

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM**

**Természettudományi és Informatikai Kar**

**Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék**

**és**

**Szegedi Biológiai Kutatóközpont**

**Biofizikai Intézet**

---

**36. OTDK Biológia szekció**

**AZ EMLŐKARCINÓMA EXOSZÓMÁK ÁLTAL OKOZOTT MIRNS ÉS MRNS  
VÁLTOZÁSOK A VÉR-AGY GÁTAT ALKOTÓ ENDOTÉLSEJTEKBEN**

MiRNA and mRNA changes in the blood-brain barrier-forming endothelial cells in response to breast cancer cell-derived exosomes

**Árki Virág**

**Biológus MSc.**



Témavezetők: **Dr. Wilhelm Imola, Ph.D.**  
**Dr. Fazakas Csilla, Ph.D.**

Belső konzulens: **Dr. Farkas Tamás, Ph.D.**

**2022**

# Tartalomjegyzék

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Rövidítések.....</b>                                                                  | <b>3</b>  |
| <b>1 Bevezetés.....</b>                                                                  | <b>4</b>  |
| 1.1 A vér-agy gát és az agyi endotélsejtek.....                                          | 4         |
| 1.2 Az agyi metasztázisok.....                                                           | 5         |
| 1.3 Az emlőkarcinóma agyi metasztázisai.....                                             | 6         |
| 1.4 Az extracelluláris vezikulák, exoszómák és a központi idegrendszeri daganatok.....   | 6         |
| 1.5 A miRNS-ek szerepe a metasztázisképzésben.....                                       | 7         |
| <b>2 Célkitűzések.....</b>                                                               | <b>10</b> |
| <b>3 Anyag és módszer.....</b>                                                           | <b>11</b> |
| 3.1 Sejtenyésztés.....                                                                   | 11        |
| 3.2 A 4T1-tdTomato sejtekből származó exoszómák izolálása.....                           | 11        |
| 3.3 Az exoszómák jellemzése.....                                                         | 12        |
| 3.3.1 Western blot analízis.....                                                         | 12        |
| 3.3.2 Dinamikus fényszórás.....                                                          | 13        |
| 3.3.3 Atomerő mikroszkópos képalkotás.....                                               | 13        |
| 3.4 PKH26 festési protokoll a 4T1-tdTomato exoszómák felvételéhez.....                   | 14        |
| 3.5 Immunfluoreszcencia vizsgálatok.....                                                 | 14        |
| 3.6 RNS extrakció, cDNS előkészítés és qPCR.....                                         | 15        |
| 3.7 Az mmu-miR146a-5p targetjeinek predikciója.....                                      | 16        |
| 3.8 Statisztikai módszerek.....                                                          | 17        |
| <b>4 Eredmények.....</b>                                                                 | <b>18</b> |
| 4.1 A tumor eredetű exoszómák felvétele egér agyi primer endotélsejtek által.....        | 18        |
| 4.2 A tumor eredetű exoszómák hatása az agyi endotélsejtek miRNS és mRNS tartalmára..... | 19        |
| 4.3 A miR célgénnek, cél-mRNS-ek qPCR validálása.....                                    | 21        |
| <b>5 Diskusszió.....</b>                                                                 | <b>25</b> |
| <b>Összefoglalás.....</b>                                                                | <b>30</b> |
| <b>Irodalomjegyzék.....</b>                                                              | <b>32</b> |
| <b>Köszönetnyilvánítás.....</b>                                                          | <b>37</b> |

## Rövidítések

|               |   |                                                                                                  |
|---------------|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AJ            | - | Adherens junctions, adherens kapcsolatok                                                         |
| BSA           | - | Bovine serum albumin, marhaszérum albumin                                                        |
| ESCRT         | - | Endosomal sorting complexes required for transport                                               |
| EV            | - | Extracelluláris vezikula                                                                         |
| FBS           | - | Foetal bovine serum, magzati szarvasmarha szérum                                                 |
| GAPDH         | - | Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Glicerinaldehyd-3-foszfát dehidrogenáz                 |
| Hsp           | - | Heat shock proteins, hősokkfehérjék                                                              |
| Irak1         | - | Interleukin-1 receptor-associated kinase 1, interleukin-1 receptorhoz kapcsolódó kináz 1         |
| MBEC          | - | Mouse brain endothelial cells, primer egér agyi endotélsejtek                                    |
| MED           | - | Mediátor                                                                                         |
| miRNS         | - | MikroRNS                                                                                         |
| miTG          | - | MicroT-CDS                                                                                       |
| mPR           | - | Membrán progeszteron receptor                                                                    |
| MV            | - | Mikrovezikulák                                                                                   |
| MVB           | - | Multivesicular body, multivezikuláris test                                                       |
| PAQR          | - | Progesterin and adipoQ receptor                                                                  |
| PBS           | - | Phosphate-buffered saline, foszfát pufferelt sóoldat                                             |
| PR            | - | Progeszteron receptor                                                                            |
| qPCR          | - | Quantitative real-time polymerase chain reaction, kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció |
| TBS-T         | - | Tris-pufferelt sóoldat, Tween-20-szal                                                            |
| TJ            | - | Tight junctions, folytonos szoros kapcsolatok                                                    |
| TLR           | - | Toll-like receptor, mintázatfelismerő receptor                                                   |
| TLR4          | - | Toll-like receptor 4                                                                             |
| TNF- $\alpha$ | - | Tumor nekrosis faktor-alfa                                                                       |
| TRAF          | - | Tumor nekrosis faktor receptor-asszociált faktorok                                               |
| Traf6         | - | Tumor nekrosis faktor receptorhoz kapcsolódó 6-os faktor                                         |
| ZO            | - | Zonula occludens                                                                                 |

# 1 Bevezetés

## 1.1 A vér-agy gát és az agyi endotélsejtek

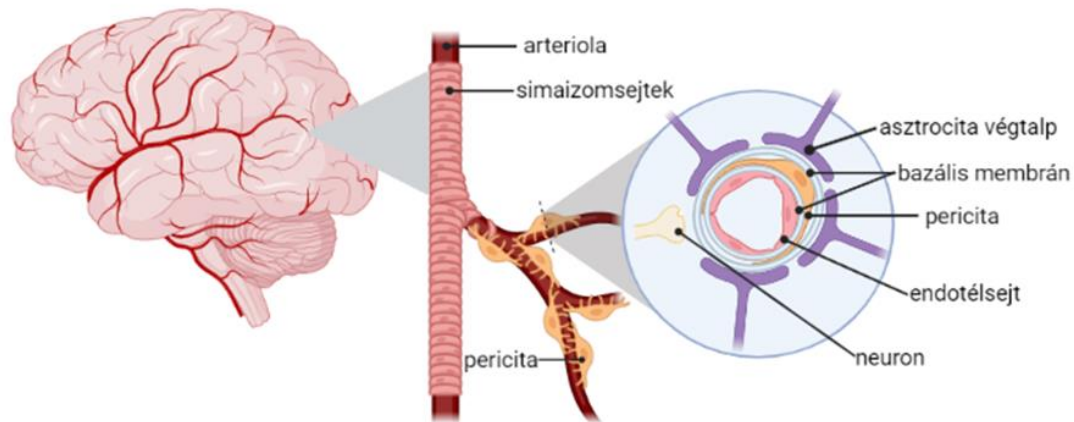
A vér-agy gát (blood-brain barrier, BBB) az ionegyensúly dinamikus szabályozójaként, a tápanyagszállítás elősegítőjeként, valamint a potenciálisan káros molekulák gátjaként [1] nélkülözhetetlen a központi idegrendszer homeosztázisának fenntartásához. A vér-agy gátat az egyedi barrier tulajdonságokkal rendelkező agyi endotélsejtek alkotják. Felépítésében az endotélsejtek mellett periciták és asztrociták vesznek részt, továbbá része még a periciták és az endotélsejtek, illetve a periciták és az asztrociták között elhelyezkedő bazális membrán is [2] (1. ábra).

A vér-agy gát endotélsejtjei a fenesztrációk hiányában, a minimális pinocitotikus aktivitásban, a folytonos szoros kapcsolatok (tight junctions, TJ) jelenlétében, az efflux transzporterek magas expressziójában, valamint a megnövekedett mitokondriális tartalomban különböznek a periférián lévő endotélsejtektől [1]. A vér-agy gát endotélsejtjei között a TJ folytonosan helyezkedik el, és biztosítja a paracelluláris gát működését. A TJ transzmembrán fehérjékből (okkludin, klaudinok, junkcionális adhéziós molekulák, stb.) és plakkk fehérjékből (zonula occludens (ZO)-1, ZO-2, paracingulin és más fehérjékből) épülnek fel, és az aktin citoszkeletonhoz kapcsolódnak. A TJ kialakítását és fenntartását segítik az adherens junkciók (adherens junctions, AJ), amelyek kadherineket, katenineket és más fehérjéket tartalmaznak [3]. Bár az AJ károsodása a vér-agy gát permeabilitásának fokozódását idézi elő [4], elsősorban a TJ feladata biztosítani az alacsony paracelluláris permeabilitást és a nagy elektromos ellenállást [5].

A vér-agy gát a barrier funkcióján kívül karrier szereppel is rendelkezik, ami a tápanyagok és aminosavak agyba való szállításáért, továbbá a metabolitok eltávolításáért felel. A kisméretű, zsírban oldódó molekulák és a vérgázok ( $O_2$ ,  $CO_2$ ) passzívan diffundálnak át a vér-agy gáton, míg az esszenciális poláris tápanyagok, beleértve a glükózt, az aminosavakat, az inzulint, a leptint és a transzferrint, specifikus transzporter- vagy receptor-mediált endocitózissal jutnak át [6, 7, 8].

A vér-agy gát kiemelkedő szereppel bír az orvos diagnosztika és a központi idegrendszert érintő betegségek terápiája szempontjából is. Egyrészt számos neurológiai rendellenesség, például agyi ischaemia, agyi trauma, központi idegrendszeri daganatok esetében megfigyelhető a vér-agy gát permeabilitásának növekedése [9]. Másrészt a gát viszonylagos áthatolhatatlansága miatt sok gyógyszer nem képes terápiásan releváns koncentrációban elérni

a központi idegrendszert, így a vér-agy gát a központi idegrendszeri betegségek kezelésének egyik fő akadálya [10, 6].



**1. ábra:** A vér-agy gát és a neurovaszkuláris egység felépítése.

## 1.2 Az agyi metasztázisok

A vér-agy gát viszonylagos átjárhatatlansága ellenére, bizonyos tumorsejtek képesek áttörni az agyi kapillárisok falán, és az agyba jutva áttétes daganatot kialakítani. A daganatos megbetegedéssel diagnosztizált betegek 20-45%-ában mutatnak ki agyi metasztázisokat a betegségük fennállása során [11]. Ezen metasztatikus agydaganatok sokkal nagyobb arányban fordulnak elő, mint a primer agyi daganatok, így a rosszindulatú agyi betegségek okozta halálozás fő okaiként tartják őket számon [12]. Egyes tanulmányok azt mutatják, hogy az agyi áttétek előfordulási aránya 8,3 és 14,3 között van 100000 lakosra vetítve. Ezen tanulmányok azonban valószínűleg jelentősen alábecsülik a valódi előfordulási gyakoriságot [13].

Felnőtteknél a leggyakoribb primer daganatok, amelyek agyi áttéteket alakítanak ki, a tüdőkarcinóma (amely az agyi áttétek nagyjából 50%-áért felelős), az emlőkarcinóma (15-20%), bizonyos ismeretlen elsődleges daganatok (10-15%), továbbá a melanóma (10%) és a vastagbél-daganat (5%) [13, 14, 15, 16].

Bár a terápiás lehetőségek folyamatosan fejlődnek, az agyi metasztázisok kezelése igen nagy problémát jelent. Az agyi metasztázisok terápiás megközelítései közé tartoznak a különböző műtéti beavatkozások, a teljes agy sugárterápiája (Whole Brain Radiation Therapy, WBRT), a sztereotaktikus sugársebészet (SRS), a kemoterápia, a növekedési faktor inhibitorok, illetve ezen terápia kombinációja [17]. Az agyi áttétes betegek medián túlélési ideje kezelés nélkül mindössze 1 hónap, műtéttel és/vagy sugárterápiával pedig 3-4 hónap [18].

A betegek kb. fele esetében a halál oka a központi idegrendszeri tumor progressziójának tulajdonítható [19].

### **1.3 Az emlőkarcinóma agyi metasztázisai**

Az emlőkarcinóma a második vezető halálok a nők körében, hiszen az összes új női daganatos megbetegedés körülbelül 30%-áért felelős. Annak az esélye, hogy a beteg meghaljon a kialakult emlődaganat miatt, 1 a 39-hez (kb. 2,6%) [20].

Az emlőkarcinómás betegek 15-25%-ánál figyeltek meg központi idegrendszeri áttéteket, és ezek előfordulási gyakorisága egyre növekszik. Továbbá a betegek 20%-ánál mindössze 1 éves túlélés valószínűsíthető. Ennek oka, hogy ezekre a másodlagos daganatképződésekre nincsenek specifikus, célzott terápiák [21, 22]. Ez abból következik, hogy kifejezetten nehéz az agyi metasztázisok kezelése, hiszen a BBB megakadályozza a legtöbb hagyományos és új kemoterápiás szer központi idegrendszeri behatolását efflux transzporterein keresztül, továbbá az agyi mikrokörnyezet gliasejtjei ellenállóvá teszik a rosszindulatú sejteket a terápiával szemben [23, 24, 25].

A hármás-negatív emlőkarcinóma az invazív emlőkarcinómák igen agresszív típusa, amelyre jellemző, hogy a daganatsejtek nem rendelkeznek ösztrogén-, illetve progeszteronreceptorokkal (ER vagy PR), és nem termelnek humán epidermális növekedési faktor receptor 2-t (HER-2). Előfordulását tekintve az összes emlőkarcinóma körülbelül 15%-át teszi ki. Jellemző rá a rossz prognózis és a nehéz terápiás kezelhetőség. Továbbá ennél az emlődaganat típusnál írtak le a legagresszívebb agyi metasztázis képzést [20, 26].

### **1.4 Az extracelluláris vezikulák, exoszómák és a központi idegrendszeri daganatok**

A metasztázisok kialakulásában fontos szerepet játszhatnak a tumorsejtek által termelt extracelluláris vezikulák (EV-k), amelyek lokálisan és szisztémásan közvetítik a sejt-sejt kommunikációt, és ezáltal részt vesznek számos, a szervezeten belüli fiziológiás és kóros folyamat irányításában [27, 28, 29].

Az EV-k méretük és biogenezisük alapján három csoportba sorolhatók. Így méretük alapján megkülönböztetünk exoszómákat (30-200 nm), mikrovezikulákat (MV-k) (100-1000 nm) és apoptotikus testeket (> 1000 nm) [30, 31, 32, 33, 34, 28].

Biogenezisük alapján az apoptotikus testeket és az MV-ket külön csoportba sorolják, hiszen ezen vezikulák közvetlenül a plazmamembránból szabadulnak fel élő és haldokló sejtekben, intracellulárisan. Ezzel szemben az exoszómák a késői

endoszómák/multivezikuláris testek (multivesicular bodies, MVB) és a plazmamembrán fúziója után szabadulnak fel az extracelluláris környezetbe [35].

Az exoszómák kialakulása endocitózissal kezdődik, amely során kialakulnak a korai endoszómák. Ezután a Golgi komplex segítségével ezek az újonnan képződött vezikulák a korai endoszómákból késői endoszómákká válnak [36, 37, 38, 39]. A létrejött késői endoszóma lumenében a plazmamembrán invaginációjával intraluminális vezikulák keletkeznek [40]. Ezt a folyamatot az ESCRT (Endosomal sorting complexes required for transport) fehérjék szabályozzák [41]. A folyamat során az érett késői endoszómák, úgynevezett MVB-kké alakulnak [42, 43]. Végül az MVB-k egyesülnek a sejtmembránnal, és felszabadítják belső vezikuláikat, azaz az exoszómáikat az extracelluláris térbe. A felszabadult exoszómák méretük, RNS tartalmuk és speciális fehérjék alapján különböztethetők meg egymástól [44, 45].

Az exoszómákba beépülő fő membránhoz kötött és citoszolikus fehérjék a tetraspanin család tagjai (CD9, CD63 és CD81), az ESCRT fehérjék (Alix, TSG101), integrinek, hősokkfehérjék (Hsp), az aktin és a flotilinek [46, 47]. Míg az olyan fehérjék, mint a Hsp-k, a CD63, az ESCRT és a citoskeletális komponensek az összes exoszómában előfordulnak, addig más fehérjék, mint például az MHC I. és II. osztály specifikusak a donor sejttípusra [48]. Az exoszómák mindezek mellett tartalmazznak nukleinsavakat [49, 48], amelyek közül a mikroRNS-ek (miRNS) az egyik legelterjedtebb RNS-típusok az exoszómán belül [46, 50].

A tumorsejtek által kibocsátott exoszómák szerepet játszhatnak az áttétek kialakulásában. Egyre több bizonyíték kerül napvilágra arról, hogy a primer tumorsejtek exoszómákat választanak ki, amelyek még a tumorsejtek célszervbe való megérkezése előtt eljutnak a távoli szervekbe. Ez a folyamat lehetővé teszi egy kedvezőbb, befogadóbb ún. pre-metasztatikus niche kialakulását, amely a későbbiekben elősegítheti a megtelepedett daganatsejtek növekedését a célszerven belül [51].

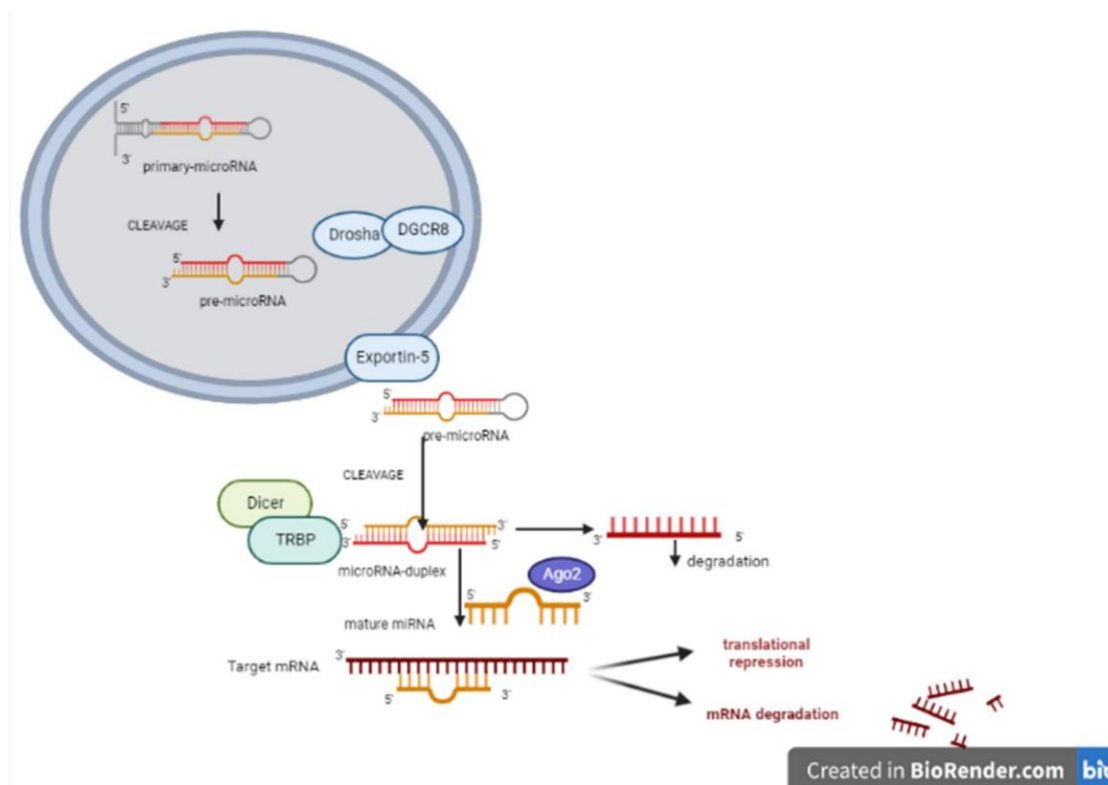
Az emlőkarcinóma sejtekből származó exoszómák agyi metasztázisok kialakításában játszott szerepéről több kutatás is készült. Kimutatták, hogy egy hialuronsav-kötő fehérje (CEMIP) feldúsulása agyi áttétképző emlőkarcinóma sejtek exoszómaiban hozzájárul egy, az áttétképzés szempontjából kedvező agyi környezet kialakításához [52].

## **1.5 A miRNS-ek szerepe a metasztázisképzésben**

A legtöbb kutatás azonban nem az exoszomális fehérjékre, hanem a miRNS-ekre koncentrált.

A miRNS-ek a nem kódoló RNS-ek egyik osztálya, amelyek képesek szabályozni a fehérjekódoló gének expresszióját [53]. Átíródásuk a sejtmagban RNS-polimeráz II által zajlik

független genetikai egységekből [54, 55, 56, 57]. Az elsődleges miRNS-transzkriptum poszttranszkripció feldolgozása egy 18-22 nukleotid hosszúságú bioaktív, érett miRNS kialakulását eredményezi [58], amely RNS-indukált fehérjékkel komplexet alkotva fejtheti ki biológiai funkcióját. Ekkor kötődik az mRNS-transzkriptum 3'-nem transzlált régiójához (3'-UTR). A folyamat során részt vesz a transzláció elnyomásában, illetve indukálhatja az mRNS teljes lebomlását, és ezzel befolyásolhatja egyes gének expressziós szintjét [53] (2. ábra).



**2. ábra:** A mikroRNS képződése és szabályozó működése.

Szakértők becslései szerint a fehérjekódoló gének többsége (legalább 60%-a) szabályozható miRNS-ekkel [59, 57]. Az emberekben előforduló miRNS-ek nagyfokú homológiát mutatnak célszekvenciáikban egyéb fajokkal, így jó jelöltek az állatmodelleken végzett miRNS-mRNS kölcsönhatások vizsgálatához [59]. Ennek köszönhetően a miRNS-ek széleskörben tanulmányozhatók a patofiziológiai folyamatok szabályozóiként [60, 61], továbbá ígéretes célpontjai lehetnek terápiás megközelítéseknek [62, 53]. Az elmúlt években felismerték, hogy a miRNS-eknek kiemelkedő szerepük van egyes daganatok progresszióját befolyásoló jelátviteli útvonalak szabályozásában [63], továbbá a metasztatikus áttétek kialakításában [64].

Emlőkarcinóma agyi metasztázisai kapcsán leírták a miR-509 és a miR-7 szintjének jelentős csökkenését az agyi metasztatikus léziókban. Azt találták, hogy a miR-509 fiziológiás koncentrációban képes elnyomni a tumorsejtek transzendentáliális migrációját a RhoC által

indukált mátrix metaloproteináz-9 expressziójának blokkolása során, illetve képes megakadályozni a TNF-alfa által indukált vér-agy gát megnyílást, mindezen folyamatokkal pedig nehezíti a tumorsejtek metasztázisát [65]. Azokban az emlőkarcinóma őssejtekben, melyek fokozott metasztatikus potenciált mutattak az agy irányába, a miR-7 expressziós szintje csökkent, mely a Kruppel-like factor 4 (KLF4) fokozott expresszióját eredményezte, ezáltal elősegítve az emlőkarcinómás őssejtek agyi endotélsejteken keresztüli vándorlását [66]. Ezzel ellentétben a miR-181c és miR-105 szintjében jelentős emelkedést tapasztaltak az emlőkarcinóma agyi metasztázisa kapcsán. Az agyba metasztázist adó emlőkarcinóma sejtek miR-181c-t tartalmazó exoszómákat bocsájtanak ki, amelyek csökkentik a 3-foszfoinozid-függő protein kináz-1 (PDPK1) expresszióját, így cofilin defoszforiláció, aktin dinamikai változás és végül az endotélsejtek közötti TJ károsodása következik be [67]. A miR-105, amely magas szinten van jelen az emlőkarcinómasejtek által kiválasztott exoszómákban, agyi endotélsejtekben csökkenti a ZO-1 expresszióját, ezáltal a vér-agy gát megnyílását okozza, így jelentősen hozzájárul az áttétek kialakulásához [68].

Megfigyelték azt is, hogy az emlőkarcinóma sejtekből származó exoszómákban lévő miR-122 gátolja az agyi asztrociták glükózfelvételét úgy, hogy csökkenti a glikolitikus piruvát-kináz enzim aktivitását, ezzel elősegítve az agyi metasztázisok kialakulását [69]. Továbbá leírták, hogy az lncRNA XIST hiány elősegíti az exoszomális miRNS-503 szekrécióját az emlőkarcinómasejtekből, ami a mikrogliasejtek polarizációját közvetítve szintúgy elősegíti az agyi metasztázisok kialakulását [70].

Összességében tehát az emlőkarcinóma agyi metasztázisok kialakulását számos miRNS szabályozhatja, azonban a kép korántsem teljes.

## 2 Célkitűzések

A hármás negatív emlőkarcinóma az emlődaganatok egy specifikus altípusa, amelynek klinikai jellemzői közé tartozik a magas invazivitás és metasztatikus potenciál, valamint a relapszusra való hajlam. A prognózist tovább rontja az agyi áttétek kialakítására való hajlam, amelyeknek kezelése nagy nehézségekbe ütközik. Éppen ezért meg kell értenünk azokat a mechanizmusokat, melyek lehetővé teszik az agyi metasztázisok kialakulását, hiszen ez az első lépés a terápiás célpontok azonosítása felé.

A tumorból felszabaduló exoszómák alapvető szerepet játszanak a premetasztatikus niche előkészítésében. Az exoszómák a távolsági kommunikáció kulcsszereplőiként információt továbbítanak a metasztatikus környezet sejtjei felé, hogy a rezidens sejteket prometasztatikus fenotípusra kötelezzék, ezzel is elősegítve az áttétképződés folyamatát.

Vizsgálataink során tripla negatív emlőkarcinóma sejtekből származó exoszómák hatását vizsgáltuk az agyi endotélsejtek miRNS és mRNS tartalmára.

Kutatásunk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Felveszik-e az agyi endotélsejtek a tripla negatív mellrák sejtekből származó exoszómákat?
2. Milyen változást váltanak ki a tumor eredetű exoszómák az agyi endotélsejtek miRNS tartalmában?
3. Hogyan befolyásolják a tumor eredetű exoszómák által okozott miRNS-szint változások az agyi endotélsejtek génexpresszióját?
4. Mi lehet a szerepe ezeknek a folyamatoknak?

### 3 Anyag és módszer

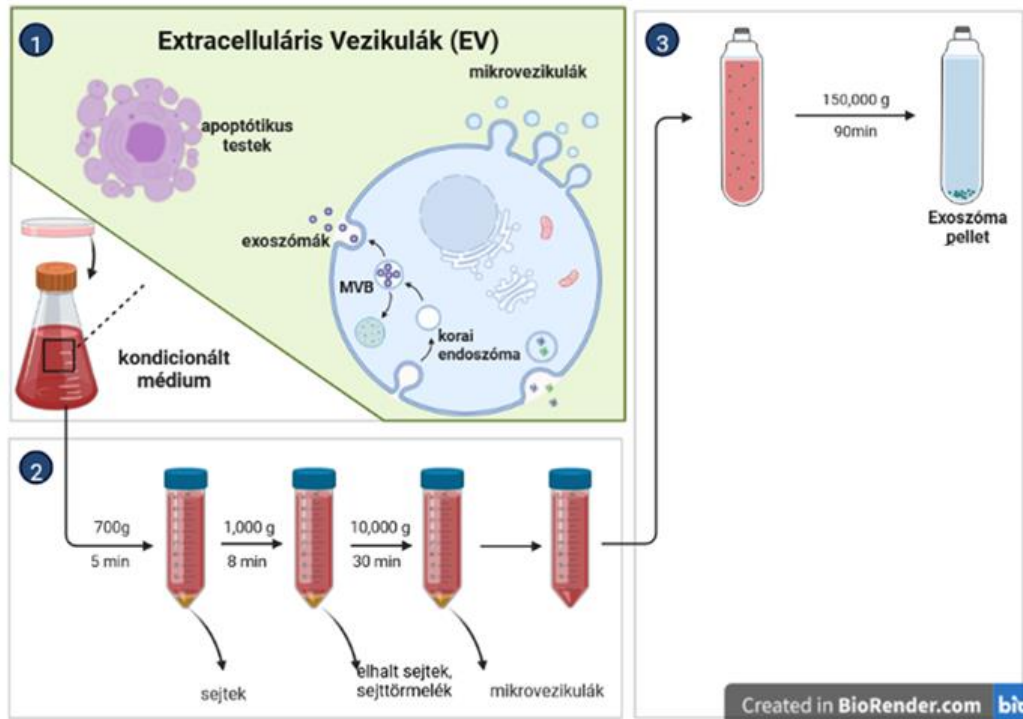
#### 3.1 Sejttenyésztés

Az egér 4T1-tdTomato tripla negatív mellrák sejteket Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 médiumban tartottuk (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), amihez 5% magzati szarvasmarha szérumot (FBS (fetal bovine serum); Gibco, Thermo Fischer Scientific) adtunk. A vörös fluoreszcencia fenntartásához 500 µg/ml Geneticinnel (G418; Gibco, Thermo Fischer Scientific) szelekciós antibiotikummal egészítettük ki a sejtek tápfolyadékát.

A primér egér agyi endotélsejteket (mouse brain endothelial cells (MBEC)) 6-8 hetes nőstény FVB/Ant:TgCAG-yfp\_sb #27 (Kísérleti Orvostudományi Intézet, Budapest, Magyarország) egerekből izoláltuk. Az agyak begyűjtése után eltávolítottuk az agyhártyát, az agykérget apró darabokra vágtuk, majd két lépéses emésztésnek vetettük alá: kollagenázal és kollagenáz/diszpázal (mindkét reagens forrása a Merck-Sigma, Burlington, MA, USA). Ezután a mikroér fragmentumokat Percoll gradiensén gyűjtöttük össze (Merck-Sigma) 10 perc 1000 g-n való centrifugálás után, majd fibronectinnel (Merck-Sigma) és 4-es típusú kollagénnel (Merck-Sigma) bevont tenyésztőedényekben tenyésztettük tovább. Az endotélsejteket DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) médiumban tenyésztettük, amihez 10% plazmából származó szérumot (PDS (plasma derived serum); First Link, Birmingham, UK), illetve növekedési faktorokat adtunk. Az első két napban 4 µg/ml puomicint (Merck-Sigma) adtunk a tenyészetekhez, hogy eltávolítsuk a nem endotélsejteket.

#### 3.2 A 4T1-tdTomato sejtekből származó exoszómák izolálása

A 4T1-tdTomato sejteket exoszóma mentes, 2% FBS-t tartalmazó médiumban tenyésztettük 10 cm átmérőjű csészékben, míg a sejtek az edény 80%-át benőtték. Ekkor a sejteknek friss médiumot adtunk, és további 24 órán át tartottuk őket inkubátorban az exoszóma izolálás előtt. Az ép exoszómák kinyerése érdekében differenciál centrifugálási módszert alkalmaztunk: 700 x g, 5 perc, 4°C; 1000 x g, 8 perc, 4°C; 10 000 x g, 30 perc, 4°C, a sejtek, sejttörmelékek, illetve a mikrovezikulák eltávolítására. Végül a felülúszót 0,22 µm-es pórusméretű membránon (Millipore, Merck-Sigma) szűrtük át. Ezt követte a centrifugálás az exoszómák leüleptetésére 150 000 x g-vel, 90 percig 4°C-on (**3. ábra**). Az exoszómákat foszfátpufferelt sóoldatban (PBS (phosphate-buffered saline) gyűjtöttük össze, és -20°C-on tároltuk. Az exoszómák koncentrációját fehérjetartalmuk alapján határoztuk meg mikrobicinkoninsav módszerrel (MicroBCA; Thermo Fisher Scientific).



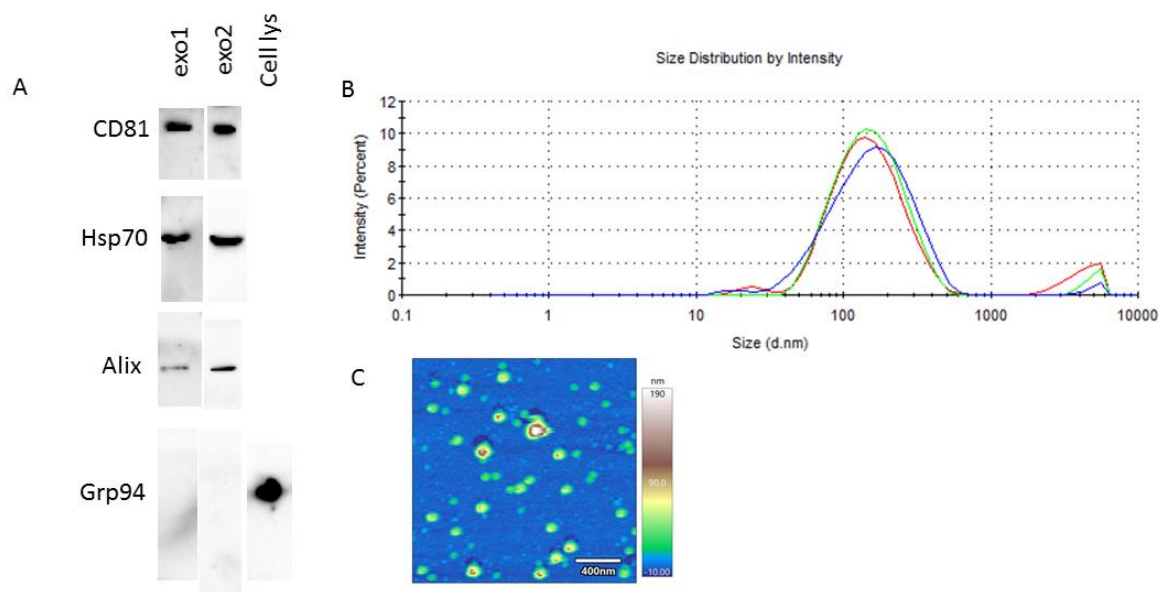
**3. ábra:** Az extracelluláris vezikula izolálás folyamata.

### 3.3 Az exoszómák jellemzése

#### 3.3.1 Western blot analízis

Az exoszómákat jéghideg lízispufferben lizáltuk (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% nátrium-dezoxikolát, 0,1% nátrium-dodecil-szulfát, 1 mM nátrium-vanadát, 10 mM NaF 1mM EDTA, 1 mM Pefabloc®), 30 percig jégen inkubáltuk, majd 13 000 x g-vel centrifugáltuk 10 percig 4 °C-on. Ezek után Laemmli puffert adtunk a mintákhoz, és 95°C-on 3 percig inkubáltuk. A fehérjéket standard denaturáló SDS-PAGE eljárással választottuk el, és 0,2 µm pórusméretű PVDF (polyvinylidene difluoride) membránokon (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) blottoltuk. A membránok nem specifikus kötőképességének blokkolását szobahőmérsékleten 30 percig 3% BSA-t, illetve 5% tejet tartalmazó TBS-T-ben (Tris-pufferelt sóoldat 0,1% Tween-20-szal) végeztük. A membránokat Grp94 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), Hsp70 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), Alix (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) és CD81 (Novus Biologicals) elleni primer antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on TBS-T-ben. Miután a membránokat háromszor 5 percig TBS-T-ben mostuk, TBS-T-ben hígított tormaperoxidázzal (HRP (horseradish peroxidase) konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk őket (Thermo Fisher Scientific), majd ismét mostuk háromszor 10 percig TBS-T-ben. Az immunreakciót Clarity Chemiluminescence

Substrate (Bio-Rad) segítségével tettük láthatóvá ChemiDoc MP rendszerben (Bio-Rad) (4.ábra, A).



**4. ábra:** Az exoszómák jellemzése western blot (A), dinamikus fényszórás (B) és atomerő mikroszkópos képalkotás (C) által.

### 3.3.2 Dinamikus fényszórás

Az exoszóma minták méreteloszlását dinamikus fényszórás segítségével határoztuk meg (DLS (dynamic light scattering, Dinamikus fényszórás); Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK). A készülék egy He-Ne lézerrel van felszerelve, amely 633 nm hullámhosszú fényt bocsát ki. A módszer a szórási intenzitás időbeli ingadozásán alapul, amely a szuszpenzióban lévő kis részecskék Brown-mozgása következtében alakul ki. Az autokorrelációs függvény a méreteloszlás kiszámítására szolgál a rögzített intenzitási nyomból. A kapott méretértékek megegyeznek a hidrodinamikai sugárral a Stokes–Einstein egyenlet alapján. Mivel a meghatározott méret a szóró tárgyként mozgó gömb átmérője, a módszer pontosan méri az exoszómák méretét. Minden mérést PBS-ben, szobahőmérsékleten (25°C) végeztünk, minden mintán legalább három mérést végezve a műszer meghajtó szoftvere által számított automatikus felbontással és paraméterekkel (4.ábra, B).

### 3.3.3 Atomerő mikroszkópos képalkotás

Az exoszómák alakját és méretét atomerő mikroszkópos képalkotással is ellenőriztük. A kísérleteinket egy Zeiss Axiovert 200, optikai mikroszkópra szerelt Asylum Research MFP-3D atomerőmikroszkóppal (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA; IgorPro 6.32A, Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) végeztük. A képalkotáshoz 30 nm-es görbületi sugarú V-alakú hegyet (BL RC150VB -A, Olympus) használtunk. A konzolok névleges rugóállandója

50 pN/nm, rezonanciafrekvenciája pedig 37 kHz volt. A képeket PBS-ben rögzítettük a 4T1-tdTomato sejtekből származó exoszómák glutáraldehiddel üvegfelületre történő rögzítése után (4.ábra, C).

### 3.4 PKH26 festési protokoll a 4T1-tdTomato exoszómák felvételéhez

A 4T1-tdTomato sejtekből származó exoszómákat PKH26 fluoreszcens festéssel jelöltük, PKH26 jelölőkészlet (Merck-Sigma) segítségével. 1 mg/ml fehérjetartalmú exoszómát összekeverünk 2 µl PKH26 festéssel (1:500) C hígítóval (1-1 v/v) 5 percig. A jelölést 1% PBS-ben lévő marhaszérum albumin (BSA (bovine serum albumin); VWR, Radnor, PA, USA) hozzáadásával állítottuk le, majd 150 000 x g-vel 90 percig centrifugáltunk, annak érdekében, hogy a PKH26-tal jelölt exoszómákat leülepítsük. Az exoszóma pelletet tovább mostuk PBS-sel, és ultracentrifugálással (150 000 x g-vel 90 perc), hogy eltávolítsuk a szabad festéket a szuszpenzióból. Végül az exoszóma pelletet 100µL DMEM/F12 médiumban szuszpendáltuk fel, a fehérjekoncentrációt a korábban leírtak szerint ismét meghatároztuk, majd a jelölt exoszómákat felhasználtuk kísérleteinkben.

### 3.5 Immunfluoreszcencia vizsgálatok

Az MBEC sejteket (P0 vagy P1) üveg fedőlemezeken tenyésztettük, míg teljesen benőtték őket. Ezután PKH-26-tal jelölt 4T1-tdTomato-eredetű exoszómákat adtunk az endoteliális réteghez 35 µg/ml fehérje koncentrációban. Miután a 24 órás inkubációs idő lejárt, a sejteket megmostuk és 4% PFA-val (paraformaldehyde; Molar, Halásztelek, Magyarország) fixáltuk 10 percig szobahőmérsékleten. A PFA-t PBS használatával mostuk ki a tenyészetből. Ezt követte a membrán permeabilizálása, ahol 15 percig, 0,2% TX-100-al kezeltük a sejteket, amit PBS-ben oldottunk. A 20 perces 3%-os BSA-val (Merck-Sigma) történő blokkolást követően a fedőlemezeket claudin-5 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), illetve ZO-1 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) elleni primer antitestekkel inkubáltuk. A festést Alexa-647-hez konjugált másodlagos antitestek segítségével tettük láthatóvá (Thermo Fisher Scientific). A sejtmagokat Hoechst 33342 (Merck-Sigma) festéssel jelöltük, amelyet 1 µg/ml koncentrációban használtunk a végső mosás során. A fedőlemezeket fakulást gátló beágyazó közegbe (Fluoromount G, Thermo Fisher Scientific) helyeztük, és a jel eloszlását fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

### 3.6 RNS extrakció, cDNS előkészítés és qPCR

A qPCR elvégzéséhez először a mintánkban található teljes RNS-t izoláltuk a miRNeasy Mini RNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével a gyártó utasításai szerint. Az RNS koncentrációt NanoDrop spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific) megmértük, majd 200 ng RNS-t írtunk át cDNS-sé a reverz transzkripció miRCURY LNA RT Kit (Qiagen) segítségével, szintúgy a gyártó utasításait figyelembe véve. A reverz transzkripció reakció előtt szintetikus RNS Spike-in Uni-SP6-ot (Qiagen) adtunk a keverékhez. A reakciót Bio-Rad iQ5 PCR készüléken végeztük, a következő körülmények között: 42°C 60 percig; majd 95°C 5 percig, mivel ezen a hőmérsékleten inaktíválhattuk a reverz transzkriptázt. A mintát lehűtöttük és 4°C-on tároltuk. A qPCR-t (quantitative real-time polymerase chain reaction, kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció) egy Bio-Rad CFX-96 berendezéssel és miRCURY LNA SYBR Green PCR Kittel (Qiagen) hajtottuk végre, a gyártó utasításai szerint 1:4 arányban hígított cDNS használatával. A következő körülményeket alkalmaztuk: 50 ciklus, az egyes ciklusok allatti beállítások pedig a következők voltak: először 95°C 15 másodpercig, majd 56°C 30 másodpercig, végül 72°C 30 másodpercig. Az előre megtervezett LNA primer párokat a Qiagentől vásároltuk a kiválasztott miRNS-hez (mmu-miR-146a-5p, MIMAT0000449: 5'UGAGAACUGAAUCCAUUGGGUU). A qPCR-t 96 lyukú lemezekon végeztük, minden mintával három mérést végeztünk és minden egyes amplifikációhoz egy minta nélküli kontrollt is bevontunk a mérésbe. A küszöbciklus meghatározását a Bio-Rad CFX szoftverével, míg a mennyiségi meghatározást összehasonlító Ct módszerrel végeztük. Az expressziós változásokat a referencia génre normalizálva ismertettük.

A cél-mRNS validálásához az RNS-t a miRNeasy Mini RNA Isolation Kit (Qiagen) segítségével izoláltuk a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS-koncentrációt ismét NanoDrop segítségével állapítottuk meg, majd 1 µg RNS-t írtunk át cDNS-sé a Maxima First Strand cDNS Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével. A qPCR reakciót Luminaris Color HiGreen qPCR keverékkel (Thermo Fisher Scientific) hajtottuk végre CFX-96 készüléken (Bio-Rad). A protokoll 40 ciklusból állt (95°C 15 másodpercig, 60°C vagy 64°C 30 másodpercig és 72°C 30 másodpercig). A primereket az NCBI Primer Blast eszközzel terveztük, a szekvenciákat az **1. táblázat** tartalmazza. A számszerűsítést a  $\Delta\Delta C_t$  módszerrel végeztük, melynél mintáinkat a GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) szintekkel hasonlítottuk össze.

| Gén neve | forward primer (5'→3') | reverz primer (5'→3')   | Oladási hőm. (TM) | Amplikon hossza (bp) |
|----------|------------------------|-------------------------|-------------------|----------------------|
| PAQR5    | AAGCTACCTTGATGTCCCTGGT | CTCCACACAAAGAACCAGAAGGG | 64°C              | 287                  |
| MED1     | CTCCTCCACTCGTGAAAGGT   | ACGACCCTCTTCTCCATTACT   | 60°C              | 179                  |
| NUMB     | GGATGGGCTCAGAGTTGTGG   | TCAGTCTTTCCCCCGTGTCT    | 60°C              | 188                  |
| TRAF6    | CAGCGTGTACGATCGGGTT    | AAGACCCAAGTTTCCGTGCC    | 60°C              | 149                  |
| IRAK1    | CTCAGATCCCAGGAACAGGTAT | GAACCTGGAGTCAAGTGCCA    | 64°C              | 293                  |
| GAPDH    | GTGAAGGTCGGTGTCAACG    | GTGAAGACGCCAGTAGACTC    | 64°C              | 298                  |

**1. táblázat:** A target génekre specifikus primerek.

### 3.7 Az mmu-miR146a-5p targetjeinek predikciója

Az mmu-miR146a-5p lehetséges célpontjainak előrejelzéséhez bioinformatikai elemzést végeztünk négy különböző, online elérhető, célpont-előrejelző algoritmus segítségével (DIANA-microT, TargetScan, MirTarget, Mirmap). Ezen algoritmusok kiválasztásánál fontosnak tartottuk, hogy bizonyos kritériumok figyelembevételével határozzuk meg a lehetséges célpontokat. Ilyenek voltak a termodinamikai stabilitás, az evolúciós megtartottság, a szekvencia tulajdonságok, illetve az mRNS hozzáférhetősége (2. táblázat).

| Predikciós algoritmus neve | Termodinamikai stabilitás | Evolúciós megtartottság | Szekvencia tulajdonságok | mRNS hozzáférhetősége | web                  |
|----------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------|
| DIANA-microT               | √                         | √                       | √                        | √                     | <a href="#">link</a> |
| TargetScan                 | √                         | √                       | √                        | √                     | <a href="#">link</a> |
| MirTarget                  | √                         | √                       | √                        | √                     | <a href="#">link</a> |
| Mirmap                     | √                         | √                       | √                        | √                     | <a href="#">link</a> |

**2. táblázat:** Online elérhető, célpont-előrejelző algoritmusok.

A DIANA-microT esetében a szoftver által ajánlott 0,7-es küszöbértéket alkalmaztunk a keresés közben. A célpont-előrejelzés eredményeit a targetscan és a DIANA-microT -CDS

(miTG) segítségével kapott pontszámok alapján rendeztük. A legnegatívabb teljes kontextus pontszám érték a represszió legnagyobb valószínűségét jelenti. A DIANA-microT megbecsüli az ugyanazon miRNS több helyről várható teljes represszióját minden egyes célpont esetében. Az értékek -1 és 1 között lehetnek, és minél negatívabb az érték, annál nagyobb a represszió az adott célgénben [71]. Ez a leglényegesebb pontszám, a TargetScan általi represszió-előrejelzés hatékonysága szempontjából, amely a preferenciálisan konzervált célpontok valószínűségét, és az aggregált PCT-t is megadja. Ez a pontszám annak a valószínűségnek a becslése, hogy egy hely az adott célszekvenciában a miRNS célpontjának fenntartása miatt konzerválódott, nem pedig véletlen vagy más, a miRNS célpontjának szempontjából nem releváns okból. Végül a DIANA-microT által számított miTG score a megjósolt kölcsönhatás általános pontszáma. Minél magasabb ez a pontszám, annál nagyobb a megbízhatóság mértéke [72].

A MirTarget (miRDB) egy online adatbázis a miRNS célpontok és funkcionális annotációk előrejelzésére állatokban. Az összes célpontot egy új bioinformatikai eszközzel jósolták meg, amelyet a miRNS-ek által befolyásolt több ezer gén SVM (Support Vector Machine) segítségével történő elemzésével fejlesztettek ki. Azokat a célpontokat tekintettük megbízhatónak, melyek 100 és 80 közötti pontszámmal rendelkeztek a célpont előrejelzés után.

A Mirmap egy nyílt forráskódú szoftverkönyvtár, amely kombinálja a termodinamikai, evolúciós, valószínűségi és szekvencia-alapú jellemzőket. Mindemellett a potenciális célpontokat egy biológiailag értelmes kritérium, a represszió erőssége alapján rangsorolja [73], a miRNS-represszió erősségét "miRmap score"-ként jósolva meg. Ez a pontszám megduplázza a TargetScan kontextus pontszámának teljesítményét, amelyet a transzkriptomikai adathalmaz magyarázott variációjának arányában mérnek. A szűrőket esetünkben  $\Delta G=70$ , Mirmap score=70 értékre állítottuk be.

A négy eszközzel kapott eredményeket összevetettük MatLab programban, és csak a legalább három algoritmus által prediktált célpontokat vettük figyelembe.

A célpontok nagy száma miatt a Betsholtz-adatbázisban [74] keresést végeztünk, hogy kiválasszuk azokat, amelyek agyi endotélsejtekben expresszálódnak, és amelyeket a további validálás szempontjából relevánsnak tekintettünk.

### 3.8 Statisztikai módszerek

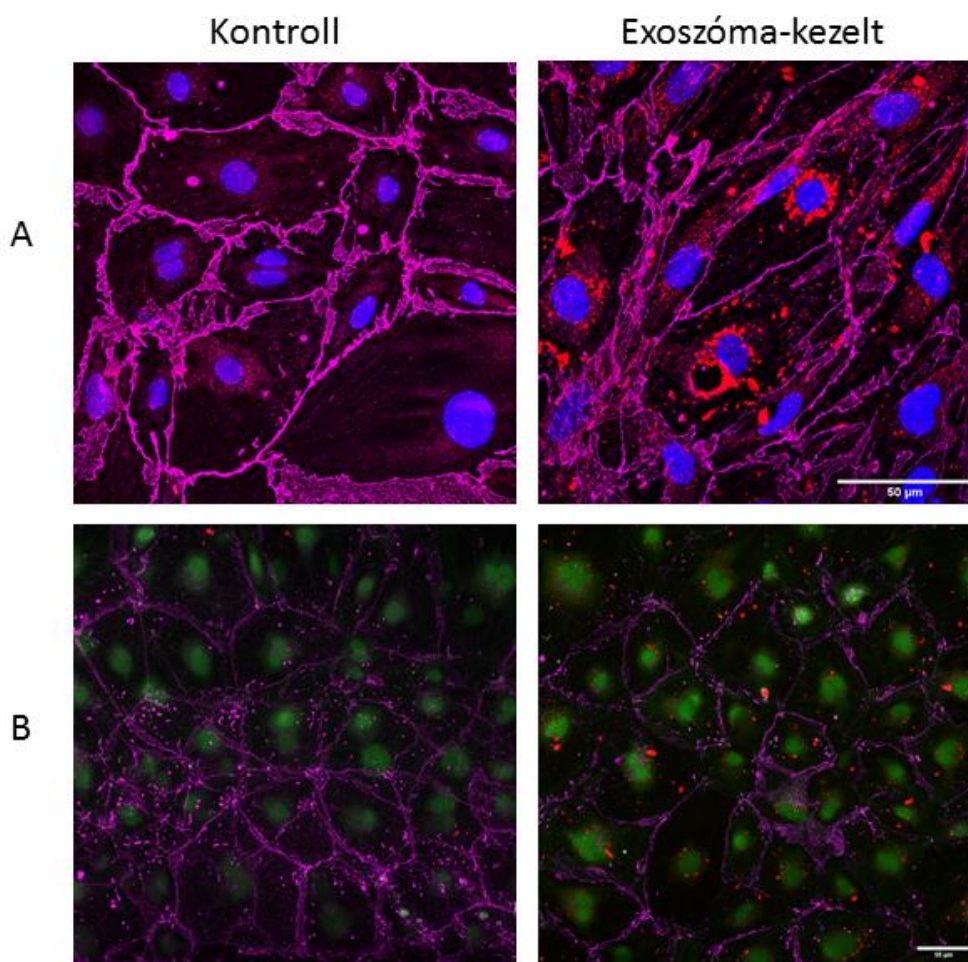
A statisztikai analíziseket Graphpad Prism 8.0 statisztikai szoftver segítségével végeztük. A minták összehasonlításához kétmintás párosított T-tesztet alkalmaztunk. A különbségeket \* $p<0,05$ , illetve \*\* $p<0,01$  érték esetén tekintettük szignifikánsnak.

## 4 Eredmények

### 4.1 A tumor eredetű exoszómák felvétele egér agyi primer endotélsejtek által

Jelen kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy az egér 4T1 tripla negatív mellrák sejtekből izolált exoszómák (EV-k) milyen sejtszintű változásokat indukálhatnak az egér agyi primer endotélsejtekben (mouse brain endothelial cells (MBEC)), amelyek hozzájárulhatnak az agyi emlőkarcinóma áttétek kialakulásához.

Első kísérleteinkben az endotélsejteket PKH-26-tal jelölt 4T1-td-Tomato eredetű exoszómákkal kezeltük 24 órán keresztül. Ezt követően a sejteket fixáltuk, majd immunfluoreszcens vizsgálat során megjelöltük a kladin-5 vagy a ZO-1 fehérjét (5. ábra).



**5. ábra:** Agyi endotélsejtek felveszik a tumor eredetű exoszómákat: Az MBEC sejteket 24 órán át 4T1-tdTomato tumor eredetű exoszómákkal (piros) kezeltük, majd a sejteket fixáltuk és ZO-1 (magenta, A), illetve kladin-5 (magenta, B) jelölést alkalmaztunk. A sejtmagokat Hoechst (kék, A), illetve Syto 13 (zöld, B) festékkel jelöltük meg. Mércse: 50 µm.

Két okból alkalmaztuk ezen jelöléseket, egyrészt hogy konfokális mikroszkóppal láthatóvá tesszük az exoszómák lokalizációját az agyi endotélsejtekben, másrészt hogy megvizsgáljuk az agyi endotélsejteket összekapcsoló szoros kapcsolatok és egyéb védelmi vonalak sérülésének lehetőségét a sejtenyészetünkben.

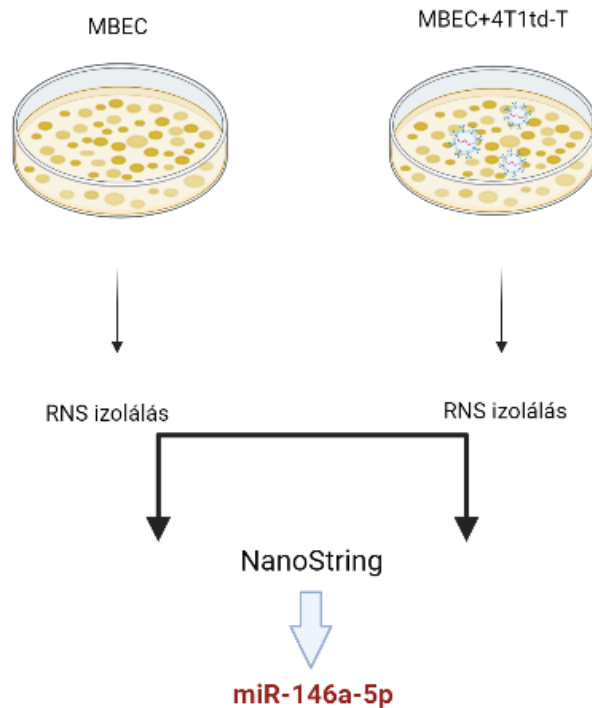
Eredményeinkből tisztán látszik, hogy az endotélsejtek felvették a PKH-26-tal jelölt tumorsejt eredetű exoszómákat, melyek nagy mennyiségben a sejtmag körül dúsultak fel. Illetve, az is megfigyelhető, hogy a szoros kapcsolatokat kialakító fehérjék folytonosságában, így feltehetőleg a vér-agy gát áteresztőképességében sem történt változás az exoszóma kezelés hatására.

#### **4.2 A tumor eredetű exoszómák hatása az agyi endotélsejtek miRNS és mRNS tartalmára**

A kísérleteink következő lépéseként azt vizsgáltuk, hogy az exoszómákkal kezelt agyi endotélsejtekben mely miRNS-ek expressziója változik meg a kontroll kezeléshez képest. Ehhez kezeletlen agyi endotélsejteket és 24 óráig EV-kezelt agyi endotélsejt tenyészeteket használtunk, melyekből teljes RNS izolálást végeztünk.

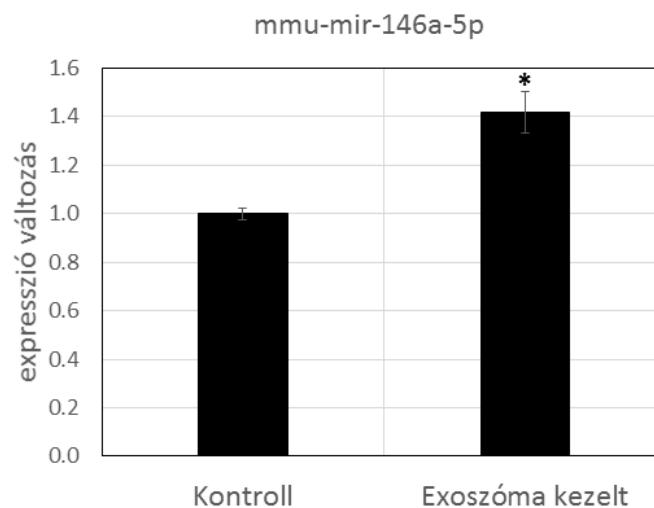
A kísérletből származó RNS mintákat csoportunk korábban egy ú.n. NanoString egér miRNS assay módszer segítségével vizsgálta, és elemezte az endotélsejtek miRNS mintázatának változásait. Ez a módszer lehetővé teszi a miRNS-ek pontos azonosítását, még az egymással nagyon hasonló változatok esetén is. A vizsgálat eredményeit kiértékelve, kiderült, hogy az mmu-miR-146a-5p szintje szignifikánsan megemelkedett az exoszóma kezelés hatására az agyi endotélsejtekben (**6. ábra**).

Az ily módon kapott eredményeket miRCURY LNA miRNS PCR Assay segítségével validáltuk, több független kísérletből származó mintából. A qPCR elvégzéséhez a mintáinkban található összes RNS-t izoláltuk a miRNeasy Mini RNA Isolation Kit (QIAGEN) segítségével a gyártó utasításai szerint. Reverz transzkripció reakció segítségével cDNS könyvtárat készítettünk, majd elvégeztük a qPCR reakciót, ahol ismét azt tapasztaltuk, hogy az mmu-miR-146a-5p szintje megnőtt az EV-kezelt agyi endotélsejtekben a kontroll kezeléshez viszonyítva (**7. ábra**).



Created in BioRender.com

**6. ábra:** Agyi endothelisejtekben bekövetkező miRNS változás, tumor eredetű exoszóma kezelés hatására: Az egér agyi endothelisejteket 24 órán keresztül kezeltük tumor eredetű exoszómákkal, majd teljes RNS izolálás után NanoString analízisre küldtük tovább a mintáinkat.



**7. ábra:** miR-146a-5p expressziós szintjének változása agyi endothelisejtekben tumor eredetű exoszóma kezelés hatására: Az egér agyi endothelisejteket 24 órán keresztül kezeltük tumor eredetű exoszómákkal, majd teljes RNS izolálás után reverz transzkripció reakciót, azt követően qPCR-t végeztünk mintáinkon.

Ezen kísérletek tehát igazolták, hogy a tumor eredetű exoszómák hatására az agyi endothelisejtekben megnő a miR-146-5p mennyisége.

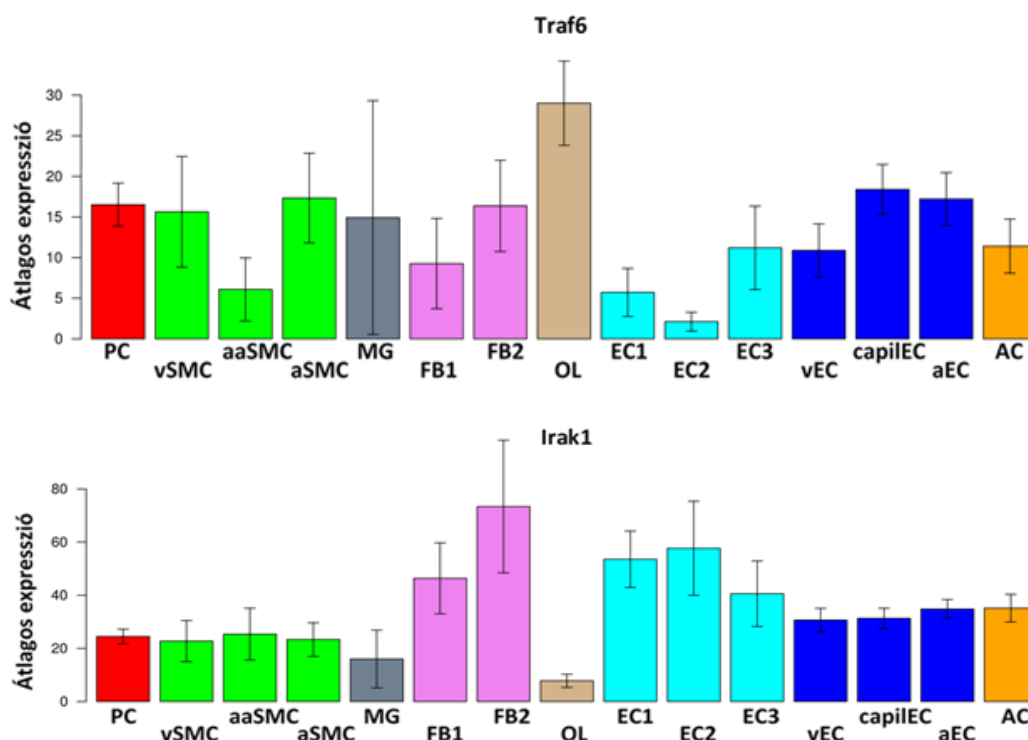
### 4.3 A miR célgének, cél-mRNS-ek qPCR validálása

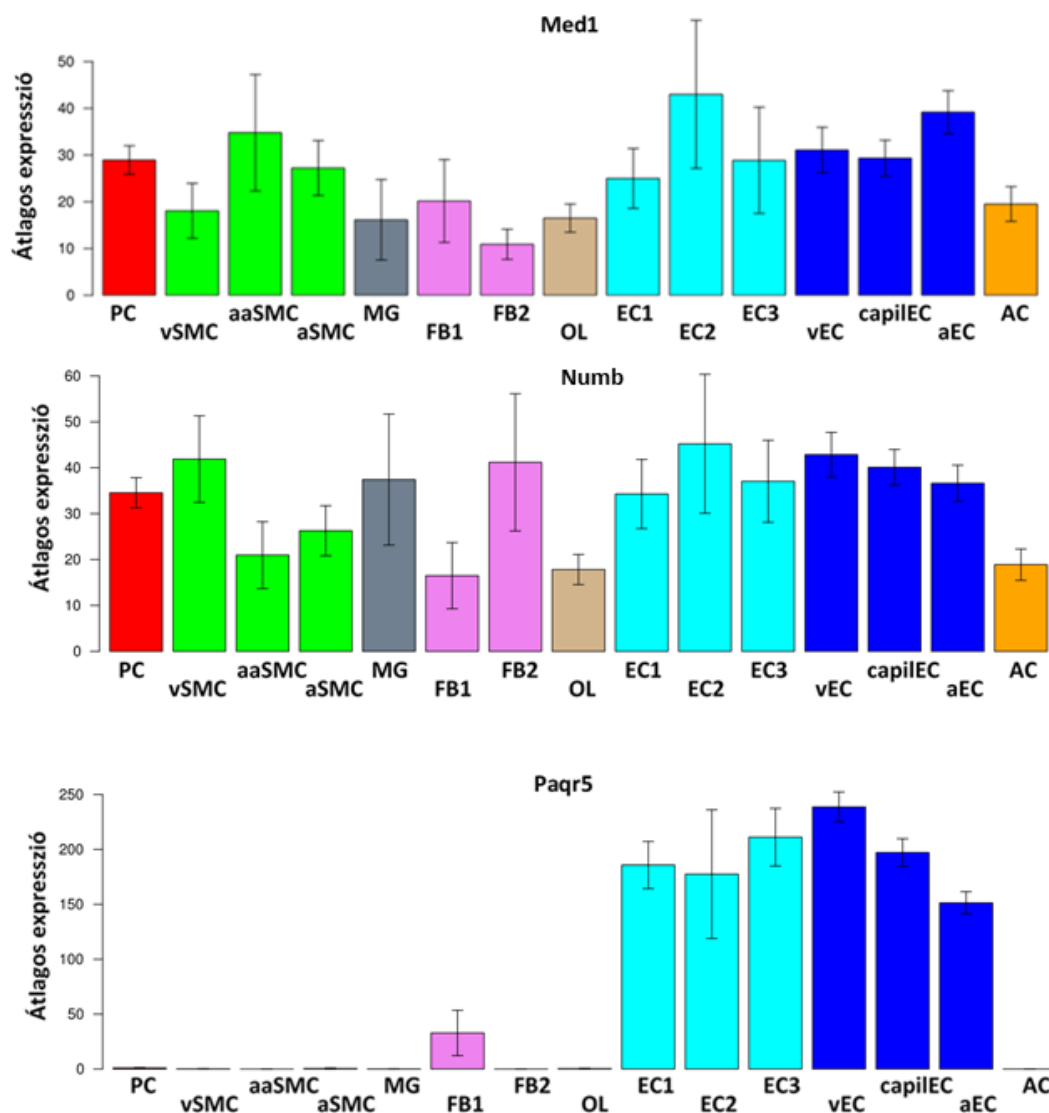
Következő célunk a lehetséges cél-mRNS-ek azonosítása volt. Hiszen a miRNS-ekről tudjuk, hogy kis nem kódoló RNS-ek, melyek funkciójuk alapján szabályozzák a génexpressziót a poszt-transzkripció szintjén, a cél-mRNS-sel való komplementer bázispárosodás és transzláció gátlása révén [72].

Az mmu-miR-146a-5p lehetséges célpontjainak előrejelzéséhez bioinformatikai elemzést végeztünk négy különböző, online elérhető célpont-előrejelző algoritmus segítségével (DIANA-microT, TargetScan, MirTarget, Mirmap).

Az algoritmusok által kapott eredményeket összehasonlítottuk MatLab programban, és csak azokat a célpontokat vettük figyelembe, amelyeket legalább 3 program prediktált lehetséges célpontként.

A legrelevánsabb célpontok a Traf6 (tumor nekrosis faktor receptorhoz kapcsolódó 6-os faktor), az Irak1(interleukin-1 receptorhoz kapcsolódó kináz 1), a Med1, a Numb és a Paqr5 cél- szekvenciák voltak, mint potenciális mRNS célpontok a miR-146a-5p számára. Ezen öt cél-mRNS expresszióját ellenőriztük agyi endotélsejtekben úgy, hogy a Betsholtz-adatbázisban [74] keresést végeztünk (8. ábra). Ezt az adatbázist felnőtt egér agy és tüdő egysejt-RNS szekvenálásból származó eredményekből állították össze, több mint háromezer transzkriptómot tartalmaz, külön csoportosítva a sejttípusok szerint.



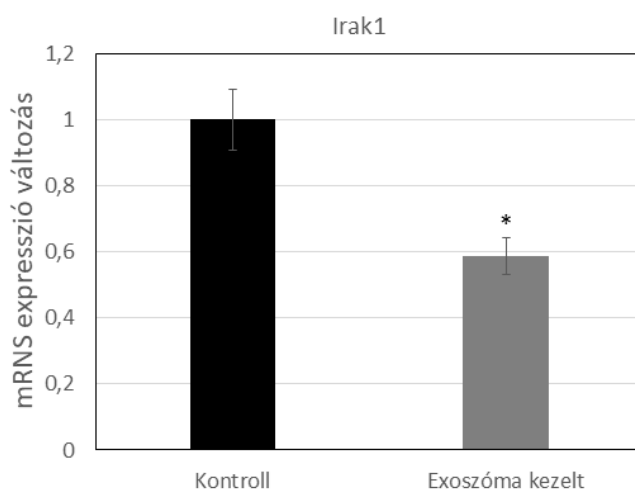
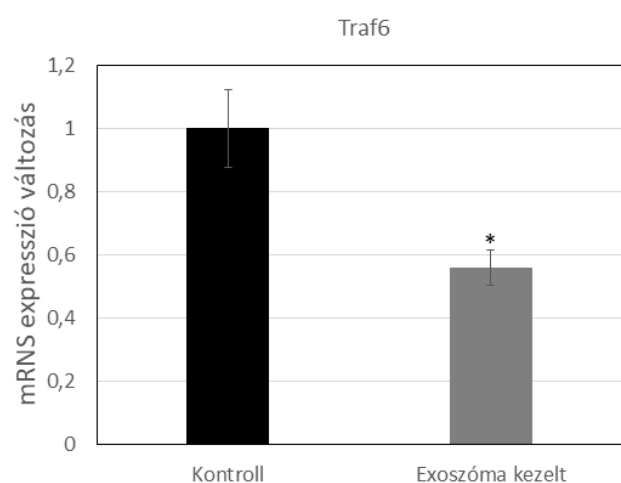


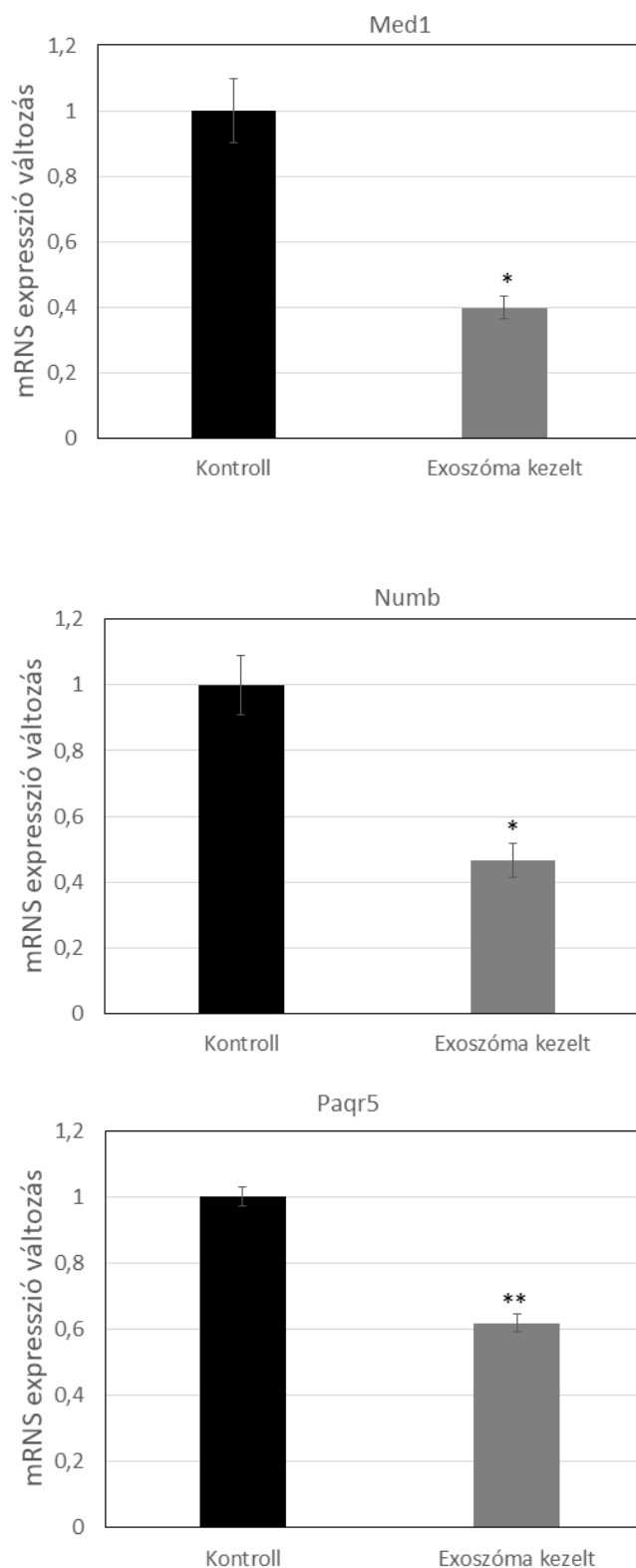
**8. ábra:** A potenciális mRNS target szekvenciák expressziója az agyi sejtekben a Betsholtz-adatbázis alapján: Az ábrán lévő rövidítések jelentése (sejttípusok): PC-pericita, vSMC-vénás simaizom sejt, aaSMC-arterioláris simaizom sejt, aSMC-artériás simaizom sejt, MG-mikroglia, FB1-1-es típusú fibroblaszt-szerű sejt, FB2-2-es típusú fibroblaszt-szerű sejt, OL-oligodendrocita, EC1-1-es típusú endotélsejt, EC2-2-es típusú endotélsejt, EC3-3-as típusú endotélsejt, vEC-vénás endotélsejt, capilEC-kapilláris endotélsejt, aEC-1-artériás endotélsejt, AC-asztrocita.

A fenti ábrán látszik, hogy a Traf6 expresszálódik endotélsejtekben és más agyi sejtekben is, de a legmagasabb expresszió oligodendrocitákban detektálható. Az Irak1 gyakori az endotélsejtekben, továbbá fibroblaszt sejtekben is igen jelentős az expressziós szintje, illetve asztrocitákban is magasan expresszálódik. A Med1 magas koncentrációban fellelhető az agyi kapillárisok endotélsejtjeiben. A Numb mRNS magas szinten expresszálódik agyi endotélsejtekben, viszont fibroblasztokban, vénás simaizomsejtekben és más agyi sejtekben is viszonylag magas expressziós szinttel rendelkezik.

Ami kiváltképp érdekes az a Paqr5, hiszen mint az ábrán is látszik, a Paqr5 kifejezetten endotéliális expressziót mutató mRNS, így a későbbiekben ígéretes molekuláris célpont lehet az agyi vaszkuláris endotélsejtekben.

A kiválasztott cél-mRNS-ek validálásához qPCR-t végeztünk, ehhez megint csak agyi endotélsejteket kezeltünk tumor eredetű exoszómákkal 24 órán keresztül. Majd a sejtekből teljes RNS izolálást végeztünk, ezt követően reverz transzkripcióval cDNS könyvtárat hoztunk létre. A továbbiakban qPCR reakciót végeztünk, aminek az eredményét  $\Delta\Delta C_t$  módszerrel számszerűsítettük, ahol az egyes mintáinkat a GAPDH szintekkel hasonlítottuk össze (**9. ábra**).





**9. ábra:** A miR146a-5p cél-mRNS-einek (*Traf6*, *Irak1*, *Med1*, *Numb*, *Paqr5*) expresszió változása agyi endotélsejtekben tumor eredetű exoszóma kezelés hatására, a GAPDH referencia génhez viszonyítva.

Eredményeinkből tisztán látszik, hogy a cél-mRNS-ek szintje szignifikáns csökkenést mutat az exoszóma kezelt agyi endotélsejtekben a kontrollhoz képest.

## 5 Diszkusszió

Az agyi metasztázisok általában tüdőkarcinómás, emlőkarcinómás, illetve melanómás betegeknél jelentkeznek [75]. Ezek közül is az egyik leggyakrabban agyi metasztázist adó tumortípus a tripla negatív emlőkarcinóma [76].

Az agyba jutáshoz a metasztatikus sejteknek az agyi hajszálerek endotélsejt rétegén kell átvándorolniuk, amely a vér-agy gát morfológiai alapját képezi.

Korábbi kutatásokból ismert a vér-agy gát kettős szerepe az agyi áttétek kialakításában: egyrészt gátat képez, amely megvédi a központi idegrendszert a daganatsejtek inváziójától, másrészt a már agyba bejutott metasztatikus sejteket aktívan képes védeni barrier funkciója által [77].

Az azonban kevésbé ismert, hogy hogyan befolyásolják a tumorsejtek a vér-agy gát endotélsejtjeit. Kísérleteinkben abból a feltételezésből indultunk ki, hogy az emlőkarcinóma sejtek által kibocsátott EV-k megváltoztatják az agyi endotélsejtek miRNS és mRNS tartalmát, és ezzel befolyásolják működésüket. Eredményeink egyértelműen igazolták, hogy az agyi endotélsejtek felveszik a tumorsejtekből származó exoszómákat úgy, hogy közben a szoros kapcsolatok nem sérülnek. Eredményeink összhangban vannak korábbi hasonló kutatási adatokkal, ahol azt figyelték meg, hogy a tumor-eredetű exoszómák főként transzcitózis révén jutnak át az agyi endotélsejteken, és eközben nem történik jelentős változás az endotélsejtek áteresztőképességében [78].

Az exoszóma kezelés által – csoportunk korábbi eredményei alapján – az mmu-miR-146a-5p szintje emelkedett meg szignifikánsan az agyi endotélsejtekben. Jelen kísérletsorozatban validáltuk ezt az eredményt, így igazoltuk, hogy a metasztatikus emlőkarcinóma sejtek által kibocsátott exoszómák hatására az agyi endotélsejtekben megnőtt a miR-146a-5p mennyisége. Ez a miRNS nagy valószínűséggel az exoszómákból származott, hiszen előzetes NanoString méréseink alapján a miR-146a-5p nagy mennyiségben volt jelen a 4T1 sejtek exoszómáiban.

A miR-146-a az egyik legjobban ismert miRNS, amely elsősorban gyulladásos folyamatokat szabályoz [79], azonban tumor szupresszor és onkogén funkciója is lehet [57]. Az első tudományos publikáció a humán miR-146a-ról 2006-ból Dr. David Baltimore laboratóriumából származik [80], pontosan 4 évvel azután tették közzé, hogy a miR-146a-t azonosították egerekben [81]. Az emberi gén, a MIR146A, az 5. kromoszómán lokalizálódik, és a róla átíródott érett miR-146a-ra erős konzerváltság jellemző a gerinces fajok között [82].

A miR-146a-5p miRNS-nek a tumorsejtek növekedésében, túlélésében, inváziójában, migrációjában és a metasztázisok kialakulásában lehet fontos szerepe [83]. Már korábbi eredmények is utaltak arra, hogy a tumorsejtek exoszómák segítségével képesek a miR-146a-t az extracelluláris térbe kiválasztani, amelyet a tumor mikrokörnyezete és távolabbi sejtek is felvehetnek. Erről a miRNS-ről kimutatták, hogy hatással van a tumor sztrómasejtekre a daganatos mikrokörnyezeten belül, beleértve a mezenchimális őssejteket, a makrofágokat és a fibroblasztokat, és befolyásolhatja génexpressziós aktivitásukat. Mindezekből feltételezhetjük, hogy a miR-146a aktívan részt vesz a daganatok kialakulásában és azok terjeszkedésében, éppen ezért méltó arra, hogy a daganatos megbetegedések elleni küzdelem kutatásának fókuszába kerüljön [57].

A mikroRNS-ekről tudjuk, hogy kicsi, endogén, nem kódoló RNS-ek, amelyek szabályozzák a fehérjekódoló gének expresszióját, mégpedig úgy, hogy képesek kötődni az mRNS 3'-nem transzlálódó régiójához, így befolyásolva a transzlációt annak elnyomásával, illetve képesek a teljes mRNS lebomlását előidézni, így lehetetlenné téve a génexpressziót [53]. Ezért a továbbiakban megvizsgáltuk az mmu-miR-146a-5p lehetséges cél-mRNS-eit. Adatbázisban való keresés és irodalmi adatok felhasználásával kiválasztottuk a legrelevánsabb 5 célpontot az mmu-miR-146a-5p számára. Ezen célgének a Traf6, az Irak1, a Med1, a Numb és a Paqr5 voltak, melyek közül a Paqr5 csak az agyi endotélsejtekben expresszálódik az agyban. Ezután megvizsgáltuk ezen mRNS-ek expressziójának változását tumor eredetű exoszóma kezelés hatására agyi endotélsejtekben. Eredményeinkből látszott, hogy az mmu-miR-146a-5p szintjének növekedése az exoszómákkal kezelt agyi endotélsejtekben a cél-mRNS-ek expressziójának jelentős csökkenésével jár együtt. A nagyon valószínű ok-okozati összefüggés ellenőrzésére egy következő kísérletben az endotélsejteket miR-146a mimic szekvenciával fogjuk kezelni. A miRNS mimic-ek olyan mesterséges miRNS szekvenciák, amelyek az endogén miRNS-ekhez hatásait imitálják. Meg fogjuk vizsgálni, hogy igazolni tudjuk-e azt a hipotézis, miszerint miR-146a mimic-vel kezelt agyi endotélsejtekben csökken a Traf6, az Irak1, a Med1, a Numb és a Paqr5 expressziója.

Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a miR-146a nagy mennyiségben expresszálódik olyan sejtekben, melyeket lipopoliszachariddal (LPS), tumor nekrozis faktor-alfával (TNF- $\alpha$ ) és/vagy interleukin-1 bétával (IL-1 $\beta$ ) indukáltak [80]. 2008-ban Sheedy és munkatársai [84] közzétettek egy áttekintő tanulmányt, amely a miR-146 miRNS családnak a veleszületett immunválaszban betöltött aktivitásának szentelt különösképpen nagy figyelmet, azon belül is a TLR4 (Toll-like receptor 4) jelátvitel útvonalak kapcsán vizsgálták a miR-146a szerepét. A jelenleg fellelhető tanulmányok nagy része az interleukin-1 receptorhoz (IL-1R) kapcsolódó

kináz 1-et (Irak1) és a Traf6-ot azonosítja a miR-146 család kulcsfontosságú célpontjaiként. Az Irak1-ről és a Traf6-ról régóta ismert, hogy létfontosságú szerepet játszik a megfelelő TLR jelátvitelben [85, 53]. Saját eredményeink is igazolták ezen két intracelluláris gyulladásos mediátor expressziójának csökkenését a miR-146a növekedésével párhuzamosan.

A **Traf6** a tumor nekrosis faktor receptor-asszociált faktorok (TRAF-ek) családjába tartozó multifunkcionális intracelluláris adaptin fehérje [86, 87]. A Traf6-ról egyes kutatók úgy gondolják, hogy fontos szerepe van a tumorgenezis elősegítésében, olyan folyamatok támogatásával, mint az apoptózis gátlása, továbbá a sejtproliferáció és a sejtinvázió elősegítése [88]. Bár az intrakraniális daganatokkal kapcsolatban kevés információ áll rendelkezésre a Traf6 szerepét illetően, glioblasztóma sejtek esetében megfigyelték, hogy a Traf6 EGFR/AKT útvonal aktiválása által elsősorban a tumorképződést. Ugyanakkor, kimutatták, hogy a miR-146b-5p a Traf6 gátlása által csökkenti a gliómasejtek proliferációját, mindemellett apoptózist indukálhat a daganatos szövetben. A kutatásból kiderül, hogy a Traf6 csendesítésével daganatellenes hatás érhető el [89]. Mindemellett fontos kiemelni a Traf6 jelentős szerepét a különböző immun- és gyulladásos reakciók elindításában [90], melyek szintén hozzájárulhatnak az áttétek kialakulásához. Mindezek alapján érdekes lesz megvizsgálni, hogy a Traf6 expressziójának csökkenése az agyi endotélsejtekben hogyan befolyásolja a premetasztatikus niche-t és az áttétképződést.

Az **Irak1** éppúgy, mint a Traf6, onkogénként van számontartva az irodalomban. Vizsgálataink során szintúgy expressziójának csökkenését tapasztaltuk az endotélsejtekben az exoszóma kezelés hatására. Az Irak1 a veleszületett immunrendszer központi eleme és egy treonin/szerin kináz, amely elsősorban inaktív konformációban létezik. Sejten belüli aktiválásához upstream TLR/IL-1R stimulációt igényel [91, 92]. Ezenkívül az Irak1 számos malignus daganat prognosztikus markerének is tekinthető [93].

A következő vizsgált célgén a **Med1** volt, mely egy, szintén onkogénként számontartott fehérjét kódol. Ez a fehérje a mediátor (MED) komplex része, amely egy evolúciósan konzervált koregulációs, multiprotein, amely csaknem 30 alegységből áll és fontos szerepet játszik a DNS-hez kötött génspecifikus transzkripciós faktorok és az RNS polimeráz II (RNS Pol II) kapcsolódásában, így a transzkripció elindításában [94, 95, 96]. Egy tanulmányban azt találták, hogy az emlőkarcinómás betegek akár 20%-ában módosulhat a Med1 fehérje, és ez a módosulás összefüggésben áll a betegek rossz túlélésével. Kimutatták továbbá, hogy a Med1 részt vesz emlőkarcinómához kapcsolódó miRNS-ek szabályozásában is, ami arra utal, hogy a mediátor komplexnek kulcsfontosságú szerepe van az emlőkarcinóma patogenezisében a

miRNS-ek szabályozása révén. A Med1 sejten belüli koncentrációjának növekedése számos proliferációval és migrációval kapcsolatos gén expressziójában okoz emelkedést [97].

Az a kérdés viszont még mindig megválaszolásra vár, hogy mindezen mRNS változások, hogyan befolyásolhatják az endotélsejtek funkcióit, és ez hogyan hat az agy metasztatizálással szemben tanúsított ellenállóképességére.

A következő cél-mRNS az eddigiektől eltérően egy tumor szuppresszort kódol, így az expressziójában bekövetkező csökkenés valószínűsíthetően pozitívan befolyásolja a metasztatikus progressziót. Ez a célgén a **Numb**, amelyről egy kutatásban azt találták, hogy csendesítése a sejt-sejt adhézió csökkenését és a sejt motilitás növekedését okozta, míg túlzott expressziója gátolta a proliferációt és elősegítette az apoptózist [98].

Általánosságban elmondható, hogy a Numb egy konzervált, több feladattal bíró endocitikus fehérje, amely elősegíti az aszimmetrikus osztódást, és meghatározza a sejtorsot az őse- és prekursor sejtekben [99]. Ezenkívül a Numb-ot tumorszuppresszornak is tekintik, amely kritikus szerepet játszik az őssejt-kompartmentek fenntartásában, a specifikus szubsztrátok ubiquitinációjában, valamint a Notch-, Hedgehog- és tumor fehérje p53- (TP53) aktivált útvonalak szabályozásában [100]. Tumorszuppresszor aktivitását annak is tulajdonítják, hogy az E-cadherin újrahaznosításának és lokalizációjának szabályozásán keresztül képes befolyásolni az epiteliális-mezenchimális átmenetet (epiteliális-mezenchimális tranzíció, EMT) [101].

Az utolsó – és számunkra kiváltképp érdekes – célgén a **Paqr5** volt, amely az agyban kifejezetten endoteliális expressziót mutat. A Paqr5 a progeszteron és adipoQ receptor (PAQR) családba tartozik, annak is a II. osztályába, a membrán progeszteron receptorok (mPR) közé. E besorolás szerint a PAQR II. osztály öt tagból áll, melyből gerincesekben jelen van a PAQR7 (mPR $\alpha$ ), a PAQR8 (mPR $\beta$ ), a PAQR5 (mPR $\gamma$ ), a PAQR6 (mPR $\delta$ ) és a PAQR9 (mPR $\epsilon$ ) [102].

Tripla negatív emlőkarcinómában kimutatták, hogy a progeszteron csökkenti a tumor növekedését és agyi áttétképzését a PAQR7 (mPR $\alpha$ ) receptoron keresztül [103]. Mindazonáltal egy másik kutatásban megfigyelték, hogy a progeszteron szint emelkedése a mikrovaskuláris agyi endotélsejtek membrán progeszteron receptorain (mPR) keresztül előidézhetheti a vér-agy gát permeabilitásának növekedését [104]. Glioblasztómát, vagyis a leggyakoribb primer agyi rosszindulatú daganatot, ezen belül is az endotélsejtek vaszkuláris hálózatát és a kapcsolódó sejteket tanulmányozva azt találták, hogy a Paqr5 mennyisége csökken a tumorban [105]. Ez az adat összevág saját kutatási eredményeinkkel, és arra utal, hogy hasonló változások mehetnek végbe primér és másodlagos agyi daganatok érhálózatában.

Ebből kiindulva azt is meg fogjuk vizsgálni, hogy az endoteliális Paqr5 csökkenése az áttétképződés melyik fázisában (a premetasztatikus fázisban, a vér-agy gáton való átvándorlás vagy a tumorsejtek agyi szaporodása során) a legkifejezettebb. További kísérletekben a Paqr5 és a többi célgén fehérjeszintű változásait is meg fogjuk vizsgálni, valamint csökkenésük következményeit az agyi metasztázisképzés folyamatára.

Összeségében eredményeink azt mutatták, hogy az agyi endotélsejtekben jelentősen megnőtt az mmu-miR-146a-5p miRNS szintje a tripla negatív emlőkarcinóma sejtekből származó exoszómák hatására. Ezzel párhuzamosan csökkenést tapasztaltunk a Traf6, az Irak1, a Med1, a Numb és a Paqr5 mRNS-ek expressziójában, melyekről tudjuk, hogy fontos résztvevői többek között a gyulladás, a sejtproliferáció és az apoptózis szabályozásának. Továbbá, mindegyik említett gén kapcsolatba hozható daganatos megbetegedések, illetve a metasztázisképzés folyamatával (**3. táblázat**), éppen ezért további vizsgálatuk kulcsfontosságú lehet annak érdekében, hogy megértsük azokat a mechanizmusokat, amelyek az emlőkarcinóma agyi metasztázisainak kialakulásához vezetnek.

| Traf6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Irak1                                                                                                                                                                                                        | Med1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Numb                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Paqr5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Onkogén</li> <li>• Intracelluláris adaptin</li> <li>• E3 ubiquitin ligáz</li> <li>• Apoptózis gátlás</li> <li>• Sejtproliferáció és sejtnvázio elősegítése</li> <li>• Immun- és gyulladásos reakciók elindítása</li> <li>• Traf6 csendesítéssel daganatellenes hatás érhető el</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Onkogén</li> <li>• A veleszületett immunrendszer központi eleme</li> <li>• Treonin/szerin kináz</li> <li>• Számos malignus daganat prognosztikus markere</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Onkogén</li> <li>• Multiprotein komplex</li> <li>• Transzkripció szabályozó</li> <li>• Emlőkarcinómás betegek akár 20%-ában módosulhat a Med1 fehérje</li> <li>• A Med1 részt vesz emlőkarcinómához kapcsolódó miRNS-ek szabályozásában</li> <li>• Med1 sejten belüli koncentrációjának növekedése számos proliferációval és migrációval kapcsolatos gén expressziójában okoz emelkedést</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumorsuppresszor</li> <li>• Csengesítése a sejt-sejt adhézió csökkenését és a sejt motilitás növekedését okozza</li> <li>• Túlzott expressziója gátolja a proliferációt és elősegíti az apoptózist</li> <li>• Az E-cadherin újrahaznosításának és lokalizációjának szabályozásán keresztül képes befolyásolni az epiteliális-mezenchimális átmenetet</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agyban kifejezetten endoteliális expressziót mutat</li> <li>• Membrán progeszteron receptor (mPR)</li> <li>• A progeszteron szint emelkedése az agyi endotélsejtek membrán progeszteron receptorain (mPR) keresztül előidézheti a vér-agy gát permeabilitásának növekedését</li> <li>• Paqr5 mennyisége csökken a tumorban</li> </ul> |

**3. táblázat:** Összefoglaló táblázat a cél-mRNS-ek lehetséges szerepeiről agyi áttétképződésben.

## Összefoglalás

A leggyakoribb intrakraniális daganat típusok a metasztatikus agydaganatok, melyekre rendkívül rossz prognózis jellemző. Annak érdekében, hogy új terápiás célpontokat azonosítsunk ennek a rendkívül nehezen kezelhető daganattípusnak a visszaszorítására, rendkívül fontos az agyi áttétképződés folyamatában szerepet játszó mechanizmusok megértése.

Az agyi áttétek döntő többsége tüdőkarinómából, emlőkarinómából, illetve melanómából származik. Az emlőkarinóma több altípusa közül a tripla negatív ad a leggyakrabban agyi áttétet, mivel kiemelkedően magas affinitással rendelkezik a központi idegrendszer iránt. Az áttétképzés feltétele, hogy a tumorsejtek a véráramon keresztül, hematogén úton eljussanak az agyba és ott szaporodni kezdjenek. Mindehhez a keringő tumorsejteknek át kell jutniuk a vér-agy gáton. A vér-agy gát egymással szorosan kapcsolt endotélsejtjei kettős szerepet játszhatnak az áttétképzésben. Egyrészt első védvonalként akadályt képeznek az érből kilépő tumorsejtek számára, másrészt védik azokat, amelyek már átjutottak az agyi parenchimába. A tumorsejtek túlélése az agyi mikrokörnyezetben nagymértékben függ attól, hogy hogyan képesek módosítani a befogadó környezetet.

A tumorsejtek terjedésében és az áttétek kialakulásában jelentős szerepet játszanak a daganatsejtekből felszabaduló exoszómák, melyek különböző bioaktív molekuláik révén képesek megváltoztatni a felvevő sejtek viselkedését, kedvező közeget teremtve a tumorok terjedésének.

Az exoszómák, az extracelluláris vezikulák egyik csoportja, melyek a multivezikuláris testek exocitózisa révén keletkeznek, és mérettartományuk 30-150 nm között van. Az exoszómákban lévő mikroRNS-ek fontos szabályozói a sejtek közötti kölcsönhatásoknak. Elősegíthetik, illetve gátolhatják a tumorok progresszióját a különböző cél gének szabályozása által. Arról azonban keveset tudunk, hogyan változtatják meg az őket felvevő célsejtek miRNS mintázatát.

Jelen kísérleteink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az agyi endotélsejtek felveszik-e az emlőkarinóma eredetű exoszómákat, és ezeknek milyen hatása van az agyi endotélsejtek miRNS és mRNS expressziós mintázatára.

Kísérleteinkhez több lépéses centrifugálást alkalmazva sikeresen izoláltunk emlőkarinóma sejtek által kibocsátott exoszómákat. Az exoszómákat western blot analízissel jellemeztük endoszomális markereik (CD81, ALIX) alapján, méretüket atomi erő mikroszkóppal és zeta-potenciál mérés által határoztuk meg.

Ezeket az exoszómákat fluoreszcensen megjelöltük és in vitro kísérletben primér agyi endotélsejtekre helyeztük, majd konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk az exoszómák lokalizációját az agyi endotélsejteken belül, továbbá vizsgáltuk az agyi endotélsejteket összekapcsoló szoros kapcsolatokra kifejtett hatásukat. Megfigyeltük, hogy az endotélsejtek felvették a tumor eredetű exoszómákat, ugyanakkor a szoros kapcsolatokra nem voltak jelentős hatással, tehát nem nyitották meg a paracelluláris barriert.

Az endotélsejtek RNS tartalmának vizsgálatára NanoString miRNS assay módszert, qPCR-t és bioinformatikai elemzést végeztünk. Eredményeink alapján elmondható, hogy a tumor eredetű exoszómákkal kezelt endotélsejtekben jelentősen nőtt az mmu-miR-146a-5p expressziós szintje. Az mmu-miR-146a-5p az exoszómákban is magas szinten volt jelen. Az mmu-miR-146a-5p mRNS célpontjait online elérhető célpont-előrejelző algoritmusok segítségével választottuk ki. Négy adatbázis összevetése, valamint irodalmi áttekintést és egysejt transzkriptomikai adatbázisban való elemzést követően a következő cél-mRNSeket választottuk ki további vizsgálatokra: Traf6, Irak1, Med1, Numb és Paqr5. Kvantitatív PCR módszerrel megvizsgáltuk kifejeződésüket az exoszómákkal kezelt endotélsejtekben. Az exoszóma kezelés hatására szignifikánsan csökkent a cél-mRNS-ek expressziós szintje az agyi endotélsejtekben, ami valószínűleg a miR-146a-5p szabályozó hatásának következtében alakult ki. Az ok-okozati összefüggést jelenleg is vizsgáljuk laboratóriumunkban. Ezen mRNS szintekben bekövetkező csökkenés agyi áttétképzésben játszott lehetséges hatásairól irodalmi kutatást végeztünk, és megállapítottuk, hogy mind az öt gén szerepet játszhat a tumor- és metasztázisképződésben.

Mivel a cél-mRNSek közül a Paqr5 szinte kizárólag endotélsejtekben expresszálódik az agyban, jelenleg azt vizsgáljuk részletesen, hogy a Paqr5 csökkenése az agyi endotélsejtekben segíti vagy gátolja a tumorsejtek agyi metasztázisképzését.

## Irodalomjegyzék

- [1] B. T. Hawkins and T. P. Davis, "The Blood-Brain Barrier / Neurovascular Unit in Health and Disease," vol. 57, no. 2, pp. 173–185, 2005, doi: 10.1124/pr.57.2.4.173.
- [2] S. Gupta, S. Dhanda, and R. Sandhir, "Anatomy and physiology of blood-brain barrier, in Brain targeted drug delivery system," *Elsevier*, 2018.
- [3] Y. Persidsky, S. H. Ramirez, J. Haorah, and G. D. Kanmogne, "Blood-brain barrier: Structural components and function under physiologic and pathologic conditions," *J. Neuroimmune Pharmacol.*, vol. 1, no. 3, pp. 223–236, 2006, doi: 10.1007/s11481-006-9025-3.
- [4] T. J. Abbruscato and T. P. Davis, "Protein expression of brain endothelial cell E-cadherin after hypoxia/aglycemia: Influence of astrocyte contact," *Brain Res.*, vol. 842, no. 2, pp. 277–286, 1999, doi: 10.1016/S0006-8993(99)01778-3.
- [5] I. A. Romero *et al.*, "Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells," *Neurosci. Lett.*, vol. 344, no. 2, pp. 112–116, 2003, doi: 10.1016/S0304-3940(03)00348-3.
- [6] I. Wilhelm, C. Fazakas, and I. A. Krizbai, "„In vitro models of the blood-brain barrier”,” *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*., pp. 71(1):113–28, 2011.
- [7] W. M. Pardridge, J. Eisenberg, and J. Yang, "Human Blood—Brain Barrier Insulin Receptor," *J. Neurochem.*, vol. 44, no. 6, pp. 1771–1778, 1985, doi: 10.1111/j.1471-4159.1985.tb07167.x.
- [8] Y. Zhang and W. M. Pardridge, "Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier," *J. Neurochem.*, vol. 76, no. 5, pp. 1597–1600, 2001, doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00222.x.
- [9] N. Weiss, F. Miller, S. Cazaubon, and P. O. Couraud, "The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1788, no. 4, pp. 842–857, 2009, doi: 10.1016/j.bbmem.2008.10.022.
- [10] P. Jeffrey and S. Summerfield, "Assessment of the blood-brain barrier in CNS drug discovery," *Neurobiol. Dis.*, vol. 37, no. 1, pp. 33–37, 2010, doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.033.
- [11] A. S. Achrol *et al.*, "Brain metastases," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 5, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41572-018-0055-y.
- [12] T. E., C. O., M. P., T. A., V. P., and G. A., "Recent trends in epidemiology of brain metastases: An overview," *Anticancer Res.*, vol. 32, no. 11, pp. 4655–4662, 2012.
- [13] L. Nayak, E. Q. Lee, and P. Y. Wen, "Epidemiology of brain metastases," *Curr. Oncol. Rep.*, vol. 14, no. 1, pp. 48–54, 2012, doi: 10.1007/s11912-011-0203-y.
- [14] J. B. Posner, "Management of brain metastases," *Rev Neurol*, pp. 148(6-7):477-87., 1992.
- [15] F. Graus, R. W. Walker, and J. C. Allen, "Brain metastases in children," *J. Pediatr.*, vol. 103, no. 4, pp. 558–561, 1983, doi: 10.1016/S0022-3476(83)80583-6.
- [16] S. Zimm, G. L. Wampler, D. Stablein, T. Hazra, and H. F. Young, "Intracerebral metastases in solid-tumor patients: Natural history and results of treatment," *Cancer*, vol. 48, no. 2, pp. 384–394, 1981, doi: 10.1002/1097-0142(19810715)48:2<384::AID-CNCR2820480227>3.0.CO;2-8.
- [17] A. F. Eichler *et al.*, "The biology of brain metastases—translation to new therapies," *Nat Rev Clin Oncol*, pp. 8(6): 344–356., 2011, doi: 10.1038/nrclinonc.2011.58.The.
- [18] V. Teglasi *et al.*, "Origin and distribution of connective tissue and pericytes impacting vascularization in brain metastases with different growth patterns," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 78, no. 4, pp. 326–339, 2019, doi: 10.1093/jnen/nlz007.
- [19] M. D. Roy A. Patchell *et al.*, "A Randomized Trial of Surgery in the Treatment of Single Metastases to the Brain," *New English J. Med.*, pp. 322:494-500, 1990.
- [20] American Cancer Society, "Breast Cancer What is breast cancer?," *Am. Cancer Soc. Cancer Facts Fig. Atlanta, Ga Am. Cancer Soc.*, pp. 1–19, 2022, [Online]. Available: <http://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/what-is-breast-cancer.html>.
- [21] A. J. Clayton *et al.*, "Incidence of cerebral metastases in patients treated with trastuzumab for metastatic breast cancer," *Br. J. Cancer*, vol. 91, no. 4, pp. 639–643, 2004, doi: 10.1038/sj.bjc.6601970.

- [22] P. S. Steeg, K. A. Camphausen, and Q. R. Smith, "Brain metastases as preventive and therapeutic targets," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 5, pp. 352–363, 2011, doi: 10.1038/nrc3053.
- [23] B. A. Shah *et al.*, "Analysis of decision making at a multidisciplinary head and neck tumor board incorporating evidence-based National Cancer Comprehensive Network (NCCN) guidelines," *Pract. Radiat. Oncol.*, vol. 6, no. 4, pp. 248–254, 2016, doi: 10.1016/j.prro.2015.11.006.
- [24] S. J. Kim *et al.*, "Astrocytes upregulate survival genes in tumor cells and induce protection from chemotherapy," *Neoplasia*, vol. 13, no. 3, pp. 286–298, 2011, doi: 10.1593/neo.11112.
- [25] K. Fink and J. Fink, "Imaging of brain metastases," *Surg. Neurol. Int.*, vol. 4, no. SUPPL4, pp. 209–220, 2013, doi: 10.4103/2152-7806.111298.
- [26] A. T. Berman, A. D. Thukral, W. T. Hwang, L. J. Solin, and N. Vapiwala, "Incidence and patterns of distant metastases for patients with early-stage breast cancer after breast conservation treatment," *Clin. Breast Cancer*, vol. 13, no. 2, pp. 88–94, 2013, doi: 10.1016/j.clbc.2012.11.001.
- [27] G. Raposo and W. Stoorvogel, "Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends," *J. Cell Biol.*, vol. 200, no. 4, pp. 373–383, 2013, doi: 10.1083/jcb.201211138.
- [28] S. Gurung, D. Perocheau, L. Touramanidou, and J. Baruteau, "The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling," *Cell Commun. Signal.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–19, 2021, doi: 10.1186/s12964-021-00730-1.
- [29] S. Mathivanan, H. Ji, and R. J. Simpson, "Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication," *J. Proteomics*, vol. 73, no. 10, pp. 1907–1920, 2010, doi: 10.1016/j.jprot.2010.06.006.
- [30] D. M. Pegtel and S. J. Gould, "9-038. Exosomes," 2019.
- [31] S. El Andaloussi, I. Mäger, X. O. Breakefield, and M. J. A. Wood, "Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 12, no. 5, pp. 347–357, 2013, doi: 10.1038/nrd3978.
- [32] C. Ettelaie, M. E. W. Collier, A. Maraveyas, and R. Ettelaie, "Characterization of physical properties of tissue factor-containing microvesicles and a comparison of ultracentrifuge-based recovery procedures," *J. Extracell. Vesicles*, vol. 3, no. 1, 2014, doi: 10.3402/jev.v3.23592.
- [33] M. Battistelli and E. Falcieri, "Apoptotic bodies: Particular extracellular vesicles involved in intercellular communication," *Biology (Basel)*, vol. 9, no. 1, 2020, doi: 10.3390/biology9010021.
- [34] S. Elmore, "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, 2007, doi: 10.1080/01926230701320337.
- [35] N. P. Hessvik and A. Llorente, "Current knowledge on exosome biogenesis and release," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 75, no. 2, pp. 193–208, 2018, doi: 10.1007/s00018-017-2595-9.
- [36] P. Nilsson *et al.*, "Autophagy-related protein 7 deficiency in amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) precursor protein transgenic mice decreases A $\beta$  in the multivesicular bodies and induces A $\beta$  accumulation in the golgi," *Am. J. Pathol.*, vol. 185, no. 2, pp. 305–313, 2015, doi: 10.1016/j.ajpath.2014.10.011.
- [37] P. D. Robbins and A. E. Morelli, "Regulation of immune responses by extracellular vesicles," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 14, no. 3, pp. 195–208, 2014, doi: 10.1038/nri3622.
- [38] A. de Gassart, C. Géminard, D. Hoekstra, and M. Vidal, "Exosome secretion: The art of reutilizing nonrecycled proteins?," *Traffic*, vol. 5, no. 11, pp. 896–903, 2004, doi: 10.1111/j.1600-0854.2004.00223.x.
- [39] C. He, S. Zheng, Y. Luo, and B. Wang, "Exosome theranostics: Biology and translational medicine," *Theranostics*, vol. 8, no. 1, pp. 237–255, 2018, doi: 10.7150/thno.21945.
- [40] M. Cordonnier *et al.*, "Exosomes in cancer theranostic: Diamonds in the rough," *Cell Adhes. Migr.*, vol. 11, no. 2, pp. 151–163, 2017, doi: 10.1080/19336918.2016.1250999.
- [41] R. L. Williams and S. Urbé, "The emerging shape of the ESCRT machinery," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 5, pp. 355–368, 2007, doi: 10.1038/nrm2162.
- [42] J. H. Hurley, "ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 20, no. 1, pp. 4–11, 2008, doi: 10.1016/j.ceb.2007.12.002.
- [43] M. Colombo, G. Raposo, and C. Théry, "Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 30, pp. 255–289, 2014, doi:

- 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- [44] H. Bu, D. He, X. He, and K. Wang, “Exosomes: Isolation, Analysis, and Applications in Cancer Detection and Therapy,” *ChemBioChem*, vol. 20, no. 4, pp. 451–461, 2019, doi: 10.1002/cbic.201800470.
  - [45] M. W. A. Hussain *et al.*, “Exosomes for Regulation of Immune Responses and Immunotherapy,” *J. Nanotheranostics*, vol. 3, no. 1, pp. 55–85, 2022, doi: 10.3390/jnt3010005.
  - [46] Y. Zhang, Y. Liu, H. Liu, and W. H. Tang, “Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential,” *Cell Biosci.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–18, 2019, doi: 10.1186/s13578-019-0282-2.
  - [47] N. A. Garcia, I. Ontoria-Oviedo, H. González-King, A. Diez-Juan, and P. Sepúlveda, “Glucose starvation in cardiomyocytes enhances exosome secretion and promotes angiogenesis in endothelial cells,” *PLoS One*, vol. 10, no. 9, pp. 1–23, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0138849.
  - [48] L. Mashouri, H. Yousefi, A. R. Aref, A. M. Ahadi, F. Molaei, and S. K. Alahari, “Exosomes: Composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance,” *Mol. Cancer*, vol. 18, no. 1, pp. 1–14, 2019, doi: 10.1186/s12943-019-0991-5.
  - [49] L. M. Doyle and M. Z. Wang, “Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis,” *Cells*, pp. 41–68, 2019.
  - [50] X. Huang *et al.*, “Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing,” *BMC Genomics*, vol. 14, no. 1, pp. 1–14, 2013, doi: 10.1186/1471-2164-14-319.
  - [51] Z. Mo, J. Y. A. Cheong, L. Xiang, M. T. N. Le, A. Grimson, and D. X. Zhang, “Extracellular vesicle-associated organotropic metastasis,” *Cell Prolif.*, vol. 54, no. 1, pp. 1–17, 2021, doi: 10.1111/cpr.12948.
  - [52] A. Hoshino *et al.*, “Tumour exosomal CEMIP protein promotes cancer cell colonization in brain metastasis,” vol. 21, no. 11, pp. 1403–1412, 2020, doi: 10.1038/s41556-019-0404-4.Tumour.
  - [53] M. R. Paterson and A. J. Kriegel, “MiR-146a/b: A family with shared seeds and different roots,” *Physiol. Genomics*, vol. 49, no. 4, pp. 243–252, 2017, doi: 10.1152/physiolgenomics.00133.2016.
  - [54] R. Kulshreshtha, R. V. Davuluri, G. A. Calin, and M. Ivan, “A microRNA component of the hypoxic response,” *Cell Death Differ.*, vol. 15, no. 4, pp. 667–671, 2008, doi: 10.1038/sj.cdd.4402310.
  - [55] L. He *et al.*, “A microRNA component of the p53 tumour suppressor network,” *Nature*, vol. 447, no. 7148, pp. 1130–1134, 2007, doi: 10.1038/nature05939.
  - [56] Y. Lee *et al.*, “MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II,” *EMBO J.*, vol. 23, no. 20, pp. 4051–4060, 2004, doi: 10.1038/sj.emboj.7600385.
  - [57] J. R. Iacona and C. S. Lutz, “miR-146a-5p: Expression, regulation, and functions in cancer,” *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, vol. 10, no. 4, pp. 1–22, 2019, doi: 10.1002/wrna.1533.
  - [58] J. Krol, I. Loedige, and W. Filipowicz, “The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 11, no. 9, pp. 597–610, 2010, doi: 10.1038/nrg2843.
  - [59] R. C. Friedman, K. K. H. Farh, C. B. Burge, and D. P. Bartel, “Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs,” *Genome Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 92–105, 2009, doi: 10.1101/gr.082701.108.
  - [60] R. W. Carthew and E. J. Sontheimer, “Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs,” *Cell*, vol. 136, no. 4, pp. 642–655, 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.01.035.
  - [61] M. Liang, “MicroRNA: A new entrance to the broad paradigm of systems molecular medicine,” *Physiol. Genomics*, vol. 38, no. 2, pp. 113–115, 2009, doi: 10.1152/physiolgenomics.00080.2009.
  - [62] R. L. Montgomery and E. Van Rooij, “Therapeutic advances in MicroRNA targeting,” *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 57, no. 1, pp. 1–7, 2011, doi: 10.1097/FJC.0b013e3181f603d0.
  - [63] G. Chen *et al.*, “miR-146a Inhibits Cell Growth, Cell Migration and Induces Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells,” *PLoS One*, vol. 8, no. 3, pp. 1–13, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0060317.
  - [64] I. Wilhelm, C. Fazakas, K. Molnár, A. G. Végh, J. Haskó, and I. A. Krizbai, “Foe or friend? Janus-faces of the neurovascular unit in the formation of brain metastases,” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 38, no. 4, pp. 563–587, 2018, doi: 10.1177/0271678X17732025.
  - [65] F. Xing *et al.*, “MiR-509 suppresses brain metastasis of breast cancer cells by modulating RhoC and TNF- $\alpha$ ,” *Oncogene*, vol. 34, no. 37, pp. 4890–4900, 2015, doi: 10.1038/onc.2014.412.
  - [66] H. Okuda *et al.*, “MiR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4,” *Cancer Res.*, vol. 73, no. 4, pp. 1434–1444, 2013, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2037.

- [67] N. Tominaga *et al.*, “Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier,” *Nat. Commun.*, vol. 6, 2015, doi: 10.1038/ncomms7716.
- [68] W. Zhou *et al.*, “Cancer-Secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis,” *Cancer Cell*, vol. 25, no. 4, pp. 501–515, 2014, doi: 10.1016/j.ccr.2014.03.007.
- [69] M. Y. Fong *et al.*, “Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 17, no. 2, pp. 183–194, 2015, doi: 10.1038/ncb3094.
- [70] F. Xing *et al.*, “Loss of XIST in breast cancer activates MSN-c-Met and reprograms microglia via exosomal miRNA to promote brain metastasis,” *Cancer Res.*, vol. 78, no. 15, pp. 4316–4330, 2018, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1102.
- [71] V. Agarwal, G. W. Bell, J. W. Nam, and D. P. Bartel, “Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs,” *Elife*, vol. 4, no. AUGUST2015, pp. 1–38, 2015, doi: 10.7554/eLife.05005.
- [72] Á. L. Rizzo-Campos, I. Riquelme, and P. Brebi-Mieville, “Tools for sequence-based miRNA target prediction: What to choose?,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 12, 2016, doi: 10.3390/ijms17121987.
- [73] C. E. Vejnár, M. Blum, and E. M. Zdobnov, “miRmap web: Comprehensive microRNA target prediction online,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. Web Server issue, pp. 165–168, 2013, doi: 10.1093/nar/gkt430.
- [74] M. Vanlandewijck and L. He, “Database of gene expression in adult mouse brain and lung vascular and perivascular cells.”
- [75] M. J. Amsbaugh; and C. S. Kim., *Brain Metastasis*. 2022.
- [76] C. Watase *et al.*, “Breast cancer brain metastasis—overview of disease state, treatment options and future perspectives,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 5, pp. 1–24, 2021, doi: 10.3390/cancers13051078.
- [77] I. Wilhelm, J. Molnár, C. Fazakas, J. Haskó, and I. A. Krizbai, “Role of the blood-brain barrier in the formation of brain metastases,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 1, pp. 1383–1411, 2013, doi: 10.3390/ijms14011383.
- [78] G. Morad *et al.*, “Tumor-Derived Extracellular Vesicles Breach the Intact BloodBrain Barrier via Transcytosis,” *ACS Nano*, vol. 13, no. 12, pp. 13853–13865., 2020, doi: 10.1021/acsnano.9b04397.Tumor-Derived.
- [79] S. S. Mortazavi-Jahromi, M. Aslani, and A. Mirshafiey, “A comprehensive review on miR-146a molecular mechanisms in a wide spectrum of immune and non-immune inflammatory diseases,” *Immunol. Lett.*, vol. 227, no. July, pp. 8–27, 2020, doi: 10.1016/j.imlet.2020.07.008.
- [80] K. D. Taganov, M. P. Boldin, K. J. Chang, and D. Baltimore, “NF-κB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 33, pp. 12481–12486, 2006, doi: 10.1073/pnas.0605298103.
- [81] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, and T. Tuschl, “Identification of tissue-specific MicroRNAs from mouse,” *Curr. Biol.*, vol. 12, no. 9, pp. 735–739, 2002, doi: 10.1016/S0960-9822(02)00809-6.
- [82] A. L. Cornett and C. S. Lutz, “Regulation of COX-2 expression by miR-146a in lung cancer cells,” *Rna*, vol. 20, no. 9, pp. 1419–1430, 2014, doi: 10.1261/rna.044149.113.
- [83] C. Labbaye and U. Testa, “The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer,” *J. Hematol. Oncol.*, vol. 5, pp. 1–10, 2012, doi: 10.1186/1756-8722-5-13.
- [84] F. J. Sheedy and L. A. J. O’Neill, “Adding fuel to fire: MicroRNAs as a new class of mediators of inflammation,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 67, no. SUPPL. 3, 2008, doi: 10.1136/ard.2008.100289.
- [85] S. Akira and K. Takeda, “Toll-like receptor signalling,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 7, pp. 499–511, 2004, doi: 10.1038/nri1391.
- [86] X. Yu *et al.*, “Pattern recognition scavenger receptor CD204 attenuates toll-like receptor 4-induced NF-κB activation by directly inhibiting ubiquitination of Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor-associated factor 6,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 21, pp. 18795–18806, 2011, doi: 10.1074/jbc.M111.224345.
- [87] C. Megasa, Q. Y. Eudoxia G. Hatzivassiliou, D. A. A. Vignali, and G. Mosialosa, “Mutational analysis of TRAF6 reveals a conserved functional role of the RING dimerization interface and a potentially necessary but insufficient role of RING-dependent TRAF6 polyubiquitination towards NF-κB activation,”

- Cell Signal*, vol. 23, no. 5, pp. 772–777., 2011, doi: 10.1016/j.cellsig.2010.12.004. Mutational.
- [88] Y. B. Choi and E. W. Harhaj, “HTLV-1 Tax Stabilizes MCL-1 via TRAF6-Dependent K63-Linked Polyubiquitination to Promote Cell Survival and Transformation,” *PLoS Pathog.*, vol. 10, no. 10, 2014, doi: 10.1371/journal.ppat.1004458.
  - [89] J. Liu *et al.*, “miR-146b-5p functions as a tumor suppressor by targeting TRAF6 and predicts the prognosis of human gliomas These author have contributed equally to this work,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 30, [Online]. Available: [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/).
  - [90] Y. Dou, X. Tian, J. Zhang, Z. Wang, and G. Chen, “Roles of TRAF6 in Central Nervous System,” *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 16, no. 9, pp. 1306–1313, 2018, doi: 10.2174/1570159x16666180412094655.
  - [91] P. Cohen, “The TLR and IL-1 signalling network at a glance,” *J. Cell Sci.*, vol. 127, no. 11, pp. 2383–2390, 2014, doi: 10.1242/jcs.149831.
  - [92] A. Jain, S. Kaczanowska, and E. Davila, “IL-1 receptor-associated kinase signaling and its role in inflammation, cancer progression, and therapy resistance,” *Front. Immunol.*, vol. 5, no. NOV, pp. 1–9, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00553.
  - [93] M. Liu, Y. Que, Y. Hong, L. Zhang, X. Zhang, and Y. Zhang, “A Pan-Cancer Analysis of IRAK1 Expression and Their Association With Immunotherapy Response,” *Front. Mol. Biosci.*, vol. 9, no. May, pp. 1–14, 2022, doi: 10.3389/fmolb.2022.904959.
  - [94] Y. J. Kim, S. Björklund, Y. Li, M. H. Sayre, and R. D. Kornberg, “A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II,” *Cell*, vol. 77, no. 4, pp. 599–608, 1994, doi: 10.1016/0092-8674(94)90221-6.
  - [95] S. Malik, H. J. Baek, W. Wu, and R. G. Roeder, “Structural and Functional Characterization of PC2 and RNA Polymerase II-Associated Subpopulations of Metazoan Mediator,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, no. 6, pp. 2117–2129, 2005, doi: 10.1128/mcb.25.6.2117-2129.2005.
  - [96] S. Malik and R. G. Roeder, “The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 11, no. 11, pp. 761–772, 2010, doi: 10.1038/nrg2901.
  - [97] N. Nagpal *et al.*, “Essential role of MED1 in the transcriptional regulation of ER-dependent oncogenic miRNAs in breast cancer,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-29546-9.
  - [98] Z. Wang, S. Sandiford, C. Wu, and S. S. C. Li, “Numb regulates cell-cell adhesion and polarity in response to tyrosine kinase signalling,” *EMBO J.*, vol. 28, no. 16, pp. 2360–2373, 2009, doi: 10.1038/emboj.2009.190.
  - [99] S. Pece, S. Confalonieri, P. R. Romano, and P. P. Di Fiore, “NUMB-ing down cancer by more than just a NOTCH,” *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, vol. 1815, no. 1, pp. 26–43, 2011, doi: 10.1016/j.bbcan.2010.10.001.
  - [100] Y. Kang *et al.*, “Overexpression of Numb suppresses tumor cell growth and enhances sensitivity to cisplatin in epithelioid malignant pleural mesothelioma,” *Oncol. Rep.*, pp. 313–319, 2013.
  - [101] K. Sato *et al.*, “Numb controls E-cadherin endocytosis through p120 catenin with aPKC,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 22, no. 17, pp. 3103–3119, 2011, doi: 10.1091/mbc.E11-03-0274.
  - [102] Y. T. Tang *et al.*, “PAQR proteins: A novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif,” *J. Mol. Evol.*, vol. 61, no. 3, pp. 372–380, 2005, doi: 10.1007/s00239-004-0375-2.
  - [103] L. Zhou *et al.*, “Progesterone suppresses triple-negative breast cancer growth and metastasis to the brain via membrane progesterone receptor  $\alpha$ ,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 40, no. 3, pp. 755–761, 2017, doi: 10.3892/ijmm.2017.3060.
  - [104] J. Abou-Fadel *et al.*, “mPR-Specific Actions Influence Maintenance of the Blood–Brain Barrier (BBB),” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 17, 2022, doi: 10.3390/ijms23179684.
  - [105] P. Dusart, B. M. Hallström, T. Renné, J. Odeberg, M. Uhlén, and L. M. Butler, “A Systems-Based Map of Human Brain Cell-Type Enriched Genes and Malignancy-Associated Endothelial Changes,” *Cell Rep.*, vol. 29, no. 6, pp. 1690–1706.e4, 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.09.088.

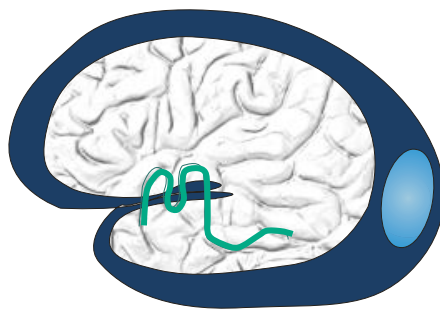
## Köszönetnyilvánítás

Szeretném köszönetem kifejezni témavezetőimnek, Dr. Wilhelm Imolának és Dr. Fazakas Csillának a munkám során nyújtott felbecsülhetetlen elméleti és gyakorlati segítségükért, támogató útmutatásukért.

Köszönöm a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Neurovaszkuláris Kutatócsoport tagjainak, Dr. Mészáros-Molnár Kingának, Mészáros Ádámnak és Dr. Farkas Elek Attilának a kísérletek elvégzéséhez nyújtott segítséget.

Továbbá szeretném megköszönni Dr. Krizbai Istvánnak, a Neurovaszkuláris Kutatócsoport vezetőjének, hogy helyet biztosított számomra a csoportjában, és ezáltal értékes szakmai tapasztalatokra tehettem szert.

Végül, de nem utolsó sorban pedig köszönetemet szeretném kifejezni belső konzulensemnek, Dr. Farkas Tamásnak, aki figyelemmel követte és segítette szakdolgozói tevékenységem.



Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Biofizikai Intézet  
Neurovaszkuláris Egység Kutatócsoport

**A 36. OTDK  
BIOLÓGIA SEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK  
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE**

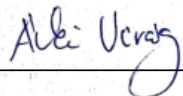
**TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS**

Alulírott **(Árki Virág)** nyilatkozom, hogy a 36. OTDK-ra benyújtott **(Az emlőkarcinóma exoszómák által okozott miRNS és mRNS változások a vér-agy gátat alkotó endotélsejtekben)** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

| Részfeladat                                              | A részvétel mértéke<br>(öt fokozatú skálán <sup>#</sup> jellemezve) |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| sejtek izolálása és tenyésztése                          | 2                                                                   |
| exoszómák izolálása és validálása                        | 5                                                                   |
| PCR kísérletek kivitelezése és kiértékelése              | 3                                                                   |
| immunfluoreszcens vizsgálatok kivitelezése, mikroszkópia | 3                                                                   |
| adatok statisztikai feldolgozása                         | 4                                                                   |

**Kelt:**

(Kérjük a dőlttel jelölt részeket értelemszerűen adják meg. A táblázat szükség szerint értelemszerűen módosítható).

  
\_\_\_\_\_

Pályamunkát benyújtó hallgató (Árki Virág)  
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:

\_\_\_\_\_  
Témavezető (Dr. Wilhelm Imola, Dr. Fazakas Csilla,  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont)  
aláírása

#Magyarázat:

*A munkafolyamatokban való részvétel mértékét ötfokozatú skálán kérjük értékelni. A skála egyes értékeinek jelentése:*

*5 – Felkészítés után a feladat teljes egészét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.*

*4 – Felkészítés után a feladat több mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.*

*3 – Felkészítés után a részfeladat felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.*

*2 – Felkészítés után a részfeladat kevesebb mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.*

*1 – A részfeladatot folyamatos segítséggel végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.*

<sup>1</sup>*A szerző hallgató a 3 éves terepi munkából egy évben vett részt. Ebben az évben társával együtt végezte a terepi munkát, melynek során a pályamunka alapját képező fajokra vonatkozó anyagok begyűjtését a terület/vizsgálati időszak egyik felében teljes mértékben ő végezte önállóan. A fennmaradó részében az anyaggyűjtést más végezte.*

<sup>2</sup>*A felhasznált 5 primer közül a szerző hallgató hármat maga tervezett, a többit készen kapta.*

<sup>3</sup>*A western-blot reakciók tervezését (pl.: mintasorrend+mennyiség), elvi összeállítását a szerző hallgató maga végezte, ugyanakkor a munka „wet” részét jórészt a laborhoz tartozó asszisztens végezte. A kiértékelést a szerző hallgató végezte.*

<sup>4</sup>*Az adatok statisztikai feldolgozását a szerző hallgató témavezetőjének folyamatos segítségével végezte.*