

37. Országos Tudományos Diákköri Konferencia

Biológia szekció

Az asztrociták által aktivált NLRP3 inflammaszóma fokozza a metasztatikus sejtek szaporodását az agyban

Lüvi Adél

biológia BSc III. évfolyam

Témavezető:

Dr. Wilhelm Imola, tudományos főmunkatárs

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet

Belső konzulens:

Dr. Csontné Dr. Kiricsi Mónika, habilitált egyetemi docens

Szegedi Tudományegyetem TTIK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék



Szegedi Tudományegyetem TTIK

Kutatóhely: HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet

Szeged

2024

Tartalom

Rövidítésjegyzék.....	3
1. Bevezetés	4
1.1. Az agyi metasztázisok.....	4
1.2. A neurovaszkuláris egység jellemzése.....	5
1.3. A neurovaszkuláris egység szerepe az agyi metasztázisképzésben	7
1.4. A gyulladásos tumor-mikrokörnyezet az agyban.....	9
1.5. Az inflammaszómák felépítése és aktivációja	10
1.6. Az NLRP3 inflammaszóma mint terápiás célpont.....	12
2. Célkitűzés.....	14
3. Anyagok és módszerek	15
3.1. A 4T1-tdTomato sejtek tenyésztése.....	15
3.2. Engedélyek és a kísérleti állatok tartása.....	15
3.3. Az <i>in vivo</i> metasztázis modell létrehozása.....	15
3.4. A kísérleti állatok kezelése MCC950-nel	16
3.5. A szövetek fixálása és metszetkészítés	16
3.6. Immunfluoreszcencia	16
3.7. Fluoreszcens mikroszkópia	17
3.8. Mintaelőkészítés és western blot.....	17
3.9. Az adatok statisztikai elemzése.....	19
4. Eredmények	20
4.1. A tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisaiban az NLRP3 inflammaszóma komponensek a peritumorális asztrocitákban expresszálódnak	20
4.2. Az NLRP3 inflammaszóma aktivációja elősegíti, annak gátlása pedig csökkenti a metasztázisok növekedését az agyban	22
5. Diskusszió	25
6. Köszönetnyilvánítás	29
7. Irodalomjegyzék	30

Rövidítésjegyzék

ABC transzporter	ATP-binding cassette transzporter
ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule
ANG-1	angiopoietin-1
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain
BCA	bicinchoninic acid
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovine serum albumin
CAPS	cryopyrin-associated periodic syndrome
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
GDNF	glial cell-line derived neurotrophic factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein, gliális fibrilláris savas fehérje
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
IFN-α	interferon alpha
IGF2	insulin-like growth factor 2
IL-1R	interleukin-1 receptor
IL-1β	interleukin-1 beta
L1-CAM	L1 cell adhesion molecule
LRR	leucine-rich repeat
MMP	matrix metalloproteinase
NACHT	NAIP (neuronal apoptosis inhibitor protein), CIITA (MHC class 2 transcription activator), HET- E (incompatibility locus protein from Podospora anserina) és TP1 (telomerase-associated protein)
NF-κB	nuclear-factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLRP3	nucleotide-binding and oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain-containing protein 3
NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
PBS	phosphate-buffered saline
PBS-T	0,5% Triton X-100-at tartalmazó PBS
PFA	paraformaldehyde
PYD	pyrin domain
RPMI medium	Roswell Park Memorial Institute medium
TBS-T	tris-buffered saline+0,1% Tween-20
TGF-β2	transforming growth factor-beta 2
TNF-R	tumor necrosis factor receptor
TNF-α	tumor necrosis factor alpha
4T1- tdT	4T1- tdTomato
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VLA-4	very late antigen-4

1. Bevezetés

1.1. Az agyi metasztázisok

A metasztázisok olyan rosszindulatú daganatok, melyek az elsődleges tumorról leszakadt rákos sejtekből alakulnak ki, amelyek a nyirokkeringés vagy a véráram útján jutnak el más szervekbe és ott képeznek daganatos áttétet (Achrol és mtsai., 2019; Wrobel & Toborek, 2016).

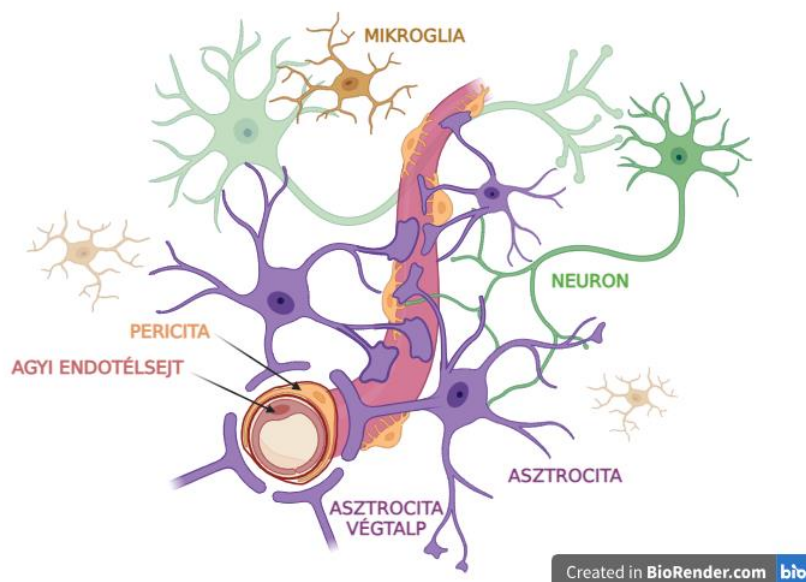
Az agyba leggyakrabban a tüdőrák, a melanóma és az emlőkarcinóma képez metasztázist. Klinikai kutatások szerint az agyi metasztázisok legnagyobb hányadáért, mintegy 20-56%-ért a tüdőrák tehető felelőssé. Szorosan második helyen következik az emlőkarcinóma, amely az agyi metasztázisok 5-20%-át teszi ki, a melanóma eredetűek pedig az esetek 7-16%-át adják (Achrol és mtsai., 2019).

Nőkben az emlőkarcinóma a leggyakrabban előforduló agyi metasztázist okozó tumortípus, mely egyes kutatások szerint leginkább a fiatalabb, 20-39 év közötti korosztályt érinti (Achrol és mtsai., 2019). Az agyi metasztázist okozó primer emlődaganatok körében a legsúlyosabb prognózissal a tripla negatív emlőkarcinóma rendelkezik, mind a primer tumor, mind az agyi metasztázis esetében. Nevét onnan kapta, hogy nem expresszálja a HER2-t (human epidermal growth factor receptor 2), az ösztrogén receptort és a progeszteron receptort (Foulkes és mtsai., 2010). Ezen receptorok hiánya a tumor kezelését nagyban megnehezíti, mivel ezek a daganatsejtek nem érzékenyek az egyéb emlődaganatok esetén hatásos kezelésnek számító célzott és endokrin terápiákra. Klinikai kutatások szerint a tripla negatív emlőkarcinómában szenvedő páciensek mintegy harmadában képződik agyi áttét, mely jóval magasabb arány, mint a többi emlőkarcinóma szubtípus esetén (Jin és mtsai., 2018). Tripla negatív emlőkarcinóma-eredetű agyi metasztázis diagnosztizálását követően a betegek medián túlélési ideje körülbelül 3-4 hónap, a legkevesebb az összes agyi metasztatikus emlőkarcinóma altípus közül (Leone & Leone, 2015; Simsek és mtsai., 2022).

Az agyi áttétek képződése soktényezős folyamat, melynek két fő aspektusát különítjük el: a metasztázist képző sejteknek sikeresen át kell vándorolniuk a vér-agy gáton, illetve túl kell élniük az agyban. Mindezen lépések során a metasztatikus sejtek kölcsönhatásba lépnek a neurovaszkuláris egység sejtjeivel.

1.2. A neurovaszkuláris egység jellemzése

A neurovaszkuláris egység fogalma egy olyan komplex rendszert jelent az agyban, melyben a vaszkuláris sejtek (endotélsejtek és periciták), valamint a gliasejtek és az idegsejtek morfofunkcionális egységet alkotnak (1. ábra). Fiziológiás körülmények között a neurovaszkuláris egység legfontosabb feladata a vér-agy gát kialakítása és fenntartása, emellett részt vesz az agyi véráramlás szabályozásában is (Muoio és mtsai., 2014).



1. ábra: A neurovaszkuláris egység felépítése

A neurovaszkuláris egységet az agyi ereket alkotó és egymással szoros kapcsolatokat kialakító endotélsejtek, a bazális membránba ágyazott periciták, az erek falát végtalpaikkal beborító asztrociták, az immunsejtként szerepet játszó mikrogliák és a neuronok alkotják. Két fő funkciójuk a vér-agy gát kialakítása és az agyi véráramlás szabályozása.

A vér-agy gát definíció szerint egy nagyon szelektíven átjárható barrier, ami elválasztja a központi idegrendszer folyadéktereit a keringéstől. Fő feladata, hogy megvédje az agyat a vérben potenciálisan keringő patogénektől és toxinoktól, ezáltal fenntartva a szerv homeosztázisát (Daneman, 2012). Mindezt az agyi **endotélsejtek** négyes védvonalból álló barrier funkciója teszi lehetővé (Wilhelm és mtsai, 2011), melyből az első és legfontosabb az agyi mikroereket alkotó endotélsejtek között elhelyezkedő paracelluláris barrier, melyet folytonos szoros kapcsolatok (tight junctionök) alkotnak. Ezek a sejtkapcsoló struktúrák a paracelluláris anyagáramlást akadályozzák meg, valamint polaritást adnak a sejteknek, megkülönböztetve az apikális és a bazolaterális oldalt (Hawkins & Davis, 2005). Az agyi

endotélsejteken keresztüli transzcelluláris anyagáramlás is erősen szabályozott, ez adja a második védvonalat. Ennek alapja, hogy a periférián elhelyezkező endotélsejtekhez képest az agyi endotélsejtek lényegesen kevesebb endocitotikus vezikulával rendelkeznek (Keaney & Campbell, 2015), valamint vastagabb glikokálix borítja őket (Reed és mtsai., 2019). A vér-agy gát harmadik védvonalát az enzimatis barrier jelenti, amely gyógyszer- és tápanyagmolekulákat metabolizáló enzimekből áll. Ezen enzimek közé tartozik a γ -glutamil-transzpeptidáz, az alkalikus foszfatáz, az aromás sav-dekarboxiláz és számos, a citokróm P450 szupercsaládba tartozó enzim (Correale & Villa, 2009). Az endotélsejtek apikális felszínén található a negyedik védvonalat alkotó efflux pumpák, melyek az ABC (ATP-binding cassette) transzporterek családjába tartoznak. Ezen aktív transzporterek feladata az agy számára potenciálisan káros anyagok, metabolikus mellék- és végtermékek, továbbá toxinok eliminálása a központi idegrendszerből (Keaney & Campbell, 2015).

A vér-agy gáton passzív diffúzióval csak az olyan, körülbelül 500 Da-nál kisebb, töltéssel nem rendelkező, 10 hidrogénkötésnél kevesebbet kialakító lipid-szolubilis molekulák juthatnak át, mint például az etanol vagy a koffein (Mikitsh & Chacko, 2014). Azonban a létfontosságú glükóz, aminosavak és zsírsavak méretük vagy vízdékonyságuk miatt nem esnek bele ebbe a tartományba, így ezeket az anyagokat a vér-agy gát karrier funkciója lévén az adott ligandra specifikus transzporterek veszik fel.

A neurovaszkuláris egység másik fontos sejttypusát a **periciták** jelentik, melyek az endotélsejtek abluminális oldalán, a bazális membránba ágyazva helyezkednek el, ezáltal szoros kontaktusban vannak mind az endotélsejtekkel, mind az erek falán megtapadó asztrocita végtalpakkal. A periciták fontos szerepet játszanak a vér-agy gát kialakításában és integritásának megőrzésében, hozzájárulnak a vaszkuláris bazális membrán szekréciójához, továbbá indukálják az asztrocita végtalpak megfelelő polarizációját (Von Tell és mtsai., 2006; Winkler és mtsai., 2018).

Az agyi kapillárisok falához végtalpaikkal kapcsolódó **asztrocitáknak** is fontos szerepe van a vér-agy gát létrejöttében és fenntartásában. Növekedési faktorok termelésével, mint például GDNF (glial cell-line derived neurotrophic factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) és ANG-1 (angiopoietin-1) járulnak hozzá a vér-agy gát funkciók fenntartásához (Wilhelm és mtsai., 2018).

A központi idegrendszer rezidens immunsejtjeiként számontartott mikroglia dinamikus változó és heterogén sejtjei a neurovaszkuláris egységnek. Ezek a prenatális

fejlődés kezdetén a központi idegrendszerbe vándorolt monociták segítenek az agyi homeosztázis fenntartásában. Szöveti sérülések hatására aktivált állapotba kerülnek és részt vesznek az elhalt neuronok fagocitálásában (Benarroch, 2013).

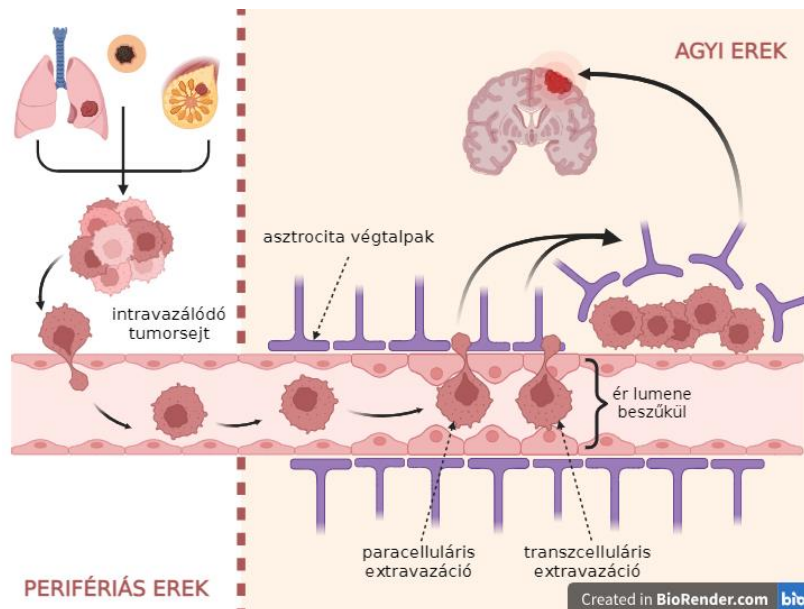
1.3. A neurovaszkuláris egység szerepe az agyi metasztázisképzésben

Az agyba hatoló tumorsejtek kapcsolatba lépnek a neurovaszkuláris egység sejtjeivel és sok esetben kétirányú kommunikáció megy végbe köztük.

Az erek falán történő átvándorlás nulladik lépéseként a tumorsejtek megtapadnak az agyi kapillárisok lumenében, melyet nagyban segítenek az endotélsejtek felszínén található adhéziós molekulák, például az ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule), a VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) és a VLA-4 (very late antigen-4) (Soto és mtsai., 2014). Ezután az endotélsejtek morfológiai változáson mennek át, sejtmagjaik a luminális oldalra kerülnek, ezáltal beszűkítik a kapillárisokat, elzárva az eret. A tumorsejtek néhány napon keresztül ebben az pozícióban maradnak, mialatt előkészítik a premetasztatikus niche-t, például exoszómák szekréciójával. Ennek hatására az endotélsejtek TNF- α -t (tumor necrosis factor alpha) és angiopoietin-2-t termelnek, ami csökkenti a vér-agy gát integritását (Wilhelm és mtsai., 2018). Körülbelül 4-5 nap elteltével a tumorsejtek kontrahálódnak és relatív gyorsan, pár óra leforgása alatt keresztülmigrálnak az érfalon (2. ábra). Ez a folyamat melanóma sejtek esetében paracelluláris-, azaz az endotélsejtek közötti, emlőkarcinóma sejtek esetében pedig jellemzően transzcelluláris úton, azaz az endotélsejtek szómáján keresztül történik (Herman és mtsai., 2019). Következő lépésként a tumorsejtek keresztülhatolnak az asztrocita-végtalpak által formált *glia limitans perivascularison*, és kolonizálják az agyi parenchimat (Wrobel & Toborek, 2016). A főként az ér mentén növekvő tumor lezorítja a kapillárisokról az asztrocita végtalpakat, melyek a növekvő daganatot körbevéve szerveződnek újjá (Haskó és mtsai., 2019).

Az agyba sikeresen bejutott tumorsejteket védi az endotélsejtek barrier tulajdonsága, mely nagyban megnehezíti a gyógyszermolekulák bejuttatását az agyba, ezáltal számos akadályt gördít a legtöbb központi idegrendszert érintő betegség kezelése elé. Az endotélsejtek paracelluláris barrierje méret, töltés és oldékonyság miatt sok gyógyszermolekulát kizár, melyek diffúzióval nem képesek átoldódni a sejtmembránon. Emellett az enzimikus barrier is jelentősen megnehezíti a gyógyszeres kezelést, mivel számos molekula már az endotélsejtek felszínén lebontásra kerülhet (Correale & Villa, 2009). Ráadásul az endotélsejtek apikális felszínén található efflux transzporterek facilitálják a gyógyszermolekulák visszapumpálását a

keringésbe (Keaney & Campbell, 2015). Ugyanezen efflux transzporterek gyakran túlexpresszálódnak a tumorsejtek felszínén is, ezáltal az agyba bejutott daganatsejtek nem csak a vér-agy gát védelmét élvezik, de saját efflux pumpáik miatt dupla védelemmel rendelkeznek a terápiás szerekkel szemben (Wilhelm és mtsai., 2018). Így az agyat sikeresen kolonizáló tumorsejtek a vér-agy gát védelmében gyorsan képesek proliferálni és gyógyszeres úton nehezen, vagy egyáltalán nem kezelhető agyi metasztázist kialakítani.



2. ábra: Az agyi metasztázisok képződésének specifikus lépései

Az agyi metasztázisok kialakulásáért felelős tüdőrák-, emlőkarcinóma- és melanómasejtek a véráram útján jutnak el a központi idegrendszerbe. Első lépésként a tumorsejtek megtapadnak az agyi kapillárisok lumenében, kapcsolódnak az endotélsejtekhez, melyek a tumorsejtek jelenlétében beszűkítik az ér lumenét. A tumorsejtek előkészítik a metasztatikus niche-t, majd jellemzően 4-5 nap elteltével átvándorolnak az érfalon. Ezután a karcinómasejtek áthatolnak a glia limitans perivascularis-on, majd a túlélő sejtek az asztrocita végtalpakat leszorítva az erek mentén kezdenek proliferálni.

Kutatócsoportunk egy korábbi munkájában bizonyította, hogy a periciták is fontos szerepet játszanak az agyi metasztázisok kialakulásában, ugyanis IGF2 (insulin-like growth factor 2) növekedési faktort termelnek. Ez a sejt metabolizmusra és mitogén szignalizációra is pozitív hatást gyakorló peptid erős pro-proliferatív hatása miatt segíti a metasztatikus emlőkarcinóma sejtek osztódását és a tumor növekedését az agyban. Továbbá a periciták extracelluláris mátrix fehérjék (4-es típusú kollagén, fibronectin) termelésével segítik a tumorsejtek letapadását az erek falára, ami szintén kulcsfontosságú a tumorsejtek túléléséhez az agyban (Molnár és mtsai., 2020).

Az asztrociták kettős, Janus-arcú szereppel bírnak az agyi metasztázisok kialakulásában. Ismert antitumorális hatásuk, például plazminogén szekréciójuk eredményeként plazmin keletkezik, mely hasítja az asztrociták által termelt FasL-t, ezzel elpusztítva a tumorsejtet. Továbbá a plazmin hasítja a metasztatikus tumorsejt által termelt L1-CAM-ot (L1 cell adhesion molecule) is, ezzel megakadályozva a tumorsejt interakcióját az érfallal (Valiente és mtsai., 2014). Azonban számos metasztázisképződést támogató anyagot is szekretálnak, például proteázokat, növekedési faktorokat, proinflammatorikus citokineket, emellett exoszómákat is kibocsátanak, melyeknek miR-190 mikroRNS tartalma aktiválja a tumorsejtek PI3K/Akt túlélési útvonalát (Wilhelm és mtsai., 2018).

A központi idegrendszer rezidens immunsejtjeiként számontartott mikroglia számos tumorelles hatással rendelkezik, például képesek fagocitózissal és citotoxikus anyagok kibocsátásával gátolni a metasztatikus tumorsejtek életben maradását az agyban (Schartner és mtsai., 2005). Azonban számos kutatás eredménye tükrözi, hogy a tumorsejtek által szekretált anyagok hatására a mikroglia hiperaktiválódik, növekedési faktorokat, MMP-eket (mátrix metalloproteinázokat) és gyulladást indukáló citokineket termelnek, melyek tumorszupportív, immunszuppresszív hatással bírnak (Wu & Watabe, 2017).

Összefoglalván tehát, a metasztázisképződés egy többlépcsős, bonyolult folyamat, melyben a tumorsejtek túlélését az szabja meg, hogy képesek-e átvándorolni az érfalon, ezután pedig túlélni az agyi mikrokörnyezetben. A teljes folyamat során kulcsszerepet játszanak a neurovaszkuláris egység sejtjei, melyek minden fontos lépésnél jelen vannak és interakcióba lépnek a tumorsejtekkel.

1.4. A gyulladáshos tumor-mikrokörnyezet az agyban

Az agyat érintő, szövetkárosodással járó betegségekhben a veszély-asszociált molekuláris mintázatok neuroinflammációt indukálnak. Nincs ez másképp az agyi metasztázisok esetében sem, ahol a vér-agy gát megnyílás, az asztrociták és mikroglia aktivációja, illetve az infiltráló immunsejtek növelik a gyulladásh mértékét. Bár az asztrociták és mikroglia elsődleges feladata a szöveti károsodások helyreállítása és a központi idegrendszer homeosztázisának fenntartása lenne, ha ez a folyamat nem elég effektív vagy túl nagy a károsodás, akkor kiterjedt gyulladásh alakul ki, mely facilitálhatja az agyi metasztázisok növekedését (Doron és mtsai., 2019).

Az inflammáció kialakulásában fontos szerepet játszanak a gyulladásos citokinek, melyek közül az egyik legjelentősebb és legpotensebb az IL-1 β (interleukin-1 beta) (Swanson és mtsai., 2019). Emlőkarcinóma-eredetű agyi metasztázissal diagnosztizált betegek véréből megnövekedett IL-1 β szintet mutattak ki, mely arra enged következtetni, hogy ez a citokin szerepet játszhat az agyi metasztázisok kialakulásában és fejlődésében (Fares és mtsai., 2021). Az IL-1 β -ra jellemző, hogy főként inflammaszóma-függő módon termelődik (Swanson és mtsai., 2019).

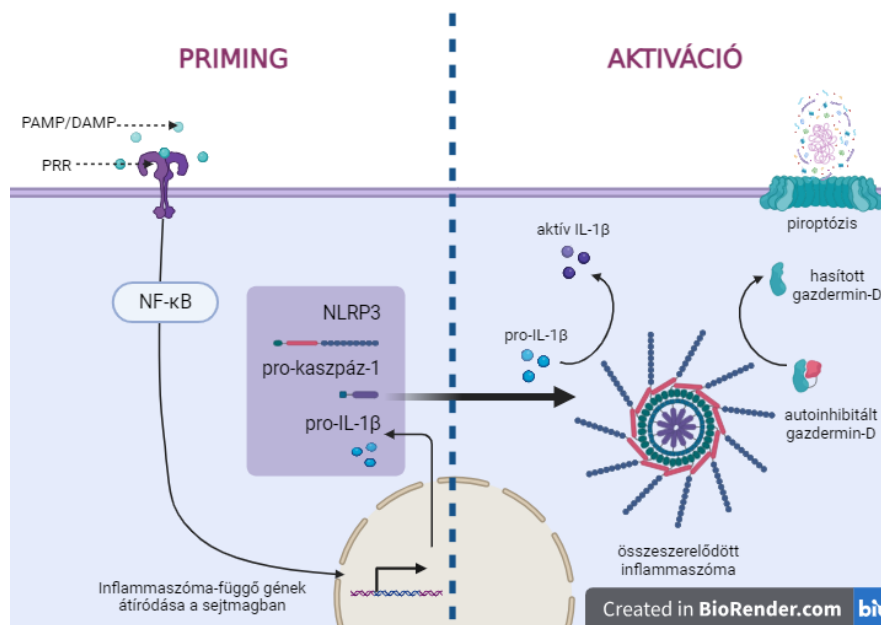
1.5. Az inflammaszómák felépítése és aktivációja

Az inflammaszómák a veleszületett immunrendszer részét képező intracelluláris multiprotein komplexek, melyek különféle veszély- és patogén asszociált molekuláris mintázatok hatására aktiválódnak. Az inflammaszómák közül a legismertebb és legjobban jellemzett az NLRP3 (nucleotide-binding and oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain-containing protein 3) inflammaszóma, a továbbiakban ennek példáján keresztül szeretném bemutatni az inflammaszómák felépítését és működését.

Az NLRP3 inflammaszóma egy három fő összetevőből felépülő oligomer. Az inflammaszóma részei az NLRP3 szenzor fehérje, az ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain) adaptor protein, amelyhez kapcsolódik a pro-kaspáz-1 effektor protein. Az NLRP3 szenzor fehérje három részből tevődik össze. N-terminálisan egy pyrin domén (PYD), középen egy NACHT domén (NAIP (neuronal apoptosis inhibitor protein), CIITA (MHC class 2 transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from *Podospira anserina*) és TP1 (telomerase-associated protein) tartalmú domén) és C-terminálisan egy LRR (leucine-rich repeat) domén alkotja. Az oligomerizációért felelős, ATPáz aktivitással rendelkező NACHT domén kulcsfontosságú szerepet tölt be az NLRP3 inflammaszóma önszerveződésében és funkcióképességének megőrzésében (Swanson és mtsai., 2019).

Az NLRP3 inflammaszóma aktivációja szigorúan szabályozott és két fő lépésben valósul meg (3. ábra). Első lépésként a sejt mintázatfelismerő receptorai, például az intracellulárisan elhelyezkedő NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2) receptor vagy a sejtfelszíni Toll-like receptorok érzékelik a különféle veszély- vagy patogén asszociált molekuláris mintázatokot, illetve a specifikus IL-1R (interleukin-1 receptor) és TNF-R (tumor nekrosis faktor receptor) transzmembrán citokin-receptorok a gyulladásos citokineket (Swanson és mtsai., 2019). Ennek hatására aktiválódik az NF- κ B (nuclear-factor

kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) szignalizációs út, mely a sejtmagban különféle inflammaszóma-függő gének transzkripciójának upregulációját eredményezi. Így végső soron fokozódik az NLRP3, illetve a pro-kaspáz-1 és a pro-IL-1 β expressziója (Bauernfeind és mtsai., 2009). Ezek után az NLRP3 protein poszttranszlációs módosításokon esik át, ezáltal stabilizálódik.



3. ábra: Az NLRP3 inflammaszóma képződésének kétlépcsős folyamata

Az NLRP3 inflammaszóma képződése két fő lépésben történik. Az első lépés a priming, amelynek során a patogén-asszociált vagy a veszély-asszociált molekuláris mintázatok a mintázatfelismerő receptorokhoz kötnek, melynek hatására az NF- κ B jelút aktiválódik. A sejtmagban inflammaszóma-függő gének íródnak át, amelyekről NLRP3 fehérje, pro-kaspáz-1 és pro-IL-1 β keletkezik. A második lépésben ezek a fehérjék inflammaszóma komplexsé szerelődnek össze, ez az aktiváció fázisa. A folyamat során a pro-IL-1 β -ből hasított, aktív IL-1 β keletkezik, valamint így képződik a pórusképző gasdermin-D is. Ez utóbbi a sejt piroptotikus halálát indukálhatja.

Az NLRP3 inflammaszóma aktivációjának második lépésében a multiprotein-komplex összeszerelődése történik. Ennek beindításához egy második stimulus is szükséges, melyet az NLRP3 szenzor protein érzékel. Elsőként az NLRP3 fehérjék oligomerizálódnak, melyhez kapcsolódnak az ASC adaptor proteinek. Ezután az ASC filamentumok összerendeződnek egyetlen, akár 1 μ m átmérőjű struktúrába, ezt nevezzük ASC speck-nek (Nagar és mtsai., 2023). Ennek hatására megtörténik a kaspáz-1 önhasítása és az inflammaszóma aktiválódik.

Az összeszerelődött NLRP3 inflammaszóma által aktivált kaszpáz-1 hasítja a pro-IL-1 β -t aktív IL-1 β -vá, mely indukálja a gyulladást a szövetben. Emellett a kaszpáz-1 hasítja a gazdermin-D-t is, mely pórusképződéshez és a sejt piroptotikus halálához vezethet (Swanson és mtsai., 2019).

Ezen mechanizmusok pontos feltérképezése és megértése rendkívül fontos ahhoz, hogy megfelelő terápiás célpontokat találjunk, ami végül hozzájárulhat számos gyulladással összefüggésben álló betegség hatékony kezeléséhez.

1.6. Az NLRP3 inflammaszóma mint terápiás célpont

Bár az inflammaszómák pontos szerepe az agyi metasztázisokban még nem tisztázott, tudjuk, hogy a kontrollálatlan gyulladás számos betegségben (például *rheumatoid arthritis*, köszvény, Alzheimer-kór, Parkinson-kór, továbbá számos daganattípus) súlyosbítja a tüneteket vagy vezethet egyenesen a beteg halálához, ezért rendkívül fontos hatékony gyulladáscsökkentő szerek fejlesztése. Az inflammaszómák blokkolására néhány gyógyszer már fogalomba is került, és sok hatóanyag áll jelenleg is tesztelés alatt.

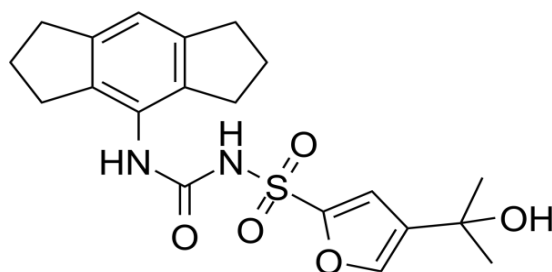
Az inflamáció mérséklésére fejlesztették a nem-glikozilált rekombináns humán IL-1R antagonistá Anakinrát, mely az inflammaszómák képződésétől *downstream* irányban fejti ki hatását, kompetitíven gátolva az IL-1 α és IL-1 β bekötődését az IL-1 receptorhoz. A gyógyszer hatékonynak bizonyult a *rheumatoid arthritis* kezelésében és gyógyszerészeti forgalomban van (Waugh és mtsai., 2005).

A Canakinumabot az NLRP3 inflammaszóma túlműködéséhez köthető betegségek, például a CAPS (Cryopyrin-associated periodic syndrome) autoimmun betegség kezelésére fejlesztették. Működésének alapja az IL-1 β jelátviteli út semlegesítése humán anti-IL-1 β monoklonális antitesttel. 2009-ben az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala jóváhagyta a gyógyszer forgalomba hozatalát (Dhimolea, 2010).

Az utóbbi években egy másik lehetséges gyógyszer-célpontra is irányultak fejlesztések, mely nem más, mint az inflammaszóma NLRP3 proteinje. Specifikus gátlása megakadályozza az inflammaszóma összeszerelődését és így az IL-1 citokinek túlzott termelését. Az NLRP3 inhibitorok specifikusan alkalmazhatók az NLRP3 inflammaszóma-függő betegségekben, mivel más inflammaszómák citokintermelő működését nem befolyásolják, így az IL-1 blokkolókkal ellentétben kisebb eséllyel járnak együtt súlyos mellékhatásokkal, például fertőzések megjelenésével (Mullard, 2019).

Az első terápiás céllal fejlesztett kismolekula, amely az NLRP3 protein ATP-hidrolízis doménjét targetálja és képes eredményesen átjutni a vér-agy gáton, az MCC950 volt (4. ábra). Ez a diarilszulfonilurea származék specifikusan gátolja az NLRP3 inflammaszóma aktiválódását, alkalmazása más inflammaszóomákra (AIM2, NLRC4 vagy NLRP1 inflammaszóma) nincs hatással. Az MCC950 hatékonynak bizonyult a CAPS betegség egérmodelljében, melyben az NLRP3 mutáns állatok a neonatális periódusban elpusztulnak. A kezelés hatására az újszülött állatok tömege szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontrollcsoportban, sőt, a kétnaponta intraperitoneálisan adagolt gátlószer jelentősen meghosszabbította az NLRP3 mutáns állatok életét (Coll és mtsai., 2015).

Az MCC950 a klinikai tesztek második fázisáig jutott, azonban potenciális májtoxicitása miatt nem vizsgálták tovább. Azonban mindez lendületet adott új MCC950 analógok fejlesztéséhez, melyek remélhetőleg hatásos kezelésnek fognak bizonyulni a gyulladásos megbetegedésekben (Coll és mtsai., 2015; Laliberte és mtsai., 2003).



4. ábra: Az MCC950 szerkezeti képlete

Az MCC950 egy diarilszulfonilurea származék, az elsőként kifejlesztett kismolekula, mely hatékonyan és specifikusan képes targetálni az NLRP3 proteint. Képes átjutni a vér-agy gáton, ezáltal eredményes lehet a központi idegrendszert érintő gyulladásos folyamatok kezelésében is.

Összegzésként elmondható, hogy az agyi metasztázisok gyakoriságuk és mortalitásuk miatt világszerte súlyos egészségügyi problémának számítanak. A hatásos és célzott terápiák fejlesztéséhez rendkívül fontos a betegség sejtszintű tanulmányozása és molekuláris folyamatainak megértése, különös tekintettel a gyulladásos folyamatokra. Az utóbbi években egyre világosabbá vált, hogy a neurovaszkuláris egység sejtjei kulcsszerepet játszanak az agyi metasztázisok kialakulásában, sokszor kettős, tumorszuppresszív és antitumorális hatást is kifejtve. További vizsgálatuk még sok ígéretes eredménnyel szolgálhat, melyek segíthetnek az agyi metasztázisok megértésében, ezáltal a betegség minél hatékonyabb kezelésében.

2. Célkitűzés

A különféle központi idegrendszeri megbetegedésekben gyakran felbukkan a gyulladás, mint tényező, ám sok esetben nem tudjuk biztosan, hogy az adott tünetegyüttes okaként vagy következményeként, illetve, hogy pozitív vagy negatív hatással van-e a betegség kialakulására és lefolyására. Nincs ez másként az emlőkarcinóma-eredetű agyi metasztázisok esetében sem.

Az agyi metasztázisban szenvedő páciensek vérében megemelkedett IL-1 β gyulladásos citokin szintet mutattak ki, mely elsősorban inflammaszóma-függő módon termelődik. Bár az agyi metasztázisok esetében bizonyítottan jelen van a neuroinflammáció, az, hogy az NLRP3 inflammaszóma szerepet játszik-e az agyi metasztázisok kialakulásában, még nem ismert.

Kísérleteink során a következő specifikus kérdésekre keressük a választ:

- Az emlőkarcinóma-eredetű agyi metasztázisok esetén szerepet játszik-e az NLRP3 inflammaszóma a neuroinflammáció kialakulásában?
- Hogyan hat ez a folyamat a metasztatikus sejtekre?
- Milyen sejttípusban alakul ki az NLRP3 inflammaszóma az agyi metasztatikus környezetben?

3. Anyagok és módszerek

3.1. A 4T1-tdTomato sejtek tenyésztése

A 4T1 egér tripla negatív metasztatikus emlőkarcinóma sejteket Lipofectamine 2000 segítségével pcDNA3.1(+)/Luc2 = tdT plazmiddal transzfektáltuk. A sikeresen transzfektált sejteket BD FACSAria Fusion sejtszorterrel válogattuk ki. Ennek eredményeként a 4T1-tdTomato sejtek (továbbiakban 4T1-tdT) vörös fluoreszcens fehérjét expresszálnak.

A 4T1-tdT sejteket 5% FBS-sel (Fetal Bovine Serum, Thermo Fisher Scientific) kiegészített RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Thermo Fisher Scientific) médiumban tenyésztettük, 500 µg/ml koncentrációban alkalmazott G418 (Thermo Fisher Scientific) szelekciós antibiotikum jelenlétében. A sejteket állandó 37 °C-on, 5%-os CO₂ koncentráció mellett tenyésztettük nedves környezetben. A mikoplazma fertőzés hiányát Mycoplasma Detection Kit (Lonza Bioscience) segítségével ellenőriztük.

A kísérleti állatokba való injektálásához a sejteket 0,05%-os Tripszin-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid, Thermo Fisher Scientific) oldattal mostuk fel, a szuszpendálást követően 700 g-n 5 percig centrifugáltuk, majd a sejtpelletet annyi Krebs-Ringer oldatban szuszpendáltuk fel újra, hogy abból 300 µl tartalmazzon 3 millió tumorsejtet.

3.2. Engedélyek és a kísérleti állatok tartása

Kísérleteink a hatályos törvényeknek és a nemzetközi standardoknak megfelelően, valamint a megfelelő állatkísérletes engedély (a Csongrád Megyei Kormányhivatal, Népegészségügyi és Élelmiszerlánc-biztonsági Főosztály, Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Osztály XVI./764/2018 sz. engedélye) birtokában történtek.

Kísérleteinkhez 8-12 hetes nőtény BALB/c egereket (Charles River Laboratories) használtunk. Az állatokat a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Központi Állatházában standard körülmények között tartották állandó 23±2 °C-on, a világos és sötét periódusok 12 órás váltakozásával, korlátlan hozzáféréssel az ivóvízhez és az eledelhez. Az egerek átlagos tömege 17-23 g között mozgott.

3.3. Az *in vivo* metasztázis modell létrehozása

A BALB/c egereket 4% izofluránnal altattuk, majd a megfelelő anesztézia elérése után 2%-os izoflurán koncentrációval tartottuk fenn az alvó állapotot. Az egerek jobb oldali *arteria*

carotis interna-jába 100 µl steril Krebs-Ringer oldatban 1 millió 4T1-tdT egér emlőkarcinóma sejtet injektáltunk. A jobb oldali *arteria carotis externa* el volt kötve, így a beadott tumorsejtek mind az *arteria carotis interna*-ba jutottak. Az állatokat a műtétet követően naponta monitoroztuk. Gyulladás, sebfertőzés vagy krónikus fájdalom nem volt megfigyelhető. A műtétek túlélési rátája 97-98%, az állatok súlyvesztése pedig maximum 5% volt.

3.4. A kísérleti állatok kezelése MCC950-nel

Az egerek egyik csoportját egy specifikus NLRP3 inflammaszóma inhibitorral, MCC950-nel (InvivoGen) kezeltük 10 mg/testtömeg kilogramm koncentrációban, intraperitoneálisan adagolva, a tumorsejtek injektálását követő 4., 5. és 6. napokon. A másik csoport vivőanyag kontrollként PBS-ben (phosphate-buffered saline, 0,1 M, pH = 7,4; 136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) oldott DMSO-t (dimethyl sulfoxide, Merck-Sigma) kapott, az előzőekhez hasonlóan, intraperitoneális injekció formájában.

3.5. A szövetek fixálása és metszetkészítés

A kísérleti állatokat frissen készített Avertinnel (2,2,2-Tribrom-etanol) altattuk, majd transzkardiális perfúziót alkalmazva PBS-sel átmostuk, és a szövetet 4% PBS-ben oldott PFA-val (paraformaldehyde) fixáltuk. Az agyat óvatosan kiemeltük majd 1 napig 4% PFA-ban posztfixáltuk. A krioprotekció érdekében az agyat 30%-os szukróz oldatba helyeztük, ahol 3 nap alatt lesüllyedt. Ezután fagyasztó mikrotómmal (Reichert-Jung, Leica Biosystems) 20 µm-es koronális metszeteket készítettünk. Az úszó szeleteket 0,02% nátrium-aziddal (Merck-Sigma) kiegészített 10 mM-os PBS-ben tároltuk.

3.6. Immunfluoreszcencia

Az egér agyi metszeteket PBS-sel történő mosást követően 0,5% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben (a továbbiakban PBS-T) permeabilizáltuk 20 percig. Ezután a nem specifikus jeleket PBS-T-ben oldott 3%-os BSA-val (Bovine Serum Albumin, VWR International) blokkoltuk egy órán keresztül. A metszeteket a primer antitestekkel [GFAP (glial fibrillary acidic protein, gliális fibrilláris savas fehérje) (nyúlban termeltetett, Abcam, ab7260, 1:300; egérben termeltetett, Sigma, G3893 1:200), NLRP3 (kecskében termeltetett, Novus Biologicals, NBP2-76806, 1:100), IL-1β (nyúlban termeltetett, Abcam, ab9722, 1:200)] egész éjszakán át inkubáltuk a blokkoló oldatban, 4 °C-on, folyamatos lassú rázatás mellett. Másnap háromszor 5 perces PBS-es mosást követően a metszetekhez hozzáadtuk a PBS-ben oldott

másodlagos antitesteket (kecskében termeltetett nyúl elleni antitest, Alexa Fluor 647 nm, A-21245; számarban termeltetett egér elleni antitest, Alexa Fluor Plus 647 nm, A32787; számarban termeltetett kecske elleni antitest, Alexa Fluor 488 nm, A-11055; számarban termeltetett nyúl elleni antitest, Alexa Fluor Plus 488 nm, A32790; mind 1:500, Thermo Fisher Scientific), amelyekkel egy órán keresztül, fénytől védve inkubáltunk a metszeteket szobahőmérsékleten, folyamatos lassú rázatás mellett. Ezután a metszeteket ismét háromszor 5 percig mostuk PBS-ben, a második mosási lépésben 1 µg/ml Hoechst 33342 (Merck-Sigma) sejtmag festéket is alkalmazva. Ezután a mintákat Fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific) fedő médiummal vittük fel a tárgylemezekre.

3.7. Fluoreszcens mikroszkópia

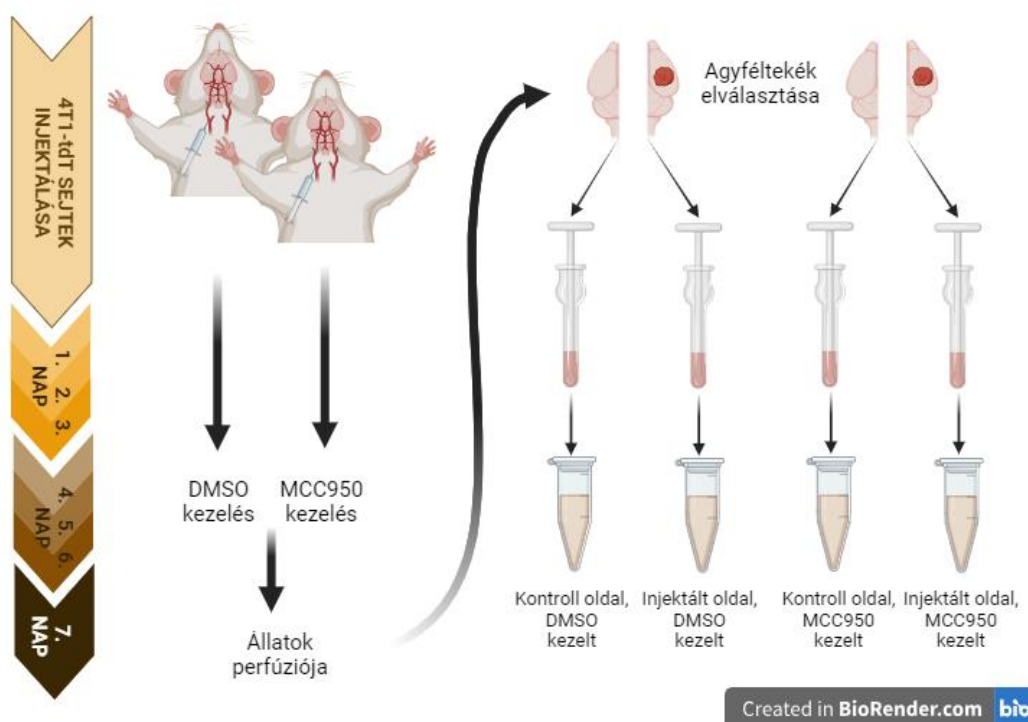
A dolgozatban bemutatott mikroszkópos képek a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont Mikroszkópos Sejtanalízis Laboratóriumának VisiScope CSU-W1 spinning disk konfokális mikroszkópjával készültek, egy PlanApo N 60x/1.42 olajos objektívvel. A függőleges síkban készült optikai szeletek összeomlasztásához FIJI programot használtunk.

3.8. Mintaelőkészítés és western blot

Kísérleteink során az állatokat két csoportra osztottuk. Az egyik csoportot egy specifikus NLRP3 inflammaszóma inhibitorral, MCC950-nel kezeltük intraperitoneális injekció formájában, míg a másik csoportot az MCC950 vivőanyagával, DMSO-val oltottuk. Mivel a tumorsejteket a fent részletezett módon az egerek jobb oldali *arteria carotis interna*-jába injektáltunk, így csak a jobb oldali hemiszfériumban alakultak ki metasztázisok. Ezért fehérje minta nyeréséhez az állatok agyának két agyféltekéjét szétválasztottuk egymástól, és külön-külön használtuk fel. Így végül négy csoportot hoztunk létre: DMSO-val kezelt állat tumorrally injektált agyfélteke, DMSO-val kezelt állat tumormentes agyfélteke, MCC950-nel kezelt állat tumorrally injektált agyfélteke és MCC950-nel kezelt állat tumormentes agyfélteke (5. ábra).

Az agyszövetből az aktív, azaz hasított IL-1β detektálására western blot technikát alkalmaztunk. A tumorsejtek injektálását követő 7. napon az állatokat a fent részletezett módon transzkardiálisan perfundáltuk, de a szövetek fixálása nélkül emeltük ki az agyat. A szaglógumót és a kisagyat eltávolítottuk, a két agyféltekét elválasztottuk egymástól, majd külön-külön azonnal 1 ml jéghideg 10 mM PBS-t, SigmaFast proteáz inhibitor koktélt (Merck-

Sigma) és 1% Triton X-100-at tartalmazó pufferben homogenizáltuk Potter-Elvehjem homogenizátorban.



5. ábra: Kísérleti állatok kezelése MCC950-nel és mintaelőkészítés western blotra

A tumorsejtek injektálását követő 4., 5. és 6. napon a kísérleti állatokat MCC950-nel kezeltük intraperitoneális injekció formájában, 10 mg/ttkg dózisban. A kontroll állatokba a vivőanyagként használt DMSO-t injektáltuk. A 7. napon, az egerek feláldozását követően az agyféltekéket elválasztottuk egymástól és külön-külön homogenizáltuk, így 4 csoportot alkotva.

A szövettörmelék eltávolítása céljából a homogenizátumokat hűtött centrifugában 4 °C-on 13000 g-n 20 percig centrifugáltuk. A felülúszó fehérjetartalmát BCA (bicinchoninic acid) módszerrel határoztuk meg úgy, hogy a minta optikai denzitását spektrofotométerrel 562 nm-en mértük. Ezt követően a minta térfogatával megegyező mennyiségű 100%-os jéghideg metanolt és a minta ¼ térfogatával megegyező kloroformot adtunk a mintáinkhoz, majd azokat vortexelést követően 4 °C-on 13 000 g-n 5 percig centrifugáltuk. A vizes fázis eltávolítása után a fehérje pelletet metanollal mostuk és vortexeltük, ezt követően újabb centrifuga lépés következett az előzőeknek megfelelő beállításokkal. A felülúszót eltávolítottuk és a fehérje pelletet jégen szárítottuk. Ezután kétszeres töménységű Laemmli pufferben visszaoldottuk a fehérjéket és 5 percig 95 °C-on melegítettük.

A fehérjeminták koncentrációját kiegyenlítettük egymással, és vertikális gélelektroforézishez használt poliakrilamid gélre vittük fel. Az elektroforézist követően előzetesen metanolba majd transzfer pufferbe áztatott PVDF (polyvinylidene difluoride, 0.2 µm pórusátmérő; Bio-Rad) membránra transzferáltuk a fehérjéket. Ezután a nem specifikus jeleket 3% BSA-t tartalmazó TBS-T (Tris-buffered saline, 0,1% Tween-20-szal) oldatban blokkoltuk a membránon. A primer antitesteket TBS-T-ben oldva egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk a mintáinkat tartalmazó membránokkal, folyamatos körkörös forgatás mellett. Másnap a membránokat háromszor 10 percig mostuk TBS-T-vel, majd a tormaperoxidázzal kapcsolt TBS-T-ben oldott szekunder antitestekkel 1 órán át inkubáltuk. A fehérjesávok vizualizálásához kemilumineszcens szubsztrátot vittünk fel a membrán felszínére, a jeleket ChemiDoc MP System (Bio-Rad) segítségével detektáltuk. A sávok denzitását Image Lab Software-rel (verzió 5.2) mértük. Adatainkat a kontrollként használt β-aktinra normalizáltuk.

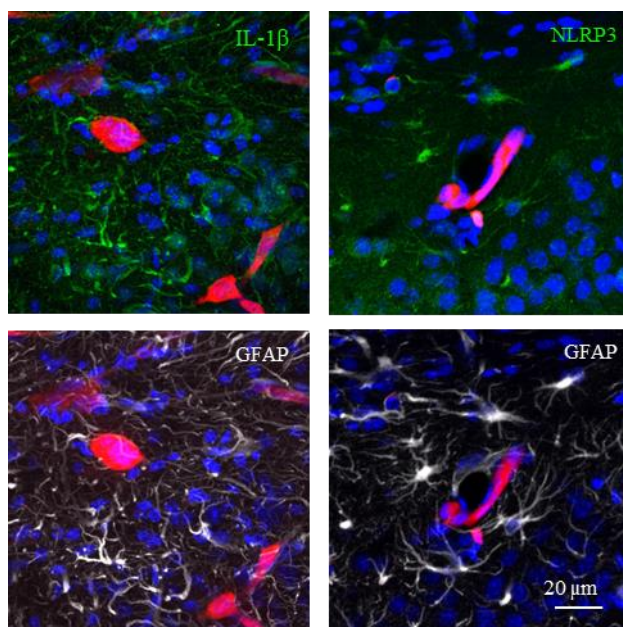
3.9. Az adatok statisztikai elemzése

Eredményeink statisztikai elemzéséhez a GraphPad Prism (verzió 8.0.1.2.44) szoftvert használtuk. A western blot sávok denzitometriás kiértékelésénél ANOVA-t és Fisher's LSD post hoc tesztet, az MCC950 *in vivo* tumorméretre, illetve *in vitro* proliferációra gyakorolt hatásának vizsgálatához t-próbát alkalmaztunk. Szignifikáns eredményként az 0,05-nél kisebb P értéket fogadtuk el.

4. Eredmények

4.1. A tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisaiban az NLRP3 inflammaszóma komponensek a peritumorális asztrocitákban expresszálódnak

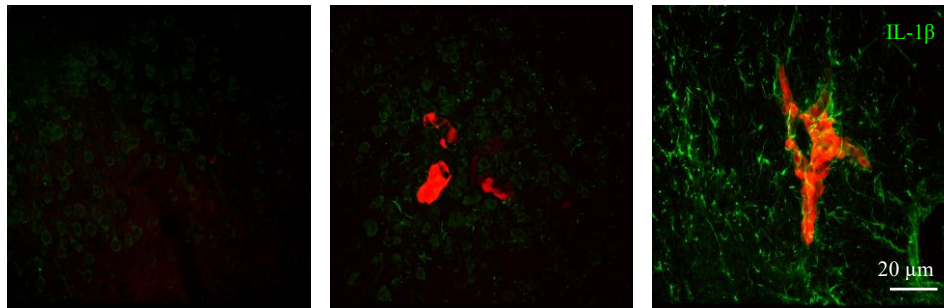
Kísérleteinkben első lépésként az inflammaszómák képződésének helyét akartuk meghatározni a tumorsejtekkel injektált egerek agyában. Ehhez immunfluoreszcens technikát alkalmaztunk. Az NLRP3 inflammaszóma két fontos komponensét, az NLRP3 fehérjét és az IL-1 β fehérjét vizsgáltuk az egér agy frontális, temporális és parietális kérgi régiójában, a peritumorális területeken a tumorsejtek injektálását követő 7. napon (6. ábra). Ezek az inflammaszóma proteinek specifikusan az asztrocita markerként használt GFAP jellel kolokalizáltak. Sem a tumorsejtekben, sem más sztrómasejtben nem figyeltünk meg NLRP3 vagy IL-1 β expressziót. Tehát kijelenthetjük, hogy az NLRP3 inflammaszóma képződésének első lépése, a priming folyamat, specifikusan a peritumorális asztrocitákban történik.



6. ábra: Az inflammaszóma komponensek jelenléte peritumorális asztrocitákban

Az NLRP3, illetve az IL-1 β kolokalizációja GFAP-val a tumorsejtek injektálását követő 7. napon az egerek agyából készült reprezentatív immunfluoreszcens képeken, amelyek a függőleges síkban készült optikai szeletek maximum intenzitású összeomlasztásával készültek. Az IL-1 β jel 79%-a, míg az NLRP3 jel 95%-a kolokalizálódik a GFAP jelöléssel. Kék: Hoechst 33342, piros: 4T1-tdT egér mellráksejtek

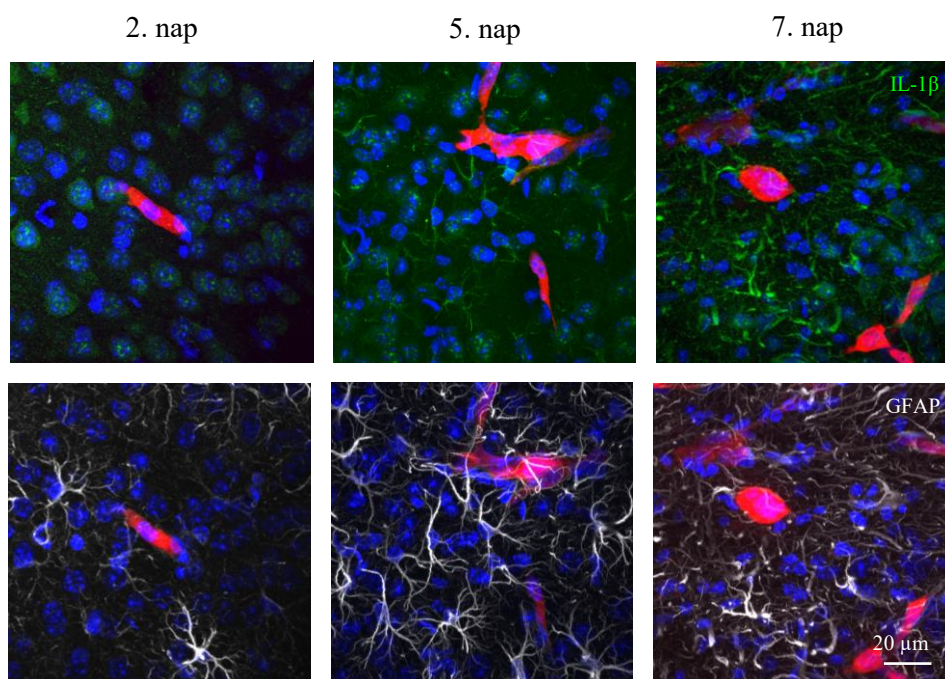
Megfigyeltük továbbá, hogy az IL-1 β fehérje expressziós szintje korrelált a metasztatikus lézió méretével (7. ábra). A tumormentes területeken nem volt detektálható az IL-1 β jel, azonban minél kiterjedtebb volt a tumoros lézió az agyban, annál kifejezettebbé vált az IL-1 β szignál, tehát a gyulladásos citokin expressziójának mértéke a tumor méretével növekedett.



7. ábra: Az IL-1 β gyulladásos citokin expressziós szintjének változása a tumorméret függvényében

Az ábra az IL-1 β expressziójának fokozódását mutatja a tumorméret függvényében, a tumorsejtek injektálását követő 7. napon. A reprezentatív immunfluoreszcens képek a függőleges síkban készült optikai szeletek maximum intenzitású összeomlasztásával készültek. Piros: 4T1-tdT egér mellráksejtek

Következő lépésként a gyulladásos folyamat időbeli nyomon követését tűztük ki célul. Ehhez a tumorsejtek injektálását követő 2., 5. és 7. napon vizsgáltuk az NLRP3 inflammaszóma komponensek expressziójának mértékét az egerek agyában (8. ábra). Két nappal a tumorsejtek injektálása után a kísérleti állatok agyában nem volt detektálható IL-1 β jel. Ez összefüggésben állhat azzal, hogy a tumorsejtek ezen a ponton általában még az agyi erek lumenében tartózkodnak, ahogy az ábrán is látszik. A tumorsejtek extravazációja a kapillárisokból az agyi parenchimába jellemzően a tumorsejtek injektálásától számított 4-5. napon történik. Ennek megfelelően az injektálástól számított 5. napon vizsgált állatok agyában már megfigyelhetők voltak kisebb tumoros léziók és megjelent az IL-1 β szignál a peritumorális asztrocitákban. Az IL-1 β jel erőssége és kiterjedése a 7. napra még tovább fokozódott a metasztatikus léziók környezetében.



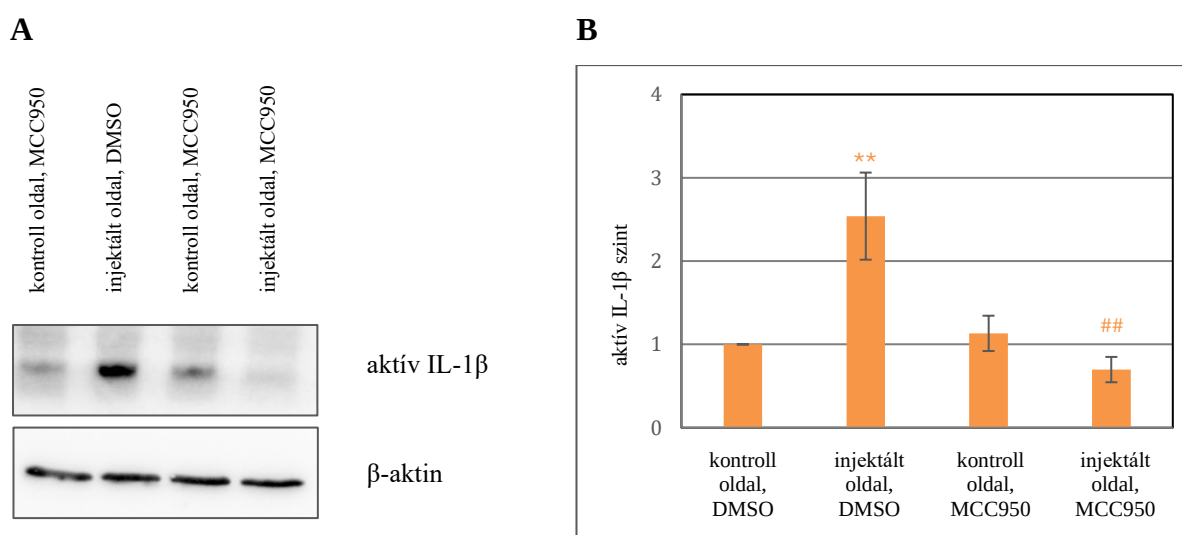
8. ábra: Az inflammaszóma komponensek upregulációja a tumorsejtek injektálásától számított idő függvényében

Az IL-1 β és a GFAP expressziójának fokozódása a tumorsejtek injektálásától számított 2., 5. és 7. napon készült reprezentatív immunfluoreszcens képeken, amelyek a függőleges síkban készült optikai szeletek maximum intenzitású összeomlasztásával készültek. Az 5. napon az IL1 β pozitív pixelek 77%-a, míg a 7. napon 79%-a kolokalizált a GFAP jelöléssel. Az 5. napon a GFAP pozitív pixelek 7%-a, míg a 7. napon a 28%-a volt pozitív IL-1 β -ra is. Kék: Hoechst 33342, piros: 4T1-tdT egér mellráksejtek

4.2. Az NLRP3 inflammaszóma aktivációja elősegíti, annak gátlása pedig csökkenti a metasztázisok növekedését az agyban

Következő lépésként az NLRP3 inflammaszóma aktivációját és annak szerepét vizsgáltuk a korábban részletezett *in vivo* agyi metasztázis modellben. A gátláshoz egy specifikus NLRP3 inflammaszóma inhibitor, az MCC950-et használtuk, mivel ez effektíven képes átjutni a vér-agy gáton. A kísérleti állatokat a korábbiakhoz hasonlóan egér mellráksejtekkel injektáltuk, majd intraperitoneálisan alkalmazott injekció formájában kezeltük az MCC950 gátlószerrel, a tumorsejtek érből való kivándorlásának időpontjában és az azt követő napokon. Mivel immunfluoreszcens festéssel nem tudjuk elkülöníteni az IL-1 β hasított, azaz aktív formáját az előalakjától, az aktív IL-1 β szintjének detektálásához western blot technikát alkalmaztunk. Az érett, 17 kDa tömegű citokin molekulásúlya jóval kisebb, mint a 31 kDa tömegű előalaké, így a két forma jól elkülöníthető volt egymástól, ezáltal vizsgálni tudtuk az inflammaszóma aktivációt. A western blot sávok és azok denzitometriával történő

analízisének eredménye jól mutatta, hogy a kísérleti állatok tumorral injektált hemiszfériumában szignifikánsan magasabb volt az aktív IL-1 β szintje, mint a kontrollként használt, tumormentes kontralaterális oldalon (9. ábra). Ezáltal igazoltuk, hogy a priming folyamatot inflammaszóma aktiváció követi, amelynek eredményeképpen aktív IL-1 β szabadul fel. Ezen túl, az MCC950-nel kezelt egerek tumorral injektált agyféltekéjében szignifikánsan kisebb volt az aktív IL-1 β mennyisége, mint a tumorsejtekkel injektált, de csak a vivőanyaggal (DMSO-val) kezelt állatok agyában. Ez is igazolta, hogy az aktív IL-1 β inflammaszóma-függő módon termelődik a tumoros áttéket tartalmazó agyban.



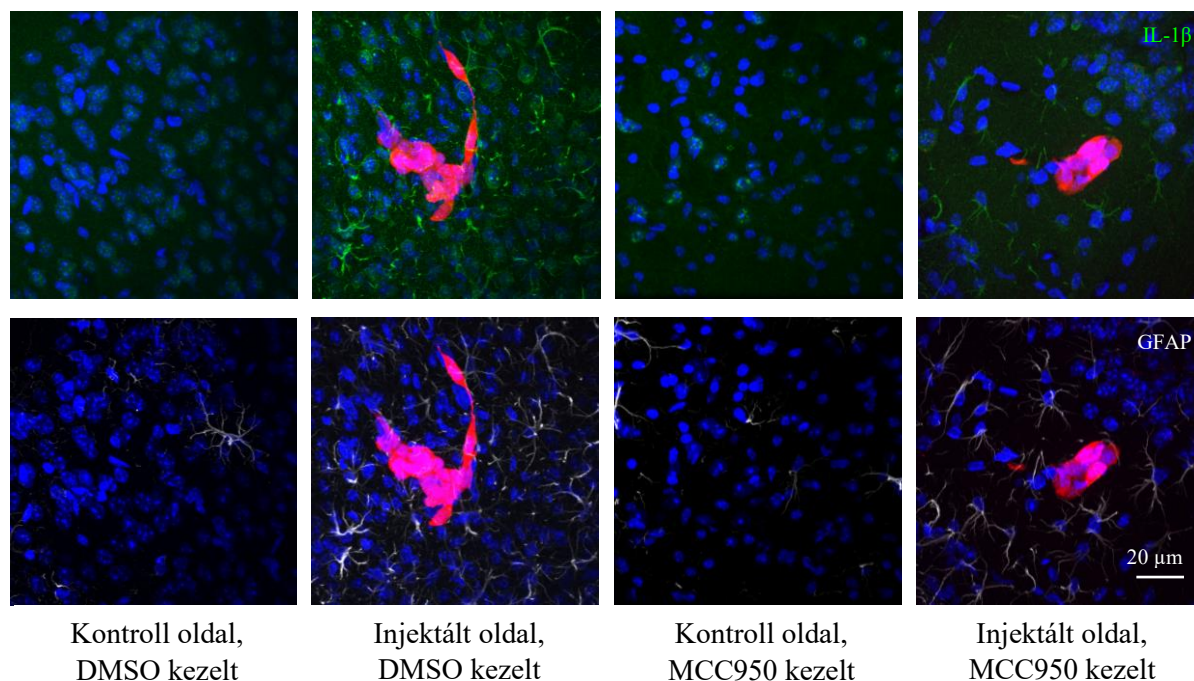
9. ábra: Az aktív IL-1 β szintje a tumorsejtekkel oltott és MCC950-nel kezelt állatok agyában

A: Reprezentatív IL-1 β western blot az MCC950-nel, illetve a vivőanyaggal kezelt állatok tumorsejtekkel injektált, illetve kontralaterális hemiszfériumából. A β -aktin a fehérjekoncentráció kontrolljaként szolgált.

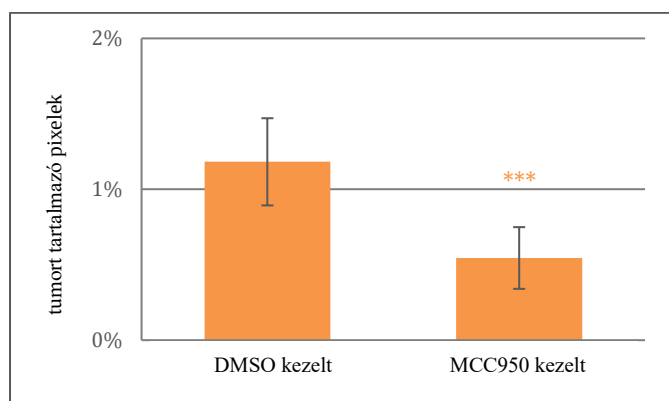
B: Az aktív IL-1 β western blot sávok denzitometriás kiértékelése, β -aktinra normálva. A diagram 3 független kísérlet átlagát és szórását mutatja. ** $P \leq 0,01$ a DMSO-kezelt kontroll oldalhoz hasonlítva, ## $P \leq 0,01$ a DMSO-kezelt injektált oldalhoz hasonlítva (ANOVA és Fisher's LSD post hoc teszt)

Végül kimutattuk, hogy az NLRP3 inflammaszóma inhibitorral kezelt állatok agyában csökkent az asztrocitákban az IL-1 β jel mennyisége a vivőanyaggal kezelt állatokéhoz képest. Ami még fontosabb, hogy az MCC950-nel kezelt állatok agyában kisebb és kevesebb tumoros lézió volt megfigyelhető. Az immunfluoreszcens képek kvantifikálásának eredményeként azt láttuk, hogy a tumorok mérete kevesebb, mint a felére csökkent az NLRP3 inflammaszóma inhibitor hatására (10. ábra).

A



B



10. ábra: Az NLRP3 inflammaszóma inhibíciójának hatása a tumorok növekedésére

A: Az *NLRP3* inflammaszóma gátlásának hatása az emelkedett *IL-1 β* expresszióra a peritumorális asztrocitákban. Az *IL-1 β* és a *GFAP* expressziója 4T1-tdT sejtekkel vagy Krebs-Ringer oldattal (kontroll) injektált és 10 mg/ttkg MCC950-nel vagy vivőanyaggal kezelt egerek agyában. Reprezentatív immunfluoreszcens képek, amelyek a függőleges síkban készült optikai szeletek maximum intenzitású összeomlasztásával készültek, 7 nappal a tumorsejtek injektálását követően. Kék: Hoechst 33342, piros: 4T1-tdT egér mellráksejtek

B: A metasztázisok csökkent növekedése az MCC950-nel kezelt egerek agyában. A tumort tartalmazó pixelek százalékos aránya az összes pixelhez viszonyítva vivőanyaggal, illetve MCC950-nel kezelt állatokból származó agyszeleteken. $N=3$ független kísérletről, állatonként 5 agyszeletről készült képek átlaga és szórása. *** $P \leq 0,001$ (Student t-teszt)

5. Diszkusszió

Az emberi test legszorosabban záródó endoteliális barrierje a vér-agy gát, mely négyes védvonalával megakadályozza a potenciálisan káros és toxikus anyagok bejutását a központi idegrendszerbe, ezáltal nagy mértékben hozzájárulva az agy homeosztázisának fenntartásához (Wilhelm és mtsai., 2013).

Ennek ellenére néhány tumortípus, nevezetesen a tüdőrák, az emlőkarcinóma és a melanóma képes áthatolni a vér-agy gáton, ezáltal metasztázist képezni az agyba (Achrol és mtsai., 2019). Az áttétes agydaganat kialakulása során első lépésként a tumorsejteknek át kell hatolniuk a vér-agy gáton, majd túl kell élniük az agyi mikrokörnyezetben. Mindkét lépésben fontos szerepet játszhatnak a proinflammatorikus citokinek és kemokinek, melyek preklinikai kutatások szerint facilitálják az agyi metasztázisképzés folyamatát (Fares és mtsai., 2021).

Az agyi metasztázisképzés során a tumorsejtek és az asztrociták kölcsönös interakcióban vannak egymással. Ennek első lépéseként a tumorsejtek az extravázáció során keresztülhatolnak az érfalon, majd a *glia limitans perivascularis*-on, azaz az erek falát beborító asztrocita végtalpak által alkotott struktúrán. A végtalpak később visszahúzódnak, körbevéve a tumoros léziót, így a metasztatikus sejtek a perivaszkuláris niche-ben proliferálnak, körbefogva az agy ereit (Haskó és mtsai., 2019). Az agyba sikeresen bejutott tumorsejtekre ezután is hatnak az asztrociták által szekretált faktorok, melyek pro- és antimetasztatikus hatásúak is lehetnek, például plazminogént szekretálnak, mely eredményeként a FasL hasítódik, ezzel elpusztítva a tumorsejtet. Ezért az agyat kolonizáló tumorsejteknek először le kell győzniük az asztrociták daganatellenes mechanizmusait, hogy ezután kihasználhassák a metasztázis fejlődését segítő hatásokat (Wilhelm és mtsai., 2018).

A metasztázisképzés során a gyulladásnak egyaránt lehet pozitív és negatív hatása is. Az akut gyulladás gyakran segíti a dendritikus sejtek érését és az antigén prezentációt, így gátolva a metasztázis kialakulását. Azonban a krónikus gyulladás immunszuppresszálo hatású lehet, mely kedvezhet az áttétek kialakulásának (Zhao és mtsai., 2021). Habár a glia-tumor interakciókról sok adat áll rendelkezésre, az asztrociták specifikus szerepe és hatásmechanizmusa a gyulladásos agyi metasztatikus környezet kialakításában még mindig kevésbé ismert (Doron és mtsai., 2019). A tudományterület korábbi eredményei korrelációt mutatnak az agyi metasztázisok létrejötte és a gyulladásos citokinek jelenléte között, azonban a pontos mechanizmusok még nem tisztázottak. A tüdőrák agyi metasztázis *in vitro* modelljében azt találták, hogy a karcinómasejtek jelenlétében az asztrociták

proinflammatorikus citokineket (IL-6, TNF- α , IL-1 β) termelnek, melyek serkentik a tumorsejtek proliferációját (Seike és mtsai., 2011). Továbbá Chen és munkatársai *in vivo* egérmodellt alkalmazva kimutatták, hogy a tüdő- és mellráksejtek protocadherin 7-et termelnek, melynek hatására réskapcsolatok (gap junctionök) alakulnak a ki az asztrociták és a tumorsejtek között. Ezeken a csatornákon keresztül a két sejt kommunikál egymással, melynek eredményeképp az asztrociták IFN- α (interferon alpha) és a TNF- α gyulladásos citokineket szekretálnak, ami serkenti a tumor növekedését, és kemorezisztenciát alakít ki (Chen és mtsai., 2016).

Az inflammaszómák szerepe az emlőkarcinóma-eredetű agyi metasztázisok kialakulásában egészen mostanáig ismeretlen volt, ám kutatócsoportunknak sikerült bizonyítania, hogy az asztrociták kulcsszerepet játszanak a tripla negatív emlőkarcinóma gyulladásos környezetének kialakításában. Az NLRP3 inflammaszóma primingjét és aktivációját a kizárólag a peritumorális asztrocitákban észleltük, melynek eredményeként IL-1 β szekretálódott a tumor mikrokörnyezetben, mely segítette a metasztatikus sejtek proliferációját az agyban.

In vitro agyi metasztázis modellben korábban Gong és munkatársai azt találták, hogy az agyi metasztatikus emlőkarcinóma sejtek is expresszálhatnak IL-1 β -t, mely aktiválja az asztrocitákban a TGF- β 2 (transforming growth factor-beta 2) szignalizációt (Gong és mtsai., 2019). Szintén *in vitro* modellt használva Xing és munkatársai a tumorsejtek által termelt IL-1 β hatására az asztrocitákban indukálódó Notch szignalizáció prometasztikus szerepére találtak bizonyítékot. Továbbá *in vivo* egérmodellben megfigyelték, hogy az IL-1 β -t túlexpresszáló tripla negatív emlőkarcinóma sejtek invazívabbá váltak és nőtt a metasztázisképző hajlamuk (Xing és mtsai., 2013).

Az agyban nem csak metasztatikus emlőkarcinóma sejtekben, hanem gliómasejtekben is kimutatták, hogy részt vesznek az inflammatorikus szignalizációban. Megfigyelték, hogy a gliómasejtekben túlexpresszálódnak az NLRP12 és az NLRC4 inflammaszóma-függő gének és fehérjék is, melyet összefüggésbe hoztak a rosszindulatú daganat kialakulásával és rossz prognózisával (Rolim és mtsai., 2022). Emellett más csoportok mikrogliákban is magas IL-1 β szekréciót mutattak ki, melyért az NLRP1 inflammaszóma tehető felelőssé, így segítve a tumorsejtek proliferációját az agyban (Liu és mtsai., 2021). Továbbá, a tüdőrák eredetű agyi metasztázisok xenograf modelljében azt találták, hogy az Nlrp3 és az Il1 β gének transzkripciója upregulálódik a tumor-asszociált makrofágokban, amiből szintén inflammaszóma aktivációra következtethetünk (Schulz és mtsai., 2020). Kísérleteinkből azonban úgy tűnik, hogy

emlőkarcinóma agyi metasztázisok esetén az asztrocita a fő sejttípus, amelyben az inflammaszómák aktiválódnak és az IL-1 β képződik.

In vivo egérmodellünkben fiziológias körülmények között az IL-1 β gyakorlatilag detektálhatatlan mennyiségben volt jelen a neokortexben. A tumorsejtek extravazációját követően azonban az IL-1 β expressziójának mértéke látványosan megnőtt az asztrocitákban. Megfigyeltük, hogy az immunfluoreszcens festéssel detektált IL-1 β mennyisége függött a transzmigráció óta eltelt időtől és a tumoros lézió nagyságától. Mindez arra enged következtetni, hogy a metasztázisképzés során a tumorsejtek és az asztrociták között kétirányú kommunikáció megy végbe. Ezt igazolja, hogy a jelen dolgozatban be nem mutatott *in vitro* eredményeink szerint a tumorsejtek által aktivált asztrociták által szekretált szolubilis faktorok serkentik a tumorsejtek proliferációját.

Habár ezek a tumorsejtek által felszabadított faktorok, melyek asztrocitákban NLRP3 inflammaszóma aktivációt indukálnak, még nem kerültek meghatározásra, sok molekula lehet felelős ezért a jelenségért. Többek között a TGF- β , több szolubilis glikoprotein, mint például a CD44 és a Wnt ligandok, illetve az elpusztult tumorsejtekből felszabaduló extracelluláris ATP (Jang és mtsai., 2021). Azért, hogy az NLRP3 inflammaszóma kizárólagos szerepét bizonyítsuk, a jelen dolgozatban be nem mutatott *in vitro* modellünkben egy specifikus NLRP3 inflammaszóma inhibitor, MCC950-et alkalmaztunk, mely a tumorsejtek proliferációs rátáját a kontrollcsoport szintjére csökkentette, így más inflammaszóma típusok szerepe is kizárható. Továbbá a specifikus, neutralizáló anti-IL-1 β antitest szintén megakadályozta a tumorsejtek túlzott szaporodását. Habár az IL-1 β inflammaszóma független módon is szekretálódhat (Mullard, 2019), az MCC950-nel végzett NLRP3 inflammaszóma inhibíció és az IL-1 β specifikus antitesttel végzett neutralizáció eredményei egybevágnak, mely megerősíti az NLRP3 inflammaszóma citokin-termelő szerepét ebben a folyamatban.

Legfontosabb eredményünk, hogy *in vivo* egérmodellben MCC950 inflammaszóma inhibitor kezelés hatására szignifikánsan csökkent a tripla negatív emlőkarcinóma-eredetű agyi metasztázisok mérete a kísérleti állatok agyában. Ez felveti a lehetőségét specifikus NLRP3 inflammaszóma inhibitorok használatának a tripla negatív emlőkarcinóma-eredetű agyi metasztázisok kezelésében. Mivel az NLRP3 inflammaszóma aktivációja számos központi idegrendszeri és perifériás betegségben szerepet játszik, az utóbbi években nagy hangsúlyt kapott az NLRP3 inflammaszóma inhibitorok fejlesztése. Az MCC950 volt az elsőként kifejlesztett kismolekulájú inhibitor, mely specifikusan és potensen blokkolja az NLRP3 ATP-hidrolízis motívumát. A molekula másik nagy előnye, hogy képes átjutni a vér-agy gáton, mely

a legfontosabb leküzdendő akadályt jelenti a központi idegrendszert célzó gyógyszermolekuláknak (Coll és mtsai., 2015). Bár az MCC950 a klinikai tesztelések második fázisán potenciális májtoxicitást okozó mellékhatása miatt nem jutott túl (Mullard, 2019), számos cég fejleszt és tesztel jelenleg is MCC950 analógokat; strukturálisan különböző, de NLRP3-at célzó molekulákat; illetve szélesebb körben használatos inflammaszóma inhibitorokat, melyek közül sok elérte a klinikai tesztelések fázisát (El-Sharkawy és mtsai., 2020). Egy ilyen, inflammaszóma inhibitor fejlesztő gyógyszercég, a *ZyVersa Therapeutics* nemrég felfigyelt a jelen dolgozat alapját képező publikációnkra, melyet honlapján is szerepeltetett (<https://www.globenewswire.com/news-release/2024/01/17/2810625/0/en/ZyVersa-Therapeutics-Highlights-Peer-Reviewed-Article-Linking-Inflammasome-Activation-to-Triple-Negative-Breast-Cancer-Brain-Metastasis.html>).

Összefoglalva, emlőkarcinóma-eredetű agyi metasztázisokban a peritumorális asztrocitákban aktiválódik az NLRP3 inflammaszóma, melynek hatására aktivált IL-1 β keletkezik. Ez a gyulladásos ciktokin tumornövekedést serkentő hatással bír, melyet *in vivo* és *in vitro* modellben is igazoltunk. Az NLRP3 inflammaszóma specifikus gátlásának hatására a kísérleti állatok agyában szignifikánsan kisebb és kevesebb tumor volt megfigyelhető. Az MCC950 nem egy potenciálisan forgalomba kerülő vagy már széles körben használt farmakon, ezért eredményeink nehezebben transzlálhatók a klinikumba, azonban a jelenleg is fejlesztés alatt álló gyógyszermolekulák közül nagy eséllyel kikerülhet olyan, hasonló pozitív tulajdonságokkal rendelkező, a vér-agy gáton átjutni képes molekula, mely a jövőben használható lehet az agyi metasztázisok kezelésére.

A jelen dolgozatban bemutatott eredmények publikálásra kerültek az *Acta Neuropathologica Communications* folyóiratban (Mészáros Á, Molnár K, Fazakas C, Nógrádi B, Lüvi A, Dudás T, Tiszlavicz L, Farkas AE, Krizbai IA, Wilhelm I. Inflammasome activation in peritumoral astrocytes is a key player in breast cancer brain metastasis development. *Acta Neuropathol Commun.* 11:155 (2023). doi: 10.1186/s40478-023-01646-2).

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretném hálámat kifejezni mentoromnak, Dr. Wilhelm Imolának, amiért az utóbbi három évben bármikor fordulhattam hozzá kérdésekkel. Lelkiismeretesen követte szakmai fejlődésemet, nagy gondot fordított a tudományos szemléletmódom kialakítására és óvó tekintete alatt elkészült ez a dolgozat. Nagy köszöntettel tartozom Dr. Mészáros-Molnár Kingának, aki hatalmas türelemmel és kedvességgel tanította meg mindazon labortechnikákat, melyeket munkám során használtam; figyelemmel követte munkámat, amikor szükség volt rá, és ellátott rengeteg jótanáccsal. Hálás vagyok Dr. Fazakas Csillának, akitől szintén sok praktikus technikát sajátítottam el és bátran fordulhattam hozzá tanácsért. Köszönöm Mészáros Ádámnak, aki a jelen dolgozat alapjául szolgáló cikk első szerzője, hogy dolgozhattam a projektjén, miközben tőle is sokat tanultam. Hálás vagyok Dr. Krizbai Istvánnak, hogy csatlakozhattam kutatócsoportjához. Köszönöm a Neurovaszkuláris Egység Kutatócsoport minden tagjának, hogy befogadtak és támogattak.

Köszönöm a családomnak, hogy mindig bátorítottak, hogy kövessem az álmaimat, még akkor is, ha azok az otthontól távolra vezettek.

7. Irodalomjegyzék

- Achrol, A. S., Rennert, R. C., Anders, C., Soffietti, R., Ahluwalia, M. S., Nayak, L., Peters, S., Arvold, N. D., Harsh, G. R., Steeg, P. S., & Chang, S. D. (2019). Brain metastases. In *Nature Reviews Disease Primers* (Köt. 5, Szám 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0055-y>
- Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B. G., Fitzgerald, K. A., Hornung, V., & Latz, E. (2009). Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *The Journal of Immunology*, 183(2), 787–791. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901363>
- Benarroch, E. E. (2013). Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology*, 81(12), 1079–1088. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a4a577>
- Chen, Q., Boire, A., Jin, X., Valiente, M., Er, E. E., Lopez-Soto, A., Jacob, L., Patwa, R., Shah, H., Xu, K., Cross, J. R., & Massague, J. (2016). Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature*, 533(7604), 493–498. <https://doi.org/10.1038/nature18268>
- Coll, R. C., Robertson, A. A. B., Chae, J. J., Higgins, S. C., Muñoz-Planillo, R., Inserra, M. C., Vetter, I., Dungan, L. S., Monks, B. G., Stutz, A., Croker, D. E., Butler, M. S., Haneklaus, M., Sutton, C. E., Núñez, G., Latz, E., Kastner, D. L., Mills, K. H., Masters, S. L., Schroder, K., Cooper, M. A., O'Neill, L. A. (2015). A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nature Medicine*, 21(3), 248–257. <https://doi.org/10.1038/nm.3806>
- Correale, J., & Villa, A. (2009). Cellular elements of the blood-brain barrier. In *Neurochemical Research* (Köt. 34, Szám 12, o. 2067–2077). <https://doi.org/10.1007/s11064-009-0081-y>
- Daneman, R. (2012). The blood-brain barrier in health and disease. *Annals of Neurology*, 72(5), 648–672. <https://doi.org/10.1002/ana.23648>
- Dhimolea, E. (2010). Canakinumab. *Landes Bioscience*, 2(1), 3–13. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.1.10328>
- Doron, H., Pukrop, T., & Erez, N. (2019). A Blazing Landscape: Neuroinflammation Shapes Brain Metastasis. In *Cancer Research* (Köt. 79, Szám 3, o. 423–436). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1805>
- El-Sharkawy, L. Y., Brough, D., & Freeman, S. (2020). Inhibiting the NLRP3 Inflammasome. *Molecules*, 25(23). <https://doi.org/10.3390/molecules25235533>
- Fares, J., Cordero, A., Kanojia, D., & Lesniak, M. S. (2021). The network of cytokines in brain metastases. In *Cancers* (Köt. 13, Szám 1, o. 1–17). <https://doi.org/10.3390/cancers13010142>
- Foulkes, W. D., Smith, I. E., & Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-Negative Breast Cancer. In *N Engl J Med* (Köt. 363). <https://doi.org/10.1056/NEJMra1001389>
- Gong, X., Hou, Z., Endsley, M. P., Gronseth, E. I., Rarick, K. R., Jorns, J. M., Yang, Q., Du, Z., Yan, K., Bordas, M. L., Gershon, J., Deepak, P., Geethadevi, A., Chaluvally-Raghavan, P., Fan, Y., Harder, D. R., Ramchandran, R., & Wang, L. (2019). Interaction of tumor cells and astrocytes promotes breast cancer brain metastases through TGF- β 2/ANGPTL4 axes. *npj Precision Oncology*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s41698-019-0094-1>

- Haskó, J., Fazakas, C., Molnár, K., Mészáros, Á., Patai, R., Szabó, G., Erdélyi, F., Nyúl-Tóth, Á., Győri, F., Kozma, M., Farkas, A. E., Krizbai, I. A., & Wilhelm, I. (2019). Response of the neurovascular unit to brain metastatic breast cancer cells. *Acta neuropathologica communications*, 7(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0788-1>
- Hawkins, B. T., & Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. In *Pharmacological Reviews* (Köt. 57, Szám 2, o. 173–185). <https://doi.org/10.1124/pr.57.2.4>
- Herman, H., Fazakas, C., Haskó, J., Molnár, K., Mészáros, Á., Nyúl-Tóth, Á., Szabó, G., Erdélyi, F., Ardelean, A., Hermenean, A., Krizbai, I. A., & Wilhelm, I. (2019). Paracellular and transcellular migration of metastatic cells through the cerebral endothelium. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(4), 2619–2631. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14156>
- Jang, J. H., Kim, D. H., & Surh, Y. J. (2021). Dynamic roles of inflammasomes in inflammatory tumor microenvironment. In *npj Precision Oncology* (Köt. 5, Szám 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41698-021-00154-7>
- Jin, J., Gao, Y., Zhang, J., Wang, L., Wang, B., Cao, J., Shao, Z., & Wang, Z. (2018). Incidence, pattern and prognosis of brain metastases in patients with metastatic triple negative breast cancer. *BMC Cancer*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4371-0>
- Keaney, J., & Campbell, M. (2015). The dynamic blood-brain barrier. *FEBS Journal*, 282(21), 4067–4079. <https://doi.org/10.1111/febs.13412>
- Laliberte, R. E., Perregaux, D. G., Hoth, L. R., Rosner, P. J., Jordan, C. K., Peese, K. M., Egglar, J. F., Dombroski, M. A., Geoghegan, K. F., & Gabel, C. A. (2003). Glutathione S-transferase omega 1-1 is a target of cytokine release inhibitory drugs and may be responsible for their effect on interleukin-1 β posttranslational processing. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 16567–16578. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211596200>
- Leone, J. P., & Leone, B. A. (2015). Breast cancer brain metastases: The last frontier. In *Experimental Hematology and Oncology* (Köt. 4, Szám 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40164-015-0028-8>
- Liu, H., Sun, Y., Zhang, Q., Jin, W., Gordon, R. E., Zhang, Y., Wang, J., Sun, C., Wang, Z. J., Qi, X., Zhang, J., Huang, B., Gui, Q., Yuan, H., Chen, L., Ma, X., Fang, C., Liu, Y. qiang, Yu, X., & Feng, S. (2021). Pro-inflammatory and proliferative microglia drive progression of glioblastoma. *Cell Reports*, 36(11). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109718>
- Mikitsh, J. L., & Chacko, A. M. (2014). Pathways for small molecule delivery to the central nervous system across the blood-brain barrier. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 6, 11–24. <https://doi.org/10.4137/PMc.s13384>
- Molnár, K., Mészáros, Á., Fazakas, C., Kozma, M., Győri, F., Reisz, Z., Tiszlavicz, L., Farkas, A. E., Nyúl-Tóth, Á., Haskó, J., Krizbai, I. A., & Wilhelm, I. (2020). Pericyte-secreted IGF2 promotes breast cancer brain metastasis formation. *Molecular Oncology*, 14(9), 2040–2057. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12752>
- Mullard, A. (2019). NLRP3 inhibitors stoke anti-inflammatory ambitions. *Nature Reviews | Drug Discovery*, 18, 405–407. <https://doi.org/10.1038/d41573-019-00086-9>
- Muoio, V., Persson, P. B., & Sendeski, M. M. (2014). The neurovascular unit - concept review. In *Acta Physiologica* (Köt. 210, Szám 4, o. 790–798). <https://doi.org/10.1111/apha.12250>

- Nagar, A., Bharadwaj, R., Shaikh, M. O. F., & Roy, A. (2023). What are NLRP3-ASC specks? an experimental progress of 22 years of inflammasome research. In *Frontiers in Immunology* (Köt. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1188864>
- Reed, M. J., Damodarasamy, M., & Banks, W. A. (2019). The extracellular matrix of the blood–brain barrier: structural and functional roles in health, aging, and Alzheimer’s disease. In *Tissue Barriers* (Köt. 7, Szám 4). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21688370.2019.1651157>
- Rolim, G. B., Dantas Lima, A. J. P., dos Santos Cardoso, V. I., de Fátima Machado Soares, É., Nunes, D. N., Barros, H. C. S., Leite, A. B., Alexandre-Moreira, M. S., Duarte, A. W. F., de Sales Marques, C., de Carvalho Fraga, C. A., & de Queiroz, A. C. (2022). Can inflammasomes promote the pathophysiology of glioblastoma multiforme? A view about the potential of the anti-inflammasome therapy as pharmacological target. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Köt. 172). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103641>
- Schartner, J. M., Hagar, A. R., Van Handel, M., Zhang, L., Nadkarni, N., & Badie, B. (2005). Impaired capacity for upregulation of MHC class II in tumor-associated microglia. *GLIA*, 51(4), 279–285. <https://doi.org/10.1002/glia.20201>
- Schulz, M., Michels, B., Niesel, K., Stein, S., Farin, H., Rödel, F., & Sevenich, L. (2020). Cellular and Molecular Changes of Brain Metastases-Associated Myeloid Cells during Disease Progression and Therapeutic Response. *iScience*, 23(6). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101178>
- Seike, T., Fujita, K., Yamakawa, Y., Kido, M. A., Takiguchi, S., Teramoto, N., Iguchi, H., & Noda, M. (2011). Interaction between lung cancer cells and astrocytes via specific inflammatory cytokines in the microenvironment of brain metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis*, 28(1), 13–25. <https://doi.org/10.1007/s10585-010-9354-8>
- Simsek, M., Aliyev, A., Baydas, T., Besiroglu, M., Demir, T., Shbair, A. T. M., Seker, M., & Turk, H. M. (2022). Breast Cancer Patients with Brain Metastases: A Cross-Sectional Study. *Breast Journal*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5763810>
- Soto, M. S., Serres, S., Anthony, D. C., & Sibson, N. R. (2014). Functional role of endothelial adhesion molecules in the early stages of brain metastasis. *Neuro-Oncology*, 16(4), 540–551. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not222>
- Swanson, K. V., Deng, M., & Ting, J. P. Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. In *Nature Reviews Immunology* (Köt. 19, Szám 8, o. 477–489). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>
- Valiente, M., Obenaus, A. C., Jin, X., Chen, Q., Zhang, X. H. F., Lee, D. J., Chaff, J. E., Kris, M. G., Huse, J. T., Brogi, E., & Massagué, J. (2014). Serpins promote cancer cell survival and vascular Co-option in brain metastasis. *Cell*, 156(5), 1002–1016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.040>
- Von Tell, D., Armulik, A., & Betsholtz, C. (2006). Pericytes and vascular stability. In *Experimental Cell Research* (Köt. 312, Szám 5, o. 623–629). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.10.019>
- Wagh, J., Perry, C. M. (2005). Anakinra: A Review of its Use in the Management of Rheumatoid Arthritis. *Biodrugs*, 19(3), 189–202. <https://doi.org/10.2165/00063030-200519030-00005>
- Wilhelm, I., Fazakas, C., & Krizbai, I. A. (2011). In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 71, 113–128. <https://doi.org/10.55782/ane-2011-1828>

- Wilhelm, I., Fazakas, C., Molnár, K., Végh, A. G., Haskó, J., & Krizbai, I. A. (2018). Foe or friend? Janus-faces of the neurovascular unit in the formation of brain metastases. In *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (Köt. 38, Szám 4, o. 563–587). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/0271678X17732025>
- Wilhelm, I., Molnár, J., Fazakas, C., Haskó, J., & Krizbai, I. A. (2013). Role of the blood-brain barrier in the formation of brain metastases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Köt. 14, Szám 1, o. 1383–1411). <https://doi.org/10.3390/ijms14011383>
- Winkler, E. A., Birk, H., Burkhardt, J. K., Chen, X., Yue, J. K., Guo, D., Caleb Rutledge, W., Lasker, G. F., Partow, C., Tihan, T., Chang, E. F., Su, H., Kim, H., Walcott, B. P., & Lawton, M. T. (2018). Reductions in brain pericytes are associated with arteriovenous malformation vascular instability. *Journal of Neurosurgery*, 129(6), 1464–1474. <https://doi.org/10.3171/2017.6.JNS17860>
- Wrobel, J. K., & Toborek, M. (2016). Blood–brain barrier remodeling during brain metastasis formation. In *Molecular Medicine* (Köt. 22, o. 32–40). University of Michigan. <https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00207>
- Wu, S.-Y., & Watabe, K. (2017). The roles of microglia/macrophages in tumor progression of brain cancer and metastatic disease. *Frontiers in Bioscience*, 22, 1805–1829. <https://doi.org/10.2741/4573>
- Xing, F., Kobayashi, A., Okuda, H., Watabe, M., Pai, S. K., Pandey, P. R., Hirota, S., Wilber, A., Mo, Y. Y., Moore, B. E., Liu, W., Fukuda, K., Iizumi, M., Sharma, S., Liu, Y., Wu, K., Peralta, E., & Watabe, K. (2013). Reactive astrocytes promote the metastatic growth of breast cancer stem-like cells by activating Notch signalling in brain. *EMBO Molecular Medicine*, 5(3), 384–396. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201623>
- Zhao, H., Wu, L., Yan, G., Chen, Y., Zhou, M., Wu, Y., & Li, Y. (2021). Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Köt. 6, Szám 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00658-5>

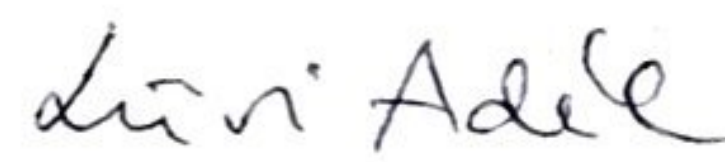
**A 37. OTDK
BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK
2. SZÁMÚ MELLÉKLETE**

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Lüvi Adél** nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott **Az asztrociták által aktivált NLRP3 inflammaszóma fokozza a metasztatikus sejtek szaporodását az agyban** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat ^{1*}	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán [#] jellemezve)
<i>4T1-tdT sejtek tenyésztése</i>	4
<i>Kísérleti állatok transzkardiális perfúziója</i>	2
<i>Metszetkészítés fagyasztó mikrotómmal</i>	5
<i>Immunofluoreszcens festés</i>	5
<i>Mikroszkópos képalkotás</i>	2
<i>Western blot</i>	3

Kelt: Szeged, 2024. 04. 11.



Lüvi Adél
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Dr. Wilhelm Imola
(HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont)
aláírása