



STRATÉGIÁK KERESÉSE, MELYEK TÁMOGATJÁK A VÉR-AGY GÁTAT A BEHATOLÓ SEJTEKKEL SZEMBEN

A Ph.D. értekezés téziseinek összefoglalója

Haskó János

Témavezető: Dr. Krizbai István

A Vér-Agy Gát Élettana és Kórélettana Kutatócsoport
Molekuláris Neurobiológia Kutatóegység
Biofizikai Intézet

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
Általános Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2018

BEVEZETÉS

Az agy különböző gyulladós betegségei során nagyszámú fehérvérsejt jut be a vérkeringésből a központi idegrendszerbe, mely súlyos veszélyt jelent a megfelelő agyi működésre. A fehérvérsejteken kívül egyes daganatsejtek is képesek átjutni az agyi erekben, melyekből az agyban áttétek alakulnak ki. A tüdőben, emlőkben valamint a bőrben (melanóma) kialakuló elsődleges daganatok sejtjei adnak legnagyobb gyakorisággal agyi áttéteket, és az összes daganat közül a melanómasejteknek van a legnagyobb hajlama az agyi áttétképzésre. A melanóma agyi áttétjei igen rossz prognózist jelentenek, melyek a medián túlélést hozzávetőlegesen négy hónapra csökkentik.

Az agyi mikroerek által kialakított vér-agy gát (blood-brain barrier, BBB) biztosítja a központi idegrendszer (KIR) működéséhez szükséges tápanyagok bejutását passzív diffúzió és aktív transzportfolyamatok révén, valamint megakadályozza a sejtjes elemek és a káros anyagok, illetve a megfelelő idegi működést zavaró ionok bejutását az agyba. Ezen anyagok átjutásának szabályzásával a vér-agy gát kulcsszerepet játszik az agyi homeosztázis kialakításában és fenntartásában. A mikroerek falát alkotó endotélsejtek sajátos tulajdonságai teszik lehetővé az agyi erek gát funkcióját. Az endotélsejteken kívül a BBB magába foglalja az asztrocita végtalpakat, a pericitákat, a bazális laminát, továbbá szoros kapcsolatban áll az agyi idegsejtekkel és a mikrogliákkal. Ezek az erek körül elhelyezkedő sejtek és struktúrák hozzájárulnak a gát-tulajdonság fenntartásához és szabályzásához.

Mivel a KIR nem rendelkezik a klasszikus értelemben vett nyirokkeringéssel, a fehérvérsejteknek és az áttétet képző sejteknek az agyi vérereken, vagyis a BBB-n keresztül kell bejutniuk az agyi parenchimába. Az rákos sejtek agyi erekben keresztüli átvándorlása egy kevésbé feltárt folyamat a fehérvérsejtek diapedeziséhez képest. Feltehetően ez a két folyamat több hasonlóságot is mutat, ugyanakkor alapvető különbségek is vannak köztük.

Az agyi gyulladós folyamatok és az agyi áttétek kialakulása és lefolyása több összetett sejtjes és molekuláris mechanizmust is magába foglal. Úgy gyulladós megbetegedések, mint metasztatikus daganatok esetében a hatékony terápia feltétele, hogy a fehérvérsejtek vagy a daganatsejtek diapedezisének különböző lépései közül többet is gátolni

tudjon. Ilyen hatékony terápiás lehetőségeket kínálhatnak az újabb molekuláris biológiai ismeretek, valamint az utóbbi évtizedekben leírt, illetve előállított hatóanyagok. Ezek közül a kettes-típusú kannabinoid receptor (cannabinoid receptor 2, CB2) agonisták és a lignánok is ígéretes hatóanyagok lehetnek a fehérvérsejtek és a metasztatikus sejtek agyba történő bejutásának gátlásában.

A kannabinoid rendszer aktiválásának legfőképp a pszichoaktív hatása miatt ismert, habár leírták gyulladáscsökkentő és neuroprotektív hatását is. A kannabinoidok elsősorban két kannabinoid receptoron, a kannabinoid receptor 1-en (cannabinoid receptor 1, CB1) és a CB2-n keresztül fejtik ki hatásaikat. A pszichoaktív hatásért a CB1 aktiváció felelős, míg a CB2 aktivációja gyulladáscsökkentő hatással jár. Szelektív CB2 agonisták, mint például a JWH133 és az O1966 lehetőséget biztosítanak arra, hogy a CB2 aktivációjának hatását tanulmányozhassuk fiziológiás és patológiás körülmények között a CB1 aktiválásával járó pszichoaktív mellékhatás kiváltása nélkül. Fontos megemlíteni, hogy ezek a szelektív agonisták gyógyszerjelöltek több gyulladással járó betegség kezelésében is.

A lignánok polifenolos vegyületek, melyek a fitoösztrogének egyik fő csoportját alkotják. Ezek az anyagok széles körben megtalálhatók a különböző növényekben, és szerkezetükben hasonlóságot mutatnak a 17β -ösztradiol endogén hormonnal. Napjainkban igen nagy az érdeklődés a természetes eredetű hatóanyagok, például a lignánok iránt. Különböző lignánokról sikerült kimutatni, hogy gyulladáscsökkentő hatással rendelkeznek, többek között egyes agyi gyulladással járó betegségek esetében is. Állatmodellek alkalmazásával azt is kimutatták, hogy egyes lignánoknak lehetnek a tumornövekedést és az áttétek kialakulását gátló hatásai.

CÉLKITŰZÉSEK

A fehérvérsejtek vagy a tumorsejtek agyi endotéliumon keresztüli átjutása kulcsfontosságú lépés az agyi gyulladással járó folyamatok, illetve az agyi áttétek kialakulásában. Munkánk során a CB2 agonistáknak és a *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* növényből izolált lignánoknak a BBB működésére és a sejtek agyi endotéliumon keresztüli átjutására gyakorolt hatását vizsgáltuk. Kutatásaink során a következő célokat tűztük ki:

1. hogy megvizsgáljuk a CB és CB-szerű receptorok kifejeződését agyi endotélsejtekben és melanómasejtekben,
2. hogy *in vivo* és *in vitro* kísérleti modellek felhasználásával megvizsgáljuk a CB2 agonisták fehérvérsejt-endotélsejt interakcióra gyakorolt hatását,
3. hogy *in vivo* és *in vitro* megfigyeléseket végezzünk arra vonatkozóan, hogy a CB2 agonisták milyen hatással vannak az agyi endotélium gát funkciójára,
4. hogy megértsük, hogy milyen hatással van a CB2 aktiválás a melanómasejtek agyi endotéliumhoz való kitapadására és az azon keresztüli átvándorlására,
5. hogy meghatározzuk, hogy a *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* növényből izolált lignánok milyen hatást gyakorolnak a melanómasejtek agyi áttétképzésére és az agyi erek gát funkciójára.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejttenyésztés és kezelések

In vitro kísérleteinkhez a következő sejt kultúrákat használtuk: humán mikrovaszkuláris agyi endotélsejtek (hCMEC/D3; rövidítve: D3), A2058 humán melanóma sejt vonal, elsődleges humán agyi mikrovaszkuláris endotélsejtek (brain microvascular endothelial cells, BMVECs) tenyésztete, elsődleges humán monociták tenyésztete, elsődleges patkány endotélsejtek tenyésztete (rat brain endothelial cells, RBECs).

A specifikus CB2 agonisták közül a JWH133 (Tocris) és az O1966 (Organic) szereket használtuk kísérleteinkhez. A *H. helianthoides* var. *scabra* növényből izolált lignánokat együttműködés keretében Hajdú Zsanettől és munkatársaitól kaptuk (Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertudományi Kar, Farmakognóziai Intézet).

Reverz transzkripcióval kapcsolt polimeráz láncreakció (RT-PCR)

A teljes RNS-t TRIzol reagens (Life Technologies) alkalmazásával izoláltuk. Az RNS-t SuperScript III reverz transzkriptáz kit (Life Technologies) segítségével írtuk át cDNS-sé. A cDNS amplifikáció BioRad iQ5 készülék segítségével, Maxima SYBR Green Mix

(Fermentas) használatával történt. A PCR termékeket etidium-bromidot tartalmazó, 1,5% agaróz gélen elektroforézissel választottuk el.

Immunfluoreszcens festések és aktin jelölés

BMVEC sejtek konfluens rétegén a CB2 és a ZO-1 fehérjék expresszióját vizsgáltuk immunfluoreszcens festéssel. Anti-ZO-1 (1:25; Invitrogen) és anti-CB2 (1:100; Thermo Scientific) poliklonális antitestek oldatában a mintákat 24 órán keresztül inkubáltuk. Az Alexa-488-cal konjugált anti-nyúl és az Alexa-594-gyel konjugált kecskében termelt anti-egér (Invitrogen) másodlagos antitesteket 1:400 hígításban használtuk 1 órán keresztül.

A lignán kezelések hatását D3 és RBEC sejtek konfluens tenyészetein vizsgáltuk immunhisztokémiával. A mintákat a fixálást követően elsődleges nyúl anti-ZO-1 poliklonális (Invitrogen) ellenanyaggal festettük 24 órán keresztül. A festéseket Cy3-kapcsolt kecske anti-nyúl antitesttel (Jackson ImmunoResearch Laboratories) tettük láthatóvá.

A Hel-6 vagy Hel-11 kezelést követően az A2058 melanómasejteket Alexa488-phalloidinnel festettük (Invitrogen).

A monocita adhézió vizsgálata BMVEC sejtek tenyészetén

A BMVEC tenyészetek konfluens rétegét CB2 agonistákkal és gyulladáshoz vezető faktorokkal kezeltük. A kezeléseket tartalmazó médiumot eltávolítottuk, majd a 24 lyukú plate-ben tenyésztett endotélsejtekre lyukanként $2,5 \times 10^5$ fluorszcensen jelölt monocitát tartalmazó sejtuszpenziót helyeztünk. A sejteket együtt inkubáltuk 15 percen keresztül, majd az endotéliumot háromszor mostuk PBS-sel, hogy eltávolítsuk a nem letapadt monocitákat. Végül megmértük a letapadt monociták fluoreszcenciáját.

A melanóma sejtek adhéziójának vizsgálata D3 sejtek tenyészetén

A 24 lyukú plate-ben tenyésztett D3 sejtek konfluens rétegét, illetve az A2058 melanómasejtek tenyészetét 4 órán át kezeltük elő CB2 agonistákkal. 10^5 fluorszcensen megjelölt melanómasejtet helyeztünk lyukanként endotélsejtek rétegére, és inkubáltuk őket 90 percet. Ezt követően az endotélsejtek rétegét megmostuk, és fixáltuk, majd

megszámoltuk az endotélsejtekhez letapadt fluoreszcensen jelölt melanómasejteket.

Transzmigrációs kísérletek

A 8 μm átmérőjű pórusokkal rendelkező inszerten tenyésztett RBEC sejtek konfluens rétegét CB2 agonistával kezeltük elő, majd az azonos módon előkezelt melanómasejtek szuszpenzióját helyeztük az endotélsejt tenyészetre. A tenyészeteket 5 óra múlva fixáltuk, majd az inszert felső oldaláról letöröltük a sejteket, és megszámláltuk az inszerten átvándorolt sejteket.

Sebgyógyulási assay

A D3, illetve A2058 sejtek konfluens rétegről pipettaheggyel sávokban lekapartuk a sejteket ("seb"). Ezután fáziskontraszt-mikroszkóppal 24 órán át követtük a sejtek vándorlását a sejtmentes sávokba. A vándorló sejteket 5 lekapart sáv területén számoltuk meg, majd ezek átlagát hasonlítottuk össze.

Intravitális mikroszkópia

Kifejlett C57BL/6 egerek koponyájának jobb oldali parietális részének egy részét műtéti úton megnyitottuk, és koponyaablakot helyeztünk fel. A koponyaablakon keresztül a fehérvérsejtek adhézióját és az agyi erek permeabilitását vizsgáltuk. A felszíni piális erekben tett megfigyeléseinket a Stereo Discovery V20 epifluorescence microscope (Carl Zeiss Microimaging) segítségével végeztük. Mély szöveti képalkotás során a Leica TCS SP5 II MP multifoton mikroszkópot használtuk. Az egereket a koponyaműtétet, illetve a mikroszkópiás megfigyelést megelőzően intraperitoneális injekcióval altattuk [ketamin (100 mg/ml, i.p.) és xylazin (20 mg/ml, i.p.) 1 ml/kg dózisban beadott keverékével]. 50 μl 0,01% rodamin 6G (Sigma-Aldrich) oldatát intravénásan injektáltuk az állatokba, mellyel fehérvérsejtjeiket festettük meg in vivo. Az agyi ereket 40 kDa-os fluoreszcein-kapcsolt dextrán intravénás bejuttatásával tettük láthatóvá. Ugyanezen festék erekből történő kiszivárgását vizsgáltuk intravitális permeabilitási kísérleteink során. Epifluoreszcens mikroszkópiás vizsgálataink során a vénák falára kitapadt fehérvérsejteket standardizált átmérőjű (20-30 μm) és hosszúságú (100 μm) erekben számoltuk, és 1 mm^2 érfelszínre átlagoltuk. Multifoton mikroszkópia során a kitapadt fehérvérsejteket véletlenszerűen

kiválasztott postkapilláris venulákban (20-30 μm átmérőjű, az agyfelszín alatt 600 μm mélységi terjedő területen) kvantifikáltuk.

Western blot

Western blot kísérleteinkhez alacsony passzázs számú BMVEC sejteket használtunk, melyekből a ProteoExtract kit (EMD Chemicals) segítségével izoláltunk fehérjét. A fehérjéket SDS-PAGE 4–20% precast gradiens gélen (Thermo Scientific) választottuk el, majd nitrocellulóz membránra transzferáltuk, és 16-18 órán keresztül inkubáltuk a következő poliklóánlis antitestekkel: anti-CB2 (1:1000; Cayman Chemicals), anti-occludin (1:500; Invitrogen), anti-claudin-5 (1:300; Invitrogen) és anti-Na/K ATPáz (1:1000; Abcam). A membránokat HRP-kapcsolt másodlagos antitesttel (Thermo Scientific) 1 órán keresztül inkubáltuk. A detektáláshoz Supersignal West Pico chemiluminescence szubsztrátot (Thermo Scientific) használtunk.

Transzendoteliális elektromos rezisztencia (TEER) mérése

A BMVEC sejtek által alkotott réteg integritásának kvantifikálásához TEER mérést végeztünk 1600R electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) rendszer (Applied Biophysics) használatával. A készülék 30 percenként végzett méréseket 24 vagy 36 órán keresztül.

Az RBEC konfluens tenyészetek TEER méréséhez CellZscope készüléket (nanoAnalytics) használtunk. Amint a TEER értékek elérték a plató értéket, az endotélsejteket Hel-6 (5 μM), illetve Hel-11 (5 μM) lignánokkal kezeltük, majd ezt követően a TEER változásait 2 órán keresztül követtük.

BBB permeabilitás mérése ex vivo

A BBB permeabilitás változásait nátrium fluorescein (sodium fluorescein, SF) érből való kiáramlásának nyomonkövetésével végeztük. A kísérleti állatokba intravénásan 50 μl , PBS-ben oldott 2%-os SF-t juttattunk be. A festékanyagot 30 percig hagytuk keringeni az állatok vérében. Ezután az állatokat PBS-sel transzkardiálisan perfundáltuk, majd az agyszövet gyors kivételét követően homogenizáltuk azt 10-szeres térfogatú 50%-os triklórecetsavban. A homogenizátumot centrifugáltuk, majd megmértük a felülúszóban található SF fluoreszcenciáját.

EREDMÉNYEK

A kannabinoid és kannabinoid-szerű receptorok expressziója agyi endotélsejtekben és melanómasejtekben

Első lépésként a CB2 expresszióját vizsgáltuk meg agyi endotélsejtekben. Ehhez a CB2 és a ZO-1 fehérjék immunfluoreszcens festését végeztük el konfluens BMVEC tenyészeteken. A ZO-1 fehérjét az endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok (tight junction, TJ) markereként használtuk, melyek jelenléte elengedhetetlen az endotélium gátfunkciójához. A BMVEC sejtekben a CB2 mérsékelt expressziója volt megfigyelhető, míg a ZO-1 erős jelet adott az endotélsejtek határán.

Mivel a BBB fontos szerepet játszik az agyi gyulladásokban, továbbá a CB2 aktiválása általános gyulladáscsökkentő hatású, megvizsgáltuk, hogy hogyan változik a CB2 kifejeződés az agyi endotéliumban gyulladással körülmények között. Western blot módszerrel megnéztük, hogy hogyan változik a CB2 fehérje relatív mennyisége különböző gyulladással kezelt BMVEC sejtek membránfrakciójában. Eredményeink azt mutatják, hogy a gyulladással citokinek (IL1 β , TNF α) és az LPS növelik a CB2 expresszióját BMVEC sejtekben.

Következő lépésként megfigyeltük a különböző kannabinoid és kannabinoid-szerű receptorok jelenlétét agyi endotélsejtekben és melanómasejtekben RT-PCR alkalmazásával. Kimutattuk, hogy a D3 humán agyi endotélsejtek és az A2058 humán melanómasejtek a CB2 fehérje CB2A transzkripciós variánsát kifejezik, viszont a CB2B variáns nem. Azt találtuk, hogy az RBEC sejtek a patkány CB2 fehérje 1-es és 2-es transzkripciós variánsát fejezik ki. A D3 sejtek expresszálják még a CB1, valamint a GPR18 és GPR55 fehérjék mRNS-ét, viszont a GPR119 fehérje mRNS-e nem volt jelen ebben a sejtvonalban. Kimutattuk továbbá a CB1, a GPR118, a GPR55 és a GPR119 fehérjék mRNS-ének jelenlétét A2058 melanómasejtekben.

A CB2 aktiváció hatása a fehérvérsejt-agyi endotélsejt kölcsönhatásra és a BBB diszfunkcióra gyulladásoz körülmények között

A CB2 aktiváció mérsékli a fehérvérsejtek adhézióját a piális erek falán

In vivo kísérleteinkben intravitális mikroszkópia alkalmazásával valós időben vizsgáltuk az agyi ereket érintő változásokat és az immunsejt-endotélsejt interakciókat. LPS intraperitoneális injektálásával szisztémás gyulladást és fokozott citokin termelést váltottunk ki az állatokban. Egyes, LPS-sel kezelt állatok egyidejűleg CB2 agonista (JWH133) kezelést is kaptak. 4 és 24 órával az LPS kezelést követően a piális erekre kitapadó fehérvérsejtek száma jelentősen megnőtt. Azokban az LPS-sel kezelt állatokban, melyek JWH133 kezelést is kaptak, 4 órával a kezelést követően 56%-kal, 24 órával a kezelést követően 65%-kal kevesebb kitapadt fehérvérsejt volt megfigyelhető a csak LPS-sel kezelt állatokhoz képest. A JWH133-hoz hasonlóan a rezorcin alapú O1966 CB2 agonista szintén szignifikánsan csökkentette a piális erek falán kitapadó fehérvérsejtek számát (50%-kal 4 órával, és 60%-kal 24 órával a kezelést követően).

A CB2 aktiváció csökkenti a fehérvérsejtek adhézióját a kortikális felszálló posztkapilláris venulákban

A hagyományos fluoreszcens mikroszkópia csak a felszíni erek vizsgálatára alkalmas, viszont a mély szöveti területek intravitális megfigyelésére a két-foton mikroszkópia nyújt lehetőséget. Ezért az idegszövet belsejében futó erek vizsgálatára ezt a módszert használtuk. Kísérleteink során egyidejű képfelvétel történt a rhodamine 6G-vel jelölt immunsejtekről és a nagy molekulású FITC-dextránnal kitöltött kortikális erekről. A parenchimális vénák esetében a felszíni ereknél kimutatottakhoz hasonló tendenciát figyeltünk meg: az LPS nagyszámú immunsejt-endotélsejt interakciót váltott ki, melyet a JWH133 vagy az O1966 CB2 agonisták jelenléte szignifikánsan csökkentett.

Az endoteliális CB2 aktiváció csökkenti a monociták kitapadását az agyi endotéliumon

A következő kísérletsorozatban megvizsgáltuk az endotélsejt-specifikus CB2 aktiválás hatását a leukociták kitapadására. Konfluens BMVEC tenyészeteket stimuláltunk TNF α -val, majd 4 órával később

ugyanezeket az endotélsejteket JWH133 vagy O1966 CB2 agonistákkal kezeltük. A kezelést tartalmazó médiumot eltávolítottuk, majd humán monocitákat helyeztünk az endoteliális rétegre. Az adhéziós tesztek eredménye igazolta, hogy az agyi endotélsejtek CB2 aktiválása elősegíti az immunsejtek adhéziójának megelőzését. Emellett megfigyeltük, hogy a CB2 agonisták fehérvérsejtek letapadására gyakorolt gátló hatása dóziszfüggő.

A CB2 agonisták javítják a BBB működését in vivo és in vitro

Az LPS kezelés a BBB akut megnyílását idézte elő, melynek kialakulását a gyulladásos mediátorok és az aktivált fehérvérsejtek tovább fokozták. Az állatokat LPS-sel kezeltük, és egyesek O1966 kezelést is kaptak. A FITC-jelölt dextrans agyi erekből való kiszivárgását intravitális mikroszkóppal vizsgáltuk, valamint ex vivo permeabilitási vizsgálatokat is végeztünk. A kezelést megelőzően nem volt megfigyelhető a FITC-dextrans agyi erekből történő kiszivárgása, és csak kis mennyiségű SF volt detektálható a nem kezelt állatok agyi homogenátumában. Ezzel szemben 4 órával az LPS injekciót követően az agyi erek permeabilitása jelentősen megnőtt. O1966 jelenlétében az LPS-sel kezelt állatok érfestése tisztább maradt és kevesebb SF volt detektálható az agyszövetben a csak LPS-sel kezelt egyedekhez képest. Ennek oka az volt, hogy jóval kevesebb dextrans diffundált ki az erekből utalva arra, hogy a CB2 aktiválás BBB protektív hatású.

A BBB integritás változásának in vitro vizsgálata TEER méréssel történt. A BMVEC rétegek rezisztenciája LPS hatására gyorsan lecsökkent (a kontroll 80%-ára), mely rezisztencia esés mérséklődött O1966 jelenlétében. Az in vivo munkánk során megfigyeltékhez hasonlóan in vitro eredményeink is arra utalnak, hogy a CB2 segíti, védi a BBB működését gyulladásos körülmények között.

A következő kísérleteink során azt terveztük megvizsgálni, hogy a CB2 aktiválás növeli-e a gátfunkciót, a strukturális integritást fiziológias körülmények között. Mind a két szelektív CB2 agonista alkalmazása (O1966, JWH133) a BMVEC sejtréteg elektromos ellenállásának fokozódását (11-15%-kal) eredményezte. Habár többféle szignalizációs mechanizmus befolyásolhatja a BBB integritását, az endotélsejtek közötti TJ fehérjék szerepe vitathatatlan a BBB szorosságának, ellenállásának biztosításában. Ezért megvizsgáltuk TJ fehérjék mennyiségét a CB2

agonistákkal kezelt BMVEC sejtek membránfrakciójában. 4 órával a CB2 kezelés megkezdését követően O1966 és JWH133 hatására 2,2-2,7-szeresére növekedett az occludin és a claudin-5 mennyisége a nem kezelt sejtekhez képest.

A CB2 aktiváció hatása a melanómasejtek és agyi endotélsejtek kölcsönhatására

Mivel a CB2 aktivációja csökkentette a fehérvérsejtek kitapadását, megvizsgáltuk, hogy hasonló hatás észlelhető-e a tumorsejtek és az agyi endotélsejtek kölcsönhatása esetén.

A CB2 aktiváció csökkenti a melanómasejtek agyi endotéliumhoz történő kitapadását

Hogy megértsük a CB2 szerepét a tumorsejtek áttétképzésében, megvizsgáltuk, hogy a JWH133 által kiváltott CB2 aktiváció hatással van-e a melanómasejtek agyi endotéliumhoz történő kitapadására. Az agyi endotélsejtek (D3) vagy a melanómasejtek (A2058) kezelése nem volt hatással az endotéliumon kitapadó melanómasejtek számára. Ugyanakkor az endotélsejtek és melanómasejtek 4 órás előkezelése, majd az azt követő adhéziós teszt közbeni kezelés JWH133-mal csökkentette a kitapadó melanómasejtek számát a nem kezelt kontrollhoz képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy mindkét sejtípus (endotél és melanóma) CB2 aktiválása szükséges a JWH133 által kiváltott adhézió gátláshoz.

A CB2 agonisták csökkentik a melanómasejtek agyi endotéliumon keresztüli átvándorlását

A következő kísérleteink célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a CB2 aktiváció hatással van-e a melanómasejtek transzendoteliális migrációjára. Transzmigrációs kísérleteinkhez elsődleges RBEC tenyészeteket és A2058 humán melanómasejteket használtunk. A JWH133-mal előkezelt endotélsejteken keresztül kevesebb melanómasejt jutott át a nem kezelt kontrollhoz képest. Ez a hatás még kifejezettebb volt, mikor mindkét sejtípust előkezeltük és a transzmigráció közben is jelen volt a CB2 agonista.

vizsgálatára. Vizsgálataink során azt figyeltük meg, hogy mindkét lignán csökkentette az A2058 sejtek migrációját.

A Hel-6 gátolja a melanómasejtek agyi endotéliumhoz történő kitapadását

A következőkben az izolált vegyületeknek a melanómasejtek endoteliális kitapadására gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Ehhez D3 humán agyi endotélsejteket és A2058 humán melanómasejteket kezeltünk elő 3 órán keresztül a hat vizsgált lignánnal, és a sejtek az adhéziós teszt közben is kapták a kezeléseket. A Hel-6 (2 μM) kezelés gátolta a melanómasejtek kitapadását az endotéliumon, ugyanakkor a többi lignán nem volt hatással a kitapadásra.

A Hel-6 által kiváltott gátló hatás sejtspecifikusságának tanulmányozása céljából a melanóma- illetve az endotélsejtek Hel-6 előkezelést kaptak. A kezeléseket a sejtadhéziós kísérlet megkezdése előtt eltávolítottuk a sejtekről. A melanómasejtek 5 μM Hel-6-tal történő kezelése nem gyakorolt hatást a letapadó melanómasejtek számára. Ugyanakkor, amikor az agyi endotélsejteket kezeltük 2 μM koncentrációjú Hel-6 lignánnal, az endoteliális réteghez tapadt melanómasejt száma szignifikánsan csökkent, bár nem olyan mértékben, mint amikor a Hel-6 jelen volt a tápfolyadékban az adhéziós kísérlet során is. Az adhéziók száma nem csökkent tovább abban az esetben, ha mindkét sejttípus kapott előkezelést és az adhézió közben is jelen volt a Hel-6, ahhoz a kísérleti csoporthoz viszonyítva, mikor csak az endotélsejtek voltak előkezelve Hel-6 lignánnal, és a sejtadhézió is Hel-6 jelenlétében történt. Eredményeink arra utalnak, hogy a Hel-6 adhéziót gátló hatása endotélspecifikusan érvényesül, mely hatás reverzibilis.

A Hel-6 és Hel-11 elősegíti az agyi endotélsejtek gát funkcióját

Az agyi endotélréteg integritását TEER mérésekkel vizsgáltuk, mely egy általánosan elfogadott módszer a sejtek közötti junciók szorosságának meghatározására. Az 5 μM Hel-6 kezelés megkezdését követő második órában az RBEC sejtek rétegének ellenállása 15-20%-kal nőtt a nem kezelt kontrollhoz képest. A TEER gyengébb, de szintén szignifikáns fokozódása volt megfigyelhető Hel-11 (5 μM) jelenlétében a kontrollhoz viszonyítva.

A szoros kapcsolatok (TJ) folytonos jelenléte az agyi endotélsejtek között elengedhetetlen a gátfunkcióhoz. Ezért megvizsgáltuk az egyik fontos TJ fehérje, a ZO-1 jelenlétét az endotélsejtek közötti kapcsolatokban. Immunfluoreszcens festéseken megfigyelhető volt a ZO-1 fehérje fokozott expressziója (D3 és RBEC sejtekben) mind Hel-6, mind pedig Hel-11 jelenlétében.

A Hel-6 és Hel-11 csökkenti az endotélsejtek migrációját

Az áttétek növekedésének egyik fontos lépése a metasztatikus tumor angiogenezise, érképződése. Ebben a folyamatban az endotélsejtek vándorlásának kulcsszerepe van. Ezért következő vizsgálataink során a Hel-6 és Hel-11 lignánok agyi endotélsejtek migrációjára gyakorolt hatását tanulmányoztuk sebgyógyulási assay alkalmazásával. Mind a Hel-6, mind pedig a Hel-11 szignifikánsan csökkentette az endotélsejtek vándorlását.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az immunsejtek és a metasztatikus daganatsejtek átjutása a vér-agy gáton olyan súlyos kórfolyamatok sarkalatos lépéseit jelenti, mint a neuroinflammáció és az agyi metasztázisok kialakulása. Ezért fontos lenne, hogy olyan stratégiákat, terápiás eszközöket találjunk, melyek segítségével gátolni lehet ezen sejtek bejutását az agyba. Ezáltal nőne a klinikai kezelések hatékonysága, a javulnának gyógyulási esélyek és a betegek életminősége.

Kutatásaink során célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a CB2 agonisták és a *Heliopsis helianthoides* var. *scabra*-ból izolált lignánok hatását a BBB integritására és a sejtek agyi endotéliumon keresztüli átjutására. Első lépésként a CB2 jelenlétét mutattuk ki humán agyi endotéliumban és melanómasejtekben. Fontos megjegyezni, hogy korábban a CB2 expresszióját a fehérvérsejtek több, különböző típusában is kimutatták már. Gyulladásos stimulusoknak kitett humán agyi endotélsejtekben megnövekedett CB2 expressziót figyeltük meg. Ezen felül a következő kannabinoid és kannabinoid-szerű receptorokat sikerült kimutatnunk: a CB1, GPR18 és GPR55 receptorokat a D3 humán agyi endotélsejtekben, valamint a CB1, GPR18, GPR55 és GPR119 receptorokat az A2058 melanóma sejtekben.

Megvizsgáltuk, hogy milyen hatást gyakorol a CB2 aktiváció a fokozott fehérvérsejt-endotélsejt adhézióra. Ehhez LPS indukált encefalitisz modellen végeztünk megfigyeléseket in vivo. A CB2 agonista kezelés szignifikánsan csökkentette a fehérvérsejtek kitapadását mind az agyfelszíni mind pedig a mélyebb, kortikális ereken. A CB2 fehérvérsejtek adhézióját gátló hatása szintén megfigyelhető volt humán agyi endotéliumon, in vitro. Továbbá sikerült kimutatnunk, hogy a CB2 aktivációja javítja az agyi endotélsejtek gát funkcióját, melynek hátterében valószínűleg a TJ fehérjék fokozott expressziója áll.

A fehérvérsejtekhez hasonlóan a CB2 aktiváció a melanómasejtek agyi endotél sejtekhez történő kitapadását is gátolta. A JWH133 CB2 agonista csökkentette az endotéliumon keresztül átvándorló melanómasejtek számát is.

A CB2 agonisták mellett két lignán, a helioxantin (Hel-6) és a dibenzilbután dehydroheliobufthalmin (Hel-11) is javította az agyi endotélium gát funkcióját, és fokozta a ZO-1 fehérje jelenlétét az agyi endotélsejtek közötti kapcsolatokban. Ez a két lignán gátló hatást gyakorolt a melanómasejtek és az agyi endotélsejtek migrációjára. Emellett a Hel-6 csökkentette az agyi endotélsejtekhez kitapadt melanómasejtek számát.

Vizsgálataink arra utalnak, hogy a CB2 agonisták és a Hel-6, valamint a Hel-11 lignánok alkalmazása hozzájárulhat az immunsejtek illetve a daganatsejtek vér-agy gáton keresztüli átjutásának gátlásához. Ezen tulajdonságaik alapján ezek a vegyületek olyan potenciális terápiás jelöltek lehetnek, melyeknek alkalmazása hozzájárulhat az agyi gyulladással járó betegségek vagy az agyi metasztatizis kialakulásának megelőzéséhez, valamint kezeléséhez.

PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Wilhelm I, Fazakas C, Molnár K, Végh AG, **Haskó J**, Krizbai IA. Foe or friend? Janus-faces of the neurovascular unit in the formation of brain metastases. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017 Jan 1:271678X17732025 (IF2016: 5,081)

2. Hajdu Z*, **Haskó J***, Krizbai IA, Wilhelm I, Jedlinszki N, Fazakas C, Molnár J, Forgo P, Hohmann J, Csupor D. Evaluation of lignans from *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* for their potential antimetastatic effects in the brain. *J Nat Prod.* 2014 Dec 26;77(12):2641-50 (*=társ-első szerzők) (IF2014: 3,798)

3. **Haskó J**, Fazakas C, Molnár J, Nyúl-Tóth Á, Herman H, Hermenean A, Wilhelm I, Persidsky Y, Krizbai IA. CB2 receptor activation inhibits melanoma cell transmigration through the blood-brain barrier. *Int J Mol Sci.* 2014 May 8;15(5):8063-74 (IF2014: 2,862)

4. Ramirez SH, **Haskó J**, Skuba A, Fan S, Dykstra H, McCormick R, Reichenbach N, Krizbai I, Mahadevan A, Zhang M, Tuma R, Son YJ, Persidsky Y. Activation of cannabinoid receptor 2 attenuates leukocyte-endothelial cell interactions and blood-brain barrier dysfunction under inflammatory conditions. *J Neurosci.* 2012 Mar 21;32(12):4004-16 (IF2012: 6,908)

További közlemények

1. Nyúl-Tóth Á, Kozma M, Nagyősi P, Nagy K, Fazakas C, **Haskó J**, Molnár K, Farkas AE, Végh AG, Váró G, Galajda P, Wilhelm I, Krizbai IA. Expression of pattern recognition receptors and activation of the non-canonical inflammasome pathway in brain pericytes. *Brain Behav Immun.* 2017 Aug;64:220-231 (IF2016: 5,964)

2. Krizbai IA, Nyúl-Tóth Á, Bauer HC, Farkas AE, Traweger A, **Haskó J**, Bauer H, Wilhelm I. Pharmaceutical targeting of the brain. *Curr Pharm Des.* 2016;22(35):5442-5462 (IF2016: 2,611)

3. Nyúl-Tóth Á, Suciú M, Molnár J, Fazakas C, **Haskó J**, Herman H, Farkas AE, Kaszaki J, Hermenean A, Wilhelm I, Krizbai IA. Differences in the molecular structure of the blood-brain barrier in the cerebral cortex and white matter: an in silico, in vitro, and ex vivo study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016 Jun 1;310(11):H1702-14 (IF2016: 3,324)

4. Molnár J, Fazakas C, **Haskó J**, Sipos O, Nagy K, Nyúl-Tóth Á, Farkas AE, Végh AG, Váró G, Galajda P, Krizbai IA, Wilhelm I. Transmigration characteristics of breast cancer and melanoma cells through the brain endothelium: Role of Rac and PI3K. *Cell Adh Migr.* 2016 May 3;10(3):269-81 (IF2016: 3,306)

5. Nagyősz P, Nyúl-Tóth Á, Fazakas C, Wilhelm I, Kozma M, Molnár J, **Haskó J**, Krizbai IA. Regulation of NOD-like receptors and inflammasome activation in Cerebral endothelial cells. *J Neurochem.* 2015 Nov;135(3):551-64 (IF2015: 3,842)
6. Wilhelm I, Fazakas C, Molnár J, **Haskó J**, Végh AG, Cervenak L, Nagyősz P, Nyúl-Tóth A, Farkas AE, Bauer H, Guillemin GJ, Bauer HC, Váró G, Krizbai IA. Role of Rho/ROCK signaling in the interaction of melanoma cells with the blood-brain barrier. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014 Jan;27(1):113-23 (IF2014: 4,619)
7. Wilhelm I, Molnár J, Fazakas C, **Haskó J**, Krizbai IA. Role of the blood-brain barrier in the formation of brain metastases. *Int J Mol Sci.* 2013 Jan 11;14(1):1383-411 (IF2013: 2,339)
8. Fazakas C, Wilhelm I, Nagyoszi P, Farkas AE, **Haskó J**, Molnár J, Bauer H, Bauer HC, Ayaydin F, Dung NT, Siklós L, Krizbai IA. Transmigration of melanoma cells through the blood-brain barrier: role of endothelial tight junctions and melanoma-released serine proteases. *PLoS One.* 2011;6(6):e20758 (IF2011: 4,092)
9. Nagyoszi P, Wilhelm I, Farkas AE, Fazakas C, Dung NT, **Haskó J**, Krizbai IA. Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem Int.* 2010 Nov;57(5):556-64 (IF2010: 3,601)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként témavezetőmnek, Dr. Krizbai Istvánnak szeretném megköszönni a doktori tanulmányaim és kutatómunkám során nyújtott tudományos útmutatását és bátorítást. Különösen hálás vagyok Dr. Wilhelm Imolának az elméleti és gyakorlati tanácsokért, megbeszélésekért és építő jellegű bírálatokért.

Köszönettel tartozom Dr. Yuri Persidskynek, a filadelfiai Temple Egyetem, Patológia Tanszék (USA, Philadelphia, PA) tanszékvezetőjének, valamint Dr. Servio Ramirez tudományos főmunkatársának, akik lehetőséget biztosítottak arra, hogy laboratóriumukban egy éves szakmai tapasztalatot szerezhsek, és kísérletes munkáimat elvégezhessem.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Molekuláris Neurobiológia Egység korábbi vezetőjének, Dr. Párducz Árpádnak, valamint jelenlegi vezetőjének Dr. Siklós Lászlónak és az egység többi tagjának. Köszönet illeti Dr. Ormos Pált és Dr. Zimányi Lászlót, a Biofizikai Intézet korábbi és jelenlegi igazgatóját és az intézet többi munkatársát a kellemes munkahelyi légkörért.

Korábbi és jelenlegi munkatársaimnak, Dr. Fazakas Csillának, Dr. Farkas Attilának, Dr. Nagyősi Péternek, Dr. Molnár Juditnak, Nyúl-Tóth Ádámnak, Molnár Kingának, Kozma Mihálynak, Mészáros Ádámnak, Andrew Skubanak, Dr. Shongshan Fannak, Holly Dykstranak, Ryan McCormicknak, Nancy Reichenbachnak, Jonathan Cenna-nak, Dr. Slava Romnak, Dr. Ming Zhangnak, Yu Zhounak szeretném megköszönni az együtt eltöltött időt, a közös kutatások és felfedezések élményét.

Hálás köszönet illeti együttműködő partnereinket, különösképpen Dr. Hajdú Zsanettet, Dr. Csupor Dezsőt és Dr. Hohmann Juditot (Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertudományi Kar, Farmakognózi Intézet) a közös kutatásainkban elvégzett lelkiismeretes munkáért, és a közös publikációkért.

Hálás vagyok családomnak, barátaimnak a töretlen támogatásukért.

Végezetül szeretném megköszönni az anyagi támogatást a Hungarian-American Enterprise Scholarship Fund (HAESF) ösztöndíj alapnak a GINOP-2.3.2-15-2016-0020, a GINOP-2.3.2-15-2016-0034 és a GINOP-2.3.2-15-2016-0030 programoknak, valamint a Konvergencia régióban meghirdetett Apáczai Csere János Doktorandusz Ösztöndíjnak (TAMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001).