



**MINTÁZATFELISMERŐ RECEPTOROK ÉS
INFLAMMASZÓMA AKTIVÁCIÓ A VÉR-AGY GÁT
SEJTJEIBEN: ÚJ SZEREPLŐK A
NEUROINFLAMMÁCIÓBAN**

A Ph.D. értekezés tézisei

Nyúl-Tóth Ádám

Témavezető: Dr. Krizbai István M.D., Ph.D., D.Sc.

**A VÉR-AGY GÁT ÉLETTANA ÉS KÓRÉLETTANA
KUTATÓCSOPORT**

**Molekuláris Neurobiológia Kutatóegység
Biofizikai Intézet, Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Magyar Tudományos Akadémia**

**Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola
Általános Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem**

Szeged

2018

BEVEZETÉS

Az agyi endotélsejtek — amelyek a vér-agy gát anatómiai alapját képezik — a központi idegrendszer első védelmi vonalát alkotják. A periciták az agyi mikroerek falában a bazális lamina kettőzetében elhelyezkedő sejtek. Mindkét sejtípus a központi idegrendszer és az immunrendszer közötti határfelületen helyezkedik el, és feltehetően fontos szerepük lehet a két rendszer funkcionális integrációjában. Az agy relatív immunprivilegiuma ellenére a különböző központi idegrendszert érintő megbetegedések egyik közös tulajdonsága a neuroinflammáció. Ez egy, az idegszövet által adott komplex gyulladáshoz vezető különböző kártékony hatásokra, amely arra szolgál, hogy megvédje és helyreállítsa a központi idegrendszer strukturális és funkcionális integritását.

Gyulladás során a veleszületett immunrendszer aktiválódik elsőként. A veleszületett immunrendszer érzékeli és dolgozza fel a potenciális veszélyre utaló jelzéseket, és riasztja az egész rendszert további immunreakciók kiváltására. Az egyik legfontosabb lépés ezekben a folyamatokban a mintázatfelismerő receptorok (Pattern Recognition Receptor – PRR) aktiválódása. Az elmúlt évtizedben a Toll-szerű receptorok (Toll-like receptor – TLR) és a NOD-szerű receptorok (NOD-like receptor – NLR) — amelyek a legjobban karakterizált PRR-ek — kerültek az érdeklődés középpontjába az idegrendszeri gyulladáshoz vezető betegségek területén.

A TLR-ek patogén- vagy sérülés-asszociált molekuláris mintázatok általi aktivációja olyan jelátviteli útvonalakat indít be, amelyek egy sor antimikrobiális és egyéb védekező mechanizmusban résztvevő gének indukciójához vezetnek. Az NLR-ek szintén széles körben ismernek fel különböző mikrobiális

és veszély jelzéseket. Az NLR család több tagjának (pl. NLRP1, NLRP3 vagy NLRC4) specifikus ligand általi aktivációja az úgynevezett inflammaszóma multiprotein komplex összeszerelődését indukálja. Ezek a platformok képesek gyulladáshoz vezető kaszpázok aktivációjára, amely aktív citokinek (interleukin (IL)-1 β vagy IL-18) termeléséhez és gyulladáshoz vezet. Az inflammaszómák felépítésében az NLR-ek mellett részt vesz egy adaptor fehérje, az ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), valamint a kaszpáz-1 és -5. Az inflammaszóma aktiváció egy nagyon jól kontrollált és hatékony módja annak, hogy a fertőzés vagy szöveti sérülés robusztus gyulladássá alakuljon.

Egyre több bizonyíték van arra, hogy az immunrendszer sejtjei mellett a központi idegrendszer sejtjei is expresszálnak PRR-eket, és képesek lehetnek inflammaszómák aktivációjára. Ugyanakkor kevés információ áll rendelkezésünkre az agyi endotélsejtekben és a pericitákban expresszálandó PRR-ek és inflammaszómák aktivitásáról és a neuroinflammációban betöltött szerepükről.

CÉLKITŰZÉSEK

Egyre több adat igazolja, hogy az agyi endotélsejtek és a periciták is aktívan részt vesznek a gyulladáshoz vezető folyamatokban, mint a neuro-immun tengely tagjai. A PRR-ek fontos elemei a gyulladáshoz vezető folyamatoknak és elengedhetetlenek a veleszületett immunrendszer aktivációjához. **Ebből adódóan tanulmányunk első célja az volt, hogy azonosítsuk az agyi endotélsejtek és periciták által expresszált PRR-eket és azok szabályozását.**

Bizonyos NLR-ek specifikus „priming” és „aktivátor” jelek hatására inflammaszómák összeszerelődését indukálják, ami aktív

IL-ek szekrécióját eredményezi. **Második célunk az volt, hogy kiderítsük, hogy az agyi endotelsejtekben és pericitákban aktiválódhatnak-e az inflammaszómák kanonikus vagy nem kanonikus útvonalon.**

A PRR-ek és a citokinek expressziója, illetve az inflammaszóma aktiváció szigorú szabályozás alatt áll. **Harmadik célként azt akartuk megérteni, hogy milyen transzkripciós és translációs szabályozás alatt áll az IL-1 β és hogy milyen jelátviteli útvonalak modulálják az inflammaszóma aktivációt az agyi endotelsejtekben és pericitákban.**

Az agyi periciták fagocita-szerű tulajdonságokkal is rendelkeznek, amelyek proinflammatorikus citokinek szekréciójához vezethetnek a nem-kanonikus inflammaszóma aktiváció által. **Negyedik célunk az volt, hogy karakterizáljuk az agyi periciták citokin válaszát és inflammaszóma aktivációját *E. coli* fertőzés, illetve a baktériumok által kibocsátott külső membránvezikulák (outer membrane vesicles – OMV) hatására.**

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejttenyésztés és kezelések

A kísérletekhez egy humán agyi endotél sejt vonal (hCMEC/D3) és humán agyi vaszkuláris periciták (HBVP, ScienCell) tenyésztéseit használtuk. Miután a sejtek elérték a konfluenciát, szérumentes médiumban kezeltük őket a következők szerint: 600 mmol/L H₂O₂, 10 ng/mL IL-1 β , 100 ng/mL IFN- γ , 10 ng/mL TNF- α , 1 μ g/mL LPS, 100 μ g/mL MDP, 100 μ mol/L PDTC, 10 μ mol/L U0126, 20 μ mol/L Z-VAD-FMK, 5 mM ATP vagy 10 ng/mL FLiC – egyesével vagy kombinációban különböző ideig. Az LPS sejtekbe való bejuttatásához

Lipofectamine® 2000-t használtunk. Egy másik kísérletsorozatban a pericitákat zöld fluoreszcens proteint (GFP) expresszáló *E. coli* sejtekkel fertőztük meg.

OMV-k izolálása és karakterizálása

Az OMV-eket egy éjszakán át növesztett baktériumtenyészet tápoldatából izoláltuk. A mintákból centrifugálással ülepítettük le a baktériumokat, majd a felülúszót átszűrtük, és ultracentrifugáltuk. Az így kapott felülúszót eltávolítottuk, és a pelletet PBS-ben feloldottuk. A minták OMV tartalmát atomerő-mikroszkópiával vizsgáltuk.

Végpont és kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR)

A kezelések után a sejtekből RNS-t izoláltunk, majd DNáz kezelést követően cDNS-sé írtuk át a PCR amplifikációhoz. Az amplifikációt egy Bio-Rad iQ5 készüléken végeztünk univerzális SYBR Green szupermixekkel, a következő protokoll szerint: 95 °C, 15 másodpercig, 56–63 °C, 30 másodpercig és 72 °C, 30 másodpercig; 40-szer ismételve. A reakciókhoz humán TLR-ek, NLR-ek, inflammaszóma komponensek, citokinek és RNS-kötő fehérjék mRNS-ével komplementer „forward” és „reverz” primer párokat használtunk. Az amplifikáció belső kontrollja a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) volt.

Mintaelőkészítés és immunprecipitáció western blot módszerhez

A sejt kultúrák tápoldatát összegyűjtöttük, és a sejteket jég hideg RIPA pufferben lizáltuk. A begyűjtött tápoldat fehérjéit metanol-kloroform vagy TCA-DOC alapú precipitációs eljárással kicsaptuk. A lizátumokat centrifugálással tisztítottuk, majd a RIPA

szolúbilis frakció fehérjetartalmát BCA (bicinkoninsav) módszerrel határoztuk meg.

Az immunprecipitációhoz a lizátumok fehérjekoncentrációját RIPA pufferrel egyenlítettük ki, majd a mintákat anti-NOD2 vagy anti-NLRP3 antitestekkel inkubáltuk. A protein A-val konjugált szefaróz gyöngyöket jéghideg Tris-pufferelt sóoldattal mostuk, ezt követően egy éjszakán át inkubáltuk a mintákkal 4 °C-on, hogy precipitáljuk a fehérje-antitest komplexeket. A gyöngyöket mosás után Laemmli pufferben oldottuk fel. Az elektroforézis előtt minden mintát 95 °C-on melegítettünk 5 percig.

Western blot

A fehérjéket standard SDS-PAGE módszerrel denaturáló körülmények között választottuk el egymástól, majd polivinilidén-difluorid vagy nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránok nem specifikus kötési kapacitását marha szérumalbuminnal vagy sovány tejjel blokkoltuk TBS-T-ben (Tris pufferelt sóoldat 1 mL/L Tween-20-szal). A blokkolás után a membránokat a következő elsődleges antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on, TBS-T-ben: anti-humán IL-1 β , anti-kaspáz-1, anti-NOD2, anti-NLRP3, anti-pERK1/2 vagy anti- β -aktin. A blottokat ezután mostuk, majd a megfelelő másodlagos antitestekkel inkubáltuk őket TBS-T-ben. További mosási lépések után az immunreakciót Bio-Rad Clarity kemilumineszcens szubsztrát segítségével ChemiDoc MP műszerben vizualizáltuk.

IL-1 β ELISA (enzim-kapcsolt immunoszorbens assay) és citokin array

Az agyi endotélsejtek és periciták által a tápoldatba szekretált IL-1 β kvantifikációjához szilárd fázisú szendvics ELISA-

t alkalmaztunk a gyártó leírásának megfelelően. Az agyi periciták által szintetizált humán citokinek és kemokinek relatív kvantifikációjához Proteome Profiler™ Array-t használtunk. A periciták *E. coli* baktériummal való megfertőzése után 4 órával eltávolítottuk a tápoldatot, és a sejtlizátumokat használtuk az assay-hez, a gyártó ajánlásai szerint.

Immunfluoreszcens festések

A pericitákat és az agyi endotélsejteket fedőlemezeken növesztettük. A pericitákat a „priming” után *E. coli* baktériummal tenyésztettük együtt 4 órán át. Az agyi endotélsejteket LPS + MDP-vel kezeltük 24 órán keresztül. A mintákat alapos PBS-es mosás után fixáltuk, majd újabb mosási lépéseket követően permeabilizáltuk, és a nem specifikus kötési kapacitást normál kecske szérummal blokkoltuk. A fedőlemezek festéséhez anti- α -aktin, anti-PDGFR β vagy anti-NLRP3 és anti-klaudin-5 antitesteket alkalmaztunk normál kecske szérumban oldva egy éjszakán át. Mosás után a fedőlemezeket Cy3- vagy Alexa 488-jelölt másodlagos antitestekkel inkubáltuk. Három további mosási lépés után a mintákat FluoroMount-G fedő médiummal fedtük le. A fluoreszcens jeleket egy Olympus Fluoview FV1000 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgáltuk.

Statisztikai analízis

A statisztikai tesztek a nyitott forráskódú és ingyenes R Statistical Software version 3.4.0. szoftverrel végeztük. Minden bemutatott adat átlag \pm standard hiba (SEM). A kísérletekben a különböző minták összehasonlításához varianciaanalízist használtunk Fisher LSD vagy Bonferroni *post hoc* módszerekkel kiegészítve. Az eltéréseket $p < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak. Minden kísérletet legalább háromszor elvégeztünk.

EREDMÉNYEK

Az agyi endotélsejtekben és pericitákban expresszáldó TLR-ek, NLR-ek, inflammaszóma komponensek és kaszpáz-szubsztrát IL-ek

Az agyi endotélsejtekben és pericitákban a TLR-ek és NLR-ek több tagja is jelen van mRNS szinten, kontroll körülmények között (1. táblázat). Ezen kívül minden inflammaszóma komponens és a kaszpáz szubsztrát IL-ek is expresszáldódnak ezen sejtekben.

*1. táblázat. TLR-ek és NLR-ek expressziója agyi endotélsejtekben és pericitákban. Az adatokat a jelen tanulmányból (félkövér), illetve az irodalomból gyűjtöttük. * = csak stimuláció hatására vagy patológiás körülmények között expresszáldódnak.*

	TLR-ek		NLR-ek	
	mRNS	protein	mRNS	protein
Agyi endotélsejtek	TLR2, TLR3, TLR4, TLR6	TLR2, TLR6	NOD1, NOD2, NLRC4, NLRC5, NLPR1, NLRP3, NLRP5, NLRP9, NLRP10, NLRP12, NLRA, NLRX	NOD2, NLRP3
Agyi periciták	TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR9*, TLR10	TLR4	NOD1, NOD2, NLRC4*, NLPR1, NLRP2, NLRP3, NLRP5, NLRP9, NLRP10, NLRA *, NLRX	NOD1

A PRR-ek és IL-ek expressziójának regulációja az agyi endotélsejtekben és pericitákban

Következő lépésként megvizsgáltuk az NLR-ek, a TLR-ek és az inflammaszóma-asszociált fehérjék transzkripcionális regulációját agyi endotélsejtekben és pericitákban különböző

patológias körülmények között. Ennek érdekében a sejteket H_2O_2 , LPS, MDP, LPS + MDP, $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ vagy $IL-1\beta$ releváns koncentrációival kezeltük. Az $IL-1\beta$, a $TNF-\alpha$ és az LPS + MDP emelte meg leginkább a vizsgált gének expresszióját, ahogy az a 2. táblázatban is látható.

Érdekes módon a H_2O_2 kezelés hatására csökkent az NLRP5 expressziója agyi endotélsejtekben. Ezzel ellentétben az oxidatív stressz jelentősen megemelte az NLRP9 és a TLR10 expresszióját agyi pericitákban.

2. táblázat. A legfontosabb NLR-ek és az $IL-1\beta$ expressziójának változása gyulladásoos faktorok hatására agyi endotélsejtekben és pericitákban.

	Agyi endotélsejtek			periciták		
	$IL-1\beta$	$TNF-\alpha$	LPS+MDP	$IL-1\beta$	$TNF-\alpha$	LPS+MDP
NOD1	-	-	-	↑	↑	-
NOD2	↑	↑	↑	↑	↑	↑
NLRP1	-	-	-	-	-	-
NLRP3	↑	↑	↑	↑	↑	↑
$IL-1\beta$	↑	↑	↑	↑	↑	↑

Kanonikus inflammaszóma aktiváció az agyi endotélsejtekben

LPS „priming” és „MDP” aktiváció hatására szignifikánsan megnövekedett a NOD2 és az NLRP3 fehérjék mennyisége az agyi endotélsejtekben. Az MDP kezelés LPS-sel kombinálva erőteljesen megemelte az $IL-1\beta$ mRNS-ének mennyiségét is, és megnövelte több inflammaszóma komponens expresszióját, beleértve az $IL-1\beta$ aktivátor kaszpáz-1-ét is. A kísérleteinkben az $IL-1\beta$ pro-forma mennyisége szignifikánsan megemelkedett az LPS-sel vagy MDP-vel kezelt sejtekben, de a legjelentősebb növekedést a kombinált kezelés hatására tapasztaltuk. Az $IL-1\beta$ hasított aktív formája is

megtalálható volt a lizátumokban. Azért hogy alátámasszuk az IL-1 β szekrécióját, megmértük az IL-1 β koncentrációját a sejtek tápoldatában. Kontroll körülmények között a kibocsátott IL-1 β fehérje mennyisége a detektálási határ körül volt. Az MDP vagy az LPS önmagában gyengén megemelte a szekretált IL-1 β szintjét, a kombinált kezelés viszont legalább 10-szeresére növelte a szekretált fehérje mennyiségét, amely így elérte az ~5 pg/ml-t (1.5×10^6 sejt által szekretált mennyiség). Az aktív IL-1 β szekréciója kaszpáz-függő (tehát inflammaszóma-mediált) módon történt, ugyanis a Z-VAD kezelés képes volt teljesen meggátolni azt.

A kanonikus inflammaszóma aktiváció hiánya az agyi pericitákban

A lehetséges inflammaszóma aktiváció detektálása érdekében az agyi pericitákban — az agyi endotélsejtekhez hasonló módon — különböző NLRP1, NLRP2 és NLRP3 „priming” és „aktivátor” szignálok (LPS, MDP, LPS + MDP, LPS + ATP és TNF- α) hatását teszteltük. Ezek közül a TNF- α volt a leghatásosabb a pro-IL-1 β fehérje mennyiségének megemelésében agyi pericitákban. A pro-IL-1 β fehérje szintjének jelentős emelkedése ellenére a TNF- α -kezelt sejtekben nem tudtunk kimutatni aktív IL-1 β szekréciót egyik „aktivátor”-ral való kezelés hatására sem. A kaszpáz-1 mRNS expressziója és a prokaspáz-1 fehérje mennyisége IFN- γ hatására emelkedett meg. Az IL-1 β mRNS és fehérje „priming”-ja 2-4 órás IFN- γ és TNF- α hatására volt maximális.

Ezután az IFN- γ és TNF- α „priming”-ot MDP és ATP „aktivációval” kombináltuk. A pro-IL-1 β szintje néhány óra után megemelkedett, de egyik stimulus hatására sem tudtunk aktív IL-1 β -t kimutatni. Az NLRC4 inflammaszóma aktivációját sem tudtuk

kimutatni IFN- γ + TNF- α „priming” és flagellin (FliC) „aktiváció” hatására a pericitákban.

A nem-kanonikus inflammaszóma aktiváció agyi pericitákban

Mivel nem tapasztaltunk kanonikus inflammaszóma aktivációt a pericitákban, megvizsgáltuk a nem-kanonikus útvonal esetleges aktiválását. A pericitákat IFN- γ + TNF- α priming után LPS-sel transzfektáltuk Lipofectamine[®] 2000 segítségével. Ennek hatására aktív IL-1 β -t tudtunk kimutatni a tenyészetek tápoldatában. A szekretált fehérje mennyisége 2 óra után érte el a maximumát, míg a pro-IL-1 β legmagasabb szintjét 3-5 óra után detektáltuk a pericitákban. ELISA segítségével ~14 pg/mL szekretált IL-1 β -t mutattunk ki a kombinált IFN- γ + TNF- α és LPS + Lipofectamine[®] 2000 kezelés hatására. Ez az érték megfelel 4×10^5 sejt által szekretált ~14 pg IL-1 β -nak.

Az agyi periciták gyulladásoos aktivációja *E. coli* fertőzés hatására

Ezek után a pericitákat GFP-t expresszáló *E. coli* baktériumokkal fertőztük meg IFN- γ és TNF- α jelenlétében, illetve hiányában. A fagocitált baktériumok detektálásához anti- α -aktin vagy anti-PDGFR β antitestekkel festettük a GFP-*E. coli*-fertőzött sejteket. A három dimenziós egyesített képek ortografikus vetületén jól látható a GFP festés (amely a baktériumoknak felel meg), mely kolokalizál az α -aktin vagy a PDGFR β festéssel (amelyek a pericitákat jelölik), így utalva intracelluláris baktériumok jelenlétére, amelyek aktív IL-1 β szekréciónját indukálhatják a nem-kanonikus útvonalon. A baktériumok jelenléte már 2 óra után felerősítette az IFN- γ + TNF- α „priming” hatását a pro-IL-1 β -ra és a pro-kaspáz-1-re, és ez még erőteljesebb volt 4 óra elteltével. A bakteriális fertőzés nemcsak megemelte a proformák mennyiségét,

de aktív IL-1 β szekréciót is eredményezett. Ez már 2 óra után megfigyelhető volt, és fokozódott 4 óra elteltével. Ugyanezen körülmények között az IL-1 β mellett a pericitákban más IL-ek, citokinek és kemokinek expressziójának emelkedése is megfigyelhető volt, úgymint az IL-1 α , IL-6, CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CXCL1, CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10) és a CXCL11.

IL-1 β szekréció agyi pericitákból bakteriális OMV-k hatására

Az LPS nemcsak baktériumok fagocitózisával juthat be a sejtekbe, hanem azt tartalmazó OMV-k felvételével is, amelyeket a baktériumok bocsátanak ki. Ezért OMV-ket izoláltunk *E. coli* tenyészetek tápoldatából, és ezekkel kezeltük a pericitákat különböző mennyiségben, IFN- γ és TNF- α jelenlétében. Ennek hatására szignifikánsan megnövekedett a pro-IL-1 β és a pro-kaspáz-1 mennyisége. Az OMV-k aktív IL-1 β szekrécióját is indukálták koncentrációfüggő módon, viszont kisebb mértékben, mint maguk a baktériumok.

ÖSSZEFOGLALÁS

Bár a gyulladás kulcsszerepet játszik számos központi idegrendszeri megbetegedésben, a gyulladásban fontos szereppel bíró inflammaszómák közül eddig csupán néhányat írtak le az agyi sejtekben. Ezek közé tartoznak az NLRP1 és AIM2 inflammaszómák a neuronokban, az NLRP2 inflammaszóma az asztrocitákban és az NLRP3, az NLRC4 és az AIM2 inflammaszómák a mikrogliaokban. Eredményeink szerint az említett sejt típusokon kívül az agyi endotélsejtekben és pericitákban szintén létrejöhet inflammaszóma aktiváció. Agyi endotélsejtekben az inflammaszóma összeszerelődés, aktiváció és így az aktív IL-1 β

szekréción a kanonikus útvonalon történik (LPS „priming” és MDP „aktiváció” hatására). Ezzel ellentétben az agyi pericitákban az inflammaszóma aktiváció a nem-kanonikus útvonalon (citoplazmatikus LPS detektálásán keresztül) valósul meg. Ezen eredmények megmagyarázzák, hogy miért nem tudtak korábban LPS hatására aktív IL-1 β szekréción kimutatni izolált rágcsháló agyi endotélsejtekből és pericitákból az IL-1 β mRNS megemelkedése ellenére.

Összegezve tehát:

- Karakterizáltuk az NLR-ek és a TLR-ek, valamint az inflammaszóma komponensek expressziós profilját agyi endotélsejtekben és agyi pericitákban, kontroll és stimulált körülmények között. Eredményeink jól mutatják, hogy ezen sejtek képesek különböző mikrobiális mintázatokat, toxinokat és endogén vészjelzéseket érzékelni.
- Először mutattunk ki inflammaszóma aktivációt és aktív IL-1 β szekréción agyi endotélsejtekben.
- Leírtuk, hogy az agyi periciták is válaszolnak gyulladáshos citokinek hatására, ugyanakkor kanonikus inflammaszóma aktiváló jelzések hatására nem tapasztaltunk aktív IL-1 β szekréción, csupán az inflammaszóma komponensek expressziója növekedett meg.
- Eredményeink szerint az agyi pericitákban az IL-1 β felszabadulás intracelluláris LPS függőnek mutatkozott, amely gyors IL-1 β felszabadulást indukált a nem-kanonikus útvonalon keresztül. Továbbá elsőként írtunk le nem-kanonikus inflammaszóma aktivációt a központi idegrendszerben. Ez azt is sugallja, hogy a periciták potens gyulladáshos reakciót képesek aktiválni — amely akár

kártékony is lehet — nagyon szigorúan szabályozott körülmények között.

- Végül bemutattuk, hogy az agyi periciták nemcsak IL-1 β -t, hanem számos más gyulladáshoz kapcsolódó citokint is expresszálnak bakteriális fertőzés hatására.

Az agyi endotélsejtekben és agyi pericitákban történő inflammaszóma aktiváció a vér-agy gátnak kevésbé karakterizált, viszont feltehetően fontos mechanizmusa a neuro-immun tengely szabályozásában. Újabb eredmények bizonyítják az inflammaszómák részvételét a központi idegrendszer megbetegedéseiben, mint például neurodegeneratív betegségekben, stroke-ban vagy retinopátiában. Az inflammaszóma gátlók új terápiás lehetőséget nyújtanak gyulladáshoz kapcsolódó megbetegedésekben és így az eredményeink szerint a CES-ek és a periciták potenciális célpontjai lehetnek ezeknek a kezeléseknek idegrendszeri gyulladáshoz kapcsolódó betegségek esetében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával tartozom a témavezetőmnek, *Dr. Krizbai Istvánnak*, a kutatócsoport vezetőjének, aki bevezetett a molekuláris idegtudomány területére. Köszönöm a támogatását és bátorító szavait, amellyel segített B.Sc., M.Sc. és Ph.D. tanulmányaim során. Különösen hálás vagyok *Dr. Nagyősi Péternek* és *Dr. Wilhelm Imolának* útmutatásukért és munkámban nyújtott segítségükért.

Szeretnék köszönetet mondani *Dr. Ormos Pálnak* és *Dr. Zimányi Lászlónak* a Biofizikai Intézet volt és jelenlegi igazgatójának, valamint *Dr. Siklós Lászlónak*, a Molekuláris Neurobiológia Kutatóegység vezetőjének és minden kollégámnak az intézetben a kellemes légkörért, amelyben munkámat végezhettem.

Köszönettel tartozom minden volt és jelenlegi munkatársamnak a csoportban, *Dr. Farkas E. Attilának*, *Dr. Fazakas Csillának*, *Haskó Jánosnak*, *Kozma Mihálynak*, *Mészáros Ádámnak*, *Dr. Molnár Juditnak* és *Molnár Kingának*, segítségükért és a motiváló csapatmunkáért.

Szeretném megköszönni kollaborációs partnereink szakértő hozzájárulását a kísérletekhez. Különösen köszönöm *Dr. Nagy Krisztina* és *Dr. Galajda Péter* munkáját és segítségét a tanulmány mikrobiológiai részében. Köszönettel tartozom *Dr. Végh A. Gergelynek* és *Dr. Váró Györgynek* az atomerő-mikroszkópos képekért.

Hálás köszönet jár egész családomnak szeretetükért és örökös támogatásukért. Szintén hálás vagyok minden barátomnak, akikre számíthattam, még ha itt név szerint nincsenek is megemlítve.

Végül szeretném megköszönni az anyagi támogatásokat: a SZTE Doktori Intézetének a Doktori Tudományos Ösztöndíjért, az Emberi Erőforrások Minisztériumának az Új Nemzeti Kiválósági Programért (ÚNKP-16-3/1. VI. 2.) és a Richter Gedeon Centenáriumi Alapítványnak díjáért. A munkát a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal támogatta (pályázati azonosítók: GINOP-2.3.2-15-2016-0020, GINOP-2.3.2-15-2016-0034 és GINOP-2.3.2-15-2016-0030).

PUBLIKÁCIÓS LISTA

A Ph.D. értekezés a következő *in extenso* publikációkon alapul:

Péter Nagyószai*, Ádám Nyúl-Tóth*, Csilla Fazakas, Imola Wilhelm, Mihály Kozma, Judit Molnár, János Haskó, István A. Krizbai. Regulation of NOD-like receptors and inflammasome activation in cerebral endothelial cells. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY*, 2015; 135: 551-564. Impakt faktor: 3.842;

Kvartilis érték: Q1

***megosztott elsőszervezők**

Ádám Nyúl-Tóth, Mihály Kozma, Péter Nagyószai, Krisztina Nagy, Csilla Fazakas, János Haskó, Kinga Molnár, Attila E. Farkas, Attila G. Végh, György Váró, Péter Galajda, Imola Wilhelm, István A. Krizbai. Expression of pattern recognition receptors and activation of the non-canonical inflammasome pathway in brain pericytes. *BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY*, 2017; 64: 220-231. Impakt faktor: 5.964; **Kvartilis érték: D1**

Imola Wilhelm, Ádám Nyúl-Tóth, Mihály Kozma, Attila E. Farkas, István A. Krizbai. Role of pattern recognition receptors of the neurovascular unit in inflamm-aging. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY*, 2017; 313: H1000-H1012. Impakt faktor: 3.348; **Kvartilis érték: Q1**

További publikációk, amelyek a Ph.D. értekezés témájához kapcsolódnak:

Ádám Nyúl-Tóth, Maria Suciú, Judit Molnár, Csilla Fazakas, János Haskó, Hildegard Herman, Attila E. Farkas, József Kaszaki, Anca Hermenean, Imola Wilhelm, István A. Krizbai. 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. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY*, 2016; 310: H1702-H1714. Impakt faktor: 3.348; **Kvartilis érték: Q1**

Monique Culturato Padilha Mendonça, Edilene Siqueira Soares, Marcelo Bispo de Jesus, Helder José Ceragioli, Ângela Giovana Batista, Ádám Nyúl-Tóth, Judit Molnár, Imola Wilhelm, Mário Roberto Maróstica Jr., István Krizbai, and Maria Alice da Cruz-Höfling. PEGylation of Reduced Graphene

Oxide Induces Toxicity in Cells of the Blood-Brain Barrier: An in Vitro and in Vivo Study. *MOLECULAR PHARMACEUTICS*, 2016; 13:3913-3924. Impakt faktor: 4.44; **Kvartilis érték: D1**

István A. Krizbai, Ádám Nyúl-Tóth, Hans-Christian Bauer, Attila E. Farkas, Andreas Traweger, János Haskó, Hannelore Bauer, Imola Wilhelm. Pharmaceutical Targeting of the Brain. *CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN*, 2016; 22:5442-5462. Impakt faktor: 3.052; **Kvartilis érték: Q1**

Imola Wilhelm, Ádám Nyúl-Tóth, Maria Suciú, Anca Hermenean, and István A. Krizbai. Heterogeneity of the blood-brain barrier, *TISSUE BARRIERS*, 2016; 4:e1143544. Impakt faktor: -; **Kvartilis érték: Q1**

Judit Molnár, Csilla Fazakas, János Haskó, Orsolya Sipos, Krisztina Nagy, Ádám Nyúl-Tóth, Attila E. Farkas, Attila G. Végh, György Váró, Péter Galajda, István A. Krizbai, Imola Wilhelm. Transmigration characteristics of breast cancer and melanoma cells through the brain endothelium: role of Rac and PI3K, *CELL ADHESION AND MIGRATION*, 2016; 10:269-81. Impakt faktor: 3.872; **Kvartilis érték: Q2**

István A. Krizbai, Csilla Fazakas, János Haskó, Judit Molnár, Ádám Nyúl-Tóth, Attila E. Farkas, Imola Wilhelm. Molecular structure and function of biological barriers, *ACTA BIOLOGICA SZEGEDIENSIS*, 2015; 59:39-50. Impakt faktor: - **Kvartilis érték: Q3**

János Haskó, Csilla Fazakas, Judit Molnár, Ádám Nyúl-Tóth, Hildegard Herman, Anca Hermenean, Imola Wilhelm, Yuri Persidsky, and István A. Krizbai. CB2 Receptor Activation Inhibits Melanoma Cell Transmigration through the Blood-Brain Barrier, *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, 2014; 15:8063-8074. Impakt faktor: 2.862; **Kvartilis érték: Q3**

Imola Wilhelm, Csilla Fazakas, Judit Molnár, János Haskó, Attila G. Végh, László Cervenak, Péter Nagyósi, Ádám Nyúl-Tóth, Attila E. Farkas, Hannelore Bauer, Gilles J. Guillemin, Hans-Christian Bauer, György Váró, István A. Krizbai. Role of Rho/ROCK signaling in the interaction of melanoma cells with the blood-brain barrier, *PIGMENT CELL AND MELANOMA RESEARCH*, 2014; 27:113-123. Impakt faktor: 4.619; **Kvartilis érték: D1**