

# **Az inflammaszóma aktiváció a neurovaszkuláris egységben: az inflammagingtől a tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisáig**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Mészáros Ádám

Témavezetők: Prof. Dr. Krizbai István, tudományos tanácsadó  
Dr. Lőrincz László Magor, egyetemi docens

Neurovaszkuláris Egység Kutatócsoport  
Biofizikai Intézet  
HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biológia Doktori Iskola  
Természettudományi és Informatikai Kar  
Szegedi Tudományegyetem

**HUN  
REN**



2024

Szeged



## BEVEZETÉS

---

Az öregedés mechanizmusairól alkotott számos egymást kiegészítő elmélet közül az inflammaging koncepciója szerint az emberi öregedés szinte elkerülhetetlenül együtt jár a gyulladással „tónus” növekedésével, amely krónikus, alacsony fokú, szisztémás gyulladással állapothoz vezet. Ha ez a proinflammatorikus állapot túlsúlyba kerül és kontrollálatlanná válik, akkor az öregedés folyamata felgyorsulhat és olyan öregedéssel járó betegségek alakulhatnak ki, mint a neurodegeneratív betegségek (pl. Alzheimer-kór), a stroke vagy bizonyos tumorsejtek.

A veleszületett immunrendszer részét képező egyes mintázatfelismerő receptorok (pattern recognition receptor, PRR), különösen a NOD-szerű receptorok (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor, NLR) kiemelkedő jelentőséggel bírnak a gyulladással kapcsolatos szabályozásában. Ugyanis egyedülálló módon képesek úgynevezett inflammaszómákat alkotni, amelyek révén biztosítják a sejtek patogén- és sérülés-asszociált molekuláris mintázatokkal (pathogen-associated molecular pattern, PAMP; damage-associated molecular pattern, DAMP) szembeni védekező mechanizmusát. Az inflammaszómák az interleukin (IL)-1 családba tartozó proinflammatorikus citokinek (IL-1 $\beta$  és IL-18) termeléséért felelős intracelluláris multimer fehérjekomplexek. Fő alkotórészüket egy szenzorfehérje (NLR vagy más receptorok), gyulladással kapcsolatos kaspázok (pl. kaspáz-1) és a köztük lévő kapcsolatokat biztosító apoptózis-asszociált, kaspáz aktiváló és toborzó domént tartalmazó szemcseszerű fehérje (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain, ASC) nevű adaptorféherje. Az összes inflammaszóma típus közül a legszélesebb körben vizsgált, ezáltal a leginkább ismert az NLRP3 inflammaszóma. Ennek aktivációja alapvetően két lépésben valósul meg. Az első lépés során, amelyet primingnek nevezünk, az *NLRP3*, *IL1B* és *IL18* gének expresszió fokozódása, továbbá az NLRP3 poszttranszlációs módosításai következnek be. A második lépés az inflammaszóma teljes aktivációját és összeszerelődését foglalja magába.

A központi idegrendszerben az NLRP3 inflammaszóma aktivációja nemcsak öregedés során, hanem számos kóros állapotban is tetten érhető, beleértve a stroke-ot, a neurodegeneratív rendellenességeket és a perifériás idegsérülést is. A daganatképződés gyulladással kapcsolatos folyamataiban is alapvető szerepet játszanak az inflammaszómák, azonban agyi metasztázisok esetében nem ismert, hogy egyáltalán aktiválódnak-e inflammaszómák, és ha igen, akkor milyen sejtekben és milyen következményekkel jár az aktivációjuk.

## CÉLKITŰZÉSEK

---

Doktori munkám fő célja az inflammaszóma aktiváció szerepének vizsgálata volt az egyik legagresszívebb és legsikeresebb agyi áttét adó daganat altípus, a tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisainak kialakulásában. Ennek érdekében *in vitro* és *in vivo* módszerekkel, továbbá humán agyszövetmintákat használva az alábbi konkrét célokat foglalmaztuk meg:

- Kimutatni, hogy az NLRP3 inflammaszóma komponensek expresszálódnak-e az agyi mikrokörnyezetben a tripla negatív emlőkarcinóma metasztázisképzése során.
- Tisztázni, melyik sejttypusban fejeződnek ki az inflammaszóma komponensek, amelyek az IL-1 $\beta$  szekréció révén felelősek a tumor gyulladós környezetének kialakításában és fenntartásában.
- Megállapítani, milyen hatással van az NLRP3 inflammaszóma aktiváció és az inflammaszóma-függő IL-1 $\beta$  felszabadulás a tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisainak sorsára nézve az áttétképzés kezdeti fázisában.
- Meghatározni, milyen hatással van az NLRP3 inflammaszóma aktiváció farmakológiai gátlása az emlőkarcinóma metasztázisképzésére, valamint a tumor által indukált asztro- és mikroglíózisra.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

---

### Sejttenyésztés és kondicionált médiumok készítése

Kísérleteinkhez humán asztrociták, primér egér asztrociták, valamint humán (MDA-TGL és MDA-BrM2) és egér tripla negatív emlőkarcinóma (4T1-tdT) sejtvonalak tenyésztéseit használtuk. A kondicionált médiumok előállításához az adott sejttypusról 48 óra után gyűjtöttük össze a tápfolyadékot. Bizonyos esetekben a kondicionált médiumokat 2 napig MCC950 (1  $\mu$ M) NLRP3 inflammaszóma inhibitorral kezelt asztrocitákról gyűjtöttük össze.

### Sejtproliferációs esszé

Külön-külön az IL-1 $\beta$  és az asztrocita szekretóm tumorsejtek proliferációjára gyakorolt hatását a humán és egér emlőkarcinóma sejteken vizsgáltuk rekombináns IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), valamint a kondicionált médiumok hozzáadásával. Az NLRP3 inflammaszóma aktivációja révén felszabaduló asztrocita eredetű IL-1 $\beta$  proliferatív hatását is megvizsgáltuk MCC950 jelenlétében. Továbbá egyes kísérleti elrendezéseknél az IL-1 $\beta$  hatásának kivédése érdekében IL-1 $\beta$  neutralizáló antitestet (1,33  $\mu$ g/ml) adtunk a kondicionált médiumokhoz. A

tumorsejtek proliferációját minden esetben 4 napon keresztül követtük fáziskontraszt mikroszkópiával és a sejteket a Fiji képfeldolgozó szoftverrel manuálisan számoltuk le.

### **Kísérleti állatműtétek és kezelések**

Vizsgálatainkat  $20 \pm 3$  g-os fiatal felnőtt (8-12 hetes) nőstény BALB/c és FVB/Ant:TgCAG-yfp\_sb #27 (Venus)<sup>1</sup> egereken végeztük. Az általunk alkalmazott agyi metasztázis modellek egyike a 4T1-tdT sejtek ( $10^6$ ) intrakarotikus injektálásán alapult. A kísérleteket az oltás után 2, 5 és 7 nappal fejeztük be, amely időpontokat korábbi megfigyeléseink<sup>2</sup> alapján választottuk ki. A másik szisztémás metasztázis modellhez a Venus egereket intrakardiálisan oltottuk be 4T1-tdT sejtekkel ( $2 \times 10^6$ ). A kísérletet 7 nappal az oltás után zártuk. Az MCC950 hatásának vizsgálatához a tumorsejtekkel oltott egerek az oltást követő 4. és 6. nap között részesültek napi egyszeri intraperitoneális MCC950 (10 mg/ttkg) kezelésben.

### **Szövetminták előkészítése**

Az immunfluoreszcens festésekhez humán tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisú és kontroll szövetmintákat<sup>3</sup>, és 4T1-tdT tumorsejtekkel oltott egerek agyából készített koronális metszeteket használtunk fel.

### **Immuncito- és immunhisztokémia**

Az NLRP3, ASC és IL-1 $\beta$  expresszióját és lokalizációját immunfluoreszcenciával mutattuk ki. Elsődleges antitestként anti-NLRP3 poliklonális kecske, anti-ASC monoklonális egér, anti-IL-1 $\beta$  poliklonális nyúl, és anti-gliális fibrilláris savas fehérje (GFAP) poliklonális nyúl és monoklonális egér ellenanyagot használtunk. Másodlagos antitestként Alexa Fluor Plus-jelölt poliklonális szamár és kecske másodlagos ellenanyagokat alkalmaztunk és a sejtanyagot Hoechst 33342 festékkel jelöltük.

### **Fluoreszcens mikroszkópia**

A fluoreszcens képalkotást háromféle mikroszkóppal végeztük: Leica TCS SP5 lézerpásztázó mikroszkóppal<sup>4</sup>, VisiScope CSU-W1 spinning disk konfokális mikroszkóppal<sup>4</sup>, valamint egy konfokális és szuperrezolúciós képalkotásra alkalmas Zeiss Axio Observer mikroszkóppal. A célfehérjék kolokalizációjának meghatározására digitális képfeldolgozó műveleteket hajtottunk végre. Egyes esetekben a kolokalizáció százalékos arányát adtuk meg a festődések egyszerűbb értelmezhetősége végett.

### **Asztrogliális IL-1 $\beta$ expresszió kvantifikációja**

A tumorrally oltott és kontroll (Krebs-Ringer oldat) csoportba tartozó, 7 napos, vivóanyaggal és MCC950-nel kezelt BALB/c egerek agymintáin IL-1 $\beta$  és GFAP kettős

<sup>1</sup> Dr. Szabó Gábor jóvoltából (HUN-REN KOKI)

<sup>2</sup> Haskó és mtsai. (2019)

<sup>3</sup> Prof. Dr. Tiszlavicz László jóvoltából (SZTE SZAKK Pathologiai Intézet)

<sup>4</sup> HUN-REN SZBK Mikroszkópos Sejtanalízis Laboratóriumának támogatásával

immunfestést végeztünk. A konfokális mikroszkópos felvételeken kiszámoltuk a pixelszámot külön-külön a GFAP- és IL-1 $\beta$ -immunpozitív jelre, valamint meghatároztuk a kolokalizációra vonatkozó pixelek számát is.

### **Tumorméret meghatározás**

Az NLRP3 inflammaszóma-gátlás tumorméretre gyakorolt hatásának vizsgálatára a kontroll csoport és MCC950-nel kezelt csoportba tartozó állatok neokortikális területeiről készítettünk konfokális képeket. Ezekon a felvételeken a tdT-pozitív pixelszámok alapján meghatároztuk a tumorral fedett területet.

### **RNS izolálás és valós idejű polimeráz láncreakció (qPCR)**

Az NLRP3, a kaspáz-1 és az IL-1 $\beta$  gének aktivitásának vizsgálatához sejtenyészeteket és szövetmintákat használtunk fel. A humán asztrocita tenyészetekből, amelyek MDA-TGL vagy MDA-BrM2 kondicionált médiummal voltak megkezelve MCC950 jelenlétében vagy hiányában, és a 4T1-tdT sejtekkel oltott, majd MCC950-nel kezelt és kontroll BALB/c egerek agyféltekéiből totál RNS-t izoláltunk a Direct-zol RNA Miniprep Plus Kit segítségével a gyártó protokollja szerint. Ezután a Maxima First Strand cDNA Synthesis Kitet használva reverz transzkripciót végeztünk. A qPCR vizsgálatokat a Luminaris HiGreen Master Mixszel végeztük egy Bio-Rad CFX96 készüléken. Mindegyik gén kifejeződését a GAPDH-hoz mint belső kontrollhoz normalizáltuk. A génexpressziós változásokat a  $\Delta\Delta C_t$  módszerrel értékeltük ki és az eredményeket a Microsoft Excel 2016 programmal ábráztuk.

### **Fehérjeminták előkészítése és Western blot**

A 4T1-tdT sejtekkel oltott 7 napos BALB/c egerek agyféltekéit homogenizáltuk és a felülúszó fehérjekoncentrációjának meghatározása után nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézist végeztünk, majd a fehérjéket polivinilidén-fluorid membránra blottoltuk. A membránokat anti-IL-1 $\beta$  poliklonális nyúl és anti- $\beta$ -aktin monoklonális egér primer antitestben, majd torna-peroxidázzal konjugált poliklonális kecske szekunder antitestben inkubáltuk. A fehérjéket kemilumineszcens módon tettük láthatóvá egy ChemiDoc MP System géldokumentációs készülékben. A denzitometrást az ImageLab szoftverrel végeztük, és az eredményeket a  $\beta$ -aktin háztartási fehérje szintjére normalizáltuk.

### **Statisztikai kiértékelés**

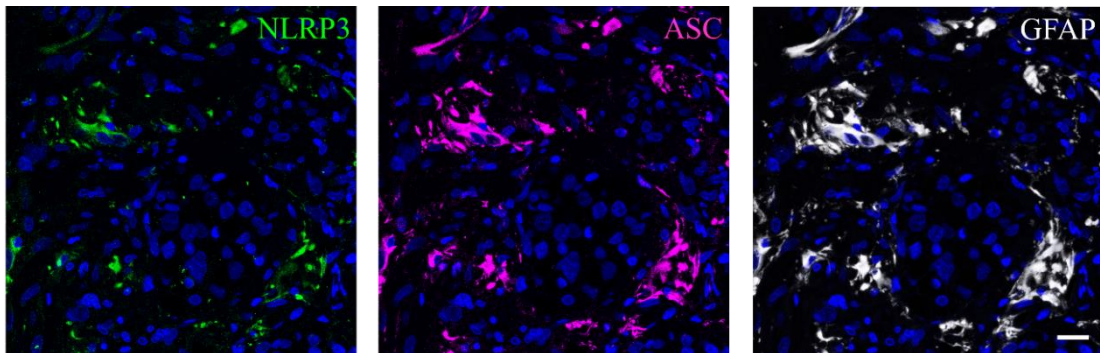
Adataink statisztikai analíziséhez a GraphPad Prism szoftvert használtuk. Az alkalmazott statisztikai módszert az adott ábra aláírásoknál minden esetben feltüntettük. A 0,05-nél kisebb P-értéket szignifikánsnak tekintettük.

## EREDMÉNYEK

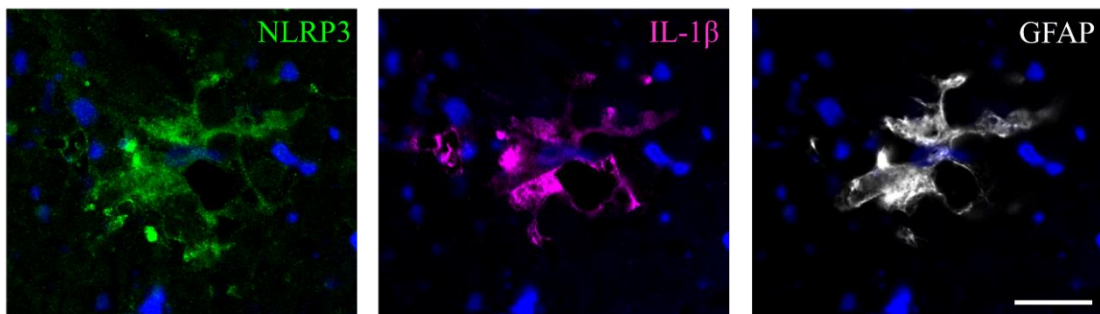
### Az NLRP3 inflammaszóma komponensek *in vivo* expressziója

Kísérleteink első lépéseként megvizsgáltuk, hogy a tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisaiban történik-e inflammaszóma-fehérje expresszió, továbbá meghatároztuk az inflammaszóma lokalizációját, hogy azonosíthassuk azokat a sejt típusokat, amelyek részt vesznek az agyban megtelepedett tumorok gyulladásos környezetének kialakításában és fenntartásában. Ehhez először tripla negatív emlőkarcinóma áttéteket hordozó humán agypreparátumokon immunfestést végeztünk, amellyel kimutattuk, hogy az NLRP3 és ASC nagymértékben és specifikusan a peritumorális asztrocitákban expresszálódik (**1. ábra, A panel**). Az inflammaszóma priming további bizonyítéka volt, hogy a metasztázis körüli GFAP<sup>+</sup>/NLRP3<sup>+</sup> asztrociták markáns IL-1 $\beta$  expressziót mutattak (**1. ábra, B panel**). Az inflammaszóma-asszociált fehérjéket azonban sem a tumorsejtekben, sem az asztrocitákon kívül más strómális sejt típusban, sem a tumoroktól távolabb lévő gliasejtekben nem figyeltük meg. Továbbá a kontroll, egészséges humán asztrociták immunnegatívak voltak mind az NLRP3-ra, mind az IL-1 $\beta$ -ra.

A

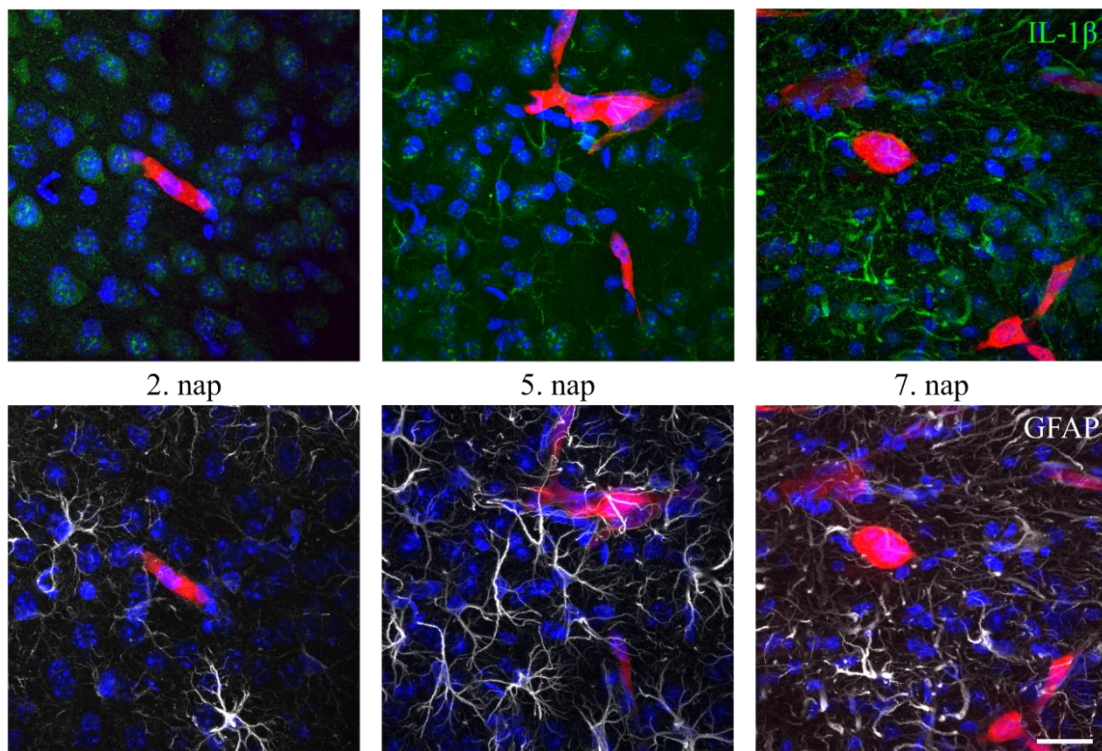


B



**1. ábra:** Az inflammaszóma komponensek expressziója a peritumorális asztrocitákban humán tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisaiban. **A)** Az NLRP3<sup>+</sup> pixelek 95,3%-a, az ASC<sup>+</sup> pixelek 98,8%-a kolokalizált a GFAP jellel. **B)** Az NLRP3<sup>+</sup> pixelek 76%-a, az IL-1 $\beta$ <sup>+</sup> pixelek 74%-a kolokalizált a GFAP jellel. Skála: 20  $\mu$ m. Zöld: NLRP3, magenta: ASC (**A**) vagy IL-1 $\beta$  (**B**), fehér: GFAP, kék: sejtmagok (Hoechst 33342).

Az agyi áttétképzést kísérő potenciális inflammaszóma aktiváció tanulmányozására 4T1-tdT emlőkarcinóma sejteket injektáltunk BALB/c egerek jobb oldali *arteria carotis communis*ába. Két nappal az oltást követően a neokortikális területeken nem detektáltunk IL-1 $\beta$  jelet. Ez azzal magyarázható, hogy ekkor az agyi kapillárisokban megrekedt tumorsejtek többsége még az érlumenben található. A vér-agy gáton való átvándorlásuk idején, vagyis az 5. napon az IL-1 $\beta$  már megjelent a metasztatikus léziókat határoló GFAP-pozitív asztrocitákban, míg a 7. napon az IL-1 $\beta$  expressziója sokkal erősebb volt a korábbi időpontban képest (**2. ábra**). Az IL-1 $\beta$  expressziós szintje a tumor méretével is korrelált, méghozzá azzal arányosan fokozódott. Ezzel párhuzamosan az NLRP3 expressziója is megnőtt a tumorokat körülvevő asztrocitákban hasonlóan a humán metasztatikus agymintákban megfigyelttel.

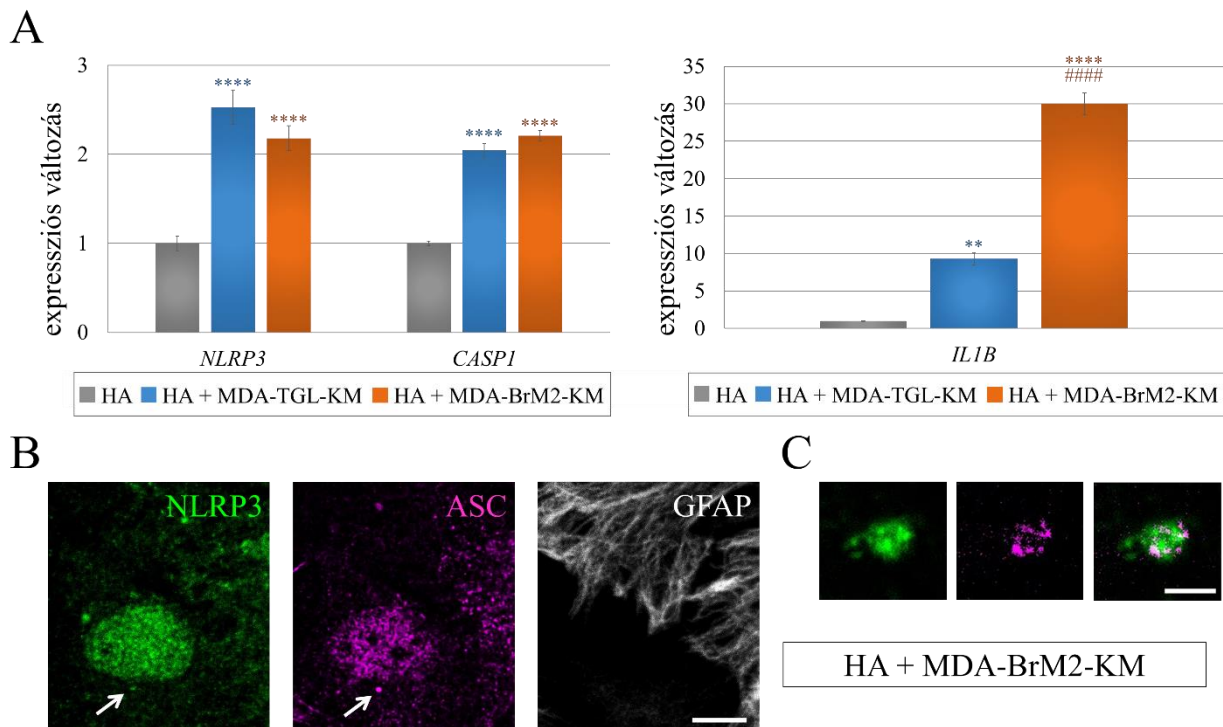


**2. ábra:** Az inflammaszóma komponensek expresszió növekedése a peritumorális asztrocitákban egér tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisaiban. Az IL-1 $\beta$  expresszió fokozódik a 4T1-tdT tumorsejtek oltását követő 2., 5. és 7. napon. Az 5. napon a IL-1 $\beta$ -pozitív pixelek 77%-a kolokalizált a GFAP-pozitív pixelekkel, míg a GFAP-pozitív pixelek 7%-a volt IL-1 $\beta$ -pozitív. A 7. napon ezek az értékek 79%-ra és 28%-ra emelkedtek. Skála: 20  $\mu$ m. Piros: 4T1-tdT, zöld: IL-1 $\beta$ , fehér: GFAP, kék: sejtmagok (Hoechst 33342).

### Az NLRP3 inflammaszóma komponensek *in vitro* expressziója

A tumor indukálta inflammaszóma aktiváció mechanizmusának feltárására *in vitro* kísérleteket folytattunk, amelyekkel a mellráksejtek által szekretált faktorok inflammaszóma komponensek primingjára kifejtett hatását kívántuk megérteni az asztrocitákban.

Eredményeink alapján a tumorsejt-kondicionált médium az *NLRP3* és *CASP1* expressziójának több, mint 2-szeres növekedését okozta az asztrocitákban a kontroll sejtekben mért szinthez képest. Az *IL1B* expresszió növekedése ennél sokkal látványosabb volt. Szintje közel 10-szeresére emelkedett az MDA-TGL kondicionált médiummal kezelt asztrocitákban, és körülbelül 30-szorosára az MDA-BrM2 sejtek médiumával kezelt asztrocitákban (**3. ábra, A panel**). Az inflammaszóma komponensek fehérjeszintű expressziós változásait is megvizsgálva azt tapasztaltuk, hogy az NLRP3 fokozott expressziója elsősorban a tumorsejt-kondicionált médiummal kezelt asztrociták sejtmagjában jelent meg. Azonban az inflammaszóma összeszerelődés közvetlenebb bizonyítékeként szolgált, hogy NLRP3<sup>+</sup>/ASC<sup>+</sup> szemcseszerű struktúrák (speck) jelentek meg a sejtmag körül (**3. ábra, B és C panel**), amelyek a szakirodalomban leírtakkal összhangban a mikrométeres tartományba estek.



**3. ábra: Az emlőcarcinóma sejtek által kibocsátott faktorok hatása az NLRP3 inflammaszóma primingjára és aktivációjára humán asztrocita tenyészetben. A) Az *NLRP3*, *CASP1* és *IL1B* gének expresszió fokozódása az MDA-kondicionált médiummal (MDA-KM) kezelt humán asztrocitákban (HA). A *GAPDH*-ra normalizált expressziós változásokat átlag  $\pm$  SEM-ként ábrázoltuk (N = 3 független kísérlet, egyenként három biológiai replikátummal). \*\*  $P \leq 0,01$  és \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$  a kontrollhoz (HA) hasonlítva; #####  $P \leq 0,0001$  a „HA + MDA-TGL-KM”-hoz hasonlítva (ANOVA és Fisher-féle LSD post-hoc teszt). B) NLRP3- és ASC-immunreaktív perinukleáris speck (nyíl) asztrocita tenyészetben, amely 24 órán át az MDA-BrM2 sejtek médiumának volt kitéve. Skála: 10  $\mu$ m. Zöld: NLRP3, magenta: ASC, fehér, GFAP. C) A speckról készült, nagyított konfokális (NLRP3 – zöld) és szuperrezolúciós (ASC – magenta) mikroszkópos felvétel. Skála: 2  $\mu$ m.**

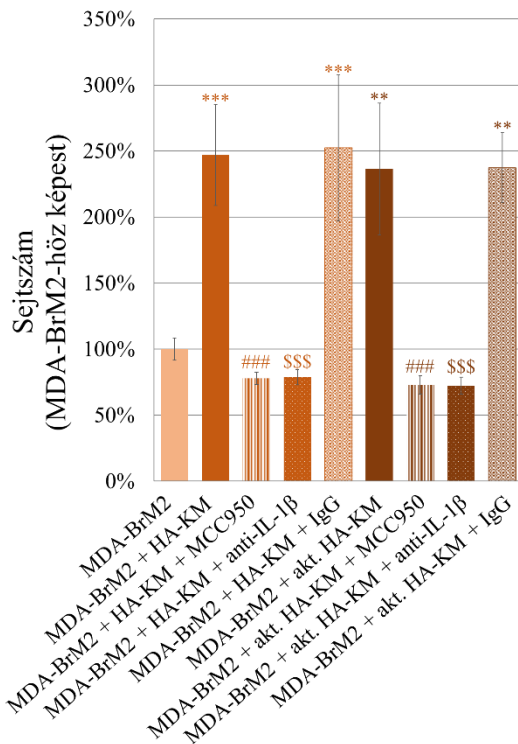


### **Az NLRP3 inflammaszóma aktiváció *in vitro* funkcionális vizsgálata**

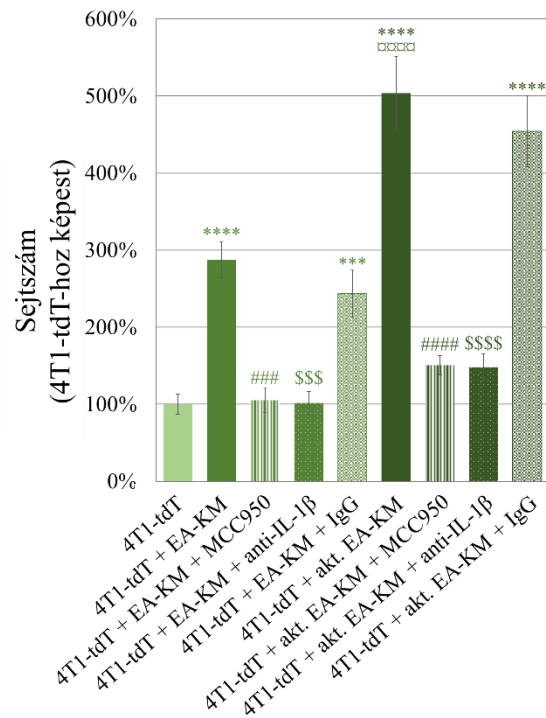
Expressziós vizsgálataink eredményei alapján feltételeztük, hogy az NLRP3 inflammaszóma által termelt IL-1 $\beta$  felszabadulása az asztrocitákból felelős lehet a tumorsejtek proliferációjáért. Ennek igazolására rekombináns IL-1 $\beta$ -t adtunk a humán és egér emlőkarcinóma sejtenyészethez. A kezelés mindhárom tumorsejt típus proliferációját egyformán serkentette napi szinten emelkedő trend mentén. Ehhez hasonlóan az asztrocita-kondicionált médium és a tumorsejt-aktivált asztrocita-kondicionált médium facilitálta mind a parentális és agyi metasztatikus MDA sejtek, mind az egér 4T1-tdT sejtek proliferációját.

Annak bizonyítására, hogy az asztrocita-kondicionált médium inflammaszóma-kapcsolt IL-1 $\beta$  szekréción keresztül fokozza az emlőráksejtek proliferációját, két eltérő ponton avatkoztunk be az inflammaszóma szignalizációba. Az egyik ilyen pont az asztrocitákban bekövetkező NLRP3 inflammaszóma aktiváció közvetlen, specifikus blokkolása volt az MCC950 inhibitorral, a másik pedig az asztrociták által kibocsátott IL-1 $\beta$  neutralizálása volt anti-IL-1 $\beta$  ellenanyaggal. Mindkét kezelés egyaránt megakadályozta a humán és egér tumorsejtek proliferációját, amelyet az asztrocita-kondicionált médium indukált. Azoknak a tumorsejteknek a száma, amelyek az MCC950-nel kezelt naiv vagy aktivált asztrocita-kondicionált médiumban voltak tenyésztve, közel azonos volt a kontroll sejtek számával. Az MCC950 kezeléshez hasonlóan az IL-1 $\beta$  semlegesítése is szinte teljesen meggátolta az asztrocita-kondicionált médium pro-proliferatív hatását. Ezzel ellentétben a neutralizáló antitest negatív kontrolljaként használt immunglobulin G (IgG) nem váltott ki ilyen jellegű hatást (**4. ábra, A és B panel**). Ezek az eredmények egyértelműen rámutatnak arra, hogy az inflammaszóma aktiváció az asztrocitákban az IL-1 $\beta$  szekréciójához vezet, amely serkenti a mellráksejtek proliferációját.

A



B

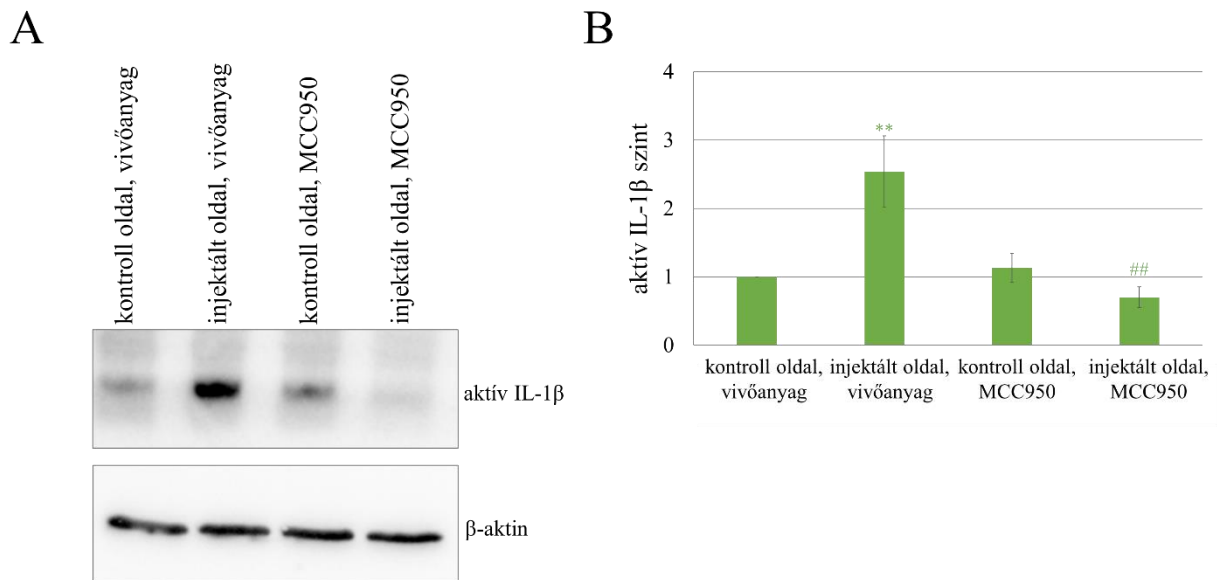


**4. ábra: Az asztrocita-eredetű IL-1β hatása az emlőkarcinóma sejtek proliferációjára.** Az MDA-BrM2 sejtek (A) és a 4T1-tdT sejtek (B) proliferációjának vizsgálata asztrocita-kondicionált médium (HA-KM, EA-KM) és tumorsejt-aktivált asztrocita-kondicionált médium (akt. HA-KM, akt. EA-KM) hatására önmagában vagy kiegészítve MCC950-nel, anti-IL-1β-val vagy IgG-vel. Az egyes csoportok sejtszámának kontrollhoz (MDA-BrM2, 4T1-tdT) viszonyított 4. napi százalékos arányát átlag ± SEM-ként tüntettük fel (N = 2 független kísérlet, egyenként 2 biológiai replikátummal, replikátumonként 5 látómezőből készített felvétel alapján). \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$  és \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$  a kontrollhoz képest; ###  $P \leq 0,001$  a KM-hez vagy az akt. KM-hez képest; ####  $P \leq 0,0001$  az akt. KM-hez képest; \$\$\$  $P \leq 0,001$  a KM-hez és KM + IgG-hez vagy az akt. KM-hez és akt. KM + IgG-hez képest; \$\$\$\$  $P \leq 0,0001$  az akt. KM-hez és akt. KM + IgG-hez képest; □□□□  $P \leq 0,0001$  a KM-hez képest (ANOVA és Fisher-féle LSD post-hoc teszt).

### Az inflammaszóma aktiváció *in vivo* funkcionális vizsgálata

Következő lépésben az NLRP3 inflammaszóma aktivációját és farmakológiai gátlásának hatását vizsgáltuk *in vivo* agyi metasztázis modelljeinkben. A 4T1-tdT sejtekkel oltott egerek az injekciót követő 4. és 6. nap között kaptak MCC950-et, ami azt az időintervallumot fedi le, amikor a tumorsejtek többnyire a metasztatikus kaszkád extravazációs fázisában és/vagy azután vannak. Ahogy az előzetes immunfluoreszcens vizsgálataink alapján várható volt, az agyi metasztázisképzés az *Nlrp3* és az *Il1b* expresszió növekedésével járt együtt a tumor károsította agyféltekén a kontrollként szolgáló, tumormentes, kontralaterális féltekéhez képest. Az MCC950 azonban csökkenteni tudta mindkét gén tumor indukálta upregulációját. Mivel az IL-1β inaktív prekurzora és aktív, érett

formája immunfluoreszcenciával nem különböztethető meg, western blot vizsgálatokat végeztünk, amely segít az IL-1 $\beta$  formák molekulatömeg szerinti azonosításában. Az inflammaszóma aktiváció eklatáns jele, hogy az agyi metasztázisok megjelenése után az érintett hemiszfériumban 2,5-ször magasabb aktív IL-1 $\beta$  szintet mértünk a bazális szinthez képest. Ezzel szemben az aktív IL-1 $\beta$  mennyiségét az MCC950 szignifikáns mértékben, 73%-kal csökkentette az injektált oldalon (5. ábra, A és B panel).

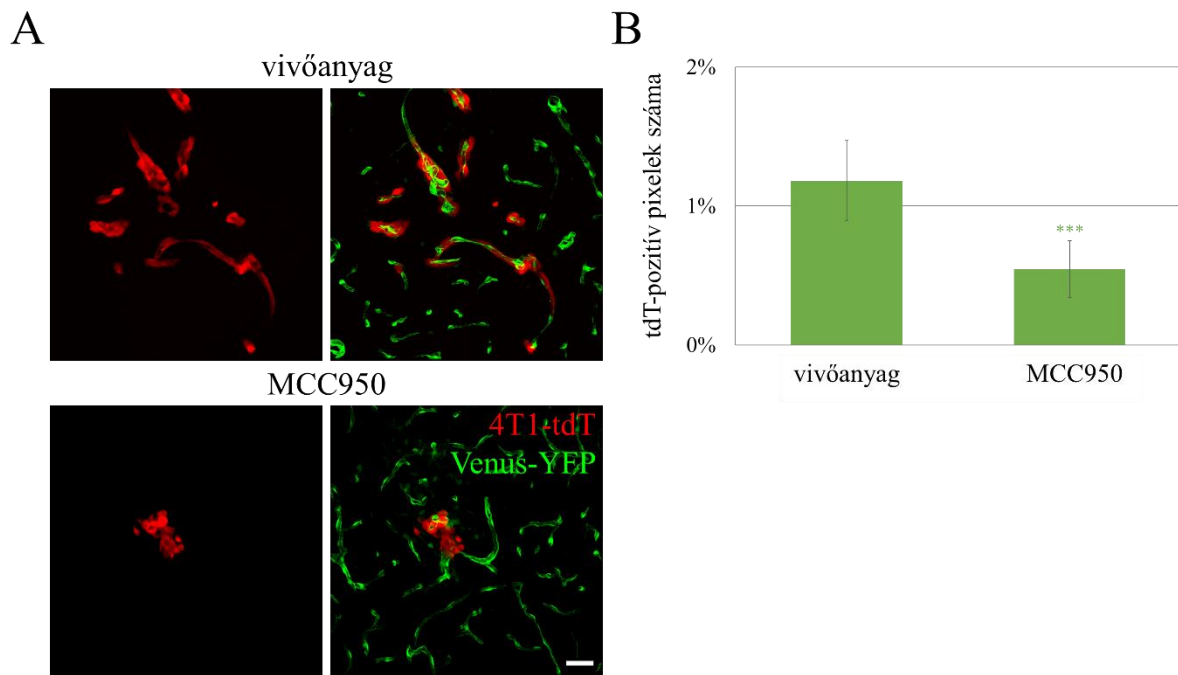


**5. ábra: NLRP3 inflammaszóma aktiváció tripla negatív emlőkarcinómát hordozó egerek agyában. A)** Reprezentatív western blot szemlélteti az aktív IL-1 $\beta$  markáns expresszióját és az MCC950 kezelésre adott aktív IL-1 $\beta$  szintesökkenést az injektált oldalon **B)** Az aktív IL-1 $\beta$  szint kvantifikációja a  $\beta$ -aktin expressziós szintjéhez viszonyítva. Az értékeket átlag  $\pm$  SEM-ként ábrázoltuk (N = 3 független kísérlet). \*\*  $P \leq 0,01$  a „kontroll oldal, vivőanyag”-hoz képest; ##  $P \leq 0,01$  az „injektált oldal, vivőanyag”-hoz képest (ANOVA és Fisher-féle LSD post-hoc teszt).

Ezután megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja az MCC950 az IL-1 $\beta$  expresszióját az asztrocitákban. Az NLRP3 gátlása gyakorlatilag megakadályozta a peritumorális asztrociták IL-1 $\beta$  upregulációját, amelyet az immunfluoreszcens festéseken az IL-1 $\beta^+$ /GFAP $^+$  pixelek százalékos arányának mintegy 75%-os csökkenése mutatott.

*In vivo* vizsgálataink másodsorban arra irányultak, hogy felmérjük, milyen hatással van az NLRP3 inflammaszóma gátlása a tripla negatív emlőkarcinóma áttétképzése során fellépő reaktív asztro- és mikrogliózisra. Az IL-1 $\beta$  expresszió csökkentése mellett az MCC950 ugyan képes volt az asztrocita reaktivitást mérsékelni, de ez a változás nem volt szignifikáns. Ezzel szemben az MCC950 kezelés a mikrogliózisban már szignifikáns mértékű csökkenést okozott a 4T1-tdT tumort hordozó egerek agyában.

Végezetül kíváncsiak voltunk arra, hogy az NLRP3 inflammaszóma aktivációjának gátlása milyen hatást képes kifejteni a tumoros léziók méretére az agyban. Az MCC950 szisztémás alkalmazása a mellráksejtekkel oltott egerekben jelentősen visszaszorította a tumorsejtek perivaszkuláris növekedését. A tdT-pozitív pixelek száma, vagyis a tumorral fedett terület több, mint 50%-kal csökkent az MCC950-nel kezelt egerekben a vivőanyaggal kezelt csoporthoz képest (6. ábra, A és B panel).



**6. ábra: Az MCC950 hatása az agyi metasztatikus tumorok növekedésére. A)** A 4T1-tdT tumorsejtekkel oltott, vivőanyaggal (DMSO PBS-ben) kezelt csoport és a MCC950-nel (10 mg/kg) kezelt csoport összehasonlítása mutatja, hogy az MCC950 az agyi érhálózat (Venus-YFP jel – zöld) mentén fejlődő tumorok (tdT jel – piros) növekedését visszafogta. Skála: 20  $\mu$ m. **B)** A tdT-pozitív pixelek a tumorral borított területek arányát mutatják az összes pixelhez képest. A százalékos értékeket átlag  $\pm$  SEM-ként ábrázoltuk (N = 3 független kísérlet, n = 5 metszet/állat, 16 ROI/5 metszet). \*\*\* P<0,001 (párosítatlan Student-féle t-próba).

Eredményeink összességében tehát azt mutatják, hogy az NLRP3 inflammaszóma gátlásával nemcsak az inflammaszóma komponensek génexpresszióját lehet csökkenteni a peritumorális asztrocitákban, hanem az azokból felszabaduló aktív IL-1 $\beta$  szintjét is. Ezáltal pedig le lehet lassítani a metasztatikus emlődaganatok növekedését az agyban.

## ÖSSZEFOGLALÁS

---

Az öregedés az ember esetében egy elkerülhetetlen, törvényszerűen progresszív, természetes biológiai folyamat, amelynek egyik fontos pillére az inflammaging, egy krónikus, alacsony szintű gyulladással járó folyamat. A legtöbb központi idegrendszeri betegséghez, például a stroke-hoz és a neurodegeneratív megbetegedésekhez társul krónikus gyulladás, továbbá a tumorigenezishez is erősen hozzájárul. Az agyban kifejlődő másodlagos daganatoknak, köztük a tripla negatív emlőkarcinóma eredetű áttéteknek a prognózisa kiemelkedően rossz, ezért ennek javítása érdekében elengedhetetlen azoknak a folyamatoknak a megértése, amelyek a tumorsejtek és a neurovaszkuláris egység sejtjei között jönnek létre. A gyulladáshoz központi mediátorainak tekintett inflammaszómnak, különösen az NLRP3 inflammaszómnak a szerepét számos primer és extracerebrális szekunder tumor esetén leírták már, azonban az agyi metasztázisokban ez megválaszolatlan kérdés. Így ezen mechanizmusok feltárása és a potenciális terápiás célpontok azonosítása fontos és aktuális kutatási terület.

Vizsgálataink során *in vivo* agyi metasztázis modellek, sejtenyészeti modellek, valamint humán agyszövet minták felhasználásával megállapítottuk, hogy az NLRP3 inflammaszóma komponensek és a proinflammatorikus IL-1 $\beta$  nagymértékben és specifikusan a peritumorális asztrocitákban expresszálódik tripla negatív emlőkarcinóma agyi áttéteiben. Megfigyeltük, hogy a karcinóma sejtekből felszabaduló szolubilis faktorok az NLRP3 és az IL-1 $\beta$  primingjét és aktivációját indukálták az asztrocitákban, míg az asztrocitákból származó mediátorok fokozták a metasztázisú sejtek proliferációját. Emellett az NLRP3 inflammaszóma aktivációjának gátlása MCC950 segítségével vagy az IL-1 $\beta$  neutralizálása megakadályozta a tumorsejtek fokozott proliferációját. *In vivo* az MCC950 csökkentette az IL-1 $\beta$  expresszióját a peritumorális asztrocitákban, valamint az inflammaszóma komponensek és az aktív IL-1 $\beta$  szintjét. Mindenekelőtt azonban legfontosabb eredményünk, hogy az MCC950-nel kezelt egerek agyában jelentősen csökkenteni tudtuk az áttétes daganatok növekedését. Összességében tehát az asztrociták a tripla negatív emlőkarcinóma sejtek jelenlétére NLRP3 inflammaszóma aktivációval és IL-1 $\beta$  szekrécióval reagálnak. Ez lehet az egyik mechanizmus, amelyen keresztül hozzájárulnak a tripla negatív emlőkarcinóma progressziójához az agyban. Eredményeink alapján levonható az a következtetés, miszerint az inflammaszóma farmakológiai célzása új stratégiát jelenthet az agyi áttétek kezelésében.

## SUMMARY

---

Human aging is an inevitable, inescapably progressive, natural biological process, of which inflammaging, a chronic, low-level inflammatory process, is an important pillar. Chronic inflammation is associated with most central nervous system diseases, such as stroke and neurodegenerative diseases, and is also a major contributor to tumorigenesis. The prognosis of secondary tumors developing in the brain, including metastases from triple-negative breast carcinoma, is extremely poor. Therefore, understanding the processes that occur between tumor cells and cells of the neurovascular unit is essential to improve prognosis in patients with such malignancies. The role of inflammasomes, in particular the NLRP3 inflammasome, considered as central mediators of inflammatory responses, has been studied in many primary and extracerebral secondary tumours, but in brain metastases it remains an unanswered question. Thus, the elucidation of these mechanisms and the identification of potential therapeutic targets is an important and ongoing area of research.

By using *in vivo* and *in vitro* models, as well as human samples, we found NLRP3 inflammasome components and IL-1 $\beta$  to be highly and specifically expressed in peritumoral astrocytes. Soluble factors from TNBC cells induced upregulation and activation of NLRP3 and IL-1 $\beta$  in astrocytes, while astrocyte-derived mediators augmented the proliferation of metastatic cells. In addition, inhibition of NLRP3 inflammasome activity using MCC950 or dampening the downstream effect of IL-1 $\beta$  prevented the proliferation increase in cancer cells. *In vivo*, MCC950 reduced IL-1 $\beta$  expression in peritumoral astrocytes, as well as the levels of inflammasome components and active IL-1 $\beta$ . Most importantly, significantly retarded growth of brain metastatic tumors was observed in mice treated with MCC950. Overall, astrocytes contribute to triple-negative breast cancer progression in the brain through activation of the NLRP3 inflammasome and consequent IL-1 $\beta$  release. This may be one of the mechanisms by which they contribute to progression of triple-negative breast cancer in the brain. Based on our results, we conclude that pharmacological targeting of inflammasomes may become a new strategy in controlling brain metastatic diseases.

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

---

MTMT azonosító: 10062814

Kumulatív hatástényező (IF): 57,197; Összes hivatkozások száma: 253; Hirsch index: 7

### A disszertáció alapjául szolgáló publikációk

- I. **Mészáros Á**, Molnár K, Fazakas Cs, 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(1):155 (2023)  
IF: 7,1
- II. **Mészáros Á**, Molnár K, Nógrádi B, Hernádi Zs, Nyúl-Tóth Á, Wilhelm I, Krizbai IA.  
Neurovascular Inflammaging in Health and Disease  
*Cells.* 9(7):1614 (2020)  
IF: 6,6

### Egyéb publikációk

- I. Molnár K, Nógrádi B, Kristóf R, **Mészáros Á**, Pajer K, Siklós L, Nógrádi A, Wilhelm I, Krizbai IA.  
Motoneuronal inflammasome activation triggers excessive neuroinflammation and impedes regeneration after sciatic nerve injury  
*J Neuroinflammation.* 19(1):68 (2022)  
IF: 9,3
- II. Kozma M, **Mészáros Á**, Nyúl-Tóth Á, Molnár K, Costea L, Hernádi Zs, Fazakas Cs, Farkas AE, Wilhelm I, Krizbai IA.  
Cerebral Pericytes and Endothelial Cells Communicate through Inflammasome-Dependent Signals  
*Int J Mol Sci.* 22(11):6122 (2021)  
IF: 6,208
- III. Molnár K, **Mészáros Á**, Fazakas Cs, Kozma M, Győri F, Reisz Z, Tiszlavicz L, Farkas AE, Nyúl-Tóth Á, Haskó J, Krizbai IA, Wilhelm I.  
Pericyte-secreted IGF2 promotes breast cancer brain metastasis formation  
*Mol Oncol.* 14(9):2040-2057 (2020)  
IF: 6,603
- IV. Costea L, **Mészáros Á**, Bauer H, Bauer H-C, Traweger A, Wilhelm I, Farkas AE, Krizbai IA.  
The Blood-Brain Barrier and Its Intercellular Junctions in Age-Related Brain Disorders  
*Int J Mol Sci.* 20(21):5472 (2019)  
IF: 4,556

- V. Haskó J, Fazakas Cs, Molnár K, **Mészáros Á**, Patai R, Szabó G, Erdélyi F, Nyúl-Tóth Á, Győri F, Kozma M, Farkas AE, Krizbai IA, Wilhelm I.  
Response of the neurovascular unit to brain metastatic breast cancer cells  
Acta Neuropathol Commun. 7(1):133 (2019)  
IF: 6,270
- VI. Herman H, Fazakas Cs, Haskó J, Molnár K, **Mészáros Á**, Nyúl-Tóth Á, Szabó G, Erdélyi F, Ardelean A, Hermenean A, Krizbai IA, Wilhelm I.  
Paracellular and transcellular migration of metastatic cells through the cerebral endothelium  
J Cell Mol Med. 23(4):2619-2631 (2019)  
IF: 4,486
- VII. David F, Çarçak N, Furdan Sz, Onat F, Gould T, **Mészáros Á**, Di Giovanni G, Hernández VM, Chan CS, Lőrincz ML, Crunelli V.  
Suppression of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channel Function in Thalamocortical Neurons Prevents Genetically Determined and Pharmacologically Induced Absence Seizures  
J Neurosci. 38(30):6615-6627 (2018)  
IF: 6,074
- VIII. Nyúl-Tóth Á, **Mészáros Á**, Győri F, Wilhelm I, Krizbai IA.  
A vér-agy gát területi heterogenitásainak vizsgálata emberben és egérben  
Orvostud. Ért. 91(1):26-36 (2018)  
IF: 0



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

---

Mindenekelőtt szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, Prof. Dr. Krizbai Istvánnak és Dr. Lőrincz László Magornak, hogy helyet és lehetőséget biztosítottak nekem a fejlődésre, hogy egyengették az utam, hogy találékonyságra és kitartásra ösztönöztek, hogy kutatási szemléletemet formálták a doktorandusz évek alatt.

Külön köszönettel tartozom volt és jelenlegi kollégáimnak mindkét kutatócsoportból, akik megtanítottak a kutatómunkához szükséges elméleti és gyakorlati alapokra. Végtelenül hálás vagyok Dr. Mészáros-Molnár Kingának, aki nemcsak mindennapi társam, hanem óriási támaszom is belém vetett töretlen hite és szívből jövő önzetlensége révén. Köszönetet mondok Dr. Wilhelm Imolának, akihez mindig fordulhattam elméleti és gyakorlati tanácsért a kísérletes munkával kapcsolatban. Köszönöm Dr. Fazakas Csillának a munkámhoz nyújtott segítséget, a hasznos ötleteket, a bensőséges beszélgetéseket. Hálával tartozom a Neurovaszkuláris Egység Kutatócsoport egykori és jelenlegi munkatársainak, kifejezetten Dr. Haskó Jánosnak, Dr. Nyúl-Tóth Ádámnak, Kozma Mihálynak, Dr. Farkas Elek Attilának és Dudás Tamásnak a sok segítségért, a baráti beszélgetésekért és a motiváló csapatmunkáért. Továbbá köszönöm Dr. Horváth-Furdan Szabinának és Dr. Molnár Benedeknek a temérdek segítséget a PhD-s éveim kezdetén. Hasonlóképpen hatalmas köszönet jár volt társtémavezetőmnek, Dr. Karri Lämsának a szakmai támogatásáért, valamint Dr. Dimitrios Kotzadimitriounak az útmutatásáért és segítségéért.

Köszönöm a Biofizikai Intézet valamennyi dolgozójának a jó munkához nélkülözhetetlen kellemes és barátságos légkört.

Köszönetet mondok munkacsoportunk együttműködő partnereinek és minden társszerzőnek, különösképpen Prof. Dr. Tizslavicz Lászlónak, a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Pathológiai Intézet igazgatójának a humán agymintákért és Dr. Nógrádi Bernátnak jelen munkában és más projekteken nyújtott segítségéért és hasznos meglátásaiért.

Köszönöm barátaimnak, név szerint Áronnak, Gabinak, Szabinának, Gábornak és Katusnak a mindenkor feltétlen támaszt és szeretetet.

Végezetül hálás köszönettel tartozom családom minden tagjának, akik nélkül nem jutottam volna oda, ahol ma tartok. Külön szeretném megköszönni kislányomnak, Hollinak, hogy nagyban hozzájárult az értekezés elkészüléséhez. Egyúttal hálát szeretnék adni Édesanyámnak, aki határtalan türelemmel, támogatással és megértéssel állt hozzám és mindig biztatott az idáig vezető rögös úton.

## Társszerzői nyilatkozat

Kijelentem, hogy ismerem **Mészáros Ádám** PhD fokozatra pályázó doktorjelölt „**Az inflammaszóma aktiváció a neurovaszkuláris egységben: az inflammingtól a tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisáig**” című disszertációját.

Felelős szerzőként kijelentem, hogy Mészáros Ádám jelentősen hozzájárult az alább felsorolt tudományos publikációk eredményéhez.

**Mészáros Á**, Molnár K, Fazakas Cs, 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(1):155 (2023)

IF: 7,1

**Mészáros Á**, Molnár K, Nógrádi B, Hernádi Zs, Nyúl-Tóth Á, Wilhelm I, Krizbai IA.  
Neurovascular Inflammation in Health and Disease

*Cells.* 9(7):1614 (2020)

IF: 6,6

Igazolom, hogy az ebben a dolgozatban bemutatott eredményeket egyetlen más PhD dolgozat sem mutatta be és a jövőben sem használják fel tudományos fokozat megszerzéséhez.

Szeged, 2024.07.03.

Prof. Dr. Krizbai István

tudományos tanácsadó

HUN-REN SZBK, Biofizikai Intézet