (338) Chang, R.; Castillo, J.; Zambon, A. C.; Krasieva, T. B.; Fisher, M. J.; Sumbria, R. K. Brain Endothelial Erythrophagocytosis and Hemoglobin Transmigration Across Brain Endothelium: Implications for Pathogenesis of Cerebral Microbleeds. *Front. Cell. Neurosci.* 2018, 12, 279. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00279.
- (339) Zhou, T.; Zheng, Y.; Sun, L.; Badea, S. R.; Jin, Y.; Liu, Y.; Rolfe, A. J.; Sun, H.; Wang, X.; Cheng, Z.; Huang, Z.; Zhao, N.; Sun, X.; Li, J.; Fan, J.; Lee, C.; Megraw, T. L.; Wu, W.; Wang, G.; Ren, Y. Microvascular Endothelial Cells Engulf Myelin Debris and Promote Macrophage Recruitment and Fibrosis after Neural Injury. *Nat. Neurosci.* **2019**, *22* (3), 421–435. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0324-9.
- (340) Parajuli, B.; Sonobe, Y.; Horiuchi, H.; Takeuchi, H.; Mizuno, T.; Suzumura, A. Oligomeric Amyloid β Induces IL-1β Processing via Production of ROS: Implication in Alzheimer's Disease. *Cell Death Dis.* 2013, *4* (12), e975–e975. https://doi.org/10.1038/cddis.2013.503.
- (341) Facci, L.; Barbierato, M.; Marinelli, C.; Argentini, C.; Skaper, S. D.; Giusti, P. Toll-Like Receptors 2,
 -3 and -4 Prime Microglia but Not Astrocytes Across Central Nervous System Regions for ATP-Dependent Interleukin-1β Release. *Sci. Rep.* 2014, *4* (1), 6824. https://doi.org/10.1038/srep06824.

- (342) Sun, Y.; Ma, J.; Li, D.; Li, P.; Zhou, X.; Li, Y.; He, Z.; Qin, L.; Liang, L.; Luo, X. Interleukin-10 Inhibits Interleukin-1β Production and Inflammasome Activation of Microglia in Epileptic Seizures. J. Neuroinflammation 2019, 16 (1), 66. https://doi.org/10.1186/s12974-019-1452-1.
- (343) Lee, Y.-J.; Choi, D.-Y.; Choi, I. S.; Kim, K. H.; Kim, Y. H.; Kim, H. M.; Lee, K.; Cho, W. G.; Jung, J. K.; Han, S. B.; Han, J.-Y.; Nam, S.-Y.; Yun, Y. W.; Jeong, J. H.; Oh, K.-W.; Hong, J. T. Inhibitory Effect of 4-O-Methylhonokiol on Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation, Amyloidogenesis and Memory Impairment via Inhibition of Nuclear Factor-kappaB in Vitro and in Vivo Models. *J. Neuroinflammation* **2012**, *9* (1), 35. https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-35.
- (344) Gong, P.; Xu, X.; Shi, J.; Ni, L.; Huang, Q.; Xia, L.; Nie, D.; Lu, X.; Chen, J.; Shi, W. Phosphorylation of Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinase-1 in Astrocytic Inflammation: A Possible Role in Inhibiting Production of Inflammatory Cytokines. *PLoS ONE* **2013**, *8* (12), e81747. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081747.
- (345) Couturier, J.; Stancu, I.-C.; Schakman, O.; Pierrot, N.; Huaux, F.; Kienlen-Campard, P.; Dewachter,
 I.; Octave, J.-N. Activation of Phagocytic Activity in Astrocytes by Reduced Expression of the
 Inflammasome Component ASC and Its Implication in a Mouse Model of Alzheimer Disease. J.
 Neuroinflammation 2016, 13 (1), 20. https://doi.org/10.1186/s12974-016-0477-y.
- (346) Banks, W. A.; Kovac, A.; Morofuji, Y. Neurovascular Unit Crosstalk: Pericytes and Astrocytes Modify Cytokine Secretion Patterns of Brain Endothelial Cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2018, *38* (6), 1104–1118. https://doi.org/10.1177/0271678X17740793.
- (347) Adamczak, S. E.; de Rivero Vaccari, J. P.; Dale, G.; Brand, F. J.; Nonner, D.; Bullock, Mr.; Dahl, G. P.; Dietrich, W. D.; Keane, R. W. Pyroptotic Neuronal Cell Death Mediated by the AIM2 Inflammasome. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2014, 34 (4), 621–629. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.236.
- Holbrook, J. A.; Jarosz-Griffiths, H. H.; Caseley, E.; Lara-Reyna, S.; Poulter, J. A.; Williams-Gray, C.
 H.; Peckham, D.; McDermott, M. F. Neurodegenerative Disease and the NLRP3 Inflammasome. *Front. Pharmacol.* 2021, *12*, 643254. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.643254.
- (349) Zahid, A.; Li, B.; Kombe, A. J. K.; Jin, T.; Tao, J. Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2538. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02538.
- (350) Xu, S.; Li, X.; Liu, Y.; Xia, Y.; Chang, R.; Zhang, C. Inflammasome Inhibitors: Promising Therapeutic Approaches against Cancer. J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol 2019, 12 (1), 64. https://doi.org/10.1186/s13045-019-0755-0.
- (351) Lapis, K.; Paku, S.; Liotta, L. A. Endothelialization of Embolized Tumor Cells during Metastasis Formation. *Clin. Exp. Metastasis* **1988**, *6* (1), 73–89. https://doi.org/10.1007/BF01580408.
- (352) Kanada, M.; Zhang, J.; Yan, L.; Sakurai, T.; Terakawa, S. Endothelial Cell-Initiated Extravasation of Cancer Cells Visualized in Zebrafish. *PeerJ* **2014**, *2*, e688. https://doi.org/10.7717/peerj.688.
- (353) Paku, S.; Laszlo, V.; Dezso, K.; Nagy, P.; Hoda, M. A.; Klepetko, W.; Renyi-Vamos, F.; Timar, J.; Reynolds, A. R.; Dome, B. The Evidence for and against Different Modes of Tumour Cell Extravasation in the Lung: Diapedesis, Capillary Destruction, Necroptosis, and Endothelialization: Tumour Cell Extravasation in the Lung. J. Pathol. 2017, 241 (4), 441–447. https://doi.org/10.1002/path.4855.
- (354) Krizbai, I. A.; Gasparics, Á.; Nagyőszi, P.; Fazakas, C.; Molnár, J.; Wilhelm, I.; Bencs, R.; Rosivall, L.; Sebe, A. Endothelial-Mesenchymal Transition of Brain Endothelial Cells: Possible Role during

Metastatic Extravasation. *PLOS ONE* **2015**, *10* (3), e0119655. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119655.

- (355) Redmer, T. Deciphering Mechanisms of Brain Metastasis in Melanoma the Gist of the Matter. *Mol. Cancer* **2018**, *17* (1), 106. https://doi.org/10.1186/s12943-018-0854-5.
- (356) Castel, P.; Toska, E.; Engelman, J. A.; Scaltriti, M. The Present and Future of PI3K Inhibitors for Cancer Therapy. *Nat. Cancer* **2021**, *2* (6), 587–597. https://doi.org/10.1038/s43018-021-00218-4.
- (357) Liang, J.; Oyang, L.; Rao, S.; Han, Y.; Luo, X.; Yi, P.; Lin, J.; Xia, L.; Hu, J.; Tan, S.; Tang, L.; Pan, Q.; Tang, Y.; Zhou, Y.; Liao, Q. Rac1, A Potential Target for Tumor Therapy. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 674426. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.674426.
- (358) Funakoshi, H.; Matsui, H.; Fushimi, K.; Yasunaga, H. Association between Preventive Administration of Fasudil Hydrochloride and Post-Interventional Neurological Outcomes in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. Ann. Clin. Epidemiol. 2020, 2 (4), 107–112. https://doi.org/10.37737/ace.2.4_107.
- (359) Fujita, A.; Kurazumi, H.; Suzuki, R.; Takahashi, M.; Mikamo, A.; Hamano, K. Relief of Vasospasm with Fasudil after Off-Pump Coronary Artery Bypass Grafting: A Case Study. *Surg. Case Rep.* 2018, 4 (1), 82. https://doi.org/10.1186/s40792-018-0481-9.
- (360) Guerra, F. S.; Oliveira, R. G. de; Fraga, C. A. M.; Mermelstein, C. dos S.; Fernandes, P. D. ROCK Inhibition with Fasudil Induces Beta-Catenin Nuclear Translocation and Inhibits Cell Migration of MDA-MB 231 Human Breast Cancer Cells. *Sci. Rep.* 2017, 7 (1), 13723. https://doi.org/10.1038/s41598-017-14216-z.
- (361) Liang, J.; Tang, M.; Wang, L.; Huang, R.; Fu, A.; Zhou, J. Design and Development of Novel Fasudil Derivatives as Potent Antibreast Cancer Agent That Improves Intestinal Flora and Intestinal Barrier Function in Rats. *Chem. Biol. Drug Des.* **2021**, *98* (6), 1065–1078. https://doi.org/10.1111/cbdd.13963.
- (362) Smoum, R.; Grether, U.; Karsak, M.; Vernall, A. J.; Park, F.; Hillard, C. J.; Pacher, P. Editorial: Therapeutic Potential of the Cannabinoid CB2 Receptor. *Front. Pharmacol.* 2022, 13, 1039564. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1039564.
- (363) Alday-Parejo; Stupp; Rüegg. Are Integrins Still Practicable Targets for Anti-Cancer Therapy? *Cancers* **2019**, *11* (7), 978. https://doi.org/10.3390/cancers11070978.
- (364) Anderson, N. M.; Simon, M. C. The Tumor Microenvironment. *Curr. Biol.* 2020, 30 (16), R921–
 R925. https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081.
- (365) Joyce, J. A.; Pollard, J. W. Microenvironmental Regulation of Metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 2009, 9 (4), 239–252. https://doi.org/10.1038/nrc2618.
- Bentolila, L. A.; Prakash, R.; Mihic-Probst, D.; Wadehra, M.; Kleinman, H. K.; Carmichael, T. S.;
 Péault, B.; Barnhill, R. L.; Lugassy, C. Imaging of Angiotropism/Vascular Co-Option in a Murine Model of Brain Melanoma: Implications for Melanoma Progression along Extravascular Pathways. *Sci. Rep.* 2016, *6* (1), 23834. https://doi.org/10.1038/srep23834.
- (367) Ziegler, A. N.; Feng, Q.; Chidambaram, S.; Testai, J. M.; Kumari, E.; Rothbard, D. E.; Constancia, M.; Sandovici, I.; Cominski, T.; Pang, K.; Gao, N.; Wood, T. L.; Levison, S. W. Insulin-like Growth Factor II: An Essential Adult Stem Cell Niche Constituent in Brain and Intestine. *Stem Cell Rep.* 2019, *12* (4), 816–830. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.02.011.

- (368) Courtney, J.-M.; Sutherland, B. Harnessing the Stem Cell Properties of Pericytes to Repair the Brain. *Neural Regen. Res.* **2020**, *15* (6), 1021. https://doi.org/10.4103/1673-5374.270301.
- Pandey, K.; Bessières, B.; Sheng, S. L.; Taranda, J.; Osten, P.; Sandovici, I.; Constancia, M.; Alberini,
 C. M. Neuronal Activity Drives IGF2 Expression from Pericytes to Form Long-Term Memory. *Neuron* 2023, S0896627323006645. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.08.030.
- (370) Yee, D. 40 YEARS OF IGF1: Anti-Insulin-like Growth Factor Therapy in Breast Cancer. J. Mol. Endocrinol. 2018, 61 (1), T61–T68. https://doi.org/10.1530/JME-17-0261.
- (371) Yuan, J.; Yin, Z.; Tao, K.; Wang, G.; Gao, J. Function of Insulin-like Growth Factor 1 Receptor in Cancer Resistance to Chemotherapy (Review). Oncol. Lett. 2017. https://doi.org/10.3892/ol.2017.7276.
- (372) Osher, E.; Macaulay, V. M. Therapeutic Targeting of the IGF Axis. *Cells* **2019**, *8* (8), 895. https://doi.org/10.3390/cells8080895.
- (373) Saldana, S. M.; Lee, H.-H.; Lowery, F. J.; Khotskaya, Y. B.; Xia, W.; Zhang, C.; Chang, S.-S.; Chou, C.-K.; Steeg, P. S.; Yu, D.; Hung, M.-C. Inhibition of Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor Signaling Attenuates the Development of Breast Cancer Brain Metastasis. *PLoS ONE* **2013**, *8* (9), e73406. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073406.
- (374) Aiken, R.; Axelson, M.; Harmenberg, J.; Klockare, M.; Larsson, O.; Wassberg, C. Phase I Clinical Trial of AXL1717 for Treatment of Relapsed Malignant Astrocytomas: Analysis of Dose and Response. Oncotarget 2017, 8 (46), 81501–81510. https://doi.org/10.18632/oncotarget.20662.
- (375) Pon, J. R.; Marra, M. A. MEF2 Transcription Factors: Developmental Regulators and Emerging Cancer Genes. *Oncotarget* **2016**, *7* (3), 2297–2312. https://doi.org/10.18632/oncotarget.6223.
- (376) Galego, S.; Kauppila, L. A.; Malhó, R.; Pimentel, J.; Brito, M. A. Myocyte Enhancer Factor 2C as a New Player in Human Breast Cancer Brain Metastases. *Cells* **2021**, *10* (2), 378. https://doi.org/10.3390/cells10020378.
- (377) Siegl, F.; Vecera, M.; Roskova, I.; Smrcka, M.; Jancalek, R.; Kazda, T.; Slaby, O.; Sana, J. The Significance of MicroRNAs in the Molecular Pathology of Brain Metastases. *Cancers* 2022, 14 (14), 3386. https://doi.org/10.3390/cancers14143386.
- (378) Doron, H.; Pukrop, T.; Erez, N. A Blazing Landscape: Neuroinflammation Shapes Brain Metastasis. *Cancer Res.* **2019**, *79* (3), 423–436. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1805.
- (379) Coll, R. C.; Hill, J. R.; Day, C. J.; Zamoshnikova, A.; Boucher, D.; Massey, N. L.; Chitty, J. L.; Fraser, J. A.; Jennings, M. P.; Robertson, A. A. B.; Schroder, K. MCC950 Directly Targets the NLRP3 ATP-Hydrolysis Motif for Inflammasome Inhibition. *Nat. Chem. Biol.* 2019, 15 (6), 556–559. https://doi.org/10.1038/s41589-019-0277-7.
- (380) Chen, Q.-L.; Yin, H.-R.; He, Q.-Y.; Wang, Y. Targeting the NLRP3 Inflammasome as New Therapeutic Avenue for Inflammatory Bowel Disease. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *138*, 111442. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111442.
- (381) Lahooti, B.; Chhibber, T.; Bagchi, S.; Varahachalam, S. P.; Jayant, R. D. Therapeutic Role of Inflammasome Inhibitors in Neurodegenerative Disorders. *Brain. Behav. Immun.* 2021, *91*, 771–783. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.11.004.

9 Az értekezésben felhasznált közlemények

Az 1.1 fejezethez kapcsolódó összefoglaló közlemények és könyvfejezet

- Krizbai I, Wilhelm I, Bauer HC, Bauer H. The role of glia in the formation and function of the bloodbrain 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.
- 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)
- Wilhelm I, Nyúl-Tóth Á, Suciu 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)
- 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)
- 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)

Az 1.2 fejezethez kapcsolódó összefoglaló közlemények

- 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)
- 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)

Az 1.3 fejezethez kapcsolódó összefoglaló közlemények és könyvfejezetek

- 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)
- 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.
- 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)
- 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.

A 4.1 fejezethez kapcsolódó közlemények

- Mallareddy JR, Tóth G, Fazakas C, Molnár J, Nagyőszi 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, Suciu 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)

A 4.2 fejezethez kapcsolódó közlemények

- 17. Nagyőszi 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, Nagyőszi 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)

A 4.3 fejezethez kapcsolódó közlemények

- 22. Wilhelm I*, Fazakas C*, Molnár J, Haskó J, Végh AG, Cervenak L, Nagyőszi 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**, Hasko 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 közlemények független idézeteinek 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 Dungnak, Dr. Nagyőszi Péternek, Kozma Mihálynak, Győri Fanninak, Mészáros Ádámnak és Dudás Tamásnak. Köszönöm az együtt töltött időt 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 Gézának); 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 KGYNKösztöndíjjal segítette munkámat.

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