

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

Doktori (Ph.D.) értekezés

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

2024

Szeged

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	8
1.1. Öregedés	8
1.2. Inflammaging	8
1.2.1. Inflammaging mechanizmusa	9
1.3. Gyulladás és mintázatfelismerő receptorok az öregedésben	11
1.4. Inflammaszómák	12
1.4.1. NLRP3 inflammaszóma	15
1.4.2. NLRP3 inflammaszóma szerepe a tumoros folyamatokban	17
1.5. Tumorok	19
1.5.1. Primer tumorok	19
1.5.2. Szekunder vagy metasztatikus tumorok	19
1.6. Agyi áttétek	20
1.6.1. Tumorsejtek agyi vaszkuláris transzmigrációja	21
1.6.2. A metasztatikus tumorsejtek interakciói az NVE elemeivel	23
2. Célkitűzések	26
3. Anyagok és módszerek	27
3.1. Sejttenyésztés	27
3.1.1. Humán asztrocita tenyésztés	27
3.1.2. Egér asztrociták izolálása és tenyésztése	27
3.1.3. Tumor sejtvonalak tenyésztése	27
3.1.4. Kondicionált médiumok készítése	28
3.1.5. Sejtproliferációs esszé	30
3.2. Felhasznált állatok	30
3.3. Kísérleti emlőadenokarcinóma agyi metasztázis modell	31
3.4. <i>In vivo</i> inflammaszóma gátlás	34
3.5. Szövetfixálás és metszés	35
3.6. Immuncito- és immunhisztokémia	36
3.7. Fluoreszcens mikroszkópia	36
3.8. Asztroglialis IL-1 β expresszió kvantifikációja	37
3.9. Tumorméret meghatározás	38
3.10. Mikrogliózis mértékének meghatározása	38
3.11. RNS izolálás és valós idejű polimeráz láncreakció (qPCR)	38
3.12. Fehérjeminták előkészítése és Western blot	40

3.13. Statisztikai kiértékelés.....	42
4. Eredmények.....	43
4.1. Az NLRP3 inflammaszóma komponenseinek expressziós vizsgálata.....	43
4.1.1. Az NLRP3 inflammaszóma komponensek <i>in vivo</i> expressziója.....	43
4.1.2. Az NLRP3 inflammaszóma komponensek <i>in vitro</i> expressziója.....	47
4.2. Az NLRP3 inflammaszóma aktiváció funkcionális vizsgálata <i>in vitro</i> körülmények között.....	50
4.3. Az inflammaszóma aktiváció funkcionális vizsgálata <i>in vivo</i> körülmények között.....	56
5. Megbeszélés.....	61
6. Köszönetnyilvánítás.....	70
7. Irodalomjegyzék.....	72
8. Összefoglalás.....	89
9. Summary.....	92

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

4T1-tdT	tdTomato-t expresszáló egér tripla negatív emlőkarcinóma sejtvonal
ACC	arteria carotis communis (közös fejverőér)
ACE	arteria carotis externa (külső fejverőér)
ACI	arteria carotis interna (belső fejverőér)
AD	acidic transactivation domain (savas transzaktivációs domén)
AGS	astrocyte growth supplement (asztrocita növekedést támogató tápfolyadék kiegészítő)
AIM2	absent in melanoma 2
ALR	absent in melanoma 2-like receptor (AIM2-szerű receptor)
ANOVA	ANalysis Of VAriance (varianciaanalízis)
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (apoptózis-asszociált, kaspáz aktiváló és toborzó domént tartalmazó szemcseszerű fehérje)
ATP	adenosine triphosphate (adenozin-trifoszfát)
BCA	bicinchoninic acid (bicinkoninsav)
BIR	baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat (bakulovírus apoptózist gátló ismétlődéseket tartalmazó domén)
BSA	bovine serum albumin (marhasavó albumin)
CA	carbonic anhydrase (szénsav-anhidráz)
CARD	caspase activation and recruitment domain (kaspáz aktiváló és toborzó domén)
CCL	chemokine (C-C motif) ligand (CC kemokin ligand)
CD44	cluster of differentiation 44 (differenciációs klaszter 44)
cDNS	kópia (copy) DNS
cGAMP	cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate (ciklikus guanozin-monofoszfát-adenozin-monofoszfát)
cGAS	cGAMP synthase (cGAMP szintáz)
cGLR	cGAS-like receptor (cGAS-szerű receptor)
CLR	C-type lectin receptor (C-típusú lektin receptor)
COX-2	cyclooxygenase-2 (ciklooxygenáz-2)
Cx43	connexin 43 (konnexin 43)
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand (CXC kemokin ligand)

DAMP	damage-associated molecular pattern (sérülés-asszociált molekuláris mintázat)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium (Dulbecco módosította Eagle médium)
DMSO	dimethyl sulfoxide (dimetil-szulfoxid)
DNS	dezoxiribonukleinsav
ECM	extracellular matrix (extracelluláris mátrix)
EGFR	epidermal growth factor receptor (epidermális növekedés faktor receptor)
EndMT	endothelial-to-mesenchymal transition (endoteliális-mezenchimális tranzíció)
FADD	Fas-associated domain with death domain (Fas-asszociált fehérje halál doménnel)
FasL	Fas ligand
FBS	fetal bovine serum (magzati marhasavó)
Fluc	firefly luciferase (szentjánosbogár luciferáz)
GABA	gamma-aminobutyric acid (gamma-aminovajsav)
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz)
GFAP	glial fibrillary acidic protein (gliális fibrilláris savas protein)
GFP	green fluorescent protein (zöld fluoreszcens fehérje)
GSDMD	gasdermin D (gaszdermin-D)
HER2	human epidermal growth factor receptor 2 (humán epidermális növekedési faktor receptor 2)
HGF	hepatocyte growth factor (hepatocita növekedési faktor)
HMG	High Mobility Group fehérje
HRP	horseradish peroxidase (torma-peroxidáz)
HSP	heat shock protein (hősokkfehérje)
HSV1-TK	herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (herpes simplex vírus-1 timidin kináz)
Iba1	ionized calcium-binding adapter molecule 1 (ionizált kalciumkötő adaptor molekula 1)
IFI16	interferon gamma inducible protein 16 (interferon-gamma által indukálható fehérje 16)
IFN	interferon
IGF2	insulin-like growth factor 2 (inzulinszerű növekedési faktor-2)
IgG	immunoglobulin G (immunglobulin G)
IL	interleukin

IL-1R	interleukin-1 receptor
ip.	intraperitoneális
L1CAM	L1 cell adhesion molecule (L1-sejtadhéziós molekula)
LPS	lipopolysaccharide (lipopoliszacharid)
LRR	leucine-rich repeat (leucingazdag részletet tartalmazó domén)
MAPK	mitogen-activated protein kinase (mitogén-aktivált protein kináz)
MDA-BrM2	MDA-MB-231-BrM2 agyi metasztatikus humán tripla negatív emlőkarcinóma sejtvonal
MDA-TGL	MDA-MB-231-TGL humán parentális tripla negatív emlőkarcinóma sejtvonal
MDP	muramyl dipeptide (muramil-dipeptid)
mRNS	hírvivő (messenger) RNS
NBD/NOD	nucleotide binding/oligomerization domain (nukleotidkötő és oligomerizációs domén)
NEK7	Never in mitosis A related kinase 7 (NIMA-rokon kináz 7)
NF- κ B	nuclear factor kappa B (nukleáris faktor kappa-B)
NLR	nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NOD-szerű receptor)
NVE	neurovaszkuláris egység
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet)
PAMP	pathogen-associated molecular pattern (patogén-asszociált molekuláris mintázat)
PBS	phosphate-buffered saline (foszfát pufferelt sóoldat)
PGE ₂	prostaglandin E ₂ (prostaglandin E ₂)
PFA	paraformaldehyde (paraformaldehid oldat)
PRR	pattern recognition receptor (mintázatfelismerő receptor)
PTEN	phosphatase and tensin homolog (foszfatáz és tenzin homológ)
PTFE	polytetrafluoroethylene (politetrafluoretilén)
PTM	posttranslational modification (poszttranszlációs módosítás)
PVDF	polyvinylidene fluoride (polivinilidén-fluorid)
PYD	pyrin domain (pirin domén)
qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction (valós idejű polimeráz lánreakció)
RIPK1	receptor-interacting protein kinase 1 (receptor kölcsönható fehérje kináz 1)
RLR	retinoic acid-inducible gene-I-like receptor (RIG-I-szerű receptor)

RNS	ribonukleinsav
ROCK	Rho-associated protein kinase (Rho-asszociált protein kináz)
ROI	region of interest (vizsgálati terület)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Insitute 1640 médium
SASP	senescence associated secretory phenotype (szeneszcencia által aktivált szekretoros fenotípus)
SDS	sodium dodecyl sulfate (nátrium-dodecil-szulfát)
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis)
SEM	standard error of the mean (átlag szórása)
STED	stimulated emission depletion (stimulált emisszió-depléción)
STING	stimulator of interferon genes (interferon gén stimulátor)
STR	short tandem repeat (rövid tandem ismétlődés)
TAM	tumor-associated macrophage (tumor-asszociált makrofág)
TBS-T	Tris-buffered saline containing Tween-20 (Tween-20 detergenst tartalmazó Tris-pufferelt sóoldat)
tdT	tandem Tomato (tdTomato) piros fluoreszcens fehérje
TGF- β 2	transforming growth factor beta 2 (transzformáló növekedési faktor-béta 2)
TGL	HSV1-TK/ GFP/Fluc fúziós riportergén
TLR	Toll-like receptor (Toll-szerű receptor)
TNFR	tumor necrosis factor receptor (tumor nekrozis faktor receptor)
TNF- α	tumor necrosis factor alpha (tumor nekrozis faktor-alfa)
TPBS	phosphate-buffered saline containing Triton X-100 (Triton X-100 detergenst tartalmazó foszfát pufferelt sóoldat)
TRIF	TIR (Toll/interleukin-1 receptor) domain-containing adapter-inducing interferon beta (TIR domént tartalmazó interferon-bétát indukáló adaptorfehérje)
TRIM	tripartite motif (háromtagú motívum)
WHO	World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)
Wnt	Wingless-related integration site
YFP	yellow fluorescent protein (sárga fluoreszcens fehérje)

1. BEVEZETÉS

1.1. Öregedés

Az elmúlt évszázadban a világ számtalan olyan közegészségügyi kihívást élt át, amely komoly hatást gyakorolt egészségünkre és jólétünkre (Fielding, 1999). Ennek ellenére az emberek világszerte egyre tovább élnek az orvostudomány, az egészségügyi ellátás és a népesség általános egészségi állapota terén bekövetkezett nagy horderejű változásoknak köszönhetően. Ezt jól tükrözi, hogy a születéskor várható globális élettartam az 1950-es évek óta 46,5 évről körülbelül 73,0 évre nőtt, és a COVID-19 világjárvány okozta visszaesés ellenére a jelenlegi trend szerint 2048-ra elérheti a 77,0 évet (WHO, 2023). A várható élettartam növekedésével párhuzamosan a kormegoszlásban mutatkozó drasztikus eltolódás azonban komoly és hosszú távú gazdasági, társadalmi és egészségügyi költségeket és következményeket von maga után (Marín-Aguilar és mtsai, 2018). Ennek súlyát érzékelteti az Egészségügyi Világszervezet (WHO) legfrissebb előrejelzése, miszerint 2030-ra a világon minden hatodik ember az idősödő korcsoportot (≥ 60 éves) fogja erősíteni, 2050-re pedig ez a szám megduplázódik. Egészségügyi vonzatát tekintve az öregedés fertőzéseknek, számos krónikus betegségnek, sőt tumoroknak is az egyik fő rizikófaktora és ezeknek a betegségeknek a prevalenciája korral nő (Latz és mtsai, 2018). A Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (OECD) és az Európai Bizottság együttes gondozásában 2022-ben megjelent Egészségügyi pillanatkép: Európa című jelentése szerint az európai uniós országokban élő 65 éves és annál idősebb polgárok körében átlagban a nők 40%-a, a férfiak 32%-a számolt be többszörös krónikus betegségről (OECD, 2022). Különösen a magyar lakosság körében az öregedéssel kapcsolatos betegségek morbiditási és mortalitási mutatói európai viszonylatban sajnos a legrosszabbak közé tartoznak (Kovács és mtsai, 2024). Mindezek fényében az öregedés és az azzal együtt járó krónikus betegségek és kóros állapotok hátterében húzódó biológiai folyamatok megértése elengedhetetlen az egészséges élettartam jelentős növelése érdekében.

1.2. Inflammaging

Az öregedés rendszerszintű megközelítéseinek térnyerése során az inflammaging koncepciója új irányba terelte az öregedéstudományt (Franceschi és mtsai, 2000a). Claudio Franceschi és munkatársai munkahipotézisükben az öregedéssel járó immunológiai változásokon keresztül kísérelték meg a különálló öregedési jelenségeket egy komplex

rendszerbe illeszteni. Konceptiójuk lefektetése óta eltelt közel negyed évszázadban az inflammaging jelentőségét felismerők tábora folyamatosan bővült (Davis és mtsai, 2006; Fülöp és mtsai, 2019; Kirkwood és mtsai, 2018; Minciullo és mtsai, 2016; Vasto és mtsai, 2007; Wilhelm és mtsai, 2017). Az elmélet lényege, hogy az élethosszig tartó stresszoroknak való kitettség, amely gyulladáshoz immunfolyamatok tónikus aktivációját váltja ki a szövetekben és szervekben, fokozatosan növekvő proinflammatorikus állapotot teremt meg időskorban. Ugyanakkor a javító- és védőmechanizmusok aktivációja az optimális működés érdekében a veleszületett és adaptív immunitás folyamatos átalakulását okozza (Franceschi és mtsai, 2000a; Franceschi és mtsai, 2000b). Az inflammaging folyamata tehát alapvetően egy fiziológiai, dinamikusan változó jelenség, amelyet krónikus, alacsony fokú, steril, szisztémás gyulladásként definiálnak (Mészáros és mtsai, 2020). A gyulladáshoz gyakran csak negatív képet társítanak, azonban a kétélű kardhoz hasonlatos. Ugyanis hasznos funkciót lát el a szervezetet érő ártalmak, inzultusok eltávolítása révén. Az egyénre jellemző fiziológiai küszöb eléréséig a stresszválaszok adaptív környezetet tartanak fent, amely a sikeres öregedésnek és a magas életkornak kedvez (Franceschi és mtsai, 1995). Ha a stresszhatások erőssége vagy időtartama viszont meghaladja a stresszel szembeni megbirkózási készség kritikus küszöbét, akkor a szervezet stresszválasza maladaptív válik, amely felgyorsult öregedéshez és öregedéssel járó betegségekhez vezethet (Franceschi és mtsai, 2018a). Összességében tehát, ahogy azt az általunk írt összefoglaló közleményben részletesen tárgyaljuk, a gyulladás a normál öregedésnek egy számottevő aspektusa. Ugyanakkor az egészséges és patológiás fenotípus közötti váltásban is igen fontos tényezőként van jelen (Mészáros és mtsai, 2020). Ezek alapján felmerül a kérdés, hogy mi különbözteti meg az egészséges öregedést a patológiástól. Egyes nézetek szerint az öregedés és az öregedéssel járó betegségek hasonló celluláris és molekuláris mechanizmusokon nyugszanak, a különbséget ezeknek a folyamatoknak a sebessége és intenzitása adja (Franceschi és mtsai, 2018a). Az öregedési pálya ütemét továbbá nagyban meghatározza és formálja a genetikai háttér, az epigenetikai módosulások, a környezet és az életmód, beleértve a táplálkozást, a fizikai aktivitást és az egész életen átívelő, környezeti ingerekre adott immunválaszokról tanúskodó immunbiográfiát (Fülöp és mtsai, 2023).

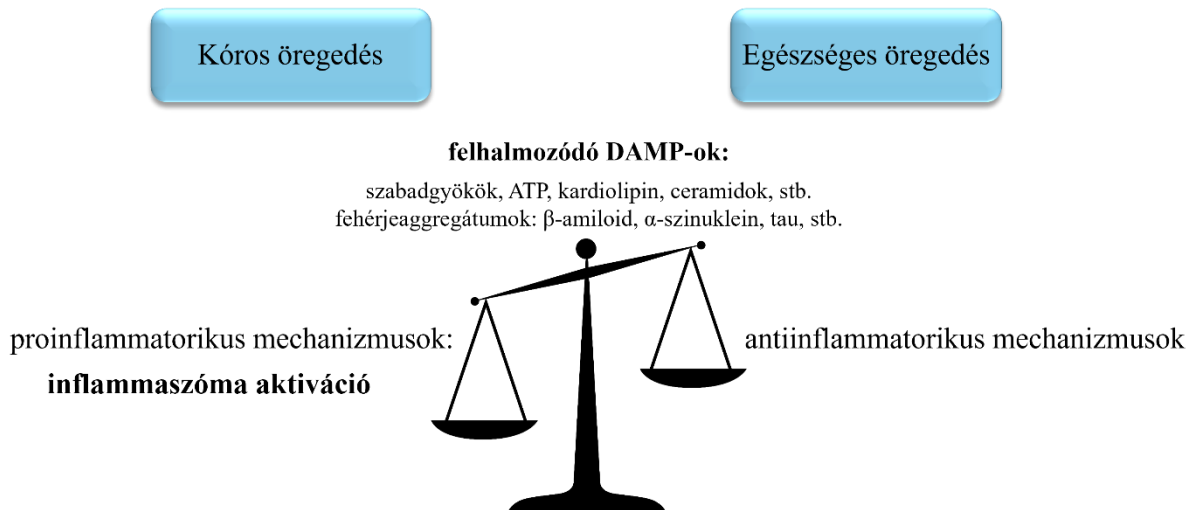
1.2.1. Inflammaging mechanizmusa

Az inflammaging elmélet kidolgozása óta rohamléptekben kibontakozott. A közelmúltban folytatott kutatások rámutattak arra, hogy az inflammaging nem pusztán immunsejt indukálta folyamat, ahogy arról kezdetben vélekedtek, központi szerepet

tulajdonítva a makrofágoknak (Franceschi és mtsai, 2000a), hanem más sejttípusok is érintettek. Többek között az adipociták, fibroblasztok, endotélsejtek, izomrostok, és általában a szenescens sejtek hozzájárulnak a krónikus, alacsony intenzitású gyulladáshoz (Aaron és mtsai, 2022; Livshits és mtsai, 2019; Mogilenko és mtsai, 2022; Praticchizzo és mtsai, 2016; Walker és mtsai, 2022). Sőt, a központi idegrendszeri sejtek is kiemelkedő szerepet játszanak az inflammaging kialakításában (Bleve és mtsai, 2023; López-Teros és mtsai, 2022; Wilhelm és mtsai, 2017).

A folyamat megismerése szempontjából kulcsfontosságú, hogy megértsük, az immun- és más szomatikus sejtek miért termelnek növekvő mennyiségben gyulladáshoz vezető mediátorokat a szervezet öregedésével párhuzamban. A szervezet külső és belső stresszhatások folyamatos kereszttüzében áll, amelyek természetüknél fogva a legkülönbözőbbek lehetnek, mint például: antigének, metabolikus, oxidatív, fizikai és kémiai stresszorok, celluláris és molekuláris szemétként viselkedő sejtmaradványok, sérült vagy hibásan hajtogatott fehérjék, szenescens vagy apoptotikus sejtek, a szenescens sejtek szekretómja (senescence associated secretory phenotype, SASP) vagy a velünk együtt élő mikroorganizmusok anyagcseretermékei (Franceschi és mtsai, 2017; Fülöp és mtsai, 2023; Santoro és mtsai, 2020). Forrásuk szerint is osztályozhatjuk a stresszorokat, így beszélhetünk idegen (látens infekciót okozó vírusok és baktériumok patogén-asszociált molekuláris mintázatai [pathogen-associated molecular pattern, PAMP]), félig saját (tápanyagok és mikrobióta elemei), illetve saját (sérülés-asszociált molekuláris mintázatok [damage-associated molecular pattern, DAMP]) ingerekről (Ebersole és mtsai, 2016; Franceschi és mtsai, 2014; Franceschi és mtsai, 2018b). A stresszorok hatására pedig olyan útvonalak aktiválódnak, amelyek az inflammaging kiváltásában és progressiójában játszanak óriási szerepet. Az immunszenescencia, a sejtöregedés és a SASP, a mitokondriális diszfunkció, a redox-homeosztázis felborulása, a diszbiózis, az endoplazmás retikulum stressz, az ubikvitin-proteaszóma rendszer meghibásodása, az inflammaszóma aktiváció, a telomer rövidülés és DNS-károsodás, a sérült autofágia, a keringésben lévő proinflammatorikus molekulák (agalaktozilált N-glikánok, gyulladáshoz vezető mediátor mikroRNS-k) felhalmozódása, a hiperkoagulabilitás és a komplementrendszer zavara mind-mind hozzájárul az inflammaginghez (Franceschi és mtsai, 2019; Mészáros és mtsai, 2020; Walker és mtsai, 2022). Azonban a DAMP-ok termelődése és eliminálása közötti egyensúlybomlást tekintik elsődleges kiváltó oknak (Franceschi és mtsai, 2017). Ennek eredményeként ezek az endogén faktorok fokozatosan felhalmozódnak és az immunsejtek aktivitásfokozása mellett az adott szövet rezidens sejtjeinek, például a központi idegrendszer esetében a vaszkuláris, glia- és idegsejteknek a strukturális és funkcionális

változásait okozzák (Mészáros és mtsai, 2020). Ráadásul az inflammaging kényes egyensúlya idővel felbillenhet (**1. ábra**), ha a kompenzáló mechanizmusok (anti-inflammaging) háttérbe szorulnak (Franceschi és mtsai, 2007). Ezáltal a proinflammatorikus állapot túlsúlyba kerül és kontrollálatlanná válik öregedés során és az öregedéssel járó betegségekben, többek között a neurodegeneratív megbetegedésekben (pl. Alzheimer-kór), a stroke-ban vagy bizonyos tumorokban (Franceschi és mtsai, 2018a; Mészáros és mtsai, 2020). Mindegyik esetben a közös kapocs a krónikus gyulladás jelenléte.



1. ábra: Proinflammatorikus eltolódás kóros öregedés során. ATP: adenoszin-trifoszfát, DAMP: sérülés-asszociált molekuláris mintázat. (Mészáros és mtsai, 2020) alapján módosítva.

1.3. Gyulladás és mintázatfelismerő receptorok az öregedésben

Az immunrendszer két nagy, egymásra épülő alrendszerből áll, a veleszületett és az adaptív immunrendszerből. A két ág közül az előbbi a gyulladás iniciációjának fő regulátoraként a potenciális veszélyekkel szembeni első védvonalat képezi. Ehhez a mintázatfelismerő receptorokat (pattern recognition receptor, PRR) aknázza ki, amelyek gyors és nem specifikus válaszreakciót indítanak el a fertőzések leküzdése és a szöveti regeneráció érdekében (Wilhelm és mtsai, 2017).

A PRR-ek legerőteljesebb aktivátorai a PAMP-ok. Ilyen struktúrák a mikrobiális nukleinsavak, glikoproteinek és lipoproteinek, különféle membrán komponensek (peptidoglikánok, muropeptidek, lipoteikolsav, lipopoliszacharidok (LPS), glikozilfoszfatidilinozitol horgonyok), bakteriális nyúlványfehérjék (pl. flagellin, pilin) vagy a gombák sejtfalát alkotó glikánok (pl. zimozán, kurdlán, mannán, kitozán) (Mogensen, 2009). A celluláris stressz vagy sérülés hatására felszabaduló DAMP-ok, amelyeknek a szerepe

vitathatatlan az öregedést és az öregedéssel járó betegségeket kísérő krónikus gyulladásban, szintén a PRR-eken keresztül fejtenek ki immunválaszt. Forrásukat és kémiai tulajdonságaikat tekintve rendkívül diverz molekulacsaládot alkotnak (Roh és mtsai, 2018). A család jellegzetes képviselői a kromatin-kapcsolt High Mobility Group fehérjék (pl. HMGB1, HMGN1), a hősokkfehérjék (pl. HSP40, 60, 90, gp96), mitokondriális termékek (pl. szabadgyökök, szukcinát, kardiolipin, mitokondriális DNS), purin metabolitok (pl. ATP, húgysav és sói), membránalkotó lipidek (pl. szfingolipidek, ceramidok), a neurodegeneratív betegségek patognomikus fehérjeaggregátumai (pl. béta-amiloid, alfa-szinuklein, tau speciális formái) és a citoszolikus nukleinsavak (DNS, RNS). Másrészt léteznek környezeti DAMP-ok, amelyek között szerepelnek alumíniumsók, kristályos anyagok (pl. azbeszt, szilícium-dioxid), levegőben lebegő récseszkék és bizonyos nehézfémek mint allergének (pl. nikkel, kobalt, palládium) (Land, 2021; Mészáros és mtsai, 2020).

Jelenleg a PRR-eket hat nagy családba soroljuk az őket felépítő, evolúciósan konzervált, funkcionális doménjeik homológiája alapján. Ide tartoznak a membránkötött Toll-szerű receptorok (Toll-like receptor, TLR) és C-típusú lektin receptorok (C-type lectin receptor, CLR), valamint a citoszolikus és nukleáris lokalizációjú NOD-szerű receptorok (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor, NLR), RIG-I-szerű receptorok (retinoic acid-inducible gene-I-like receptor, RLR), AIM2-szerű receptorok (absent in melanoma 2-like receptor, ALR) és cGAS-szerű receptorok (cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase-like receptor, cGMR) (Bodnar-Wachtel és mtsai, 2023; Bruchard és mtsai, 2015; D. Li és mtsai, 2021; Y. Li és mtsai, 2023). Az előbb felsorolt fehérjecsaládok közül az NLR és ALR család tagjai a háromtagú motívum (tripartite motif, TRIM) családba tartozó pirinnel együtt kiemelkedő jelentőséggel bírnak az immunválasz különböző folyamatainak, különösen a gyulladással kapcsolatos reakciók szabályozásában. Egyedülálló módon képesek úgynevezett inflammaszómakat alkotni, amelyek révén biztosítják a sejtek exogén és endogén stimulusokkal szembeni védekező mechanizmusát.

1.4. Inflammaszómak

Az inflammaszómak olyan intracelluláris multimer fehérjekomplexek, amelyek az interleukin (IL)-1 családba tartozó proinflammatorikus citokinek (IL-1 β és IL-18) termelődéséért felelősek. A komplexek fő alkotórésze egy szenzorfehérje (NLR vagy más receptorok), gyulladással kapcsolatos kaspázok és a kettő közötti kapcsolatot biztosító adaptorfehérje, amely az úgynevezett apoptózis-asszociált, kaspáz aktiváló és toborzó domént (caspase

activation and recruitment domain, CARD) tartalmazó szemcseszerű fehérje (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) (de Carvalho Ribeiro és mtsai, 2022).

Az NLR család elsőként azonosított tagjának, a NOD1-nek a felfedezése óta 23 humán és 34 egér NLR-t írtak le (Franchi és mtsai, 2009; Inohara és mtsai, 1999). Az NLR-eket alapvetően három konzervált domén építi fel: az N-terminális részen többfajta effektor domén, egy központi elhelyezkedésű nukleotidkötő és oligomerizációs domén (nucleotide binding/oligomerization domain, NBD/NOD) és a C-terminális részen 20-30 leucingazdag részletet tartalmazó domén (leucine-rich repeat, LRR). Az NBD, ahogy arról a neve is árulkodik, ATP-függő önszerveződési reakció során az NLR monomerek összekapcsolódásáért felelős (Martinon és mtsai, 2009). Így jön létre a közel 5-11 monomerből egyesülő oligomer, aminek az inflammaszóma érdekes gyűrűszerű alakját köszönheti. Az LRR domének legfontosabb feladata a receptor stabilizálása ligand hiányában és a ligand felismerése. A receptoraktivációval konformáció változások sorozata indul el. Ennek során megszűnik az LRR-mediált intramolekuláris autoinhibíció, amelynek következtében az oligomerizációra képes domének szabaddá válnak és ez az ADP-ATP cseréjét vonja maga után. Ezt követően az NBD domének oligomerizációja az effektor domének oligomerizációját okozza, amely végül egy szignáltranszdukciós kaszkádhoz vezet. Ez inflammaszómatípustól függő módon az effektor domén különböző szignalizációs partnerekkel (NLR-ek, ASC, kinázok) létesített fehérje-fehérje kölcsönhatásait foglalja magába (Hu és mtsai, 2023; Martinon és mtsai, 2009; Maruta és mtsai, 2022).

Az NLR-eket az effektor domén szerkezete alapján öt alcsaládba osztjuk, úgymint a savas transzaktivációs doménnel (acidic transactivation domain, AD) rendelkező NLRA, a bakulovírus apoptózist gátló ismétlődéseket tartalmazó (baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat, BIR) NLRB, a CARD domént hordozó NLRC, a pirin domén (pyrin domain, PYD) tartalmú NLRP és a más NLR doménnel szekvenciahomológiát nem mutató NLRX alcsalád (Saxena és mtsai, 2014).

Az ASC két doménből áll, N-terminálisán egy PYD, C-terminálisán egy CARD domén helyezkedik el. Az NLR-ekhez az előbbi doménon keresztül tud kapcsolódni, míg a kaszpáz-1 proformájához az utóbbi doménnel kötődik. A legújabb kutatások szerint az ASC helikális filamentumokat hoz létre az NLR-ek által alkotott nukleációs magon. Ez a filamentáris szerveződés a szemcsképződés (specking) alapja, amely az inflammaszómák mintegy 1-2 μm átmérőjű formája és a jelerősítésben tulajdonítanak neki nagy szerepet (Dick és mtsai, 2016). Ezzel összhangban van az a megfigyelés, miszerint a szemcsék az inflammaszóma aktiváló stimulus erősségétől és koncentrációjától függően alakulhatnak ki és

befolyásolhatják az inflammaszóma ingerküszöbét. Ezen túlmenően, a szemcsékből kisebb inflammaszóma komplexek válhatnak le, amelyek az interleukinok hatékonyabb processzálását teszik lehetővé (Nagar és mtsai, 2021).

A kaszpázok olyan cisztein proteázok, amelyek a fehérjéket belülről, meghatározott helyeken (aszparaginsav, glutaminsav, foszfoserin) bontják (Seaman és mtsai, 2016). Valamennyi kaszpázra jellemző, hogy szintézisük során inaktív formában (prokaspáz) fordulnak elő. A csoporton belül elsőként leírt kaszpáz-1 enzimatis működéséhez szükség van arra, hogy az inflammaszómán csoportokba tömörüljön. Ez lehetővé teszi, hogy az enzimmonomerek dimerizálódjanak, ami az enzim aktivációját eredményezi. Ezt követően a kaszpáz-1 – a korábbi vélekedéssel ellentétben – inflammaszóma-kötött formában többlépcsős autokatalízisen megy keresztül, amely során kialakuló aktív formák, elsősorban a p33/p10 végzi a szubsztrátok hasítását. Az autokatalitikus reakciók végén a nagy (p20) és kis (p10) alegységekből álló tetramer leválik az inflammaszómáról, majd gyorsan szétesik és elveszti proteáz aktivitását (Boucher és mtsai, 2018).

A szubsztrátok között szerepelnek elsősorban az IL-1 β és IL-18 gyulladáskeltő citokinek prekursorai, a pórusformáló gaszdermin-D (GSDMD), valamint felmerült az antiinflammatorikus IL-37 is, mint a kaszpáz-1 által hasított termék (Bulau és mtsai, 2014), azonban ezt nemrég megkérdőjelezték (Gritsenko és mtsai, 2022). Továbbá a kaszpáz-1-ről kimutatták, hogy képes más kaszpázokat is hasítani (Lamkanfi és mtsai, 2008). Az említett szubsztrátokból proteolitikus reakció révén bioaktív formák keletkeznek (Mészáros és mtsai, 2020). Ugyan az IL-1 β és IL-18 érését leggyakrabban az inflammaszóma aktivitással hozzák kapcsolatba, alternatív mechanizmusok szerepe éppoly hangsúlyos lehet a gyulladáso folyamatokban. Direkt vagy indirekt módon más kaszpázok, szerin és aszpartát proteázok, mátrix metalloproteinázok, sőt érdekes módon fungális enzimek is részt vesznek ezen citokinek hasításában (Evavold és mtsai, 2022; Netea és mtsai, 2015). Azonban ilyen inflammaszóma-független folyamatot ritka esetben figyeltek meg agyi sejtekben (Edye és mtsai, 2013).

Az inflammaszóma aktiváció egy másik meghatározó kimenete a piroptózis. A programozott sejthalálnak ezt a lítikus formáját részben a kaszpáz-1 által hasított GSDMD vezérel. A piroptózis sejtduzzadással, a sejtmembrán felszakadozásával és a sejttartalom kiürülésével, vele együtt DAMP-ok és gyulladáso citokinek (IL-1 β , IL-18, IL-6) felszabadulásával jár (Weir és mtsai, 2022).

Az előbb említett kétféle effektor mechanizmus (citokin felszabadulás és piroptózis) révén az inflammaszómák szabályozott és hatékony módon járulnak hozzá a gyulladáso

reakció kialakításához, elősegítve ezzel a szervezet antimikrobiális védelmét és a gyors szöveti regenerációt. Ha azonban az inflammaszóma aktivitás zavart szenved, például a DAMP-ok korral való felhalmozódása következtében, akkor az öregedési folyamat felgyorsulhat (Mészáros és mtsai, 2020). Ráadásul ezáltal az öregedéssel összefüggő betegségek (pl. neurodegeneratív, kardiovaszkuláris, metabolikus betegségek) és daganatok (pl. emlőkarcinóma, melanóma, kolorektális karcinóma) is súlyosbodhatnak (Lamkanfi és mtsai, 2011; Latz és mtsai, 2018; Mészáros és mtsai, 2020).

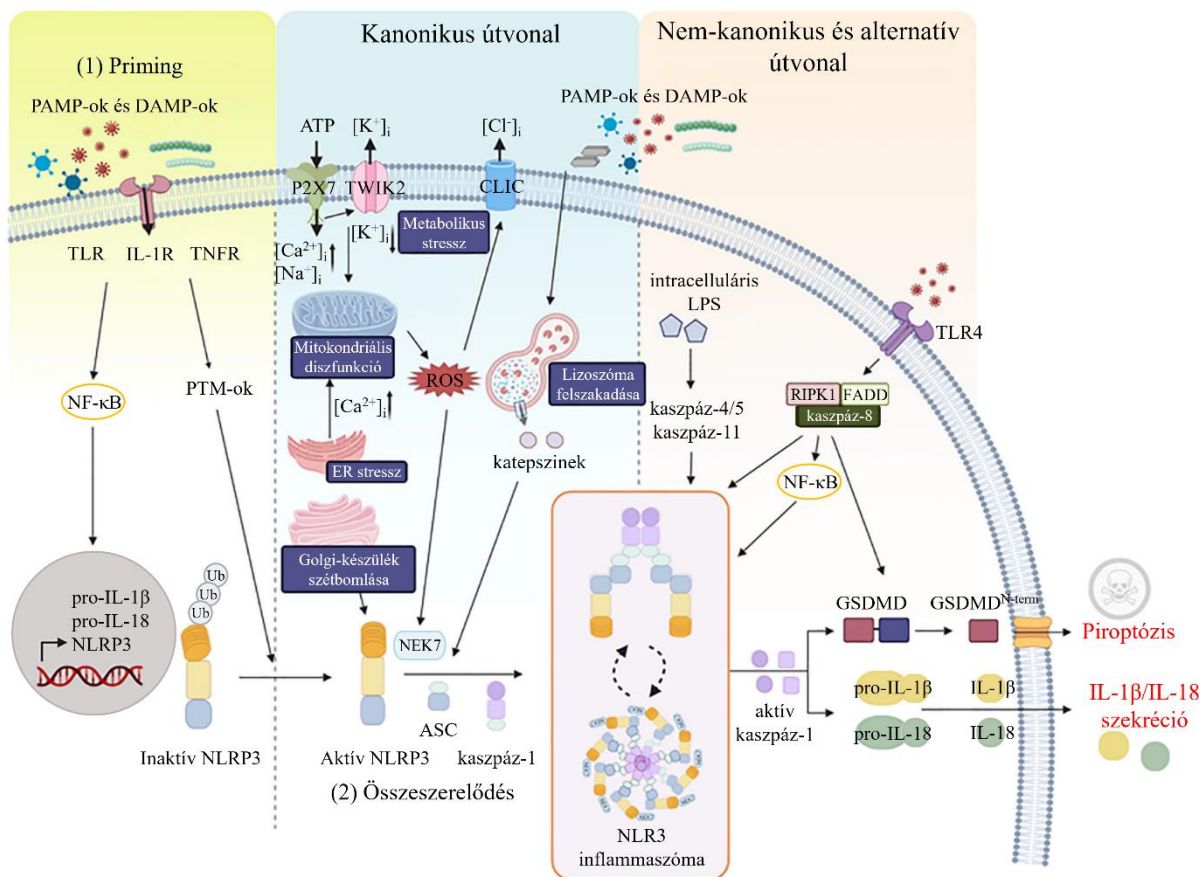
1.4.1. NLRP3 inflammaszóma

Az inflammaszóma-knak klasszikusan négy típusát (NLRP1, NLRP3, NAIP-NLRC4 és AIM2) különböztetjük meg, azonban a közelmúltban több atipikus inflammaszómat (NLRP2, NLRP6, NLRP7, NLRP9b, NLRP10, NLRP12, NLRC5, pirin, IFI16, CARD8) is felfedeztek (Carriere és mtsai, 2021; Próchnicki és mtsai, 2023). A prototipikusnak számító NLRP3 inflammaszóma, amelyet a néhai Jürg Tschopp vezetett munkacsoport írt le csakúgy, mint az alcsaládon belül elsőként felfedezett NLRP1 inflammaszómat, az összes inflammaszóma közül a legszélesebb körben vizsgált és ezáltal a leginkább ismert a gyulladással járó betegségek terén, beleértve a tumoros megbetegedéseket is (Agostini és mtsai, 2004; Shadab és mtsai, 2023). Két évtizede töretlenül intenzív kutatások tárgyát képezi, ami annak köszönhető, hogy más inflammaszómaival ellentétben ligandok széles spektruma képes aktiválni. Az NLRP3 inflammaszóma aktivátorok közé tartozik a bakteriális hírvívő RNS (mRNS), bakteriális DNS-RNS hibridek, a muramil-dipeptid (MDP), bakteriális toxinok (pl. nigericin, gramicidin, valinomycin, hemolizinek), DNS- és RNS-vírusok, gombák, protozoonok, metabolitok (pl. ATP, glükóz), kristályos anyagok (pl. húgysav, koleszterin, szilícium-dioxid, alumínium-hidroxid, azbeszt), immunmodulánsok (pl. imikimod, rezikimod) és a méhmembrán fő komponense, a melittin (Kalantari és mtsai, 2014; Martin-Sanchez és mtsai, 2017; Swanson és mtsai, 2019; Zhou és mtsai, 2010). A feltételezések szerint ezen stimulusok közül nem képes mindegyik az NLRP3-hoz direkt kötődni, hanem univerzális celluláris stressz útvonalakat aktiválnak, amelyek az NLRP3 inflammaszóma-ra konvergálnak. Az elfogadott mechanizmusok között szerepel az ionháztartás (K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) megbomlása, a mitokondriumok működési zavara és a velejáró oxidatív stressz, a lizoszómák és a transz-Golgi-hálózat szétesése vagy az anyagcsere megváltozása (Paik és mtsai, 2021). Továbbá a legújabb kutatások szerint más útvonalak, mint például a komplement rendszer és a purinerg szignálútvonalak is érintettek az NLRP3 inflammaszóma aktiváció szabályozásában, különösen többféle daganattípus vonatkozásában (Janneh és mtsai, 2022; Karki és mtsai,

2021; Yu és mtsai, 2020). Mivel az aktivációhoz az NLRP3 bazális expressziója önmagában nem elegendő, így ahhoz a humán monocitákon kívül két szignál szükséges, amely szigorú szabályozási lehetőséget biztosít (Gritsenko és mtsai, 2020; Netea és mtsai, 2009). Az ilyen kanonikus útvonal során az első szignált, amelyet primingnek nevezünk, a TLR-ok, a NOD2 vagy citokin receptorok (tumor nekrozis faktor receptor-1 és -2 [TNFR1/2], illetve 1-es típusú IL-1 receptor [IL-1R1]) közvetítik és a nukleáris faktor kappa-B (NF- κ B) transzkripció faktor aktivációján keresztül az *NLRP3*, *IL1B* és *IL18* gének expresszióját indukálják. A priming lépés részét képezik továbbá az NLRP3 poszttranszlációs módosításai, amelyek biztosítják az NLRP3 megfelelő térbeli elrendeződését, valamint „készleteti állapotba” hozzák a későbbi fehérje interakciók kialakításához. A második szignál az inflammaszóma teljes aktivációját és összeszerelődését eredményezi. Nemrég kimutatták, hogy sajátos módon az aktiváció során az NLRP3-hoz a NIMA-rokon kináz 7 (Never in mitosis A related kinase 7, NEK7) nevű szerin-treonin kináz kapcsolódik, amely az NLRP3-t aktív konformációba mozgatja, intracelluláris transzportját szabályozza és a komplex kialakulását elősegíti (Fu és mtsai, 2023; Swanson és mtsai, 2019).

A kanonikus inflammaszóma aktiváción kívül ismert egy nem-kanonikus és egy alternatív útvonal is. Előbbi során az inflammaszómát egérben a kaszpáz-11, emberben az egér ortológ kaszpáz-4 és -5 alkotja, amelyek a Gram-negatív baktériumokból (pl. *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*) származó LPS és az oxidatív stressz során keletkező oxidált foszfolipidek intracelluláris receptoraként funkcionálnak. Másfelől effektorként a piroptózist és másodlagosan az NLRP3 inflammaszóma aktivációt befolyásolják (Ross és mtsai, 2022).

Az eddig csak humánban és sertésben leírt alternatív inflammaszóma aktivációt az különbözteti meg a többi útvonaltól, hogy az LPS a TLR4 – TIR domént tartalmazó interferon-bétát indukáló adaptorfehérje (TIR domain-containing adapter-inducing interferon- β , TRIF) – receptor kölcsönható fehérje kináz 1 (receptor-interacting protein kinase 1, RIPK1) – Fas-asszociált fehérje halál doménnel (Fas-associated domain with death domain, FADD) – kaszpáz-8 tengely mentén aktiválja az NLRP3 inflammaszómát piroptózis kiváltása nélkül (Zito és mtsai, 2020). A fentiekben részletezett három különböző aktivációs útvonalat az **2. ábra** foglalja össze.



2. ábra: Az NLRP3 inflammaszóma útvonalak áttekintése (Seok és mtsai, 2020) nyomán módosítva. Az NLRP3 inflammaszóma aktiváció két lényeges lépést ölel fel. Először is, a primingot (1) PAMP-ok vagy DAMP-ok váltják ki, amelyek az NF- κ B transzkripciós faktoron keresztül az IL-1 β , IL-18 prekursorok és az NLRP3 expresszióját indukálja, másfelől az inflammaszóma komponensek (NLRP3, ASC) poszttranszlációs módosításait (PTM) befolyásolja. Másodszor, az inflammaszóma összeszerelődést (2) a kanonikus és nem-kanonikus útvonalon is különböző PAMP-ok és DAMP-ok indukálják, amelyek a kanonikus útvonal esetén változatos sejtszintű folyamatokat (pl. ionáramlás, Golgi-készülék szétesése, ER stressz, lizoszóma destabilizáció, metabolikus stressz) indítanak el. Ennek eredményeként kaszpáz-1 aktiváció és IL-1 β /IL-18 felszabadulás vagy GSDMD mediálta piroptózis következik be. A nem-kanonikus útvonal, amelyet a kaszpáz-4/5 és kaszpáz-11 közvetít, indirekt járul hozzá az IL-1 β vagy IL-18 termelődéséhez. A RIPK1, FADD és kaszpáz-8 alternatív útvonalon szabályozza az NLRP3 inflammaszóma aktivációt. CLIC: klorid csatorna (chloride intracellular channel); ER: endoplazmás retikulum; P2X7: purinerg ionotróp receptor altípus 7; ROS: reaktív oxigéngyök; TWIK2: két pórusformáló egységet tartalmazó káliumcsatorna (Tandem of P-domains in a weak inward-rectifying K⁺ channel 2).

1.4.2. NLRP3 inflammaszóma szerepe a tumoros folyamatokban

A daganatok fő ismertetőjegye a gyulladási reakció, amely az öregedésnek is az egyik alappillére (Hanahan, 2022; López-Otín és mtsai, 2023). Így nem meglepő módon az NLRP3 inflammaszóma aktiváció tetten érhető öregedés során éppúgy, mint számos kóros

állapotban, beleértve a különféle daganatos megbetegedéseket vagy a központi idegrendszert érintő betegségeket, mint például a stroke-ot és a neurodegeneratív rendellenességeket (Mészáros és mtsai, 2020; Sharma és mtsai, 2021), de perifériás idegsérülés esetén is aktiválódik (Molnár és mtsai, 2022). Az NLRP3 inflammaszóma és a hozzá downstream kapcsolódó citokin szignalizáció daganatképződésben és progresszióban betöltött szerepe kettős, lehet pro- és antitumorigén hatású. Ez több tényezőre vezethető vissza, az inflammaszóma aktivitás változhat az idő, a környezet, a lokalizáció és a tumortípus vagy altípus függvényében (Ershaid és mtsai, 2019; Tengesdal és mtsai, 2021). Megfigyelték, hogy a daganat előrehaladottsága az NLRP3 inflammaszóma aktiváció szabályozottságával korrelál, például korai stádiumú melanómában a kanonikus útvonalra jellemző két ellenőrzőpont a kései stádiumban megszűnik és helyette konstitutív aktiváció kerül érvénybe, megágyazva ezzel egy autoinflammatorikus állapotnak (Okamoto és mtsai, 2010). Továbbá döntő szerepet játszik a szabályozásban a tumor mikrokörnyezet celluláris és molekuláris összetétele és kölcsönhatásai. Fontos szempont, hogy az NLRP3 inflammaszóma aktiváció a tumorszöveten belül a tumorsejtekben, a strómasejtekben vagy mindkét sejtcsoportban következik be (Chow és mtsai, 2012; Y. Li és mtsai, 2020; Lin és mtsai, 2020). A különböző szervekben vagy szövetekben eltérő lehet az NLRP3 inflammaszóma funkciója, így befolyásolhatja a daganatra gyakorolt hatását. Tumorszuppresszív hatását leginkább kolitisz-asszociált kolorektális karcinóma vagy kolorektális eredetű májjáttét kapcsán mutatták ki (Allen és mtsai, 2010; Dupaul-Chicoine és mtsai, 2015), de lehet tumorprotektív is például melanómában vagy emlőkarcinómában (Tengesdal és mtsai, 2022; Tengesdal és mtsai, 2021). Az NLRP3 inflammaszóma karcinogenezisben és progresszióban betöltött összetettségét jelzi, hogy más inflammaszómák (pl. NLRP1, NLRP6, NLRC3, NLRC4, AIM2) is aktiválódhatnak vagy downregulálódhatnak a tumor mikrokörnyezetben (Domblides és mtsai, 2020; Farshchian és mtsai, 2017; Y. Y. Ma és mtsai, 2018; Ohashi és mtsai, 2019; Zhai és mtsai, 2017). Ráadásul kísérletes bizonyítékok utalnak az NLRP3 inflammaszóma AIM2-vel és NLRC4-gyel való interakciójára elsősorban fertőzések esetén (Cunha és mtsai, 2017; Karki és mtsai, 2015; Oh és mtsai, 2023), ami felveti annak a lehetőségét, hogy hasonló interakciók fellépnek a tumorokban. Mindezek a faktorok együttesen pedig hatással lehetnek a daganatnövekedésre és túlélésre, az angiogenezisre, az invazivitásra, az áttétképzésre, az immunválaszokra és a tumort célzó terápiák hatékonyságára (Elgohary és mtsai, 2023).

Habár az NLRP3 inflammaszóma képződés hagyományosan az immunsejtekhez, főleg makrofágokhoz köthető (Moossavi és mtsai, 2018), nem immunsejtekben is képes aktiválódni. A központi idegrendszer szinte mindegyik sejtípusában kimutattak már NLRP3

inflammaszóma aktivációt, beleértve a vaszkuláris sejteket (Kozma és mtsai, 2021), a neuronokat (P. Y. Chen és mtsai, 2023; Molnár és mtsai, 2022), az oligodendrocitákat (X. Zhang és mtsai, 2020) vagy az ependima sejteket (Z. Zhang és mtsai, 2022), de ezen a téren a legfőbb sejtípus a mikroglia és az asztrocita (Lénárt és mtsai, 2016).

Az agyi daganatok közül a glioblasztómában írtak le NLRP3 inflammaszóma aktivációt a tumorsejtekben, az asztrocitákban és a mikrogliában, valamint inflammaszóma-kapcsolt válaszokat a betegség patomechanizmusában (Lim és mtsai, 2019; Tarassishin és mtsai, 2014). Így az NLRP3 gátlása potenciális terápiás lehetőséget kínálhat a jövőben az elsődleges agydaganatban, például glioblasztómában szenvedő betegek számára (Rolim és mtsai, 2022). Agyi metasztatikusokban azonban az inflammaszómák szerepe egyáltalán nem tisztázott.

1.5. Tumorok

A daganatok olyan kóros szövetszaporulatok, amelyek a sejtek autonóm, túlzott és progresszív növekedése folytán keletkeznek. Lehetnek jóindulatúak (benignus) és rosszindulatúak (malignus). Utóbbira jellemző, hogy invazívvá válhat, azaz az ép alapszövetet infiltrálja és áttétképzés révén áttérjedhet a távoli szövetekbe, szervekbe, ahol új daganatokat hozhat létre.

1.5.1. Primer tumorok

A gazdaszövetben kialakuló daganatokat hívjuk primer tumoroknak, amelyekből több, mint százféle típus létezik. A legtöbb malignus daganatot szövettani megjelenésük alapján hat fő csoportba lehet osztani, így megkülönböztetjük a kötőszöveti eredetű szarkómákat, a hámsejtekből kiinduló karcinómákat, a hematopoetikus és limfoid eredetű limfómákat, leukémiákat és mielómákat, valamint a kevert daganattípusokat (Stein és mtsai, 2019). Ezen csoportokból a szolid tumorok többsége két szerkezeti elemből áll: a neoplasztikus sejtek által alkotott parenchimából és a nem neoplasztikus, kötőszöveti, vaszkuláris és immunsejtekből felépülő strómából (Bast és mtsai, 2023).

1.5.2. Szekunder vagy metasztatikus tumorok

A primer daganatból leváló tumorsejtek a keringésbe, a csatornarendszerekbe vagy a testüregekbe jutva az eredeti helyükhöz képest közeli vagy távoli célterületeket érnek el, ahol megtelepedve újabb, áttétes daganatokat képezhetnek. Ez a metasztatikus kaszkád néven leírt

töblépcsős folyamaton keresztül megy végbe. Karcinómák esetén első lépésben a primer tumorban metasztatikus fenotípust kialakító sejtpopuláción belüli intercelluláris kapcsolatok meglazulnak. Az epitel tumorsejtek ezt követően áttörnek az őket körülvevő extracelluláris mátrixot (ECM) és a strómasejtek rétegét. A keringésbe lépve testszerte szétterjednek, majd a különböző szervek mikroérhálózatában megrekednek és kilépnek onnan. Az idegen mikrokörnyezetben megtapadva újraindítják a proliferációs programot, amellyel új neoplasztikus képződményeket hoznak létre (Krizbai és mtsai, 2015a).

1.6. Agyi áttétek

Az agyi metasztázisok a leggyakoribb intrakraniális rosszindulatú daganatok. Jelentőségüket jól szemléltetik az epidemiológiai mutatók. Az Amerikai Egyesült Államokban a becslések szerint a rákos betegek 8-10%-ánál alakulnak ki agyi áttétek, ami évente hozzávetőleg 200.000 új esetet jelent (Vogelbaum és mtsai, 2022). Lakosságárányosan a hazai adatok sem festenek kedvezőbb képet. Az Országos Onkológiai Intézet által működtetett Nemzeti Rákregiszter adatbázisa alapján évi mintegy 2000-2500 új eset került azonosításra 2010 és 2020 között. A primer daganatok közül a tüdőrák, az emlőrák és a melanóma rendelkezik a legnagyobb organotropizmussal az idegszövethez. Az esetek 40-50%-ában tüdőrákból, 15-25%-ában emlőrákból, 5-20%-ában melanómából fejlődik ki agydaganat. Ezek a betegségformák egybevéve a központi idegrendszeri áttétek 70-80%-át teszik ki. Kisebb gyakorisággal azonban a vese-, gasztrointesztinális, petefészek-, prosztata- és heredaganatok, sőt a limfómák is hajlamosak agyi áttétképzésre (Wilhelm és mtsai, 2018).

Az agyi áttétek prognózisa a mai napig igen kedvezőtlen. Ezt számos tényező befolyásolja, többek között az életkor, a beteg általános állapota, a primer tumorról szerzett előzetes ismeretek, az (extracerebrális) szekunder tumorok altípusa, lokalizációja, száma és mérete. A malignus alaptergység megléte mellett az áttét kezelés nélkül átlagosan pár hónapra korlátozhatja a túlélést. Az aktív kezelés jó esetben akár évekkkel is javíthat az életkilátásokon, ellenben a diagnózistól számított medián túlélési idő sajnos nem haladja meg az egy évet. Ennek oka, hogy a klinikai gyakorlatban jelenleg alkalmazott terápiák sajnos korlátozott lehetőségeket nyújtanak a betegek számára.

Az agyi áttétet adó tumorok közül az emlőrák a szűrővizsgálatoknak köszönhetően napjainkban az egyik leggyakrabban diagnosztizált daganat lett. Világszerte és hazánkban is a vezető halálokok között szerepel a nők körében. Az összes emlőrák 15-20%-át a tripla negatív emlőkarcinóma (ösztrogénreceptor-, progesteronreceptor- és humán epidermális növekedési faktor receptor 2 (HER2)-negatív) teszi ki (Kenessey és mtsai, 2022; Lv és mtsai, 2021). Ez a

molekuláris altípus egy agresszív, rekurrens, erősen metasztatikus, főleg az agyat támadó daganat, amely rossz klinikai prognózissal és a többi altípushoz képest a legrövidebb teljes túléléssel jellemezhető. Habár gyakoribb a 40 év alatti nők körében, az idősödő (≥ 60 éves) korosztályba tartozó emlőrákos betegek jelentős hányadánál (10-18%) is kialakul (Aapro és mtsai, 2012; Chan és mtsai, 2022). A tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisainak kezelésében a viszonylag magas áttét incidencia, az endokrin terápia hatástalansága, a tumor minták génexpressziós vagy proteomikai analíziséből kinyert heterogén szignatúrák alkalmazhatósága és nem utolsósorban a vér-agy gát és vér-tumor gát által izolált környezet komoly kihívásokat vet fel (Bos és mtsai, 2009; Lv és mtsai, 2021; Rojas és mtsai, 2019).

Az agyi áttétképződés szempontjából kulcsszerepe van a helyi speciális mikrokörnyezetnek, amelyet a neuronok, glia- és vaszkuláris sejtek szoros strukturális és funkcionális együttese által alkotott neurovaszkuláris egység (NVE) hoz létre, így a tumorsejtek és az NVE között fellépő kölcsönhatások megértése rendkívül fontos a tumornövekedést és progressziót illetően.

1.6.1. Tumorsejtek agyi vaszkuláris transzmigrációja

A keringés és a központi idegrendszer kapcsolatát biztosító, mikroerek szintjén megjelenő aktív védvonal, a vér-agy gát, amely normális esetben megakadályozza a potenciálisan káros anyagok bejutását a központi idegrendszerbe, a tumorsejtek számára is komoly fizikai gátat jelent. A vér-agy gátat az ereket bélelő endotélsejtek, a kapillárisok falát burkoló asztrocita végtalpak és az endotélsejteket határoló bazális membrán kettőzetében helyet foglaló periciták alkotják, létrehozva a legszorosabb biológiai barriert a szervezetben. Az áttétképzés alapvető feltétele, hogy a metasztatikus sejteknek át kell törniük ezen a szoros védvonalon, hogy az agy részben immunprivilegizált környezetében kontrollálatlanul tudjanak növekedni (Wilhelm és mtsai, 2013). A tumorsejtek ritkán a *plexus choroideus* által formált vér-liquor gáton keresztül is képesek bejutni a központi idegrendszerbe, azonban ennek a folyamatnak a részletei túlnyomórészt tisztázatlanok (Beach és mtsai, 2021; Vandenhoute és mtsai, 2015).

A szóródásra hajlamos daganatok leggyakrabban hematogén úton jutnak az agyba, szolid tumort létrehozva a parenchimában (Schroeder és mtsai, 2020). A tumorsejtek extravazációja a leukocitákéhoz hasonlóan három lépésben történik: elakadás, adhézió és transzmigráció vagy más néven diapedézis (Wilhelm és mtsai, 2013). Miután elakadnak az agyi mikroérhálózatban, leginkább az elágazásokban, már egy órán belül kitapadnak, azonban pozíciójuk dinamikusan változhat és számuk jellemzően idővel csökken (Haskó és mtsai,

2019; Kienast és mtsai, 2010). Ez azzal magyarázható, hogy különféle stresszhatásoknak (hemodinamikai erők, sejthalál, tumorelles immunválaszok) vannak kitéve, míg el nem hagyják az érpályát (Strilic és mtsai, 2017). Intravaszkuláris túlélésük ezáltal egy sebességmeghatározó lépés a metasztázisképzés kimenetele szempontjából (Lorger és mtsai, 2010).

Az extravazációt celluláris és molekuláris interakciók sora kíséri, amelyek direkt vagy indirekt kapcsolódnak egymáshoz. Ezekben a folyamatokban a tumorsejtek mellett az endotélsejtek is aktív szerepet vállalnak. Ilyen strukturális és funkcionális változások közé tartozik a tumorsejtek intravaszkuláris proliferációja, a vazokonstriktio, az endotélsejtek intraluminális betüremkedéséből keletkező „dugók” kialakulása, az endoteliális nyúlványképződés, a fehérjeexpressziós mintázat megváltozásával járó endoteliális-mezenchimális tranzíció (EndMT), a fibrinlerakódás és vérlemezke aggregáció, és a tumor indukálta angiogenezis (Haskó és mtsai, 2019; Karreman és mtsai, 2023; Krizbai és mtsai, 2015b; Lorger és mtsai, 2010).

Az agyi metasztázisképzés egyedülálló tulajdonsága, hogy a tumorsejteknek lényegesen hosszabb időre van szüksége ahhoz, hogy az agyi kapillárisokon vagy posztkapilláris venulákon keresztül jussanak, mint amit más szervekben, például a májban, a mellékvesében vagy a tüdőben megfigyeltek (Paku és mtsai, 2000). Tumorsejt típustól függően ez a folyamat eltérő kinetikával, 1-14 napot vehet igénybe (Haskó és mtsai, 2019; Karreman és mtsai, 2023; Kienast és mtsai, 2010; Lorger és mtsai, 2010). Korábbi megfigyeléseink szerint például a tripla negatív emlőkarcinóma sejtek extravazációja jellemzően a tumorsejtek keringésbe juttatását követő 4-5. napon következik be (Haskó és mtsai, 2019).

Extravazáció során a tumorsejtek kezdetben megnyúlt morfológiája, amelyet a kapillárisok méretéhez igazítva az elakadás után vesznek fel, megváltozik és citoplazma nyúlványokat növesztenek, amelyekkel benyomulnak az érfalba. Az esetek többségében ráadásul a plazmamembránon az apoptózisra jellemző, kisebb-nagyobb blebek (membrán lefűződések) jelennek meg. Ezzel egyidejűleg az endotélsejtek is anélkül, hogy elpusztulnának, blebeket képeznek, ami miatt az érintett érszakasz felhólyagosodottnak látszik. Ez a kaotikus érmorfológia azonban rendeződik a tumorsejtek transzmigrációját követően (Haskó és mtsai, 2019).

A tumorsejtek átvándorlása kétféleképpen történhet. Egyedi preferenciájuk szerint választhatják a paracelluláris útvonalat, az endotélsejteket összekötő sejtkapcsolatok felbontásával, vagy a transzcelluláris útvonalat, közvetlen az endotélsejteken keresztül a

junkciók megtartása mellett. Előbbire példa a melanómasejtek, utóbbira a tripla negatív emlőkarcinóma sejtek (Herman és mtsai, 2019).

1.6.2. A metasztatikus tumorsejtek interakciói az NVE elemeivel

Az agy a többi szervtől merőben eltérő sejtösszetételének és tulajdonságainak köszönhetően rendkívül speciális környezetet nyújt a metasztázisok számára, amely a tumorsejteken kívül a vaszkuláris sejteket (endotélsejtek és periciták), a gliasejteket, a neuronokat és a tumort infiltráló immunsejteket foglalja magába. Ezeken kívül a bazális membrán, melynek komponenseit a vér-agy gát sejtjei termelik, elősegíti a tumorsejtek adhézióját, invázióját és alapvető sejt túlélési szignálokkal látja el őket az extravazáció után.

Az NVE szerepe kettős az agyi metasztázisok kialakulásában: egyfelől a vér-agy gát létrehozásával védi a központi idegrendszert a betolakodó tumorsejtektől, másfelől aktívan részt vesz az áttétet képező sejtek védelmében azok extravazációja és proliferációja során (Wilhelm és mtsai, 2018).

Amikor a tumorsejtek megkezdik extravazációjukat, legelőször az endotélsejtekkel kerülnek kapcsolatba, amelyben számos sejt felszíni és adhéziós molekula, proteolitikus enzim és jelátviteli útvonal érintett. Ezek a molekuláris mechanizmusok, mint például a Rho-Rho-asszociált protein kináz (ROCK) útvonal, hatással vannak a tumorsejtek adhéziós és migrációs tulajdonságaira, másfelől szerepet játszanak az endotélsejtek közötti junkciók megbontásában (Wilhelm és mtsai, 2013). Ezenfelül az endotélsejtek a kemoterápiás szerek citotoxikus hatásaival szemben védelmet biztosítanak a tumorsejtek számára azok átvándorlását követően. A tumorprotektív szerepért többek között a réskapcsolat- és endotelin receptor-mediált szignalizáció és a vér-agy gát négyszeres védvonalát erősítő efflux transzporterek felelnek (Wilhelm és mtsai, 2018).

A daganatsejtek, ahogy osztódnak, a meglévő kapillárisokat maguk köré hurkolják és bekebelezik őket az endotélsejtekkel és pericitákkal együtt (Haskó és mtsai, 2019; Karreman és mtsai, 2023). A daganatos sejtekkel kölcsönható partnerek sorában a periciták érdekes módon tumort segítő tulajdonságokkal vannak felruházva. Ugyanis különféle prometasztatikus faktorok, különösen az inzulinszerű növekedési faktor-2 (IGF2) szekréciójával elősegítik kifejezetten az emlőkarcinóma sejtek szaporodását, másrészt ECM elemek szintézise révén fokozzák a tumorsejtek adhézióját (Molnár és mtsai, 2020). Ezt alátámasztja, hogy a humán agyi metasztázisok hatására megváltozik a periciták molekuláris identitása és az ECM-termelő csoport válik dominánssá (Bejarano és mtsai, 2024). Továbbá egy friss *in vitro* vizsgálat szerint az emlőkarcinóma sejtek és periciták közötti adhézió

erősebb és hosszabb ideig megmarad, mint amit az endotélsejtekkel alakítanak ki, amely a transzmigrációt követő perivaszkuláris túlélésüket és szaporodásukat szolgálhatja (Csonti és mtsai, 2024).

A központi idegrendszer rezidens immunsejtjei, a mikroglia-sejtek a metasztatizáló tumorsejtek jelenlétére adott reakciók frontvonalában állnak. A tumor körül változó számban jelennek meg, ahol antagonisztikus szerepet töltenek be a mikrokörnyezetben uralkodó körülményekhez mérten. Pro- és antiinflammatorikus citokinek, növekedési faktorok és enzimek termelésével pro- és antitumorogén aktivitást mutathatnak, amely a tumorsejtek proliferációját, invázióját, angiogenezisét és az immunválaszokat szabályozza (Caffarel és mtsai, 2022; Lorger és mtsai, 2010).

Az NVE agyi parenchima felőli oldalát figyelembe véve kevés információ áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a neuronok és a tumorsejtek milyen kölcsönhatást gyakorolnak egymásra a metasztázisképzés kezdeti szakaszán. Azonban nemrégiben megfigyelték, hogy a neuronok hatására az ingerületátvitelben és a funkcionális plaszticitásban részt vevő receptorok és neuromodulátorok génexpressziós szintje fokozódik, míg egyes neurotranszmitterek, mint például a gamma-aminovajsav (gamma-aminobutyric acid, GABA) szintje csökken az emlőkarcinóma sejtekben. Ezek a változások felkészítik a tumorsejteket arra, hogy alkalmazkodni tudjanak az új környezeti feltételekhez az agyban (Deshpande és mtsai, 2022).

Abluminális elhelyezkedésüknél és verzatilis funkcióiknál fogva az asztrociták karmesterei számos vaszkuláris és neuronális folyamatnak. Újonnan felismert szerepeik révén, amelyet a veleszületett és adaptív immunitásban töltenek be, központi megvilágításba kerültek a központi idegrendszert érintő patológiás állapotokban, beleértve a daganatos megbetegedéseket is (Priego és mtsai, 2019). Az agyi áttétképzés korai szakaszának tipikus kísérőjelensége a peritumorális asztrogliózis. Miután a tumorsejtek áthaladnak az endotéliumon, áttörik a *membrana limitans gliae perivascularis*, amely nem más, mint a kapillárisok felszínét borító asztrocita végtalpak majdnem folytonos rétege. A tumor növekedésével az asztrocita végtalpak kiszorulnak a tumor felszínére (Haskó és mtsai, 2019). Az asztrociták a tumorsejtekkel szemben tanúsított Janus-arcú viselkedésükkel a daganat sorsát erőteljesen befolyásolják (Wilhelm és mtsai, 2018). Egyfelől a plazminogén-plazmin enzimátikus konverzióját végző plazminogén aktivátorok szekréciójával gátolják a metasztázis növekedés kezdeti lépéseit. A fibrinolízisben is szerepet játszó szerin proteáz plazmin az asztrociták plazmamembránjában ülő Fas ligand (FasL) hasításával és felszabadításával a tumorsejtek apoptózisát váltja ki, míg a tumorsejtek felszínén lévő L1-

sejtadhéziós molekula (L1 cell adhesion molecule, L1CAM) hasításával és inaktivációjával megakadályozza a tumor növekedését és a kapillárisok inkorporációját. Másfelől az asztrociták direkt sejt-kapcsolatokat létesítenek a daganatsejtekkel, amelyeken keresztül fokozzák bennük a sejttúlélést indukáló gének expresszióját és az endotélsejtekhez hasonlóan a kemorezisztencia kialakításában segítik őket (Valiente és mtsai, 2014). Továbbá különféle protumorigén faktorokat, köztük exoszómákat, proteázokat és proinflammatorikus citokineket is kibocsátanak, ezáltal támogatják a daganatsejtek túlélését az agyban (Q. Chen és mtsai, 2016; L. Wang és mtsai, 2013; L. Zhang és mtsai, 2015).

Összességében tehát az NVE sejtjei és a metasztatikus tumorsejtek szerteágazó interakciók útján hatnak egymásra. Ezeknek a sejteknek a hálózata által létrehozott mikrokörnyezetben, ahogy a primer tumorok esetén is megfigyelhető, a gyulladás a tumornövekedés és progresszió egyik legfontosabb meghatározó tényezője (Hanahan, 2022). A daganatképződés gyulladásos folyamataiban az inflammaszómák alapvető szerepet játszanak (Karki és mtsai, 2019), azonban agyi metasztázisok esetében nem ismert, hogy aktiválódnak-e inflammaszómák, és ha igen, akkor milyen sejtekben és milyen következményekkel jár az aktivációjuk.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A központi idegrendszer betegségeinek többségéhez, beleértve az öregedéssel járó patológiás állapotokat is, neuroinflammatorikus folyamatok társulnak (Wilhelm és mtsai, 2017). Az agyi metasztázisok ez alól nem képeznek kivételt. A neuroinflammációt kiváltó vész szignálok érzékelésének és feldolgozásának első vonalában az asztrociták kiemelkedő szerepet játszanak (Doron és mtsai, 2019). A különféle patológiás stimulusok hatására az asztrocitákban molekuláris szinten meghatározott sejtprogramok sora indul el, amelyek morfológiai és funkcionális változásokhoz vezetnek (Escartin és mtsai, 2021). Ilyen molekuláris folyamat a proinflammatorikus expressziós profil kialakulása, amely az áttétképzésre és progresszióra hatással lehet. Ezek tudatában az értekezés alapját képező kísérletes munka a következő kérdések megválaszolására irányult:

- Meghatározni, hogy az NLRP3 inflammaszóma szerepet játszik-e a tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisainak patogenezisében.

Kimondott céljaink között szerepelt:

- Kimutatni, hogy az NLRP3 inflammaszóma komponensek expresszálódnak-e az agyi mikro környezetben a tripla negatív emlőkarcinóma metasztázisképzése során.
- Tisztázni, melyik sejt típusban fejeződnek ki az inflammaszóma komponensek, amelyek az IL-1 β szekréció révén felelősek a tumor gyulladáshoz vezető környezetének kialakításában és fenntartásában.
- Megállapítani, milyen hatással van az NLRP3 inflammaszóma aktiváció és az inflammaszóma-függő IL-1 β 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 mikroglia-reakciónak.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Sejttenyésztés

3.1.1. Humán asztrocita tenyésztés

Az agykérgi humán asztrocitákat 5% magzati marhasavót (fetal bovine serum, FBS), sejtnövekedést támogató tápfolyadék kiegészítőt (astrocyte growth supplement, AGS) és penicillin/sztreptomycin antibiotikum keveréket (100 U/ml és 100 µg/ml) tartalmazó asztrocita médiumban (AM) tenyésztettük. Mind a primér sejtek, a tápfolyadék és az adalékanyagok a ScienCell Research Laboratories cég termékei. A sejteket poli-L-lizinnel bevont műanyag tenyésztőcsészékbe szélesztettük és 2-5 passzázs szám között használtuk.

3.1.2. Egér asztrociták izolálása és tenyésztése

A primér egér asztrocita tenyészet előállításához posztnatális 1-2 napos (P1-2), beltenyésztett BALB/cAnNCrl (röviden BALB/c, Charles River Laboratories) egerek agyát dolgoztuk fel. Ebből a célból az egereket először dekapitáltuk, az agyak eltávolítása után a szaglógumókat és kisagyat leválasztottuk, majd az agyhártyákat hideg, steril foszfát pufferelt sóoldatban (PBS) óvatosan lefejtettük. A kinyert agyszövetet alacsony glükóz tartalmú (1 g/l) Dulbecco módosította Eagle médiumba (DMEM; Thermo Fisher Scientific) tettük, amelyben pipetta és steril fecskendőre szerelt hosszú tű (21 G, B.Braun) segítségével mechanikusan disszociáltuk. Következő lépésben a szövetszuspenziót 40 µm pórusméretű nejlonszűrőn átszűrtük és az így kapott, egyedi sejtekre szétválasztott szuszpenziót poli-L-lizinnel bevont csészékbe szélesztettük. A tenyészetet 10% FBS-sel (Thermo Fisher Scientific), valamint gentamicin (100 µg/ml; Thermo Fisher Scientific) és amfotericin B (500 ng/ml; Thermo Fisher Scientific) antibiotikum-antimikotikum keverékével kiegészített DMEM-ben tartottunk fenn. Amikor a sejtek elérték a konfluens állapotot, primér tenyészetként vagy legfeljebb egyszeri passzálást követően azonnal felhasználásra kerültek.

3.1.3. Tumor sejtvonalak tenyésztése

Munkánk során humán és egér tripla negatív emlőkarcinóma sejtvonalakkal dolgoztunk. A humán sejtvonalakat a Memorial Sloan Kettering Cancer Center onkológiai intézettől szereztük be Dr. Joan Massagué intézetigazgató jóváhagyásával. A sejtvonal pár egyike a viszonylag széles metasztatikus profillal rendelkező MDA-MB-231-TGL (MDA-TGL; RRID:CVCL_VR35) parentális vonal, amelyet eredetileg egy 51 éves emlőrákkal

diagnosztizált beteg pleurális effúziójából izoláltak (Cailleau és mtsai, 1978). Ezeket a sejteket *in vivo* képalkotó vizsgálatok céljából módosították egy mesterséges fúziós riporter génnel (herpes simplex vírus-1 timidin kináz (HSV1-TK)/zöld fluoreszcens fehérje (GFP)/luciferáz (Fluc); TGL) bevitelével (Minn és mtsai, 2005). A másik humán sejtvonal az agyi tropizmussal bíró, vagyis fokozott agyi áttétképzést mutató MDA-MB-231-BrM2 (MDA-BrM2; RRID:CVCL_VR36) variáns, amelyet immundeficiens egerek agyi áttétjeiből nyertek a parentális sejtpopuláció két egymást követő szelekciójával (Bos és mtsai, 2009). Mindkét sejtípust 10% FBS-t (Thermo Fisher Scientific) tartalmazó DMEM-ben növesztettük.

A tripla negatív emlődaganat állatkísérletes modelljeként tandem Tomato piros fluoreszcens fehérjét (tdTomato, tdT) expresszáló 4T1 egér emlőkarcinóma sejteket (4T1-tdT) használtunk. A kiindulási 4T1 sejtvonalat az American Type Culture Collection sejtbank szolgáltatta. Ez a sejtvonal egy onkogén vírust hordozó BALB/c törzs spontán kialakult emlődaganatának alpopulációjából származik. Tumormodellként való széles körű elterjedését jól szemlélteti, hogy a humán emlőkarcinómával nagyban átfedő metasztatikus tulajdonságokat mutat (Pulaski és mtsai, 2001). A 4T1 sejtek genetikai módosítását egy korábbi tanulmányunkban leírtak szerint hajtottuk végre (Haskó és mtsai, 2019). A létrejött 4T1-tdT sejteket Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Thermo Fisher Scientific) 1640 médiumban tartottuk, amelyet kiegészítettünk 5% FBS-sel (Thermo Fisher Scientific). A tdT expresszió megőrzésére szolgáló szelekciós ágensként G418 antibiotikumot (Thermo Fisher Scientific) használtunk.

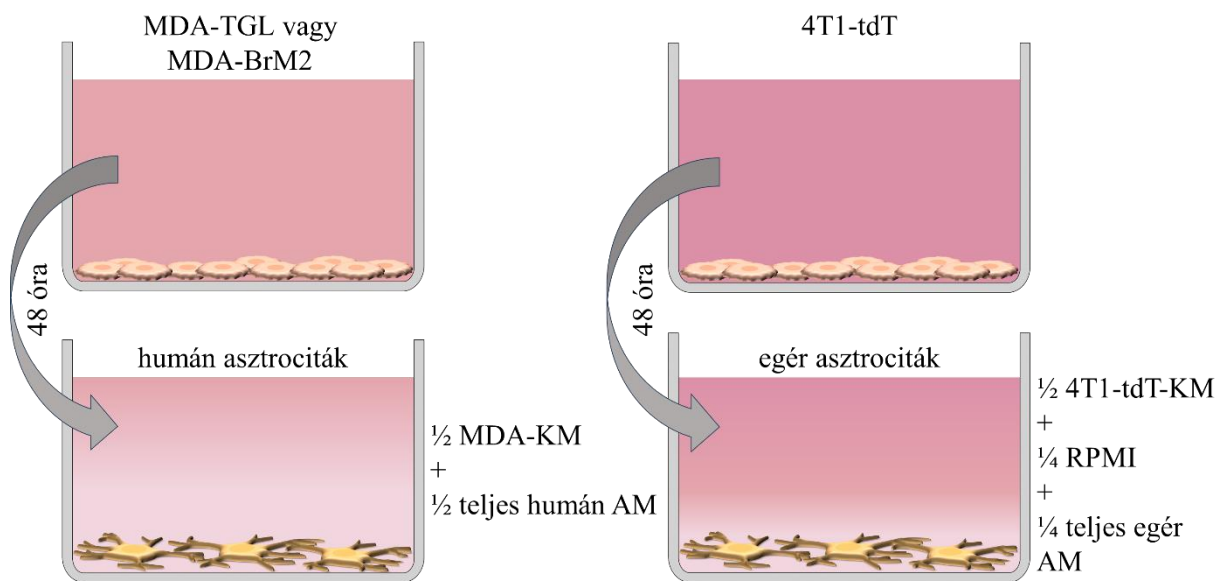
Minden sejtípust standard körülmények között (37°C, 5% CO₂ tartalom, 85-95% páratartalom) tartottuk. Mind a humán, mind az egér tumor sejtvonalat a rájuk jellemző, eredeti genetikai profil ellenőrzése végett egy rutinszerűen használt, rövid tandem ismétlődés (short tandem repeat, STR) alapú tesztnek vetettük alá. Az MDA sejtvonalak elemzése a Thermo Fisher Scientific vállalat Applied Biosystems szolgáltatásával készült el, míg a 4T1-tdT sejtvonal validálását a Microsynth cég végezte. Továbbá a *Mycoplasma* kontamináció kizárására rendszeres vizsgálatot folytattunk a MycoAlert Mycoplasma Detection Kittal (Lonza).

3.1.4. Kondicionált médiumok készítése

A humán asztrocita-kondicionált médium előállításához a humán asztrocitákat poli-L-lizinnel bevont 6-lyukú lemezekben 90%-os konfluenciáig növesztettük. Az egér asztrocitákat a humán megfelelőjével azonos módon tenyésztettük. Esetükben azonban a konfluens állapot

beállta után a sejtek a saját médiumuk helyett szérumban RPMI és teljes egér asztrocita médium 1:1 arányú keverékét kapták. Az MDA-TGL vagy MDA-BrM2 sejtekből 5×10^5 db-ot ültettünk 6 cm-es tenyésztőcsészékbe a saját médiumukban, majd másnap a tápfolyadékot teljes humán asztrocita médiumra cseréltük. A 4T1-tdT sejteken a médiumot 24 óra elteltével szérumban RPMI és teljes egér asztrocita médium 1:1 arányú keverékére lecseréltük. Az így kapott kondicionált médiumokat 48 óra elteltével összegyűjtöttük az adott sejttípusról.

A humán asztrocitákat poli-L-lizinnel bevont 6-lyukú sejtenyésző lemezre raktuk ki. 90%-os konfluencia esetén a saját médiumot friss, teljes humán asztrocita médium és MDA-TGL vagy MDA-BrM2 kondicionált médium 1:1 arányú elegyére cseréltük. Az egér asztrocitákat szintén poli-L-lizinnel bevont 6-lyukú lemezekben tenyésztettük. A sejtek a konfluencia elérése után $\frac{1}{4}$ szérumban RPMI, $\frac{1}{4}$ teljes egér asztrocita médium és $\frac{1}{2}$ 4T1-tdT kondicionált médium keverékét kapták. Az így kapott tumorsejt-aktivált kondicionált médiumokat az asztrocitákról 48 óra után összegyűjtöttük (3. ábra).



3. ábra: Humán és egér tumorsejt-aktivált kondicionált médium készítésének sematikus ábrája. AM: asztrocita médium, MDA-KM: MDA-kondicionált médium, 4T1-tdT-KM: 4T1-tdT-kondicionált médium

Negatív kontrollként nem kondicionált médiumot alkalmaztunk. A kondicionált médiumokat minden esetben $0,2 \mu\text{m}$ pórusméretű fecskendőszűrőn (Sarstedt) átszűrtük, hogy a sejttörmeléktől megszabaduljunk.

Bizonyos esetekben, ahol azt külön feltüntettük, a kondicionált médiumokat 2 napig $1 \mu\text{M}$ MCC950-nel (DMSO-ban oldva; Invivogen) kezelt humán és egér asztrocitákról gyűjtöttük össze. Kontrollként a dimetil-szulfoxid (DMSO; Merck) mint vivőanyag szolgált, amelynek a végkoncentrációja nem haladta meg a $0,1\%$ -ot.

3.1.5. Sejtproliferációs esszé

Az IL-1 β emlőkarcinóma sejtek proliferációjára gyakorolt hatásának vizsgálatához 10⁴ MDA-TGL, MDA-BrM2 vagy 4T1-tdT sejtet 6-lyukú sejtenyésző lemezekben tenyésztünk 10 ng/ml rekombináns IL-1 β (ImmunoTools) jelenlétében vagy hiányában. A tápfolyadékot és az IL-1 β kezelést 2 nap múlva frissítjük.

Az asztrocita szekretóm (kondicionált médium) és a tumorsejtek proliferációja közötti kapcsolat felderítésére az emlőkarcinóma sejteket (10⁴ sejt/lyuk) 4 napon keresztül a nekik megfelelő humán vagy eger asztrocita-kondicionált médiumban, vagy tumorsejt-aktivált asztrocita-kondicionált médiumban tenyésztjük. A kísérletekben a nem kondicionált asztrocita médium kontrollként funkcionált. A sejtek 48 óra elteltével a kezelésüknek megfelelően friss médiumot kaptak.

Az NLRP3 inflammaszóma aktivációja révén felszabaduló asztrocita eredetű IL-1 β proliferatív hatását is megvizsgáltuk. Ennek során az MDA-BrM2 és a 4T1-tdT sejtek humán, illetve eger asztrocitákról gyűjtött kondicionált médiumban voltak tartva, amelyet 48 órán át inkubáltunk 1 μ M MCC950 jelenlétében.

Azoknál a kísérleti elrendezéseknél, ahol azt külön kiemeltük, az IL-1 β downstream hatásának kivédése érdekében IL-1 β neutralizáló antitestet (Bio-Techne) adtunk a kondicionált és az aktivált kondicionált médiumokhoz 1,33 μ g/ml végkoncentrációban. Negatív kontrollként normál kecske immunglobulin G-t (IgG; Bio-Techne) adtunk a tápfolyadékhoz a neutralizáló antitesttel azonos koncentrációban. A médiumokat a felhasználás előtt 30 percig inkubáltuk az antitestekkel szobahőmérsékleten.

A tumorsejtek proliferációjának nyomon követésére fáziskontraszt képeket készítettünk kezelésenként 2-2 párhuzamos tenyészet 5-5 látóteréből napi rendszerességgel 4 napon keresztül. A képek rögzítése egy digitális kamerához (ORCA-Fusion CMOS kamera, Hamamatsu Photonics) csatlakoztatott Nikon Eclipse TE2000-U invertált mikroszkóppal történt 10 \times objektívvel (CFI Plan Fluor DL, 0,30 NA). A sejteket a Fiji (Max Planck Molekuláris Sejtbiológiai és Genetikai Intézet) nyílt forráskódú, ingyenes képfeldolgozó szoftver Cell Counter sejtszámoló bővítményével manuálisan számoltuk le.

3.2. Felhasznált állatok

Vizsgálatainkba 20 \pm 3 g-os fiatal felnőtt (8-12 hetes) nőstény BALB/c és FVB/Ant:TgCAG-yfp_sb #27 (Venus) egereket vontunk. Utóbbi egerek sajátossága az endoteliális Venus-YFP (Yellow Fluorescent Protein) sárga fluoreszcens fehérje expresszió.

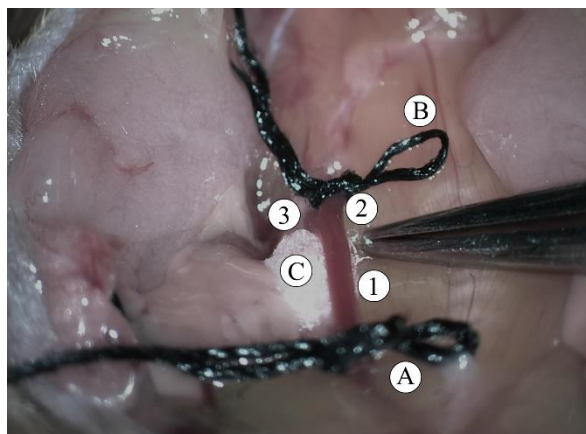
Ezt a transzgenikus egértörzset Dr. Szabó Gábor jóvoltából a HUN-REN Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet bocsátotta rendelkezésünkre. Az állatokat állandó megfigyelés alatt és szabályozott körülmények között (12:12 órás sötét-világos periódus, $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ hőmérséklet) tartottuk. Az univerzális rágcslótáphoz (VRF1) és csapvízhez korlátlan hozzáférést biztosítottunk a számukra. A laboratóriumi állatok gondozásával kapcsolatos előírások teljes mértékben követték a széles körben elfogadott nemzetközi irányelveket és a kísérleti célokra felhasznált állatok védelméről és kíméletéről szóló magyar kormányrendeletet (40/2013. (II. 14.)). A vizsgálataink során végzett valamennyi kísérleti eljárást a Csongrád-Csanád Vármegyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Főosztálya engedélyezte (engedélyszám: XVI./764/2018, kelt: 2018.05.04.).

3.3. Kísérleti emlőadenokarcinóma agyi metasztázis modell

A hematogén úton kiváltott agyi metasztázis modellek közül az intrakarotikus oltás alkalmazása hosszú múltra tekint vissza (Machinami, 1973). Kutatócsoportunk a modellt az elmúlt években rutinszerűen használta (Figueira és mtsai, 2021; Haskó és mtsai, 2019; Herman és mtsai, 2019; Mészáros és mtsai, 2023; Molnár és mtsai, 2020; Sereno és mtsai, 2020). Ebben az alfejezetben igyekeztem a módszert kimerítő részletességgel kifejteni saját meglátásaimmal kiegészítve. A tankönyvekből, klinikai esetismertetésekéből, egyetemi jegyzetekből és értekezésekből tüzetesen megismerhetjük a nyak artériás ágrendszerének anatómiáját, azonban a műtéti eljárást taglaló magyar nyelvű ismeretanyagok felületessége okán az alábbiakban szándékozok átfogó képet adni annak technikai részleteiről és nehézségeiről.

Az intrakarotikus injektálásokhoz felhasznált BALB/c egereket (n=26) először izoflurán és szintetikus levegő gázkeverékével (4%; 0,2-0,4 l/perc áramlási sebesség) elaltattuk erre a célra kialakított indukciós kamrában. A légzési frekvencia csökkenésekor (~1,5 Hz) az izoflurán szintjét 2%-ra csökkentettük és az állatokat az előaltató dobozból a sztereotaxiás műszerre (RWD Life Science) csatlakoztatott altatómaszkra helyeztük. A narkózis kellően mély állapotáról a lábreflex ellenőrzésével bizonyosodtunk meg. A beavatkozás során a szemszárazság elleni védelmet egy karbomer hatóanyagú szemgél (Vidisic, Bausch & Lomb) nyújtotta, folyadékpótlás gyanánt pedig intraperitoneálisan (ip.) adott fiziológiás sóoldat (400 μl) szolgált. A műtét teljes ideje alatt a vitális paramétereket (légzési frekvencia, testhőmérséklet, cianózis) folyamatosan figyelemmel kísértük. Általános érvényű szempont volt, hogyha a légzés túl lassúvá vagy szabálytalanná vált, vagy ha zihálás

lépett fel, az izoflurán koncentrációját csökkentettük. Az állatok testhőmérsékletét fűtőpaddal tartottuk $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ -on. A műtéti eljárás megkezdéséhez az állatokat a hátukra fektettük, majd a mellső és hátsó lábuknál fogva latex gumigyűrűkkel rögzítettük. A nyaktájék borotválása után a bőrfelszínt 70%-os etanollal és 10%-os povidon-jód tartalmú oldattal (Betadine, Egis Gyógyszergyár Zrt.) fertőtlenítettük. A preparálást a bőr felnyitásával kezdtük a mediánszagittális sík mentén a mellsont markolata és az állkapocscsont közötti 10-12 mm-es szakaszon. Ezt követően mikrosebészeti csipeszekkel az állkapocsalatti nyálmirigyeket tompán szétválasztottuk az őket borító vékony kötőszövetes tok megbontásával és oldalra kihajtottuk őket. Az ezen a ponton feltáruló nyakizmok közül a tracheától laterálisan, a *musculus (m.) omohyoideus*, *m. sternomastoideus* és *m. digastricus posterior* által határolt nyaki izomháromszög (*trigonum caroticum*) alatt találtuk a közös fejverőeret (*arteria (a.) carotis communis*, ACC), amely a tőle laterálisan fekvő vagozszimpatikus köteggel és *vena jugularis internával* közös kötőszövetes hüvelybe (*vagina carotica*) van beágyazva. A jobb oldali ACC preparálása gondos, tárogató mozdulatokat igényelt, hogy minél hosszabb szakaszon lefejtsük a kötőszövetet és az idegkötegtől sérülésmentesen elválasszuk. Az ACC-től rostrális irányba haladva láthatóvá vált a carotis villa, amelynek mediálisan kilépő ága az *a. carotis externa* (ACE). Az ACE kidolgozásánál hasonló technikát követtünk, mint az ACC esetén. A preparálást követően az ACC proximális szakasza és az ACE eredése alatt egy-egy selyem sebészfonalat (7/0, Fine Science Tools) fűztünk át. Az ACE átmeneti ligatúrája lehetővé tette, hogy az anyagáramlás az *a. carotis interna* (ACI), vagyis az agyi keringés irányába történjen. Az ACC-t steril PBS-sel átítatott, apró vattagolyóval „alápárnáztuk”, amely kontrasztosabbá tette az érszakaszt, valamint a szúrásakor kiszivárgó vért képes volt elvezetni. Továbbá segített nedvesen tartani az artériát, ezzel mérsékelve a vérzés kockázatát. A sebészfonalakból oldható hurkot kötöttünk az erek köré a szúrásból adódó vérveszteség minimalizálása végett. Az így elkészült sebészeti fázist az **4. ábra** illusztrálja.



4. ábra: Az intrakarotikus oltáshoz előkészített, preparált terület. A jobb oldali arteria carotis communis (1) és két ága, az arteria carotis externa (2) és arteria carotis interna (3) kiemelve, proximális (A) és disztális sebészfonallal (B) reverzibilisen elszorítva és nedves vattagolyóval (C) aládúcolva.

Az injekciós tű (30 G, Becton, Dickinson and Company) érbe helyezése éppoly kritikus lépésnek számított, mint a befecskendezés. Ennek előfeltétele volt, hogy a tűt a proximális lekötéshez minél közelebb, hegyesszögben (10° alatt), az artéria anatómiájához és rugalmasságához igazodva vezessük az érbe. Metasztázis modellünk egyik kulcsmozzanata az volt, hogy az ACC-n keresztül 10^6 4T1-tdT sejtet juttattunk a véráramba 100 μ l steril Krebs-Ringer oldatban (150 mM NaCl, 5,2 mM KCl, 2,2 mM CaCl₂, 0,2 mM MgCl₂, 6 mM NaHCO₃, 5 mM HEPES, 2,8 mM D-glükóz; pH = 7,4). A kontroll esetekben sejtmentes Krebs-Ringer oldatot fecskendeztünk be. A tű metszlapjának ventrális állása és teljes intraluminális helyzete, a tű egyhelyben tartása az injektálás teljes ideje alatt, valamint a viszonylag lassú, egyenletes és buborékmentes injektálás jelentette az injekció maradéktalan beadásának zálogát. Az injektálás sikerességét mutatta, hogy az artéria kitisztult a befecskendezett sejtszuszpenziótól. Az injektálás befejeztével az ACC disztális végét felemeltük, amivel elkerültük a nemkívánatos anyag visszaáramlást. Az artéria alá tömött vatta eltávolítása után az ACC-t a szűrés helye fölé helyezett vérzéscsillapító zselatin szivaccsal (Gelita, B.Braun) tamponáltuk, majd a nyálmirigyet visszahajtva steril fültisztító pálcikával lenyomtuk, miközben a tűt óvatosan kihúztuk az érből. A lekötések ezután egyesével kioldottuk, elsőként a proximális szálát meglazítva. Végül a feltárt területet anatómiai pozícióba rendeztük, a sebészleket szövetragasztóval (Vetbond, 3M) egyesítettük és a sebet Betadine oldattal bekentük. A kísérleteket a tumorsejtek beoltása után 2, 5 és 7 nappal fejeztük be. Ezeket az időpontokat korábbi megfigyeléseink alapján, az emlőkarcinóma sejtek agyba történő extravazációját megelőző, az alatti és azt követő fázisok figyelembevételével választottuk ki (Haskó és mtsai, 2019).

Vizsgálataink során egy másik szisztémásan kialakított agyi metasztázis modellhez kapcsolódó protokollt is átültettünk a gyakorlatba, amely az emlőkarcinóma sejtek intrakardiális bejuttatásán alapszik (Campbell és mtsai, 2012). A széles körben használt beviteli mód eredményeként a metasztatikus tumorsejtek a szív bal kamrájából kiindulva az artériás rendszeren keresztül eljutnak az agyba, azonban a véráram útján számos más extrakraniális célszervbe (pl. tüdő, máj, csont, mellékvese, petefészek) is adhatnak áttétet (Knier és mtsai, 2022; Miarka és mtsai, 2021). A modellt az agyban létrejövő mikrometasztázisok globális eloszlásának maximalizálása végett alkalmaztuk. Az oltás gyakorlati megvalósítása az intrakarotikus oltásnál leírt előkészületeket vette igénybe, azonban kisebb invazivitással járt. Ezekhez a kísérletekhez Venus egereket (n=19) használtunk. Az anesztéziát követően az állatok mellkasáról a szőrt eltávolítottuk, majd a szúrás környékét 70%-os etanollal és 10%-os Betadine oldattal fertőtlenítettük. A szúrás a mellkas középvonalában kitapintható *incisura jugularis* és *processus xyphoideus* csúcsa által határolt egyenes képzeletbeli felezőpontjától laterálisan, anatómiailag kissé balra, a 4. bordaközi tér magasságában végeztük. A bőrt két ujjal kifeszítve függőleges állásban vagy enyhén döntve bevezettük a tűt (30 G; Becton, Dickinson and Company) a bal kamrába, ahova 2×10^6 4T1-tdT sejtet juttattunk 200 μ l steril Krebs-Ringer oldatban. Az injekciót sikeresnek ítéltük, ha a kamrába hatoló tűn keresztül világosvörös vér szökött a fecskendőbe az injekció előtt és után. A tű kihúzásakor enyhe negatív nyomást fejtettünk a dugattyúra, hogy megelőzzük a tumorsejtek beszűrődését és szétoszlását a mellüregben, majd a szúrás helyén pár percig gyengén lenyomtuk a mellkast steril fültisztító pálcikával a vérzés hatékony csillapítása végett. Azokat az állatokat, amelyekből az injekció során sötétvörös vénás vért sikerült venni, kizártuk a kísérletből. Az oltások átlagos sikeressége 90% körüli volt. A kísérletet 7 nappal az oltás után zártuk.

A beavatkozásokat követően az állatokat minden esetben a fűtőpadon hagytuk lábadozni. Miután magukhoz tértek, áthelyeztük őket egy tiszta ketrecbe és a kísérlet végéig egyesével tartottuk őket. A túlélési állapotukat és testsúlyukat naponta ellenőriztük. A túlélési arány 97-98%-os volt, és a posztoperatív időszak végére legfeljebb 5%-os testsúlycsökkenés volt mérhető. Fertőzés, seb diasztázis vagy belső vérzés nem alakult ki náluk, és nem mutatták a fájdalom krónikus jeleit.

3.4. *In vivo* inflammaszóma gátlás

Az MCC950 NLRP3 inflammaszóma gátló hatásának vizsgálatához a 4T1-tdT tumorsejtek oltását követően 7 napos túlélési időt választottunk. Az állatcsoport egyik fele az

injektálást követő 4. és 6. nap között naponta egyszer 10 mg/ttkg dózisban MCC950 (DMSO-ban feloldva, PBS-ben hígítva) ip. kezelésben részesült. A kezelés időpontját az alapján határoztuk meg, hogy a metasztatikus sejtek agyi kapillárisokon keresztüli diapedézise általában ez idő alatt következik be egérmodellekben (Haskó és mtsai, 2019; Karreman és mtsai, 2023; Kienast és mtsai, 2010; Lorger és mtsai, 2010). Az MCC950 kezelés kontrolljaként a csoport másik fele PBS-ben oldott DMSO-t kapott ip. A kísérlet végén az agyak további mintafeldolgozásra kerültek.

3.5. Szövetfixálás és metszés

A humán tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztatikus és kontroll szövetminták a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Pathológiai Intézetének hisztológiai archívumából származnak Prof. Dr. Tiszlavicz László intézetigazgató hozzájárulásával. A mintagyűjtés a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával zajlott (engedélyszámok: EMLOSEB001, kelt: 2017.01.31.; és 172/2022-SZTE RKEB, kelt: 2021.11.22.) az Orvos Világszövetség által 1964-ben kiadott és 2013-ban átdolgozott Helsinki Nyilatkozat alapelveivel összhangban. Az immunfestésekhez felhasznált két áttéti agyminta egyikét egy 41 éves nőbeteg okcipitális lebenyi daganatának, a másikat egy 39 éves nőbeteg frontális lebenyi daganatának sebészeti eltávolításából nyerték. A páciensek malignus alapbetegségének vagy az extrakraniális metasztázisok meglétének értékelésére nem került sor. Megfelelő tájékoztatást követően a betegek beleegyező nyilatkozat aláírásával önként rendelkeztek a beteganyag kutatási célokra való felhasználásáról. A szövettani minták fixálásában, paraffin-beágyazásában és metszetkészítésében (5 µm) a Pathológiai Intézet munkatársai voltak segítségünkre.

A 4T1-tdT tumorsejtekkel oltott egereket 2%-os 2,2,2-tribrómetanol (Merck) hatóanyagú anesztetikummal (320 mg/ttkg ip.) altattuk, majd 25 ml 0,1 M PBS-sel (pH = 7,4) és 25 ml 4%-os paraformaldehid (PFA) oldattal transzkardiálisan perfundáltuk. 24 órás utófixálást és 72 órás krioprotekciót követően az agyakat fagyasztó mikrotómmal (Frigomobil, Reichert-Jung) 20 µm vastag, szabadon úszó, koronális sorozatmetszetekre szeljük le. A kész metszeteket az immunhisztokémiai festésig 0,02%-os nátrium-aziddal (Merck) kiegészített PBS-ben (10 mM, pH = 7,4), 4°C-on tároltuk.

3.6. Immuncito- és immunhisztokémia

Az NLRP3 és ASC inflammaszóma komponensek, valamint az IL-1 β inflammaszóma termék expressziójának és lokalizációjának vizsgálatára indirekt immunfluoreszcens festési technikát alkalmaztunk. A 12-lyukú üvegaljú sejttenyésztő kamrákban (Ibidi) növesztett humán asztrocitákat, amelyek 24 órán át tumorsejt-kondicionált (MDA-TGL és MDA-BrM2) médiumnak voltak kitéve, 4%-os PFA-val fixáltuk 10 percig. Háromszori PBS mosást követően a sejteket 3% marhasavó albumint (bovine serum albumin, BSA; VWR International) és 0,2% Triton X-100 detergenst (Merck) tartalmazó PBS-ben 1 órán keresztül blokkoltuk a nonspecifikus kötőhelyek telítése céljából. Az elsődleges antitesteket (**2. táblázat**) a blokkoló oldatban hígítottuk, és a mintákat ebben egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk. Másnap újabb háromszori mosás után a sejteket a megfelelő fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestben (**2. táblázat**) szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk. A sejtmagokat a protokoll végén biszbenzimid (Hoechst 33342, 1 μ g/ml; Merck) festékekkel jelöltük, végül a sejteket fluoreszcencia fakulást csökkentő, vízdékony fedőanyaggal (FluoroMount-G, Thermo Fisher Scientific) lefedtük.

A humán agymetszeteken deparaffinálást (xilol) és rehidrációt (leszálló alkoholsor és desztillált vizes öblítés) követően hőindukált epitóp feltárást végeztünk előmelegített nátrium-citrát oldatban (10 mM, pH = 6,0; Merck) mikrohullámú sütőben (15 perc, 250 watt). Az egér agymetszeteket 0,5% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben (TPBS) 20 percig permeabilizáltuk. A 3% BSA-t tartalmazó TPBS-sel történő 1 órás blokkolást követően mindkét típusú preparátumot az elsődleges antitestekkel (**2. táblázat**) egy éjszakán át, 4°C-on, lassú kevertetés (50 rpm) mellett inkubáltuk. A metszeteket háromszori, egyenként 10 perces PBS mosás után a megfelelő, fluorofórral konjugált másodlagos antitestben (**2. táblázat**) inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, sötétben. További mosási lépések során a második mosás alkalmával a humán agymetszeteken 5 percig, az egér agymetszeteken pedig 10 percig tartó nukleáris ellenfestést (Hoechst 33342, 1 μ g/ml) alkalmaztunk. Utolsó lépésként a metszeteket FluoroMount-G fedőanyaggal fedtük.

3.7. Fluoreszcens mikroszkópia

A fluoreszcens jel detektálására háromféle konfokális mikroszkópot használtunk. Ezek közül a Leica TCS SP5 lézer-pasztázó mikroszkóppal (Leica Biosystems) egy 63 \times olajimmerziós objektívvel (HCX PL APO lambda blue, 1,4 NA) készítettünk felvételeket, a VisiScope CSU-W1 spinning disk (Nipkow-féle korong) konfokális mikroszkóppal (Visitron

Systems) pedig egy 60× olajimmerziós objektívvel (PlanApo N, 1,42 NA). Mindkét mikroszkóp a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont Mikroszkópos Sejtanalízis Laboratóriumának gondozásában lévő géppark része. Egyes konfokális és szuperrezolúciós képeket egy Axio Observer Z1 invertált epifluoreszcens mikroszkóp vázra (Zeiss) épített, stimulált emisszió-deplécio (STED) elven működő, felbontás növelő rendszer (STEDYCON, Abberior Instruments) segítségével rögzítettük, amelyhez egy szuperrezolúcióra alkalmas 100× olajimmerziós objektívet (alpha Plan-Apochromat, 1,46 NA) választottunk. A képalkotás során z-irányú képsorozatokot vettünk fel, amelyeknek a mélységét a humán minták esetén a minták vastagságából adódóan kb. 5 µm-ra állítottuk, az egér agymetszetek esetén 20 µm-ra. A z-sorozatokot ezután a Fiji szoftverben egyesítettük. A rekonstruált képeken intenzitás-küszöbölést hajtottunk végre, melynek eredményeképpen létrejött bináris képen a háttértől elkülönülő objektumok (pozitív jelek) bitszintű diszjunkciójával megkaptuk, hogy a vizsgált fehérje specifikus immunfestődése hány százalékban egyezik meg a másik vizsgált fehérje specifikus immunfestődésével. A százalékban kifejezett kolokalizáció egyszerűsítette a megjelenítést.

3.8. Asztrogliális IL-1β expresszió kvantifikációja

Az intrakarotikus metasztázis modellben az IL-1β peritumorális expressziójának számszerű meghatározásához az IL-1β és az asztrocitákat szelektíven jelölő gliális fibrilláris savas fehérje (glial fibrillary acidic protein, GFAP) kettős immunfestését végeztük el. Az immunhisztokémiai kísérletekhez a tumor és kontroll (Krebs-Ringer oldat) oltott, 7 napos, vivőanyaggal és MCC950-nel kezelt állatok agymintáit használtuk fel. Mindegyik csoportból összesen 5 agymetszetet válogattunk ki és minden egyes metszetből 8 vizsgálati területet (region of interest, ROI) választottunk ki. A konfokális mikroszkóppal készített optikai szeleteket, vagyis z-sorozatfelvételeket (x: 222 µm, y: 222 µm, z: 20 µm, lépésköz: 1 µm; VisiScope CSU-W1) végül a Fiji szoftver segítségével dolgoztuk fel. Ennek során standardizált protokoll szerint haladtunk, amely a következő műveleteket foglalta magába: az egyes optikai szeletek digitális egymásra vetítéséből származó képeken kiszámoltuk a pixelszámot külön-külön a GFAP- és IL-1β-immunpozitív jelre, valamint meghatároztuk az IL-1β-GFAP kolokalizációra vonatkozó pixelek számát is, majd ezeket az egyes csoportokra átlagoltuk. Az adatokat az összes pixelszámmal normalizáltuk.

3.9. Tumorméret meghatározás

A metasztatikus léziók méretének meghatározására és az NLRP3 inflammaszóma-gátlás tumorméretre gyakorolt hatásának tesztelésére a Venus egereket a 4T1-tdT sejtvonallal oltottuk be intrakardiálisan. A Venus-YFP fehérje endoteliális expressziójának és a 4T1-tdT sejtek fluoreszcenciájának kombinációja lehetővé tette, hogy a perivaszkuláris tumorokat immunhisztokémiai festés nélkül vizualizáljuk az agyban. A vizsgálat során két csoportba osztottuk az egereket. A kontroll csoportot ip. PBS-ben oldott DMSO-val, míg a kísérleti csoportot 10 mg/ttkg dózisú MCC950-nel kezeltük. A tumorinjektálást követő 7. nap elteltével az agy rostromaudális tengelye mentén 5 különböző szintről származó, 30 µm vastagságú metszetet használtunk fel. Mindkét csoportból ugyanazokat az agyterületeket magába foglaló, azonos távolságra eső ($1,12 \pm 0,16$ mm) metszeteket vetettünk össze. Korábbi tanulmányaink elsősorban az emlőkarcinóma áttétképzésének neokortexben zajló eseményeire összpontosítottak (Haskó és mtsai, 2019; Molnár és mtsai, 2020), így ezen az agyterületen készítettünk reprezentatív z-sorozatokat konfokális mikroszkóppal (VisiScope CSU-W1). A z-sorozatokat ezután a Fiji szoftverrel dolgoztuk fel. A daganatot jelző tdT-pozitív pixelszámokat átlagoltuk az 5 metszet 15 ROI-jából, majd az így kapott átlagértéket a csoportonkénti 3 egyedre átlagoltuk.

3.10. Mikrogliózis mértékének meghatározása

A peritumorális mikrogliózis kvantitatív meghatározásához a mikroglia marker ionizált kalciumkötő adaptor molekula 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba1) elleni immunfestést alkalmaztuk. Ugyanazt a szövetszövetfeldolgozási és mikroszkópos eljárást követtük, mint a tumorméret meghatározásnál. Az Iba1-pozitív pixeleket átlagoltuk 6 metszeten 8 ROI-ban, majd összehasonlítottuk az átlagokat mind a kontroll, mind az MCC950-kezelt csoportokban (N=3 állat/csoport), és normalizáltuk az összes pixelszámra.

3.11. RNS izolálás és valós idejű polimeráz lánreakció (qPCR)

A PCR vizsgálatokat sejttenyészeteken és szövetmintákon végeztük. A 6-lyukú lemezekben tenyésztett humán asztrocitákat szubkonfluens (kb. 90%) állapotban MDA-TGL vagy MDA-BrM2 kondicionált médiummal kezeltük 1 µM MCC950 jelenlétében vagy hiányában 24 órán keresztül. A kontroll sejtek nem kaptak tumorsejt-kondicionált médiumot. A sejteket 1 ml fenol és guanidin-izotiocianát összetételű, totál RNS izoláló oldatban (TRI Reagent, Thermo Fisher Scientific) gyűjtöttük össze. Az *ex vivo* kísérletekhez 4T1-tdT

sejtekkel oltott BALB/c egereket a fent részletezett módon kezeltük. Az állatokat 7 nap elteltével transzkardiálisan perfundáltuk 0,1 M PBS-sel (pH = 7,4) és az agyat jéghideg PBS-be merített agymátrixban disszekáltuk. A szaglógumókat és a kisagyat eltávolítottuk, majd a *fissura longitudinalis cerebri* mentén a nagyagyat óvatosan elfeleztük, elkülönítve ezzel a jobb oldali tumoros oldalt a kontralaterális, kontroll oldaltól. A féltekéket külön-külön 1 ml TRI Reagent oldatba tettük és Potter-Elvehjem kézi szövet homogenizátorban politetrafluoretilén (PTFE) mozsártörővel mechanikailag feltártuk. A minták közötti szöveti kontamináció elkerülése érdekében a homogenizátort többször alaposan átöblítettük desztillált vízzel minden egyes minta között.

A TRI Reagent oldatban lizált mintákhoz 200 µl kloroformot adtunk. A fázisszeeparálást követően a felső vizes fázisból össz RNS-t izoláltunk a Direct-zol RNA Miniprep Plus Kit (Zymed Laboratories) segítségével az izoláló készlet kézikönyvében foglaltak szerint. Az RNS-ről való kópia DNS (cDNS)-átíráshoz a Maxima First Strand cDNA Synthesis Kitet (Thermo Fisher Scientific) használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. Az amplifikációs reakciót Luminaris HiGreen Master Mixszel (Thermo Fisher Scientific) végeztük Bio-Rad CFX96 készüléken (Bio-Rad) a következő beállítások szerint: 40 cikluson át ismétlődő denaturációs (95°C, 15 másodperc), hibridizációs (60°C, 30 másodperc) és elongációs (72°C, 30 másodperc) lépés. A PCR során alkalmazott forward és reverse primer párokat a **1. táblázat** foglalja össze. Belső kontrollként a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (*GAPDH*) háztartási gént használtuk. A fluoreszcens jel detektálásához a küszöbértéket és a kvantifikálást a CFX Maestro szoftverrel (1.1-es verzió, Bio-Rad) végeztük. A génexpressziós változásokat a $\Delta\Delta C_t$ módszerrel értékeltük ki és az eredményeket a Microsoft Excel 2016 program segítségével ábrázoltuk.

Név	Forward primerszekvencia (5'-3')	Reverse primerszekvencia (5'-3')
<i>NLRP3</i> (humán)	GTGCCGTGTTCACTGCCTGGTAT	AGTGGGATTCGAAACACGTGCA
<i>CASP1</i> (humán)	TCTTGGAGACATCCCACAATGGGC	TGCGCTCTACCATCTGGCTGC
<i>IL1B</i> (humán)	AGCTCGCCAGTGAAATGATG	GCCCTTGCTGTAGTGGTGGT
<i>Nlrp3</i> (egér)	GGCGAGACCTCTGGGAAAAA	CTTCAAGGCTGTCCTCCTGG
<i>Il1b</i> (egér)	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	TGATGTGCTGCTGCGAGATT
<i>GAPDH</i> (humán)	GTGAAGGTCGGTGCAACG	GTGAAGACGCCAGTAGACTC

1. táblázat: a polimeráz lánreakciókhoz használt humán és egér specifikus primerek.

3.12. Fehéjeminták előkészítése és Western blot

A 4T1-tdT sejtekkel oltott 7 napos BALB/c egerek agyszövetéből történő fehérje kinyerés során ugyanúgy jártunk el, mint az RNS izolálás során azzal a különbséggel, hogy a hemiszfériumokat 1 ml hideg pufferoldatban homogenizáltuk, amely 10 mM PBS-t, SIGMAFAST proteáz inhibitor koktélt (1:100, Merck) és 1% Triton X-100-at tartalmazott. A kézi szövet homogenizátort az egyes minták között többször gondosan átöblítettük desztillált vízzel. A szövettörmelék leüleltetése (13 000 × g, 20 perc, 4°C) után a felülúszó fehérje koncentrációját bicinkoninsav (BCA) módszerrel (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) mértük meg. Ezt követően a fehérje kicsapást hagyományos metanol-kloroform módszerrel végeztük. A fázisszeparáláshoz 1 rész jéghideg metanolt és 1/8 rész kloroformot adtunk 1 rész felülúszóhoz. Az elegyet vortexeltük és centrifugáltuk (13 000 × g, 5 perc, 4°C). A vizes fázist óvatosan leszívtuk és a fehérjecsapadékot metanollal megmostuk. Újabb vortexelés és centrifugálás (13 000 × g, 5 perc, 4°C) után a felülúszót eltávolítottuk és a pelletet megszáritottuk. A mintákat kétszeres töménységű Laemmli-féle denaturáló mintapufferben (10% glicerin, 0,8% nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 0,04% brómfenolkék, 24 mM Tris-HCl (pH = 6,8), 5,72 M 2-merkaptotanol) visszaoldottuk és a Western blot kísérletek előtt 5 percig 95°C-on denaturáltuk.

Az azonos mennyiségű fehérjét tartalmazó mintákat standard denaturáló SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választottuk el. A fehérjéket ezután nagy fehérjekötő kapacitással bíró, 0,2 µm pórusméretű polivinilidén-fluorid (PVDF) membránokra (Bio-Rad) blottoltuk. A membránok szabad kötőhelyeit 3% BSA-t és 0,1% Tween-20 detergenst tartalmazó Tris-pufferelt sóoldatban (TBS-T) blokkoltuk, majd a membránra

transzferált fehérjék azonosítására a **2. táblázatban** szereplő elsődleges antitesteket használtuk. Másnap a blotokat háromszor 10 percig TBS-T-ben mostuk a membránhoz nem kötődött antitestek eltávolítása végett, majd a megfelelő, torma-peroxidázzal (horseradish peroxidase, HRP) konjugált másodlagos antitestekben (**2. táblázat**) való inkubációval folytattuk, amely szobahőmérsékleten 1 órán át tartott. A fehérjéket kemilumineszcens módon tettük láthatóvá a Clarity Chemiluminescence Substrate reagens (Bio-Rad) segítségével egy ChemiDoc MP System (Bio-Rad) géldokumentációs készülékben. A denzitometrálist az ImageLab szoftverrel (5.2. verzió, Bio-Rad) végeztük, és az eredményeket a β -aktin háztartási fehérje szintjére normalizáltuk.

Antitest	Gazda faj	Hígítás	Gyártó	Katalógusszám
Immuncito- és immunhisztokémia				
poliklonális anti-NLRP3 elsődleges antitest	kecske	1:100	Bio-Techne	NBP2-76806
poliklonális anti-GFAP elsődleges antitest	nyúl	1:300	Abcam	ab7260
monoklonális anti-GFAP elsődleges antitest	egér	1:200	Merck	G3893
monoklonális anti-ASC elsődleges antitest	egér	1:100	Santa Cruz Biotechnology	sc-271054
poliklonális anti-IL-1 β elsődleges antitest	nyúl	1:200	Abcam	ab9722
poliklonális anti-Iba1 elsődleges antitest	kecske	1:200	Abcam	ab5076
Alexa Fluor Plus 647 konjugált, anti-egér másodlagos antitest	szamár	1:500	Thermo Fisher Scientific	A32787
Alexa Fluor Plus 488 konjugált, anti-nyúl másodlagos antitest	szamár	1:500	Thermo Fisher Scientific	A32790
Alexa Fluor 594 konjugált, anti-kecske másodlagos antitest	szamár	1:500	Thermo Fisher Scientific	A-11058
Alexa Fluor 488 konjugált, anti-kecske másodlagos antitest	szamár	1:500	Thermo Fisher Scientific	A-11055
Alexa Fluor Plus 594 konjugált, anti-nyúl másodlagos antitest	szamár	1:500	Thermo Fisher Scientific	A32754
Alexa Fluor Plus 647 konjugált, anti-nyúl másodlagos antitest	szamár	1:500	Thermo Fisher Scientific	A32795

Alexa Fluor Plus 647 konjugált, anti-kecske másodlagos antitest	szamár	1:500	Thermo Fisher Scientific	A32849
Alexa Fluor 488 konjugált, anti-egér másodlagos antitest	kecske	1:500	Thermo Fisher Scientific	A-11029
Alexa Fluor 647 konjugált, anti-nyúl másodlagos antitest	kecske	1:500	Thermo Fisher Scientific	A-21245
Western blot:				
poliklonális anti-IL-1 β elsődleges antitest	nyúl	1:1000	Abcam	ab9722
monoklonális anti- β -aktin elsődleges antitest	egér	1:10000	Merck	A5441
HRP konjugált, anti-nyúl másodlagos antitest	kecske	1:3000	Jackson ImmunoResearch	111-035-003
HRP konjugált, anti-egér másodlagos antitest	kecske	1:3000	Thermo Fisher Scientific	G21040
Neutralizálás:				
poliklonális humán anti-IL-1 β elsődleges antitest	kecske	1:150 (1,33 μ g/ml)	Bio-Techne	AF-201-NA
poliklonális egér anti-IL-1 β elsődleges antitest	kecske	1:150 (1,33 μ g/ml)	Bio-Techne	AF-401-NA
poliklonális IgG	kecske	1:750 (1,33 μ g/ml)	Bio-Techne	AB-108-C

2. táblázat: A kísérletek során alkalmazott elsődleges és másodlagos antitestek jellemzőinek összefoglalása.

3.13. Statisztikai kiértékelés

Adataink statisztikai analíziséhez a GraphPad Prism szoftvert (8.0.1.244-es verzió, GraphPad Software) használtuk. Az alkalmazott statisztikai módszert az adott ábra aláírásoknál minden esetben feltüntettük. A 0,05-nél kisebb P-értéket szignifikánsnak tekintettük.

4. EREDMÉNYEK

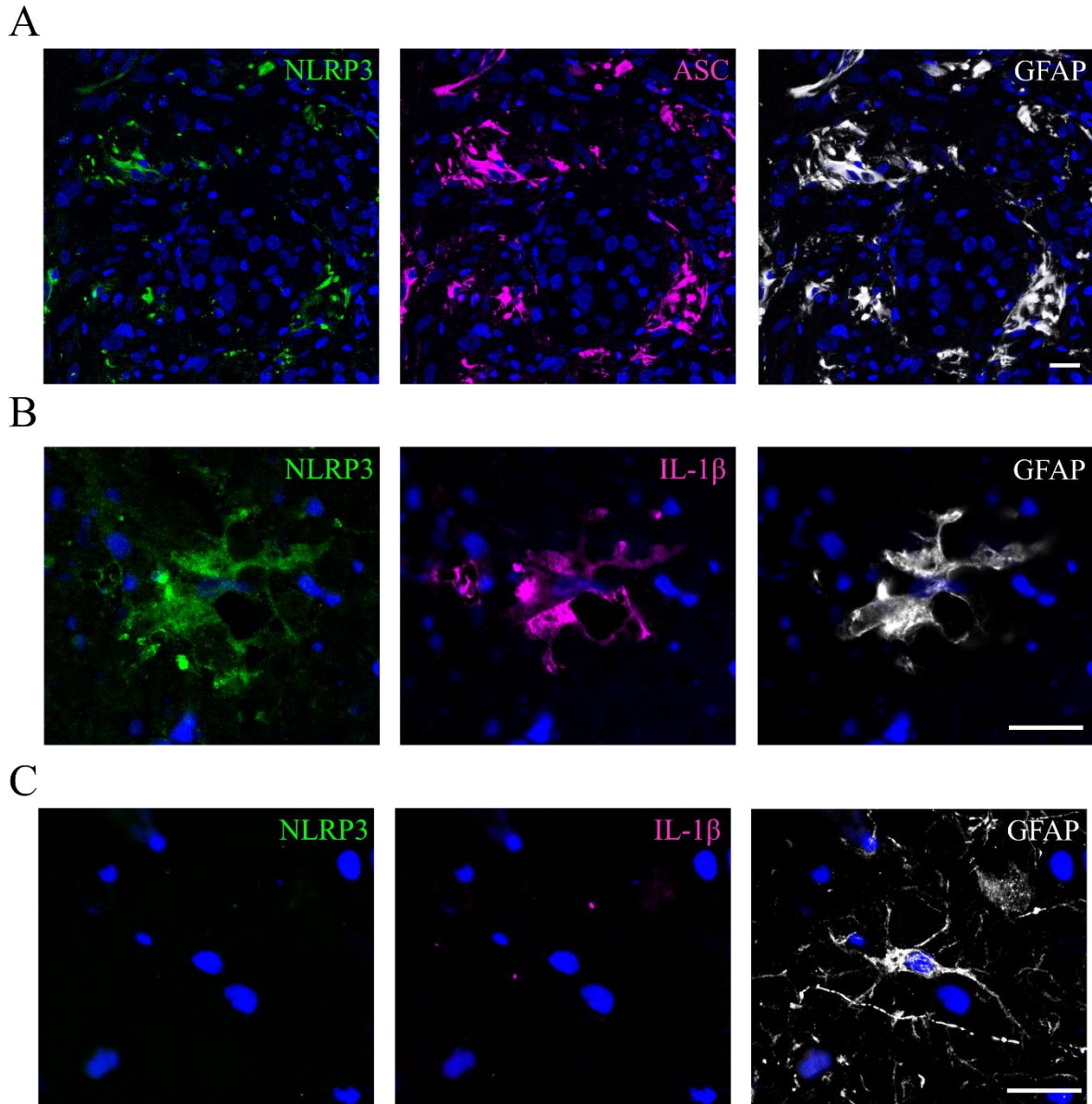
4.1. Az NLRP3 inflammaszóma komponenseinek expressziós vizsgálata

Az áttétképzés egyik meghatározó velejárója a gyulladás, amelynek fenntartásában az inflammaszómák is szerepet játszhatnak és ezáltal erőteljes befolyással lehetnek a tumor mikrokörnyezetre (Karki és mtsai, 2019). A metasztatikus niche-t alkotó tumorsejtekben és strómasejtekben egyaránt kimutattak inflammaszóma aktivációt (Z. Zhang és mtsai, 2023), azonban az agy idegen és rendkívül sajátos miliójában kialakuló metasztázisokban – köztük az emlőkarcinóma agyi metasztázisaiban – mindmáig nem álltak rendelkezésre az inflammaszóma komponensek expressziójára és ennek funkcionális következményeire vonatkozó információk.

4.1.1. 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 inflammaszómák lokalizációját, hogy azonosíthassuk azokat a sejttípusokat, amelyek részt vesznek az agyban megtelepedett tumorok gyulladásos környezetének kialakításában és fenntartásában. Az inflammaszómák közül az NLRP3 inflammaszóma daganatképződésben és progresszióban betöltött szerepéről extracerebrális daganatok esetén bőséges szakirodalmi információ áll rendelkezésre (Sharma és mtsai, 2021), éppen ezért kíváncsiak voltunk, hogy az emlőkarcinóma agyi áttéteinek inflammatorikus folyamataiban is kulcsszerepet játszik-e. Hipotézisünk igazolására először NLRP3 és ASC immunhisztokémiai festést végeztünk tripla negatív emlőkarcinóma humán agy-metasztázisaiból készített preparátumokon. Hármás fluoreszcens jelöléssel kimutattuk az NLRP3 inflammaszóma aktiválódásának első jelét, a priming lépésként értelmezhető inflammaszóma fehérjék expresszió fokozódását. Expressziójuk nagymértékben és specifikusan a peritumorális asztrocitákra korlátozódott, amit az NLRP3 és ASC, valamint az asztrocita-specifikus GFAP kolokalizációja mutatott a konfokális mikroszkópos felvételeken. A pixelanalízis eredményei alapján az NLRP3-pozitív pixelek 95,3%-a, az ASC-pozitív pixelek 98,8%-a fedett át a GFAP-pozitív pixelekkel (**5. ábra, A panel**). Az inflammaszóma priming másik bizonyítékeként szolgált, hogy a metasztázis körüli GFAP⁺/NLRP3⁺ asztrociták markáns IL-1 β expresszióval bírtak. Számszerűen az NLRP3-pozitív pixelek 76%-a, az IL-1 β -pozitív pixelek 74%-a kolokalizált a GFAP-pozitív pixelekkel (**5. ábra, B panel**). Érdekes módon az inflammaszóma-asszociált

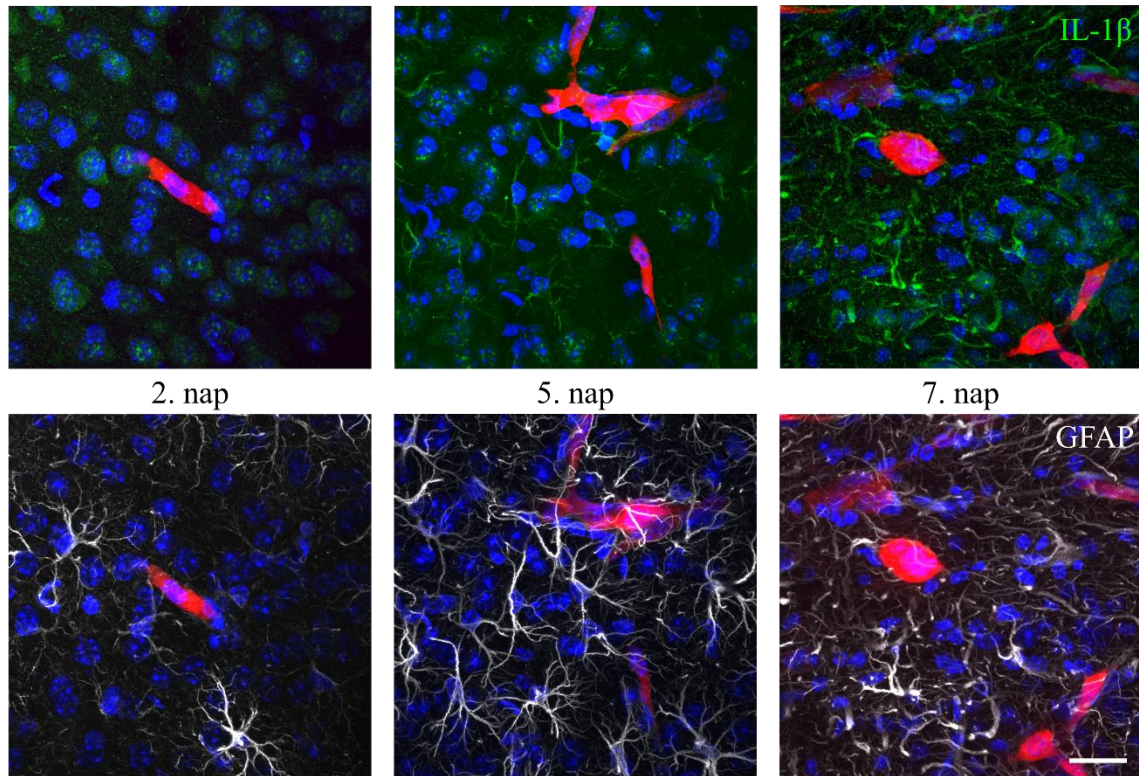
fehérjéket sem a tumorsejtekben, sem az asztrocitákon kívül más strómális sejttípusban, sem a tumoroktól távolabb lévő gliasejtekben nem figyeltük meg. Az immunfestés specificitását alátámasztotta, hogy a kontroll, egészséges humán asztrociták immunnegatívak voltak mind az NLRP3-ra, mind az IL-1 β -ra (5. ábra, C panel).



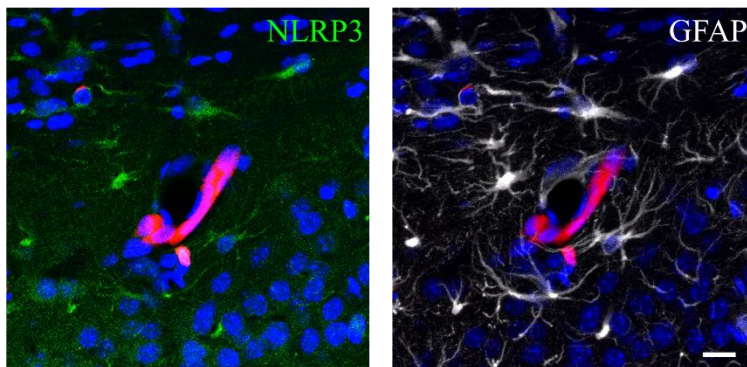
5. ábra: Az inflammaszóma komponensek peritumorális asztrocitákban való expressziója humán tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisaiban. A reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételeken jól látszik, hogy az NLRP3 és az ASC (A), valamint az NLRP3 és az IL-1 β (B) együtt fordul elő a tumort szegélyező GFAP-pozitív asztrocitákban. Ezzel szemben az egészséges humán agyi asztrocitákban nincs detektálható NLRP3 és IL-1 β expresszió (C). Skála: 20 μ m. Zöld: NLRP3, magenta: ASC (A) vagy IL-1 β (B), fehér: GFAP, kék: sejtmagok (Hoechst 33342).

Az agyi áttétképzést kísérő potenciális inflammaszóma aktiváció tanulmányozására egy szisztémás, szingenikus állatkísérletes modellt alkalmaztunk, amely során 4T1-tdT tripla negatív egér emlőkarcinóma sejteket injektáltunk BALB/c egerek jobb oldali ACC-ába. A tumorsejtek inokulációját követően három időpontot (2., 5. és 7. nap) jelöltünk ki előzetes tapasztalataink alapján (Haskó és mtsai, 2019), majd az inflammaszóma fehérjék lokalizációját immunfluoreszcenciával mutattuk ki. A 2. napon a frontális, temporális és parietális kérgi területeken elakadt tumorsejtek környezetében nem detektáltunk IL-1 β -t. Ez idő alatt az agyi kapillárisokban megrekedt tumorsejtek többsége munkacsoportunk korábbi vizsgálata alapján az érlumenben található (Haskó és mtsai, 2019). A vér-agy gáton való átvándorlásuk pillanatában, az 5. napon az IL-1 β már megjelent a metasztatikus léziókat határoló GFAP-pozitív asztrocitákban, míg a 7. napon az IL-1 β expressziója meghaladta a korábbi időpontban megfigyelt expressziós szintet. A pixelanalízis alapján az 5. napon a citoplazmikus IL-1 β -pozitív pixelek 77%-a mutatott kolokalizációt a GFAP-pozitív pixelekkel, míg a GFAP-pozitív pixelek 7%-a volt IL-1 β -pozitív. A 7. napon pedig az IL-1 β -pozitív pixelek 79%-a fedett át a GFAP-pozitív pixelekkel, míg a GFAP-pozitív pixelek 28%-a volt IL-1 β -pozitív (**6. ábra, A panel**). A metasztatikus tumorsejtek hatással vannak a reaktív asztrogliózis időbeli változására (Fitzgerald és mtsai, 2008). Modellünkben az asztrociták reaktivitása a vizsgált időpontok közül a 7. napon volt kifejezett, amelyet a GFAP-tartalmú primer nyúlványok hipertrófiája (**6. ábra, A panel**), valamint a GFAP⁺ jel emelkedése jelzett (**17. ábra, A panel**). Az IL-1 β expressziós szintjének időbeli változása mellett pozitív korrelációt figyeltünk meg az IL-1 β expresszió és a metasztatikus lézió mérete között, amit jól tükrözött, hogy a nagy, kiterjedt tumorok az IL-1 β nagymértékű upregulációjával társultak, szemben a kisebb áttétek környezetében kimutatható gyenge IL-1 β expresszióval, illetve az IL-1 β expresszió hiányával a tumormentes területeken (**7. ábra**). Ezzel párhuzamosan az NLRP3 expressziója is megnőtt a tumorokat körülvevő asztrocitákban hasonlóan a humán metasztatikus agymintákban megfigyeltekkel. A pixelanalízissel kapott érték jelen esetben is nagyfokú átfedést mutatott. Az NLRP3-pozitív pixelek 95%-a egyezett a GFAP-pozitív pixelekkel (**6. ábra, B panel**).

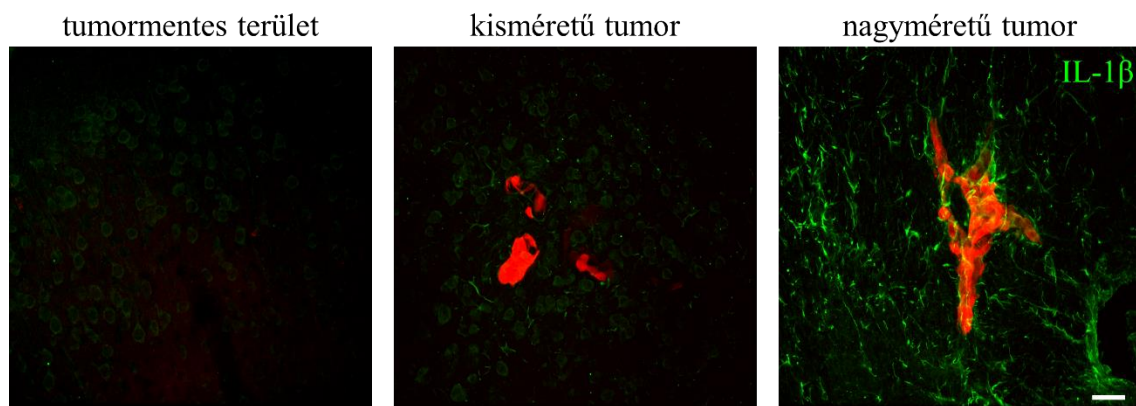
A



B



6. ábra: Az inflammaszóma komponensek expressziójának növekedése a peritumorális asztrocitákban egér tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisaiban. Kettős immunjelölés jeleníti meg az IL-1 β expresszió és az asztrocita reaktivitás upregulációját az idő előrehaladtával. A 4T1-tdT tumorsejtek intrakarotikus oltását követő 2. napon, vagyis a vér-agy gát áttörését megelőző időpontban az IL-1 β expressziója még nem mutatható ki az asztrocitákban, azonban az 5. napon, amikor a tumorsejtek átvándorolnak az érfalon, az IL-1 β expressziója indukálódik a tumorok környezetében lévő asztrocitákban és a 7. napra 4-szeresére emelkedik (A). Az NLRP3 kimagasló expressziót mutat a peritumorális asztrocitákban 7 nappal a tumorsejtek oltása után (B). Skála: 20 μ m. Piros: 4T1-tdT, zöld: IL-1 β (A) vagy NLRP3 (B), fehér: GFAP, kék: sejtmagok (Hoechst 33342).

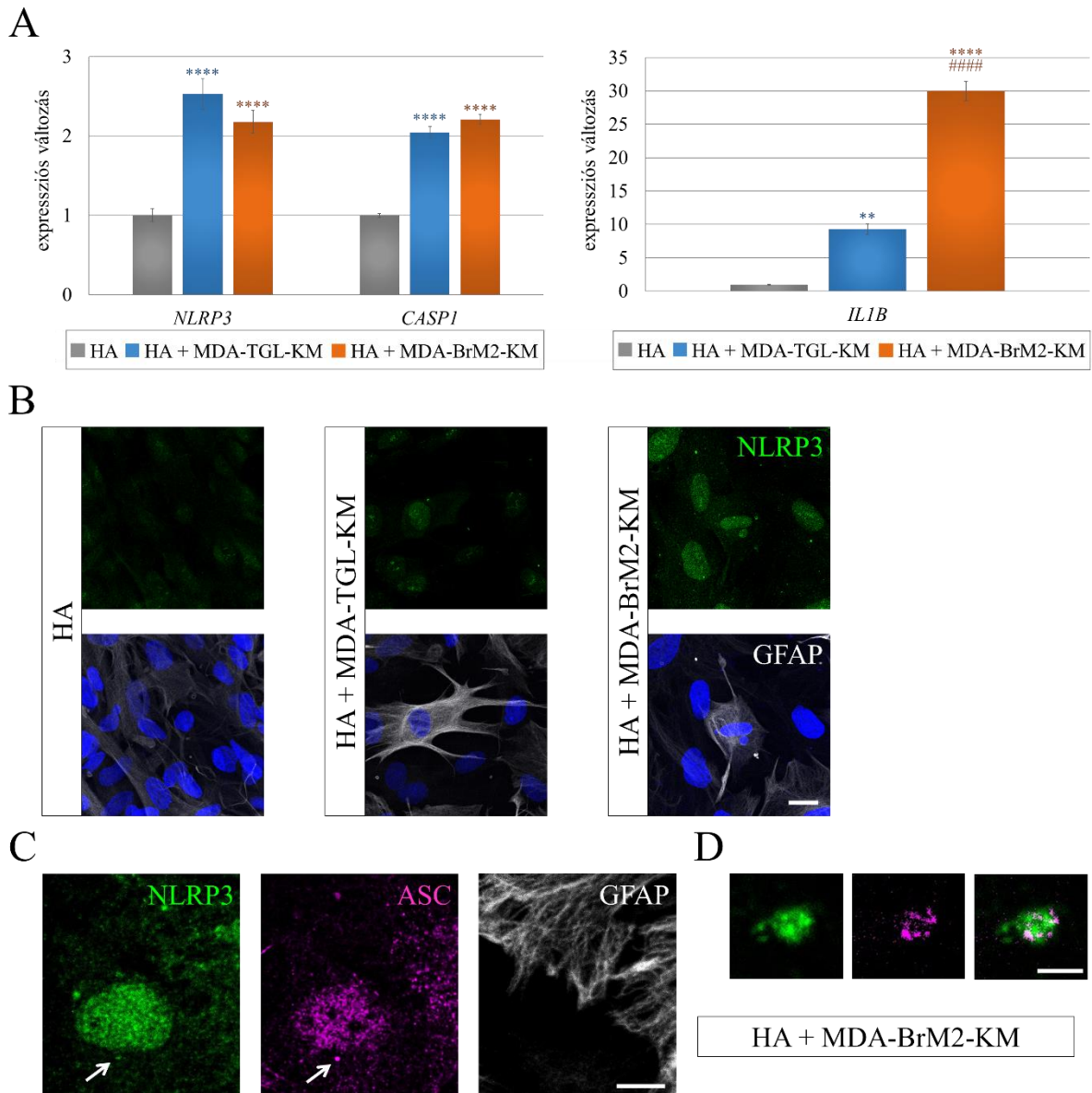


7. ábra: A tumorméret mint kritikus tényező az IL-1 β expressziójában. A tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisainak mérete nagyban meghatározza az IL-1 β expresszió mértékét egér agyban a tumorsejtek oltását követő 7. napon. Ez abban nyilvánul meg, hogy a tumormérettel arányosan fokozódik az IL-1 β expressziója. Skála: 20 μ m. Piros: 4T1-tdT, zöld: IL-1 β .

4.1.2. Az NLRP3 inflammaszóma komponensek *in vitro* expressziója

A tumor által indukált inflammaszóma aktiváció hátterében húzódo mechanizmusok tisztázása végett *in vitro* kísérletekben először megvizsgáltuk, hogy a mellráksejtek által szekretált faktorok milyen hatással vannak az inflammaszóma komponensek primingjára az asztrocitákban. Ennek érdekében tápfolyadékot kondicionáltunk a humán tripla negatív emlőkarcinóma sejtenyészeteken, amely tartalmazza a sejtek szekretómját, vagyis mindazt a potenciális DAMP-ként szolgáló bioaktív molekulákból és extracelluláris vezikulákból álló szekrécións „koktél”, amely a sejt-sejt kommunikáció egyik fontos eszközeként inflammaszóma-függő sejt választ válthat ki (Abu és mtsai, 2021; Hernandez és mtsai, 2016). A tumorsejtekről gyűjtött kondicionált médiumot az asztrocita tenyészetéhez adtuk, ezt követően qPCR technikával meghatároztuk, hogy a tumorsejt-kondicionált médium milyen mennyiségi változást okoz az asztrociták inflammaszóma alkotóelemeinek mRNS szintű expressziójában. A kezelés eredményeképpen az *NLRP3* és *CASP1* transzkriptumok expressziója szignifikáns, több, mint 2-szeres növekedést ért el a humán asztrocitákban a parentális (MDA-TGL) vagy agyi metasztatikus (MDA-BrM2) karcinómasejt-kondicionált médium hatására a kontroll, kezeletlen asztrocitákban mért szinthez képest. Az *IL1B* expresszió növekedése ennél sokkal látványosabb méretet öltött. Szintje közel 10-szeresére emelkedett azokban az asztrocitákban, amelyeket a parentális sejtvonalról gyűjtött kondicionált médiummal kezeltük, és körülbelül 30-szorosára azokban, amelyeket az agyi metasztatikus sejtek médiumával kezeltük (**8. ábra, A panel**). Következő lépésben az inflammaszóma komponensek fehérjeszintű expressziós változásait elemeztük

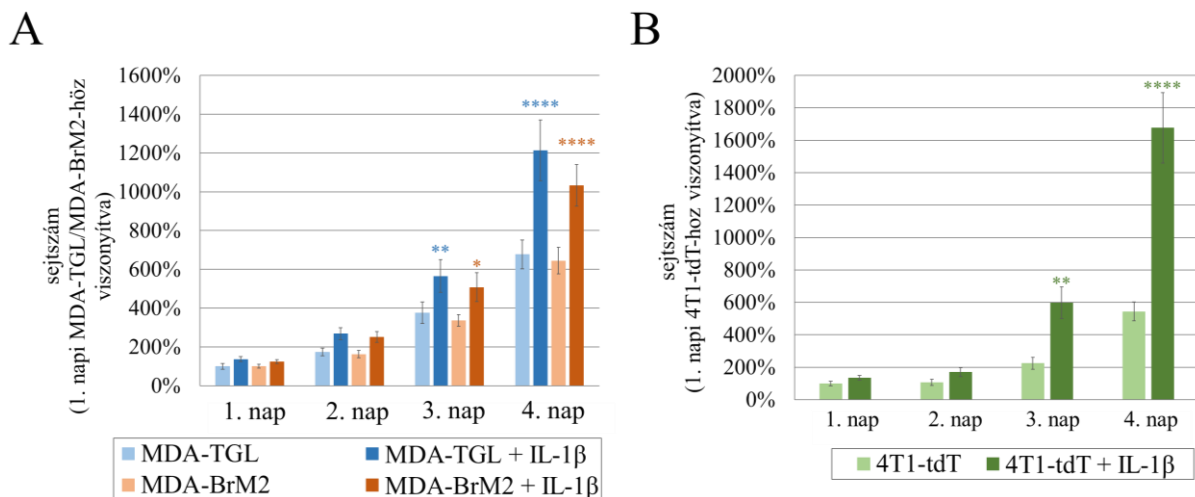
immuncitokémiával. Az NLRP3 fokozott expresszióját elsősorban a tumorsejt-kondicionált médiummal kezelt asztrociták sejtmagjában mutattuk ki (**8. ábra, B panel**). Egyes feltételezések szerint NLRP inflammaszóma aktiváció a sejtmagban is létrejöhet (L. Wang és mtsai, 2016), azonban kísérleteinkben az inflammaszóma összeszerelődés közvetlenebb bizonyítékként szolgált, hogy NLRP3- és ASC-pozitív szemcseszerű struktúrák (speck) jelentek meg a sejtmag körül (**8. ábra, C és D panel**). Szuperrezolúciós mikroszkópia segítségével megfigyeltük, hogy a speck fehérjekomplex külső gyűrűjét az ASC alkotja, míg a magi régióját az NLRP3 (**8. ábra, D panel**). Ezt a térbeli elrendeződést korábbi tanulmányok is tanúsítják (Man és mtsai, 2014), ráadásul a mérete más kutatócsoportok megfigyeléseivel összhangban a mikrométeres tartományba esik (Hoss és mtsai, 2017; Stutz és mtsai, 2013).



8. ábra: Az emlőkarcinóma sejtek által kibocsátott faktorok hatása az **NLRP3** inflammaszóma primingjára és aktivációjára humán asztrocita tenyészetben. Az *NLRP3*, *CASP1* és *IL1B* gének expressziója fokozódik az MDA-kondicionált médiummal (MDA-KM) 24 órán át kezelt humán asztrocitákban (HA). A *GAPDH*-ra normalizált expressziós változásokat átlag \pm SEM-ként ábrázoltuk (A). N = 3 független kísérlet, kísérletenként három biológiai replikátummal. Statisztikai próba: ANOVA és Fisher-féle LSD post-hoc teszt, ** $P \leq 0,01$ és **** $P \leq 0,0001$ a kontrollhoz (HA) hasonlítva; ##### $P \leq 0,0001$ a „HA + MDA-TGL-KM”-hez hasonlítva. Az MDA-TGL-KM és az MDA-BrM2-KM hatására az NLRP3 expressziója fehérje szinten is növekedést mutat 24 óra elteltével asztrocitákban a kontroll, kezelést nem kapott csoporthoz képest (B). Skála: 20 μ m. Zöld: NLRP3, fehér: GFAP, kék: sejtmagok (Hoechst 33342). Konfokális mikroszkóppal azonosított perinukleáris elhelyezkedésű NLRP3- és ASC-immunreaktív szemcseszerű struktúra (nyíl) inflammaszóma összeszerelődésre utal az asztrocita tenyészetben, amelyet 24 órán át az agyi metasztatikus humán tripla negatív emlőkarcinóma sejtekről (MDA-BrM2) gyűjtött kondicionált médiumban tartottunk (C). Skála: 10 μ m. Zöld: NLRP3, magenta: ASC, fehér, GFAP. A C képen nyíllal jelölt speckről készült, nagyított konfokális (NLRP3 – zöld) és szuperrezolúciós (ASC – magenta) mikroszkópos felvétel (D). Skála: 2 μ m.

4.2. Az NLRP3 inflammaszóma aktiváció funkcionális vizsgálata *in vitro* körülmények között

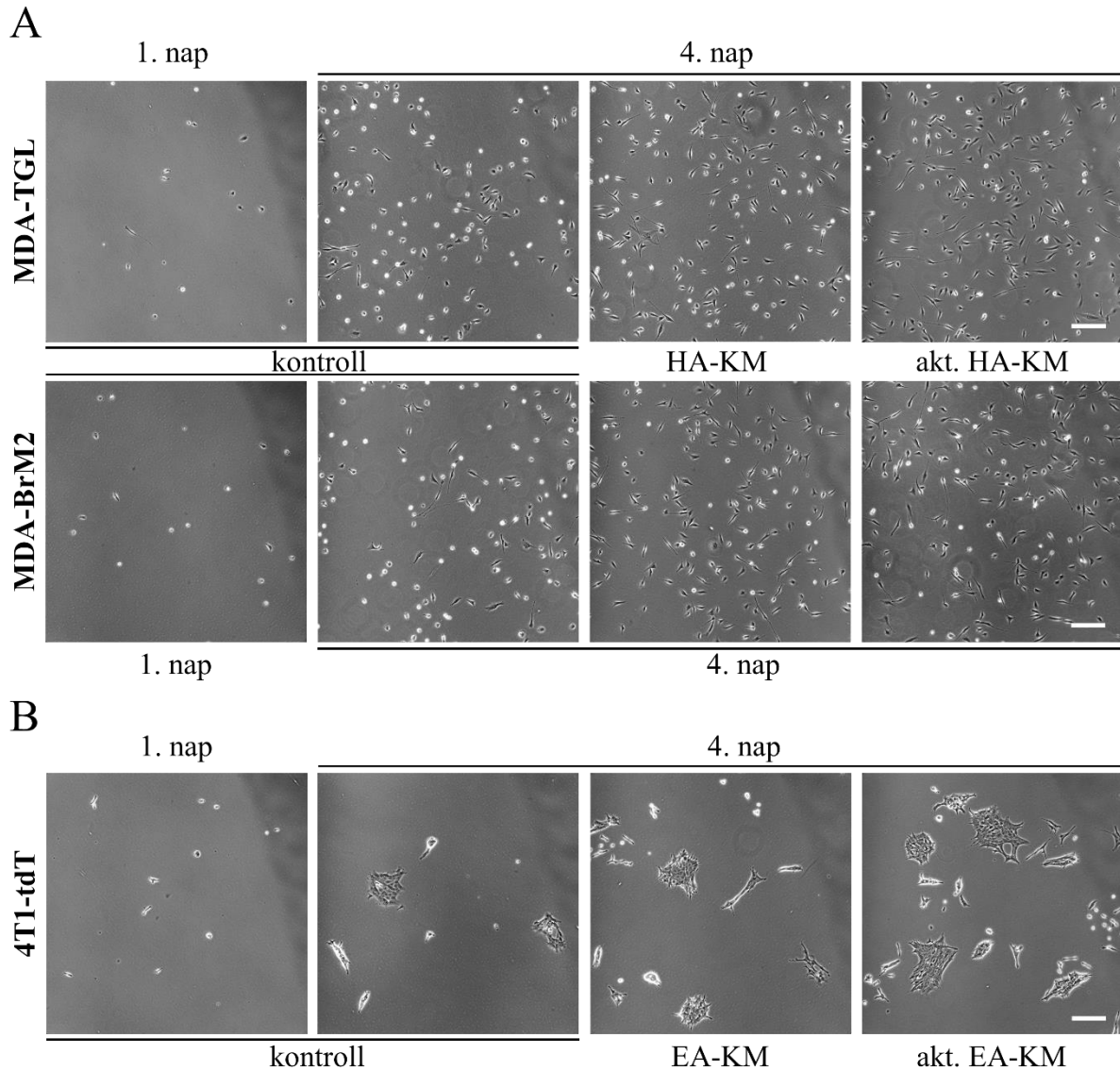
Expressziós vizsgálataink eredményei alapján feltételeztük, hogy az NLRP3 inflammaszóma által termelt IL-1 β felszabadulása az asztrocitákból felelős lehet a tumorsejtek proliferációjáért. Ennek igazolására rekombináns IL-1 β -t adtunk a humán és egér emlőkarcinóma sejttenyészethez 10 ng/ml koncentrációban. Az IL-1 β kezelés mindhárom tumorsejt típus proliferációjára egyformán serkentő hatással volt, amelyet napról napra emelkedő tendencia jellemzett. A 3. naptól a humán és egér tumorsejtek száma hirtelen és szignifikáns mértékben megugrott, végül a 4. napon a humán modellben a kontroll érték 2-szeresét, az egér modellben pedig annak 3-szorosát érte el (9. ábra, A és B panel).



9. ábra: Az IL-1 β hatása az emlőráksejtek proliferációjára. Az IL-1 β (10 ng/ml) mind a parentális (MDA-TGL), mind az agyi metasztatikus (MDA-BrM2) humán emlőkarcinóma sejtek proliferációjának fokozódását idézte elő (A). A grafikonon az MDA-TGL vagy MDA-BrM2 sejtek 1. napon mért számához viszonyított százalékos értékek vannak feltüntetve átlag \pm SEM-ként (N = 3 független kísérlet, kísérletenként 2 biológiai replikátummal, replikátumonként 5 különböző látómezőből készített fáziskontraszt kép alapján). Statisztikai próba: ANOVA és Fisher-féle LSD post-hoc teszt. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ és **** $P \leq 0,0001$ a kontrollhoz (MDA-TGL, illetve MDA-BrM2) képest. Az IL-1 β (10 ng/ml) továbbá a 4T1-tdT egér emlőkarcinóma sejtek proliferációjának fokozódását is elősegítette (B). A grafikonon a 4T1-tdT sejtek 1. napon mért számához viszonyított százalékos értékek vannak feltüntetve átlag \pm SEM-ként (N = 3 független kísérlet, kísérletenként 2 biológiai replikátummal, replikátumonként 5 különböző látómezőből készített fáziskontraszt kép alapján). Statisztikai próba: ANOVA és Fisher-féle LSD post-hoc teszt. ** $P \leq 0,01$ és **** $P \leq 0,0001$ a kontrollhoz (4T1-tdT) képest.

Az IL-1 β sejtproliferációt serkentő hatásához 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. A folyamatról

négy egymást követő napon, napi rendszerességgel készítettünk fáziskontraszt képeket. A tumorsejtek számában a legszembeütőbb különbség az első és utolsó napi felvételek, illetve a kontroll és kondicionált vagy aktivált kondicionált médiummal kezelt csoportokról készült felvételek összehasonlítása alapján látszódott (10. ábra, A és B panel).

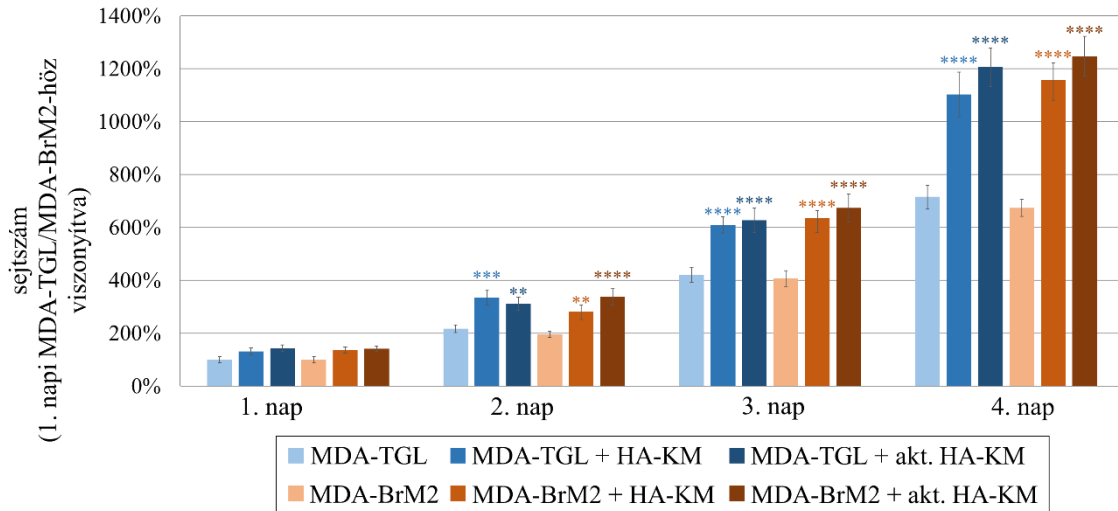


10. ábra: Az asztrocita-kondicionált médium tumorsejt proliferációt támogató hatása. A reprezentatív fáziskontraszt felvételeken a kontroll, humán asztrocita-kondicionált médiumban (HA-KM) és a tumorsejt-aktivált HA-KM-ben (akt. HA-KM) tenyésztett humán emlőráksejtek proliferációja hasonlítható össze 1 és 4 nap elteltével (A). Hasonlóképpen a kontroll, egér asztrocita-kondicionált médiumban (EA-KM) és a tumorsejt-aktivált EA-KM-ben (akt. EA-KM) tenyésztett egér emlőráksejtek számbeli különbsége látható 1 és 4 napot követően (B). Skála: 200 μm .

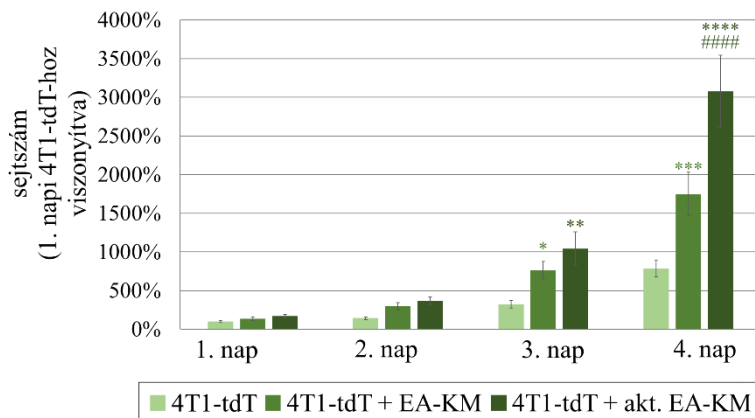
Az asztrocita-kondicionált médium hatására a humán mellráksejtek sejtszámában már a 2. naptól, az egér mellráksejtek sejtszámában pedig a 3. naptól figyeltünk meg szignifikáns emelkedést (11. ábra, A és B panel). Az egér tumorsejtek szaporodásában különösen akkor

tapasztaltunk erőteljesebb növekedést, amikor a médium olyan asztrocitákról lett legyűjtve, amelyek már korábban kapcsolatba kerültek a tumorsejtekből származó faktorokkal (tumorsejt-aktivált kondicionált médium). Ebben az esetben a naiv és az aktivált egér asztrociták hatása közötti különbség körülbelül 1,75-szörös volt (**11. ábra, B panel**).

A

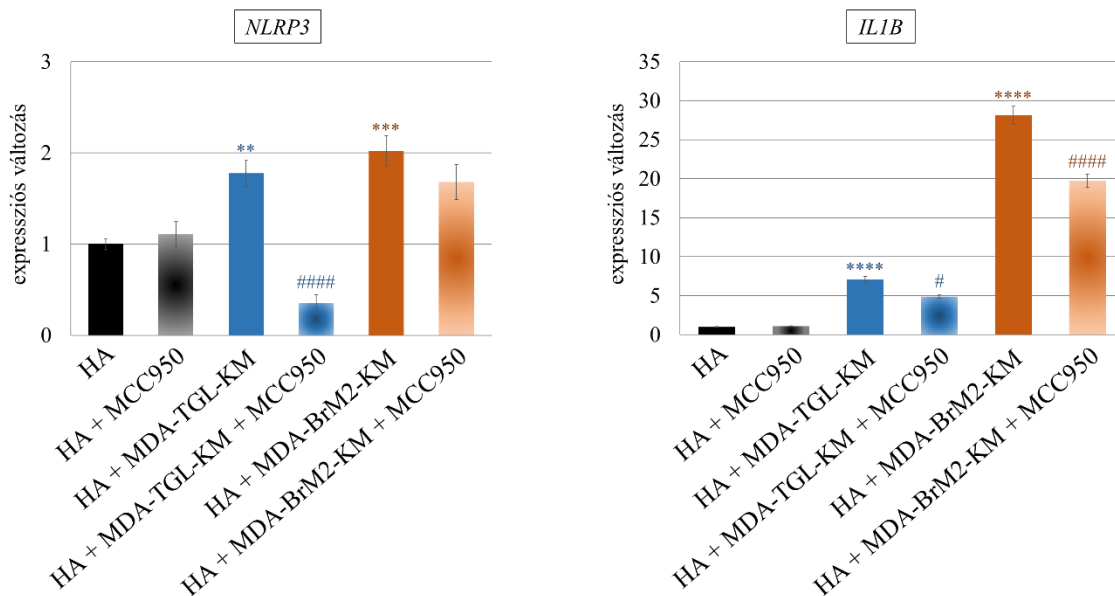


B



11. ábra: Az asztrocita-kondicionált médium tumorsejt proliferációt támogató hatásának mennyiségi elemzése. A humán asztrocita-kondicionált médiumban (HA-KM) és aktivált HA-KM-ben (akt. HA-KM) tenyésztett humán emlőkarcinóma sejtek proliferációjának kontrollhoz (MDA-TGL vagy MDA-BrM2) viszonyított százalékos értékeit átlag \pm SEM-ként ábrázoltuk (**A**). $N = 3$ független kísérlet, kísérletenként 2 biológiai replikátum, replikátumonként 5 különböző látómezőből készített felvétel alapján. Statisztikai próba: ANOVA és Fisher-féle LSD post-hoc teszt. ** $P \leq 0,01$ és **** $P \leq 0,0001$ az azonos napi kontrollhoz (MDA-TGL, illetve MDA-BrM2) képest. Az egér asztrocita-kondicionált médiumban (EA-KM) és aktivált EA-KM-ben (akt. EA-KM) tenyésztett egér emlőkarcinóma sejtek proliferációjának kontrollhoz (4T1-tdT) viszonyított százalékos értékeit átlag \pm SEM-ként ábrázoltuk (**B**). $N = 3$ független kísérlet, kísérletenként 2 biológiai replikátum, replikátumonként 5 különböző látómezőből készített felvétel alapján. Statisztikai próba: ANOVA és Fisher-féle LSD post-hoc teszt. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ és **** $P \leq 0,0001$ az azonos napi kontrollhoz (4T1-tdT) képest; ##### $P \leq 0,0001$ az azonos napi „4T1-tdT + akt. EA-KM”-hez képest.

Annak bizonyítására, hogy az asztrocita-kondicionált médiumba inflammaszóma-kapcsolt módon IL-1 β szabadul fel, amely fokozza az emlőráksejtek proliferációját, két eltérő ponton avatkoztunk be az inflammaszóma szignalizációba. Az egyik farmakológiai támadáspont az asztrocitákban bekövetkező NLRP3 inflammaszóma aktiváció közvetlen, specifikus blokkolása volt az MCC950 inhibitorral (1 μ M), a másik pedig az asztrociták által kibocsátott IL-1 β neutralizálása volt IL-1 β elleni elsődleges antitesttel (1,33 μ g/ml). Az MCC950 kezelés esetén először is megfigyeltük, hogy képes volt csökkenteni az inflammaszóma primingot az asztrocitákban, amelyet a tumorsejt-szekretóm önmagában kiváltott (**12. ábra**). Az MCC950 génexpresszióra gyakorolt hatása feltételezhetően az IL-1 β közvetett gátlásán és az ezt követő negatív visszacsatoláson keresztül valósulhatott meg, amelyet korábban más modellben saját csoportunk (Molnár és mtsai, 2022) és független kutatócsoportok (Ismael és mtsai, 2018) is tapasztaltak.



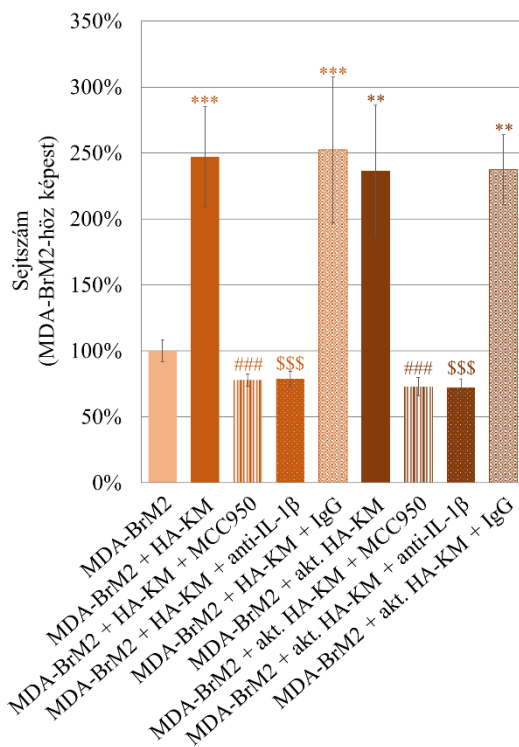
12. ábra: Az NLRP3 gátlás hatása az NLRP3 inflammaszóma-kapcsolt gének emlőkarcinóma sejtek indukálta fokozott expressziójára asztrocitákban. Az MCC950 (1 μ M) negatívan szabályozta az inflammaszóma primingot, visszafojtva az *NLRP3* és *IL1B* gének tumorsejt-szekretóm által indukált transzkripcióját a humán asztrocitákban (HA), amelyeket 24 órán át humán MDA-kondicionált médiumban (MDA-TGL-KM és MDA-BrM2-KM) tenyésztettünk MCC950 jelenlétében vagy hiányában. A *GAPDH*-ra normalizált expressziós változásokat átlag \pm SEM-ként mutatjuk (N = 3 független kísérlet, kísérletenként három biológiai replikátummal). Statisztikai próba: ANOVA és Fisher-féle LSD post-hoc teszt. ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ és **** $P \leq 0,0001$ a kontrollhoz (HA) képest; # $P \leq 0,05$ és ##### $P \leq 0,0001$ a „HA + MDA-TGL-KM”-hez, illetve a „HA + BrM2-KM”-hez képest.

Másfelől ennél is hangsúlyosabb, hogy az MCC950 és az IL-1 β neutralizálás egyaránt megakadályozta a humán és eger 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 (**13. ábra, A és B panel**).

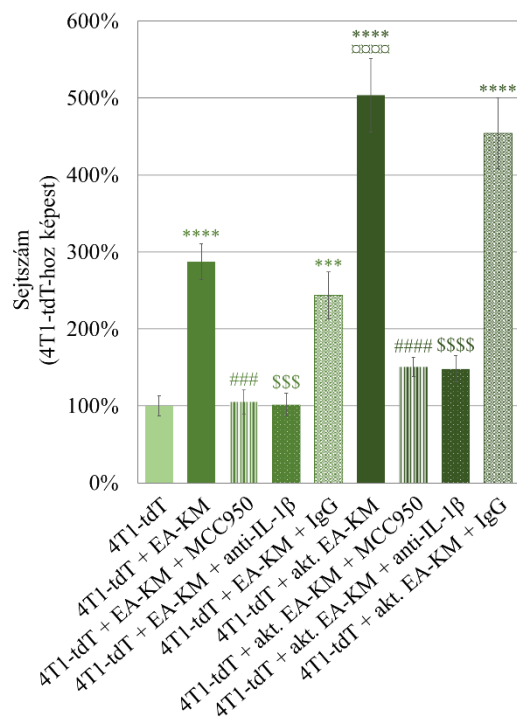
Az IL-1 β gátlását az antitesttel 30 perccel azelőtt elvégeztük az asztrocita-kondicionált médiumban, mielőtt a médiumot az emlőkarcinóma sejtekhez adtuk volna. Ez az előinkubáció elegendő időt (Indalao és mtsai, 2017) biztosított ahhoz, hogy a neutralizáló antitest a médiumba felszabadított IL-1 β -t specifikusan azelőtt blokkolja, mielőtt kifejthette volna proliferáció fokozó hatását az emlőkarcinóma sejteken. Az MCC950 kezeléshez hasonlóan az IL-1 β semlegesítése is szinte teljesen meggátolta az asztrocita-kondicionált médium proliferatív hatását. Ezzel ellentétben a neutralizáló antitest negatív kontrolljaként használt IgG nem váltott ki ilyen jellegű hatást (**13. ábra, A és B panel**).

Ezek az eredmények egyértelműen rámutatnak arra, hogy az inflammaszóma aktiváció az asztrocitákban az IL-1 β szekréciójához vezet, amely serkenti a mellráksejtek proliferációját.

A



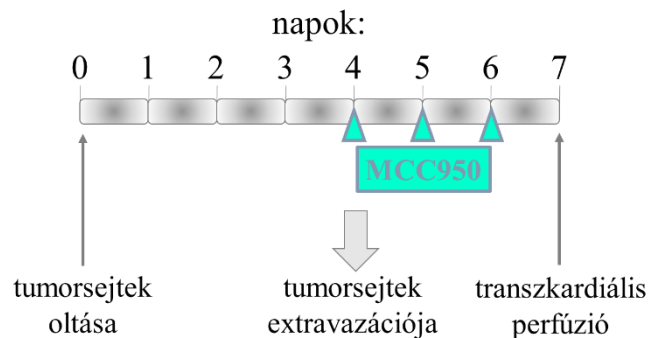
B



13. ábra: Az asztrocita-eredetű IL-1β hatása az emlőkarcinóma sejtek proliferációjára. Az MDA-BrM2 sejtek proliferációját 4 napon keresztül követtük nyomon különböző kezelési felállásokban: humán asztrocita-kondicionált médium (HA-KM) és tumorsejt-aktivált asztrocita-kondicionált médium (akt. HA-KM), MCC950-nel kiegészített kondicionált médium (HA-KM+ MCC950, akt. HA-KM + MCC950), a kondicionált médiumhoz adott anti-IL-1β neutralizáló antitest (HA-KM + anti-IL-1β, akt. HA-KM + anti-IL-1β) vagy a negatív kontrollként szolgáló IgG antitest (HA-KM + IgG, akt. HA-KM + IgG) hatására (A). Az egyes csoportok sejtszámának kontrollhoz (MDA-BrM2) viszonyított 4. napi százalékos arányát átlag ± SEM-ként tüntettük fel (N = 2 független kísérlet, kísérletenként 2 biológiai replikátummal, replikátumonként 5 különböző látómezőből készített felvétel alapján). Statisztikai próba: ANOVA és Fisher-féle LSD post-hoc teszt. ** $P \leq 0,01$ és *** $P \leq 0,001$ a kontrollhoz (MDA-BrM2) képest; ### $P \leq 0,001$ az „MDA-BrM2 + HA-KM”-hez vagy az „MDA-BrM2 + akt. HA-KM”-hez képest; \$\$\$ $P \leq 0,001$ az „MDA-BrM2 + HA-KM”-hez és „MDA-BrM2 + HA-KM + IgG”-hoz vagy az „MDA-BrM2 + akt. HA-KM”-hez és „MDA-BrM2 + akt. HA-KM + IgG”-hez képest. A humán emlőkarcinóma sejteknél alkalmazott kezelési rezsim analógiájára megvizsgáltuk az eger asztrocita-kondicionált médium (EA-KM) és tumorsejt-aktivált asztrocita-kondicionált médium (akt. EA-KM) hatását önmagában vagy kiegészítve MCC950-nel, anti-IL-1β-val vagy IgG-vel az eger 4T1-tdT sejtek proliferációjára (B). A grafikon a csoportok sejtszámának kontrollhoz (4T1-tdT) viszonyított százalékos arányát mutatja a szélesztést követő 4. napon (átlag ± SEM, N = 2 független kísérlet, kísérletenként 2 biológiai replikátummal, replikátumonként 5 különböző látómezőből készített felvétel alapján). Statisztikai próba: ANOVA és Fisher-féle LSD post-hoc teszt. *** $P \leq 0,001$ és **** $P \leq 0,0001$ a kontrollhoz (4T1-tdT) képest; ### $P \leq 0,001$ a „4T1-tdT + EA-KM”-hez képest; ##### $P \leq 0,0001$ a „4T1-tdT + akt. EA-KM”-hez képest; \$\$\$ $P \leq 0,001$ a „4T1-tdT + EA-KM”-hez és „4T1-tdT + EA-KM + IgG”-hez képest; \$\$\$\$ $P \leq 0,0001$ a „4T1-tdT + akt. EA-KM”-hez és „4T1-tdT + akt. EA-KM + IgG”-hez képest; □□□□ $P \leq 0,0001$ a „4T1-tdT + EA-KM”-hez képest.

4.3. Az inflammaszóma aktiváció funkcionális vizsgálata *in vivo* körülmények között

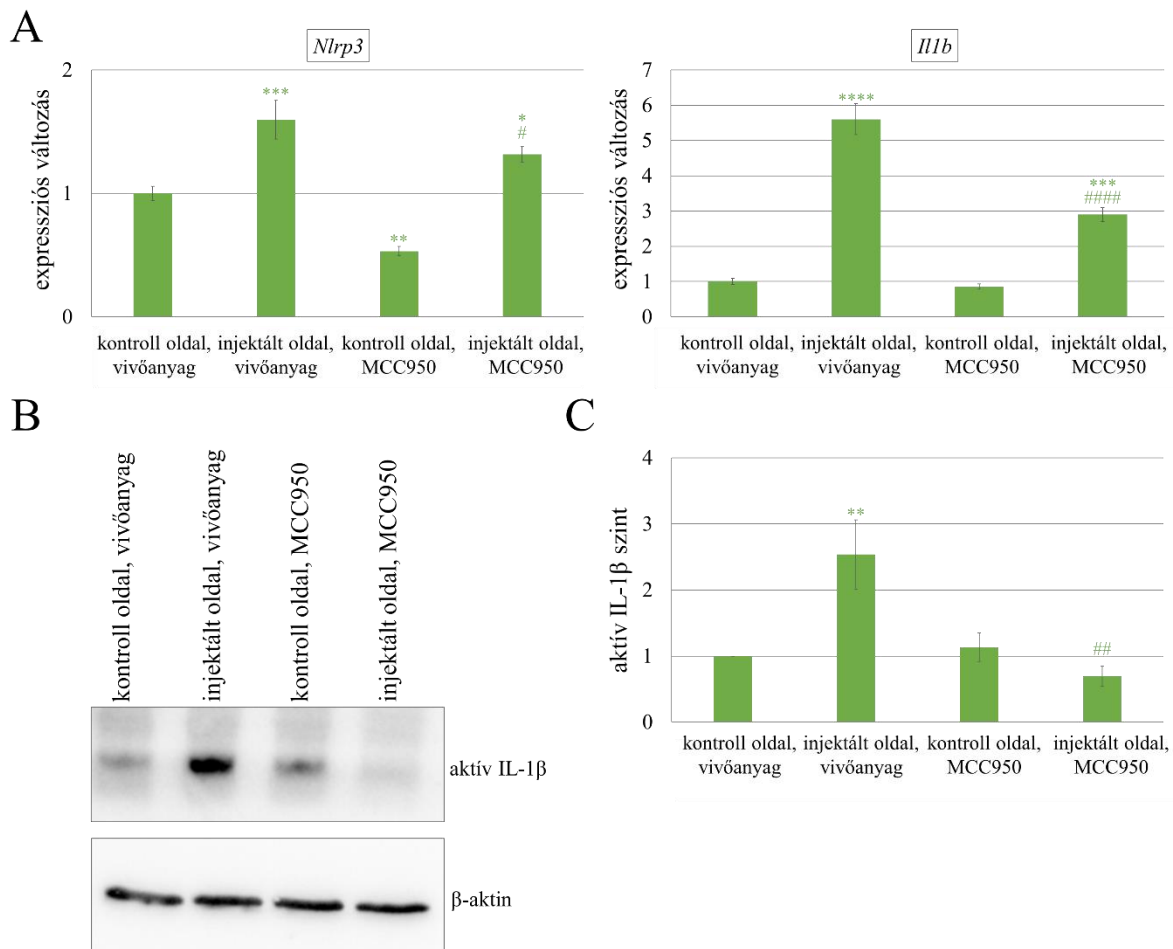
Következő lépésben az NLRP3 inflammaszóma aktivációját és farmakológiai gátlásának hatását kívántuk megérteni *in vivo* agyi metasztázis modelljeinkben. A 4T1-tdT sejtekkel oltott egereknek ip. MCC950-et adagoltunk 10 mg/ttkg dózisban az injektálást követő 4. és 6. nap között, ami azt az időintervallumot fedi le, amikor a tumorsejtek többnyire a metasztatikus kaszkád extravazációs fázisában és/vagy azután vannak (**14. ábra**).



14. ábra: Az *in vivo* emlőadenokarcinóma agyi metasztázis modell idővonala. A 4T1-tdT tripla negatív emlőkarcinóma sejtek intrakarotikus vagy intrakardiális oltását követő 4. és 6. nap között ip. MCC950 (10 mg/ttkg) kezelést kaptak az egerek, majd a kísérlet további mintafeldolgozás céljából a 7. napon transzkardiális perfúzióval ért véget.

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. Ez úgy nyilvánult meg, hogy a vivőanyaggal (PBS-ben oldott DMSO) kezelt csoportban az *Nlrp3* expressziós szintje a kontroll oldalhoz viszonyítva 1,6-szor volt magasabb a tumoros oldalon, míg az *Il1b* expressziós szintje 5,6-szor. Az MCC950 azonban szignifikánsan csökkenteni tudta mindkét gén tumor indukálta upregulációját. Az *Nlrp3* esetén ez 18%-os csökkenést jelentett, az *Il1b* esetén pedig majdnem 50%-os csökkenést (**15. ábra, A panel**).

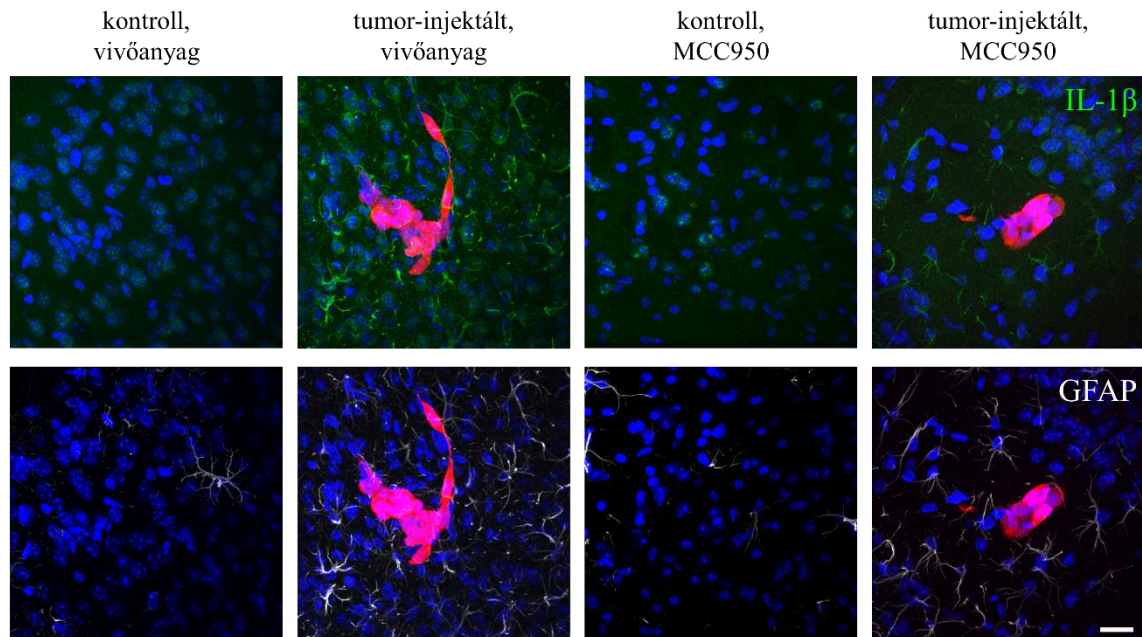
Mivel az IL-1 β inaktív prekuzora és aktív, érett formája immunfluoreszcenciával nem különböztethető meg, western blot vizsgálatokat végeztünk, amely segített az IL-1 β formáinak azonosításában a hasított formára jellemző 17 kDa-os molekulatömeg alapján. Az inflammaszóma aktiváció eklatáns jele, hogy az agyi metasztázisok megjelenése után az érintett hemiszfériumban 2,5-ször magasabb aktív IL-1 β szintet mértünk a bazális szinthez képest. Ezzel szemben az aktív IL-1 β mennyiségét az MCC950 szignifikáns mértékben, 73%-kal csökkentette az injektált oldalon (**15. ábra, B és C panel**).



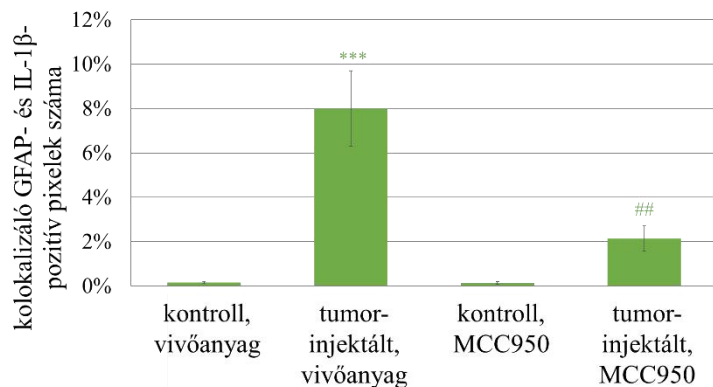
15. ábra: NLRP3 inflammaszóma priming és aktiváció tripla negatív emlőkarcinómát hordozó egerek agyában. Az *Nlrp3* és *Il1b* gének expressziós változásait qPCR módszerrel határoztuk meg az ipszilaterális injektált és kontralaterális kontroll agyféltekében 7 nappal a 4T1-tdT sejtek intrakarotikus oltását követően, a vivőanyaggal (DMSO PBS-ben) és az MCC950-nel (10 mg/kg) kezelt csoportban (A). A grafikonok a *GAPDH*-ra normalizált expressziós változás értékeit mutatják átlag ± SEM-ként (N = 3 független kísérlet, kísérletenként 3 biológiai replikátummal). Statisztikai próba: ANOVA és Fisher-féle LSD post-hoc teszt. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ és **** $P \leq 0,0001$ a „kontroll oldal, vivőanyag”-hoz képest; # $P \leq 0,05$ és ##### $P \leq 0,0001$ az „injektált oldal, vivőanyag”-hoz képest. Western blot eredményeink igazolják az aktív IL-1β markáns expresszióját és az MCC950 kezelésre adott aktív IL-1β szintcsökkenést az injektált oldalon (B). Az aktív IL-1β szintjét a β-aktin expressziós szintjéhez normalizáltuk (C). Az értékeket átlag ± SEM-ként ábráztuk (N = 3 független kísérlet). Statisztikai próba: ANOVA és Fisher-féle LSD post-hoc teszt. ** $P \leq 0,01$ a „kontroll oldal, vivőanyag”-hoz képest; ## $P \leq 0,01$ az „injektált oldal, vivőanyag”-hoz képest.

Ezután megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja az MCC950 inflammaszóma gátló hatása az IL-1β expresszióját az asztrocitákban. Az immunfluoreszcens jelölés az IL-1β nagyfokú asztrogliális expresszióját mutatta a tumorrally oltott állatok agyában, míg a kontroll csoportban nem volt kimutatható IL-1β. Ezenkívül az NLRP3 gátlása protektívnek bizonyult a peritumorális asztrociták IL-1β upregulációjával szemben, amelyet az IL-1β⁺/GFAP⁺ pixelek százalékos arányának mintegy 75%-os csökkenése szemléltetett (16. ábra, A és B panel).

A



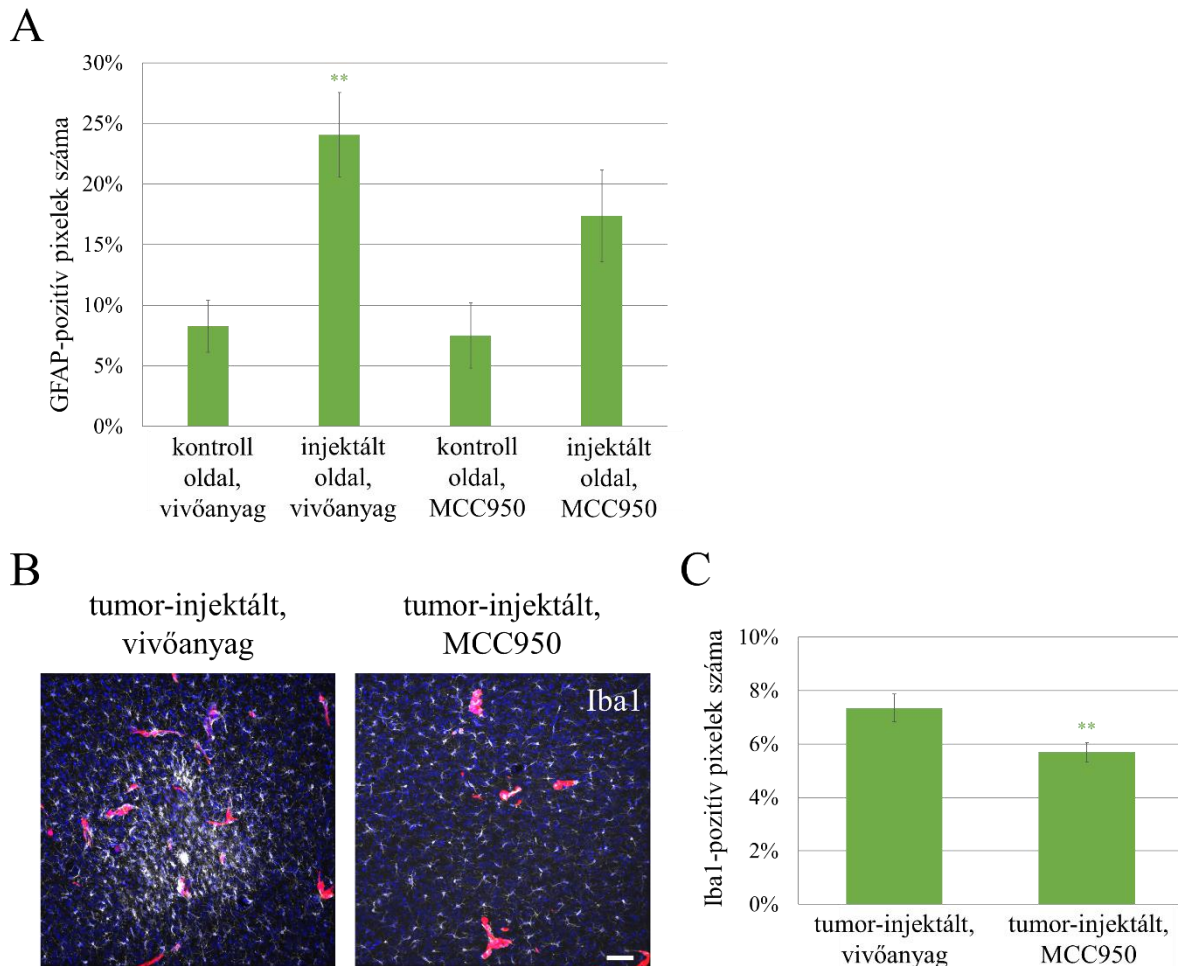
B



16. ábra: Az NLRP3 gátlás védőhatása az IL-1 β upregulációjával szemben egér emlőkarcinóma agyi metasztázisaiban. Reprezentatív immunfluoreszcens mikroszkópos felvételek az IL-1 β és a GFAP expresszióját mutatják 4T1-tdT sejtekkel vagy Krebs-Ringer oldattal (kontroll) oltott, és vivőanyaggal (DMSO PBS-ben) vagy MCC950-nel (10 mg/kg) kezelt egerek agyában, 7 nappal a tumorsejtek beadása után (A). Skála: 20 μ m. Az egyes csoportoknál a kolokalizáló GFAP- és IL-1 β -pozitív pixelek mennyiségi elemzésével kapott százalékos értékeket átlag \pm SEM-ként ábrázoltuk (B). N = 3 független kísérlet, n = 5 metszet/állat, 8 ROI/metszet. Statisztikai próba: ANOVA és Fisher-féle LSD post-hoc teszt. *** $P \leq 0,01$ a „kontroll, vivőanyag”-hoz képest; ## $P \leq 0,01$ a „tumor-injektált, vivőanyag”-hoz képest. ROI = (region of interest) vizsgálati terület.

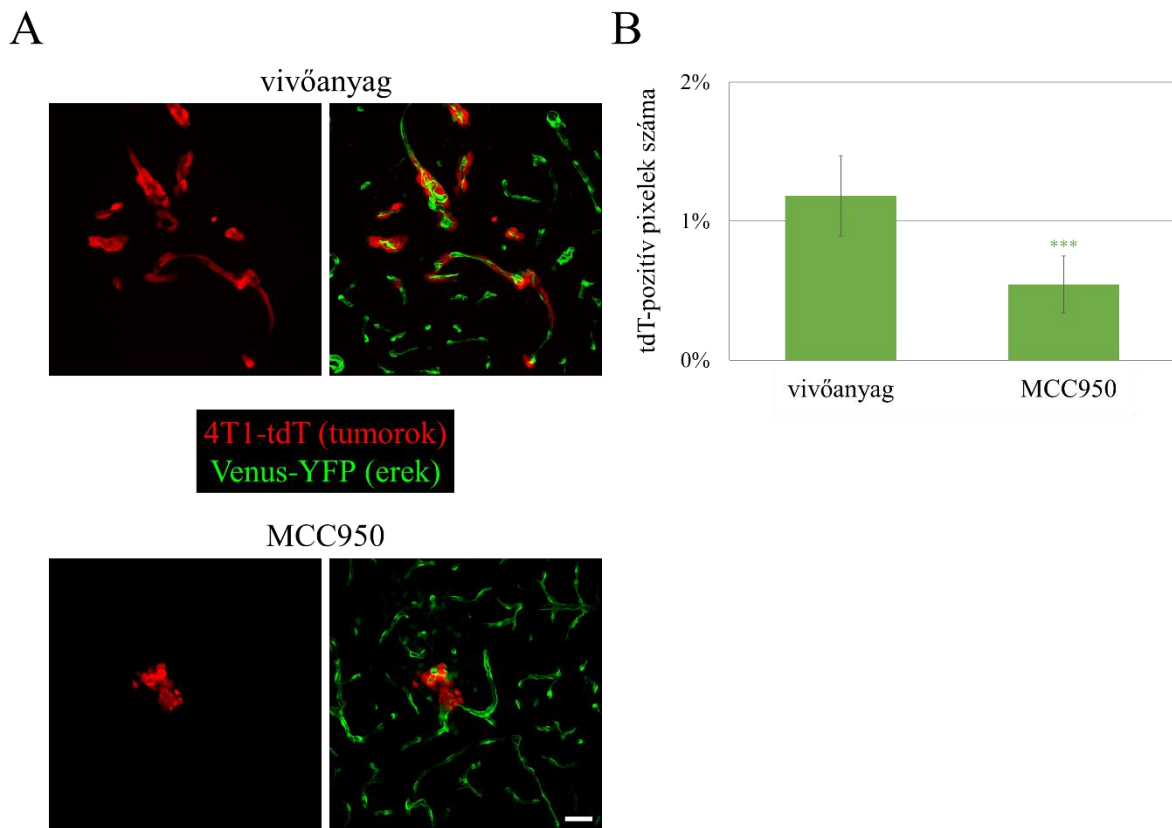
In vivo vizsgálataink másodsorban arra irányultak, hogy felmérjük, milyen hatással van az NLRP3 inflammaszóma gátlása a tripla negatív emlőkarcinóma áttétképzése során fellépő reaktív asztro- és mikrogliózisa. Az IL-1 β expresszió csökkentése mellett az MCC950 ugyan képes volt az asztrocita reaktivitást mérsékelni, de ez a változás nem volt szignifikáns (17. ábra, A panel). A tumorsejtek beadását követő 7. napon kiterjedt peritumorális mikrogliózist is megfigyeltünk. Az asztrogliózisa kifejtett hatásával ellentétben

az MCC950 kezelés a mikrogliózisban már szignifikáns mértékű csökkenést okozott a 4T1-tdT tumort hordozó egerek agyában (17. ábra, B panel). Ennek számszerűsítése során az Iba1-immunpozitív pixelek mennyiségi változása jól tükrözte az MCC950 mikrogliózisra gyakorolt hatását, 7,35%-ról 5,69%-ra csökkent (17. ábra, C panel).



17. ábra: Az NLRP3 gátlás hatása az agyi áttétképződéssel összefüggő gliózis mértékére. A reaktív asztroglíózis fokmérőjeként meghatároztuk a GFAP-pozitív pixelek százalékos arányát az összes pixelhez képest a 4T1-tdT sejtekkel vagy Krebs-Ringer oldattal (kontroll) oltott, és vivőanyaggal (DMSO PBS-ben) vagy MCC950-nel (10 mg/kg) kezelt egerek agyában, 7 nappal a tumorsejtek beadását követően (A). Az értékeket átlag ± SEM-ként ábrázoltuk (N = 3 független kísérlet, n = 8 metszet/állat). Statisztikai próba: ANOVA és Fisher-féle LSD post-hoc teszt. ** $P \leq 0,01$ a „kontroll oldal, vivőanyag”-hoz képest. Az immunfluoreszcens mikroszkópos felvételek szembevető különbséget mutatnak a tumor hatására megemelkedett Iba1 expresszió és annak MCC950 kezelésre bekövetkező csökkenése között egér tripla negatív emlőcarcinóma agyi metasztázisaiban 7 nappal a tumorsejtek oltása után (B). Skála: 20 μm . Piros: 4T1-tdT, fehér: Iba1, kék: sejtmagok (Hoechst 33342). Az MCC950 hatása szignifikánsnak bizonyult, amit az összes pixelhez normalizált Iba1-pozitív pixelek száma mutat a tumor-injektált, MCC950-kezelt csoportban a tumor-injektált, vivőanyag-kezelt csoporthoz képest (C). A százalékos értékeket átlag ± SEM-ként tüntettük fel (N = 3 független kísérlet, n = 6 metszet/állat, 8 ROI/6 metszet). Statisztikai próba: párosítatlan Student-féle t-próba. ** $P \leq 0,01$. ROI = (region of interest) vizsgálati terület.

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 tumorok perivaszkuláris növekedését. A tdT-pozitív pixelek száma, vagyis a tumorral fedett terület több, mint 50%-kal csökkent az MCC950-nel kezelt egerek agyában a vivőanyaggal kezelt csoporthoz képest (**18. ábra, A és B panel**).



18. ábra: Az MCC950 hatása az agyi metasztatikus tumorok növekedésére. Az MCC950 leglátványosabb hatása abban mutatkozott meg, hogy az agyi érhálózat (Venus-YFP jel – zöld) mentén fejlődő tumorok (tdT jel – piros) növekedését fékezésre bírta, amit jól szemléltetnek a reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek, összehasonlítva a 4T1-tdT tumorsejtekkel oltott és vivőanyaggal (DMSO PBS-ben) kezelt csoportot a MCC950-nel (10 mg/kg) kezelt csoporttal, 7 nappal a tumorsejtek beadást követően (**A**). Skála: 20 μ m. A tdT-pozitív pixelek a tumorral borított területek arányát mutatják az összes pixelhez képest (**B**). A százalékos értékeket átlag \pm SEM-ként ábrázoltuk (N = 3 független kísérlet, n = 5 metszet/állat, 16 ROI/5 metszet). Statisztikai próba: párosítatlan Student-féle t-próba. *** P \leq 0,001. ROI = (region of interest) vizsgálati terület.

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 β szintjét is. Ezáltal pedig le lehet lassítani a metasztatikus emlődaganatok növekedését az agyban.

5. MEGBESZÉLÉS

Az öregedésnek az egyik elválaszthatatlan velejárója a krónikus, alacsony szintű gyulladásozó állapot, vagyis az inflammaging, amely számos öregedéssel járó betegség, köztük a neuroinflammatorikus betegségek vagy például bizonyos daganatos megbetegedések alapját is képezheti (Mészáros és mtsai, 2020). A gyulladás gyakran társul a metasztázisképzéshez (Karki és mtsai, 2019), jelen kutatásunk ezért célzottan arra irányult, hogy megértsük, a gyulladásozó folyamatok milyen módon befolyásolják az agyi áttétképzést.

Klasszikus értelemben a malignus daganatokra jellemző áttétképzés végső lépései között az érpályában keringő tumorsejteknek át kell hatolniuk a primer tumortól anatómiailag távol eső szervek érhálózatán (Rahrmann és mtsai, 2022). Ez az agy esetében a szervezet legszorosabb endoteliális barrierjét alkotó vér-agy gáton való átjutást jelenti. Az ezt követő lépésben a metasztatizáló sejteknek pedig túl kell élniük az agyi sejtek által létrehozott és fenntartott speciális környezetben (Wilhelm és mtsai, 2013). Az extravazált tumorsejtek miután áttörnek az asztrocita végtalpak által alkotott *membrana limitans gliae perivascularis* rétegen, proliferációjuk során az erek szoros közelségében maradnak és inkorporálják őket, miközben az erekről letaszítják az asztrocitákat, amelyek végtalpaikkal kívülről beborítják a fejlődő tumormasszát (Haskó és mtsai, 2019). Azonban az asztrocitákkal való kölcsönhatás nem szűnik meg. Épp ellenkezőleg, továbbra is döntő jelentőséggel bírnak a tumor sorsának meghatározásában. Mivel az asztrociták egyszerre lehetnek a tumorsejtek „örzői vagy ellenségei”, a tumorsejteknek először le kell küzdeniük az asztrociták tumorellenes mechanizmusait ahhoz, hogy előnyükre tudják fordítani azok prometasztikus tulajdonságait (Wilhelm és mtsai, 2018). Ennek érdekében az agyi metasztatikus tumorsejtek átprogramozzák az asztrocitákat, amelyek tartósan alacsony szintű gyulladásozó környezetet hoznak létre, hasonlóan ahhoz, amely az inflammaginget is jellemzi, elősegítve ezzel a metasztázisképzést (W. Ma és mtsai, 2023).

A gliasejtek közül a mikrogliaat tekintik a központi idegrendszer fő immunsejtjeinek (Sochocka és mtsai, 2017), ugyanakkor az asztrociták, amelyek az agy egyik legnépesebb sejtípusát alkotják (von Bartheld és mtsai, 2016), szintén ellátnak széleskörű immunfunkciókat (Colombo és mtsai, 2016). A glia- és tumorsejtek között létrejövő komplex kölcsönhatásoknak számos típusa ismert, viszont az asztrociták szerepe az agyban kifejlődő metasztázisok gyulladásozó környezetének kialakításában pontosan nem körvonalazott (Doron és mtsai, 2019). Ebben a folyamatban néhány tanulmány tanúsága szerint a citokineknek és kemokineknek fontos szerepet tulajdonítanak. Kutatási eredmények egy csoportja azt mutatja,

hogy *in vitro* körülmények között az asztrociták a tüdőkarinóma sejtek hatására különféle gyulladáshatos citokineket (IL-6, tumor nekrozis faktor-alfa (TNF- α), IL-1 β) termelnek, amelyek aztán a daganatsejtek proliferációját fokozzák (Seike és mtsai, 2011). *In vivo* is hasonló eredményre jutottak, az asztrocitákból felszabaduló citokinek, mint például az I-es típusú interferonok (interferon-alfa és -béta, IFN- α és IFN- β) vagy a TNF- α a tüdő- és emlőkarinóma, illetve a melanóma áttétek növekedését és kemorezisztenciáját okozza az agyban (Q. Chen és mtsai, 2016; W. Ma és mtsai, 2023). Más vizsgálatok arról számolnak be, hogy az emlőkarinóma sejtek és melanómasejtek által termelt enzimek (pl. ciklooxygenáz-2, COX-2) és citokinek (pl. IL-1 β) további citokinek (pl. IL-23; hepatocita növekedési faktor, HGF) és kemokinek (pl. CCL2, 5, 7, 8, CXCL1 és 5) expresszióját emelik meg az asztrocitákban. Ennek következtében pedig a tumorsejtek transzendentális migrációja, önmegújító képessége és perivaszkuláris növekedése fokozódik (Klein és mtsai, 2015; Motalebnejad és mtsai, 2022; K. Wu és mtsai, 2015; Xing és mtsai, 2016). Mindent összevetve, ezen megfigyelések alapján úgy tűnik, hogy a metasztatikus progresszióban szerepet játszó molekulák tumortípusonként eltérhetnek, azonban az asztrociták agyi áttétek jelenlétére adott gyulladáshatos válasza univerzális jelenség. A gyulladáshatos citokinek, jelesen az IL-1 β és IL-18 termeléséért főként az inflammaszómák felelősek. Mindazonáltal a szerepükről szerzett ismereteink az agyi metasztázisok kialakulásában mindeztidáig hiányosak voltak.

Doktori értekezésemben részletezett kísérletsorozatunk fő célja az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon az NLRP3 inflammaszóma szerepet játszik-e a tripla negatív emlőkarinóma agyi metasztázisának patogenezisében. Ehhez a kutatócsoportunkban régóta alkalmazott *in vivo* agyi metasztázis modelleken, sejtenyészetes modelleken, valamint humán agyi metasztatikus szövetmintákon végzett különböző biokémiai, sejtbiológiai és képalkotó vizsgálatokkal kívántuk megérteni, az NLRP3 inflammaszóma miként járulhat hozzá a tripla negatív emlőkarinóma áttétképzéséhez az agyban.

Eredményeink elsőként szolgáltatnak információt arról, hogy az NLRP3 inflammaszóma komponensek, vagyis az NLRP3 és ASC, valamint az IL-1 β fehérje expressziója a peritumorális asztrocitákra lokalizálódik tripla negatív emlőkarinóma agyi metasztázisának korai szakaszában. Megfigyeléseink új megvilágításba helyezik az asztrocitákat ebben a tekintetben, ugyanis korábbi tanulmányok más sejtípusok inflammaszóma-kapcsolt szerepéről tettek tanúbizonyságot a tumorok gyulladáshatos mikroörményzetének szabályozásában. Tüdő adenokarinóma xenograft transzplantációs modellen végzett vizsgálatok során például azt találták, hogy az agyi metasztázisok

strómasejtjei közül a tumor-asszociált makrofágokban (TAM) következett be inflammaszóma priming, amely az *Nlrp3* és az *Il1b* transzkriptumok upregulációjában mutatkozott meg (Schulz és mtsai, 2020). Egér és humán primer emlődaganatban az NLRP3 inflammaszóma aktivációját szintúgy a TAM-okban, valamint a tumor-asszociált fibroblasztokban figyelték meg, amelyek az immun- és endotélsejtek modulációján keresztül fokozták a tumor növekedését és metasztázisképzését (Ershaid és mtsai, 2019; Weichand és mtsai, 2017). A TAM-ok a csontvelő eredetű sejtek olyan heterogén csoportját alkotják, amelyek a rosszindulatú agytumorerő kialakulása során az asztrocitákhoz hasonlóan eltérő fenotípusokkal és funkciókkal rendelkeznek, beleértve pro- és antiinflammatorikus szerepeiket is (Hourani és mtsai, 2021). Továbbá a központi idegrendszer primer és metasztatikus daganatai ellen szintén azonnali válaszreakciót produkálnak, azonban az egyes TAM altípusok a tumor típusától függően változó mértékben oszolhatnak meg a TAM-ok összpopulációján belül (Schulz és mtsai, 2021). A közöttük lévő heterogenitás valószínűleg magyarázhatja, hogy jelen munkánkban az NLRP3 inflammaszóma komponenseket miért nem tudtuk detektálni a peritumorális asztrocitákon kívül más strómasejtokban az általunk vizsgált időintervallumban. Azonban a kimutatható NLRP3 inflammaszóma expresszió hiánya a TAM-okban nem feltétlenül jelenti annak hiányát minden TAM altípusban, hanem inkább az egyes alcsoportok differenciált részvételére utalhat az agyi áttétek gyulladós folyamatainak kezdeti időszakában. Ugyanakkor felmerül a lehetőség, hogy a tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisainak kialakulása során az NLRP3 inflammaszóma az asztrocitákhoz képest később aktiválódik a TAM-okban, vagy más inflammaszóma típusok töltenek be hasonló gyulladós mediátor szerepet az ilyen tumorokban. Utóbbi esetre példa lehet az NLRC4 inflammaszóma, amelynek aktivációját a primer emlőkarcinómák TAM-jaiban mutatták ki nemrég (Kolb és mtsai, 2016). Kísérleteink viszont az NLRC4 vagy más inflammaszóma típus vizsgálatára nem terjedtek ki.

Számos adat utal arra, hogy az agyi metasztatikus mellráksejtek *in vitro* képesek IL-1 β -t szekretálni, amely aktiválja a Notch, az NF- κ B és a transzformáló növekedési faktor-béta 2 (TGF- β 2) jelátviteli útvonalat az asztrocitákban (Gong és mtsai, 2019; Xing és mtsai, 2013; Xing és mtsai, 2016). Az emlőrák sejtekben bekövetkező inflammaszóma aktiváció pedig elősegíti invazivitásukat és áttétképzésüket (Y. Wang és mtsai, 2021). Érdekes módon azonban humán és egér agyszövet mintáinkban nem tudtunk kimutatni se NLRP3, se IL-1 β expressziót az emlőkarcinóma sejtekben. Ennek egyik háttérmechanizmusa az lehet, hogy metasztázisképzés során az emlőkarcinóma sejtekben csökken a foszfatáz és tenzin homológ (phosphatase and tensin homolog, PTEN) nevű tumorszupresszor fehérje expressziója (L.

Zhang és mtsai, 2015), amelyről nemrég leírták, hogy az NLRP3-mal direkt kölcsönhatva lehetővé teszi az inflammaszóma aktivációt (Huang és mtsai, 2020). Ennek értelmében a downregulált PTEN csökkent vagy gátolt NLRP3 inflammaszóma aktivitást eredményezhet a tumorsejtekben, azonban ennek pontos feltérképezése további kutatások alapját képezi.

Külön érdemes megjegyezni, hogy *in vivo* modellünkben az emlőkarcinóma sejtek extravazációját megelőzően az IL-1 β expressziós szintje alig volt kimutatható a tumorsejttel oltott egerek neokortexében, míg azt követően a peritumorális asztrocitákban idő- és tumorméret-függő módon nőtt az expressziója. Egér és humán adataink jelentőségét növeli, hogy az IL-1 β expresszióját mRNS vagy fehérje szinten korábban kizárólag *in vitro* igazolták tüdőkarcinóma sejtek által aktivált asztrocitákban (Seike és mtsai, 2011), és melanóma mikrometasztázisok meg nem határozott sejtjeiben (Schwartz és mtsai, 2016). A metasztázisokon kívül primer agydaganatokban ugyanakkor mind a strómasejtekben, mind a tumorsejtekben megfigyeltek inflammaszóma aktivitásra utaló jeleket. Magas grádusú gliómában például, amely a primer agydaganatok leggyakoribb formája, a tumor-asszociált mikroglia-sejtekben írtak le IL-1 β szekréciót, amely az NLRP1 inflammaszóma aktivációhoz volt köthető (H. Liu és mtsai, 2021). Ezen túlmenően klinikai vizsgálatok a glióma sejtek emelkedett NLRP12 és NLRC4 expressziójára világítottak rá, amely rossz klinikai prognózissal korrelált (Rolim és mtsai, 2022).

Vizsgálataink során nemcsak az inflammaszóma komponensek (*NLRP3*, *CASP1*, *IL1B*) transzkripcionális fokozódását mutattuk ki az asztrocitákban a tripla negatív emlőkarcinóma sejtek által felszabadított faktorok hatására, hanem megfigyeltük az NLRP3 inflammaszóma aktivációt potenciálisan jelző, mikroszkopikus, szemcseszerű struktúrákat is az asztrociták sejtmagja körül, amelyek NLRP3 és ASC kettős immunreaktivitást mutattak. Eredményeink összhangban állnak azzal a megfigyeléssel, miszerint asztrocita természetben ki tudnak alakulni ilyen ASC szemcsék perinukleárisan NLRP3 inflammaszóma aktivátorok hatására (Zhu és mtsai, 2018).

Jelen tanulmányunkban a tripla negatív emlőkarcinóma sejtekből származó DAMP-okat, amelyek az asztrociták NLRP3 inflammaszóma aktivációját ki tudják váltani, nem sikerült azonosítani, azonban több potenciális veszély molekula is felelős lehet ezért a jelenségért. Egyre több kísérletes bizonyíték utal arra, hogy a daganat citokin miliójének kialakításához a tumorsejtek különböző DAMP-ok közvetítésével járulnak hozzá. Ilyen molekula lehet a TGF β 1, amelyről kimutatták, hogy a metasztatikus mellráksejtekből felszabadulva indukálja a mieloid sejtek IL-1 β expresszióját (T. C. Wu és mtsai, 2018), vagy autokrin módon a máj Ito-féle csillagsejtjeiben az NLRP3 inflammaszóma aktiváció mindkét

lépését (Kang és mtsai, 2022). Megfigyelték, hogy a karcinogenezisben fontos szerepet játszó úgynevezett Wingless-related integration site (Wnt) ligandok a TAM-ok IL-1 β termelését serkentik premetasztatikus állapotú primer emlődaganatban (Wellenstein és mtsai, 2019). A Wnt ligandok, például a Wnt1 és 7A valószínűleg TLR-ok aktivációján keresztül vezetnek az IL-1 β inflammaszóma-kapcsolt felszabadulásához (Martin-Medina és mtsai, 2022). Újabb kutatások azt feltételezik, hogy a mellráksejtek által felszabadított szolubilis differenciációs klaszter 44 (cluster of differentiation 44, CD44), amely több tumornövekedésben és metasztázisképzésben részt vevő receptor (epidermális növekedés faktor receptor, EGFR; HGF receptor, TGF β receptorok, TLR4) koreceptora, makrofágokban inflammaszóma aktivációt eredményez (Jang és mtsai, 2020). A tumorsejtek pusztulásával az extracelluláris térbe többféle DAMP-ként viselkedő molekula (pl. HMGB1, ATP) kikerülhet. A kemoterápia mellékhatásaként felszabaduló ATP például a dendritikus sejtek P2X7 purinerg receptorain keresztül aktiválja az NLRP3 inflammaszómát (Ghiringhelli és mtsai, 2009). A lehetséges DAMP-ok sorában egy érdekes közvetlenebb példa lehet a citoszolikus duplaszálú DNS, amely a ciklikus guanozin-monofoszfát-adenozin-monofoszfát (cGAMP) szintáz (cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase, cGAS) – interferon gén stimulátor (stimulator of interferon genes, STING) jelátviteli útvonalat serkenti. Az emlőkarcinóma sejtek és asztrociták közötti konnexin 43 (connexin 43, Cx43)-alapú réskapcsolatokon átadott cGAMP másodlagos hírvivő molekula proinflammatorikus programot indít be az asztrocitákban (Q. Chen és mtsai, 2016). Ismert tény, hogy az IFN- α és TNF- α expresszió szabályozásától független módon a STING lizoszóma-károsodáson és kálium effluxon keresztül aktiválhatja az NLRP3 inflammaszómát bakteriális és virális fertőzések során (Gaidt és mtsai, 2017). Így felmerül annak a lehetősége, hogy hasonló mechanizmussal az emlőkarcinóma sejtek is képesek aktiválni az NLRP3 inflammaszómát az asztrocitákban, és ezáltal IL-1 β felszabadulást kiváltani belőlük.

Szakirodalmi adatok alapján ismeretes, hogy az IL-1 β egy pleiotróp hatással bíró citokin, amely szabályozza a tumorsejtek proliferációját, migrációját, a tumorba szivárgó immunsejtek által koordinált immunválaszokat, a tumor angiogenezist (Rébé és mtsai, 2020). Ezek alapján feltételeztük, hogy az asztrociták által NLRP3 inflammaszóma-függő módon szekretált IL-1 β a tripla negatív emlőkarcinóma agyi áttétjeinek növekedéséhez a tumorsejtek proliferációjának serkentésével járul hozzá. Valóban, *in vitro* vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az asztrociták által felszabadított IL-1 β növeli az emlőráksejtek proliferációját, míg az NLRP3 inflammaszóma aktiváció farmakológiai gátlása vagy a szekretált IL-1 β neutralizálása megakadályozta a tripla negatív emlőkarcinóma sejtek fokozott proliferációját mind az egér,

mind a humán sejtenyészetes modellünkben. Az asztrociták és a tumorsejtek közötti kétirányú kommunikáció másik bizonyítéka, hogy egér sejtenyészetes modellünkben azoknak az asztrocitáknak a szekretómja, amelyek az emlőráksejtek által felszabadított szolubilis faktorokkal korábban találkoztak, a tumorsejtek intenzívebb proliferációját okozta, mint azoké az asztrocitáké, amelyek az emlőkarcinóma sejtekkel semmilyen kölcsönhatásba nem kerültek.

Bár az IL-1 β az inflammaszóma-független módon is szekretálódhat (Netea és mtsai, 2015), eredményeink alapján az NLRP3 inflammaszóma gátlása MCC950-nel és az IL-1 β -semlegesítése specifikus antitestekkel hasonló hatást váltott ki, amely az inflammaszómák IL-1 β felszabadításában betöltött szerepére utal. Mivel az MCC950, amely egy specifikus NLRP3 inflammaszóma gátlószer, az asztrociták által fokozott tumorsejt proliferációt a kontroll szintre csökkentette, más inflammaszóma típusok szerepe kizárható.

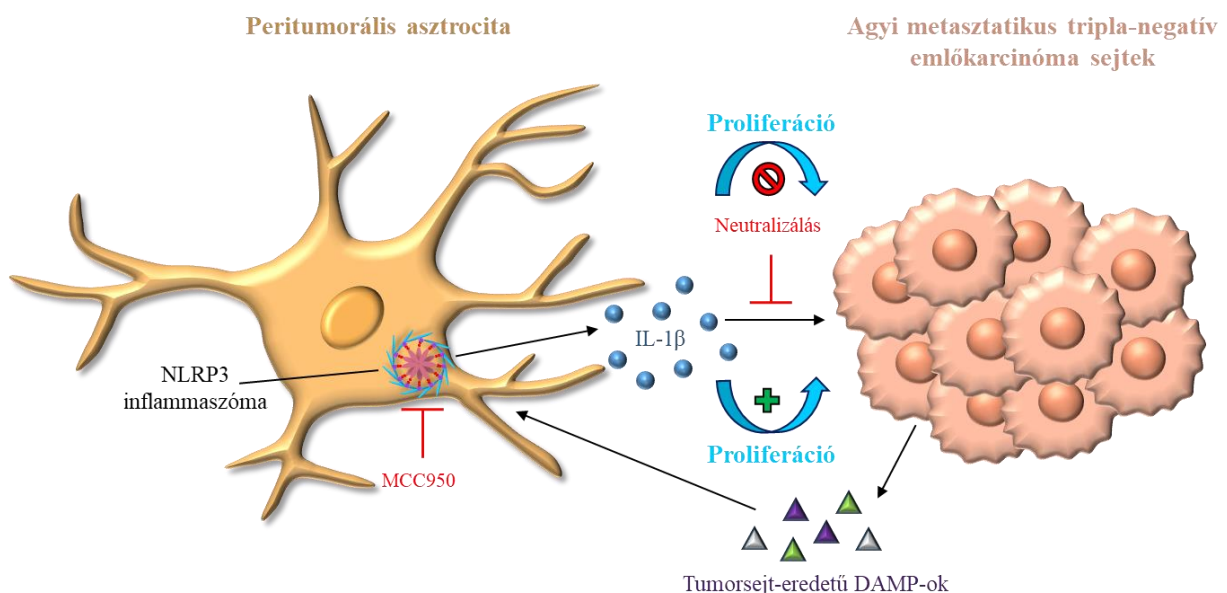
Megfigyeltük, hogy az MCC950 kezelés csökkentette a tumor indukálta NLRP3 inflammaszóma primingot és aktivációt is *in vivo* agyi metasztázis modellünkben. Továbbá csökkentette a tumor jelenlétére adott asztroglíozist és mikroglíozist, azonban az utóbbira kifejtett hatás markánsabbnak bizonyult. Ennek hátterében az állhat, hogy az asztrocitákban kiváltott NLRP3 inflammaszóma aktiváció gátlása nemcsak a tumorsejtek proliferációjára van közvetlen hatással, hanem a mikroglia aktivációjára is. Modellünkben az IL-1 β feltételezhetően nem az IL-1R szignalizáción keresztül szabályozza a mikroglia reaktivitást. Ezt alátámasztandó a mikroglia sejtek nem expresszálják az IL-1 β fő receptoraként működő IL-1R1-et (X. Liu és mtsai, 2019). Továbbá az IL-1 β nem képes sem a receptorhoz köthető intracelluláris szignalizációs útvonalakat (mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), NF- κ B) aktiválni, sem különféle gyulladáshoz vezető mediátorok (prostaglandin E₂ (PGE₂), IL-6) felszabadulását indukálni a mikrogliaiban (Pinteaux és mtsai, 2002). Habár ugyanebben a tanulmányban kimutatták az IL-1R2 expresszióját mikrogliaiban, amelyhez szintén tud kötődni az IL-1 β , viszont az IL-1R2 mint csali receptor nem rendelkezik funkcióképes szignalizációs doménnel, hanem az IL-1 szignalizáció negatív regulátoraként mérsékelheti vagy gátolhatja az IL-1 β gyulladást fokozó hatását (Supino és mtsai, 2022). Ez esetben viszont az MCC950 gátló hatása nem magyarázná a mikroglíozis mértékének direkt csökkentését. Az asztrocitákról viszont kimutatták, hogy közvetve modulálják a mikroglia sejtek emlőkarcinóma és melanóma metasztázisok helyszínére való toborzását. Az asztrociták exoszómákba csomagolt mikroRNS-eken keresztül gátolják a tumorsejtek PTEN expresszióját, aminek következtében azok CCL2-t bocsátanak ki. A CCL2 kemoattraktáns

tulajdonságainak köszönhetően a mikroglia sejteket a tumorhoz vonzza, amelyek fokozzák a mellráksejtek proliferációját és gátolják azok apoptózisát (L. Zhang és mtsai, 2015).

Eredményeink közül a legjelentősebb, hogy az MCC950 alkalmazásával hatásosan tudtuk gátolni a tripla negatív emlőkarcinóma metasztázisainak növekedését az egerek agyában. Ezáltal az NLRP3 inflammaszóma és annak aktivitása során keletkező IL-1 β tumorsejt proliferáció fokozó szerepük miatt lehetséges célpontként szolgálhatnak az agyi metasztázisok elleni terápiák kidolgozása során. Mivel az NLRP3 inflammaszóma aktivációját számos gyulladással járó betegséggel összefüggésbe hozták, ezért az NLRP3 inflammaszómát gátló gyógyszerjelöltek fejlesztésére irányult a fókusz, és ezen jelöltek közül több eljutott a klinikai tesztekig (Q. L. Chen és mtsai, 2021). Az ilyen inhibitorok alkalmazása új és ígéretes lehetőséget kínál nemcsak a központi idegrendszert érintő vagy szisztémás gyulladással járó állapotok, hanem a különböző daganatok kezelésében is (Xu és mtsai, 2019). Az MCC950 volt az első diaril-szulfonilurea típusú kismolekula, amelyről kísérletesen bizonyították, hogy már nanomoláris koncentrációban hatásosan és szelektíven gátolja az NLRP3 inflammaszóma oligomerizációját és aktivációját (Coll és mtsai, 2015), annak ATP-kötő motívumához kapcsolódva (Coll és mtsai, 2019). Nagy dózisú adagolásából eredő májkárosodási kockázat miatt viszont sajnos megghiúsult, hogy a fázis II. klinikai vizsgálatokig eljusson (Mullard, 2019), amelynek hátterében a célmolekulán kívüli (off-target) hatás állhat. Egy friss kutatásban a sav-bázis egyensúly szabályozásában szerepet játszó szénsav-anhidráz (carbonic anhydrase, CA) 2-t azonosították, mint off-targetet, amelyet az MCC950 magas mikromoláris koncentrációban, nemkompetitív módon gátol (Kennedy és mtsai, 2021). Ez a megfigyelés viszont ellentmondásban van egy korábbi farmakológiai analízissel, miszerint a diaril-szulfonilurea vegyületek, amilyen az MCC950 is, nem befolyásolják a CA2 aktivitását (Laliberte és mtsai, 2003). Egy másik, újonnan megjelent tanulmány szerint a CA2 gén expressziója alacsony a tripla negatív emlőrákban (Lee és mtsai, 2023), viszont asztrociták bizonyos hányadában kifejeződik (Agnati és mtsai, 1995), amelyet a legújabb transzkriptomikai adatbázisok (<http://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html>, <https://knowledge.brain-map.org/abcatlas>) is megerősítenek (Vanlandewijck és mtsai, 2018; Yao és mtsai, 2023). Iszkémiás stroke modellben a diklórfenamid, amely egy általánosan használt CA inhibitor, csökkentette az iszkémiás-reperfúziós károsodásra megemelkedett IL-1 β szintjét egeragyban (Kumar és mtsai, 2023), így elképzelhető, hogy az MCC950 a CA2 gátlásán keresztül indirekt szabályozhatja az inflammaszómák aktivitását. Ennek a mechanizmusnak a feltárása jövőbeli kutatások tárgyát képezheti. Mindent összevetve, habár vizsgálataink nem terjedtek ki a

szénsav-anhidrázok tumornövekedésben játszott esetleges szerepének meghatározására, az MCC950 fő támadáspontja a rá jellemző hatáserősség és specificitás alapján (Vande Walle és mtsai, 2019), valamint mások és saját eredményeink tükrében az NLRP3 inflammaszóma. Ezt a megállapítást alátámasztja, hogy *in vitro* modellünkben az asztrocita-eredetű IL-1 β által kiváltott, fokozott tumorsejt proliferációt az MCC950 a kontroll szintre csökkentette, így az inhibitor más molekuláris célpontokra kifejtett hatása másodlagos lehet.

Különböző gyulladásos modellekben az MCC950-nek továbbra is bizonyított a protektív hatása és elfogadott az alkalmazhatósága (Molnár és mtsai, 2022; Naeem és mtsai, 2024). Ezt bizonyítandó az MCC950-et több mint 50 betegség 80 állatmodelljében tesztelték ezidáig (Cross, 2020). Továbbá óriási előnyt jelent, hogy maga az MCC950 és a rokon szerkezetű kismolekulák átjutnak a vér–agy gáton (Dempsey és mtsai, 2017), sőt annak integritását is képesek javítani (Ward és mtsai, 2019). Ez a tulajdonság azért kiemelt fontosságú, ugyanis a vér–agy gát relatív impermeabilitása miatt sok esetben a gyógyszer hatóanyagok nem érik el a terápiás koncentrációt a központi idegrendszerben (Krizbai és mtsai, 2016). Az agyi metasztázisok a legagresszívabb és legnehezebben kezelhető daganatok közé tartoznak, ezért az inflammaszómák direkt gátlása a peritumorális asztrocitákban vagy az IL-1 β blokkolása az agyi áttétes daganatok kezelésének fontos elemei lehetnek a jövőben (19. ábra).



19. ábra: A peritumorális asztrociták hatása a metasztatikus tripla negatív emlőkarcinóma sejtek proliferációjára. Az NLRP3 inflammaszóma a metasztatikus tumorsejtekből származó DAMP-ok hatására aktiválódik az asztrocitákban, amelynek következtében IL-1 β szabadul fel belőlük. Az IL-1 β fokozza a tumorsejtek proliferációját. Az NLRP3 inflammaszóma MCC950-nel való gátlásával vagy az IL-1 β specifikus neutralizáló antitesttel való blokkolásával az emlőkarcinóma sejtek proliferációja lefékezhető.

Az általunk alkalmazott kísérleti módszerek bizonyos korlátokat hordoznak. *In vivo* agyi metasztázis modellünkben maga a tumorsejt bejuttatási mód nem tükrözi teljes mértékben a metasztatikus kaszkádot, mivel nincs jelen a primer tumor és nem foglalja magába a tumorsejtek invázióját és az azt követő intravazációt. Azonban az agyi metasztázis modellek egyik leggyakrabban alkalmazott típusa az intrakarotikus oltás (Knier és mtsai, 2022), amely nagyobb reprodukálhatósági és alacsonyabb variabilitási rátával jellemezhető a többi módszerhez képest (C. Zhang és mtsai, 2017). Mindazonáltal a jövőben érdekes lenne azt megvizsgálni, hogy a premetasztatikus állapot befolyásolhatja-e az inflammaszóma aktivációt a tumor mikrokörnyezetben a daganatos sejtek extravazációját követően.

Fontos megjegyezni, hogy az MCC950 emberi vizsgálatokban hepatotoxicitás jeleit mutatta, ami miatt nem fog klinikai használatba kerülni, azonban biztató irányt mutat az MCC950 analógok és a szerkezetileg nem rokon vegyületek tervezése és tesztelése (El-Sharkawy és mtsai, 2020), hogy olyan inflammaszóma gátló alapú gyógyszereket találjanak, amelyek hatásosak, szelektívek, biztonságosak és az agyi áttétek hozzáférhetősége végett átjutnak a vér-agy gáton és a vér-tumor gáton.

Továbbá a kísérleteinkhez használt egér tripla negatív emlőkarcinóma sejtvonal (4T1-tdT) és az MDA-ból származó humán sejtvonalak (MDA-TGL és MDA-BrM2) ugyan nem rendelkeznek a betegekből származó xenograftok heterogenitásával, mindazonáltal ezek a sejtvonalak nagyon jól karakterizált agyi metasztatikus sejteknek tekinthetők (Bos és mtsai, 2009; Sereno és mtsai, 2020). A xenograft modellek alkalmazásának követelménye, hogy a graft-versus-host (nem-rokon donortól származó sejt vagy szövetdarab beültetése okozta) reakciók elkerülése végett immunhiányos állatokat kell használni. Ennek nagy hátránya, hogy korlátozza az immunrendszer hatásának az értékelését (Y. Liu és mtsai, 2023). Másik lehetőség a humanizált állatokat használata, viszont ezek immundefektusokat hordozhatnak (Fujiwara, 2018).

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik valamilyen formában segítséget nyújtottak az értekezés témájának kiválasztásában, elkészítésében és összeállításában.

Mindenekelőtt köszönettel tartozom 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-sok segítségért, a megosztott tapasztalatokért, a baráti beszélgetésekért és a motiváló csapatmunkáért. Továbbá köszönöm a Dr. Lőrincz László Magor által korábban irányított MTA-SZTE NAP B Celluláris és Hálózati Neurofiziológiai Kutatócsoport munkatársainak, 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 és az egykoron általa vezetett MTA-NAP Inhibitory Interneurons and Plasticity Kutatócsoport tagjainak és vendégkutatójának, Dr. Dimitrios Kotzadimitriounak az útmutatásért és segítségért.

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. Tiszlavicz Lászlónak, a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Pathologiai Intézet igazgatójának a humán agymintákért és Dr. Nógrádi Bernátnak jelen munkában és más projektekben nyújtott segítségéért és hasznos meglátásaiért.

Köszönöm barátaimnak, név szerint Áronnak, Gabinak, Szabinának, Gábornak és Katusnak a mindenkori 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. Már szinte születésétől kezdve végigalussza az éjszakákat, így sokszor lehetőségem nyílt arra, hogy hajnalig kényelmesen a fogalmazásra koncentrálhassak. Egyúttal hálát szeretnék adni Édesanyámnak, aki határtalan türelemmel, támogatással és megértéssel állt hozzám és biztatott az egyetemi és doktorandusz évek során. Nem utolsó sorban nagyra értékelem, hogy sosem hangzott el tőle a PhD aktuális állapotára irányuló kérdések egyike, így a nehéz pillanatok súlya alól volt némi felszabadulás.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Aapro, M., & Wildiers, H. (2012). Triple-negative breast cancer in the older population. *Ann Oncol*, 23 Suppl 6, vi52-55. doi:10.1093/annonc/mds189
- Aaron, N., Costa, S., Rosen, C. J., & Qiang, L. (2022). The Implications of Bone Marrow Adipose Tissue on Inflammaging. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 13, 853765. doi:10.3389/fendo.2022.853765
- Abu, N., Rus Bakarurraini, N. A. A., & Nasir, S. N. (2021). Extracellular Vesicles and DAMPs in Cancer: A Mini-Review. *Front Immunol*, 12, 740548. doi:10.3389/fimmu.2021.740548
- Agnati, L. F., Tinner, B., Staines, W. A., Vaananen, K., & Fuxe, K. (1995). On the cellular localization and distribution of carbonic anhydrase II immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res*, 676(1), 10-24. doi:10.1016/0006-8993(95)00026-m
- Agostini, L., Martinon, F., Burns, K., McDermott, M. F., Hawkins, P. N., & Tschopp, J. (2004). NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*, 20(3), 319-325. doi:10.1016/s1074-7613(04)00046-9
- Allen, I. C., TeKippe, E. M., Woodford, R. M., Uronis, J. M., Holl, E. K., Rogers, A. B., Herfarth, H. H., Jobin, C., & Ting, J. P. (2010). The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med*, 207(5), 1045-1056. doi:10.1084/jem.20100050
- Bast, R. C., Byrd, J. C., Croce, C. M., Hawk, E., Khuri, F. E., Pollock, R. E., Tsimberidou, A. M., Willett, C. G., & Willman, C. L. (2023). *Holland-Frei Cancer Medicine* (10th ed.): Wiley-Blackwell.
- Beach, I. R., Olszewski, A. M., Thomas, A. A., DeWitt, J. C., & Liebelt, B. D. (2021). Multifocal metastases to choroid plexus from papillary thyroid carcinoma: illustrative case. *J Neurosurg Case Lessons*, 2(11), CASE21436. doi:10.3171/CASE21436
- Bejarano, L., Kauzlaric, A., Lamprou, E., Lourenco, J., Fournier, N., Ballabio, M., Colotti, R., Maas, R., Galland, S., Massara, M., Soukup, K., Lilja, J., Brouland, J. P., Hottinger, A. F., Daniel, R. T., Hegi, M. E., & Joyce, J. A. (2024). Interrogation of endothelial and mural cells in brain metastasis reveals key immune-regulatory mechanisms. *Cancer Cell*. doi:10.1016/j.ccell.2023.12.018
- Bleve, A., Motta, F., Durante, B., Pandolfo, C., Selmi, C., & Sica, A. (2023). Immunosenescence, Inflammaging, and Frailty: Role of Myeloid Cells in Age-Related Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*, 64(2), 123-144. doi:10.1007/s12016-021-08909-7
- Bodnar-Wachtel, M., Huber, A. L., Gorry, J., Hacot, S., Burlet, D., Gerossier, L., Guey, B., Goutagny, N., Bartosch, B., Ballot, E., Lecuelle, J., Truntzer, C., Ghiringhelli, F., Py, B. F., Coute, Y., Ballesta, A., Lantuejoul, S., Hall, J., Tissier, A., & Petrilli, V. (2023). Inflammasome-independent NLRP3 function enforces ATM activity in response to genotoxic stress. *Life Sci Alliance*, 6(4). doi:10.26508/lsa.202201494
- Bos, P. D., Zhang, X. H., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R. R., Nguyen, D. X., Minn, A. J., van de Vijver, M. J., Gerald, W. L., Foekens, J. A., & Massague, J. (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*, 459(7249), 1005-1009. doi:10.1038/nature08021
- Boucher, D., Monteleone, M., Coll, R. C., Chen, K. W., Ross, C. M., Teo, J. L., Gomez, G. A., Holley, C. L., Bierschenk, D., Stacey, K. J., Yap, A. S., Bezbradica, J. S., & Schroder, K. (2018). Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *J Exp Med*, 215(3), 827-840. doi:10.1084/jem.20172222

- Bruchard, M., Rebe, C., Derangere, V., Togbe, D., Ryffel, B., Boidot, R., Humblin, E., Hamman, A., Chalmin, F., Berger, H., Chevriaux, A., Limagne, E., Apetoh, L., Vegran, F., & Ghiringhelli, F. (2015). The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nat Immunol*, *16*(8), 859-870. doi:10.1038/ni.3202
- Bulau, A. M., Nold, M. F., Li, S., Nold-Petry, C. A., Fink, M., Mansell, A., Schwerd, T., Hong, J., Rubartelli, A., Dinarello, C. A., & Bufler, P. (2014). Role of caspase-1 in nuclear translocation of IL-37, release of the cytokine, and IL-37 inhibition of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(7), 2650-2655. doi:10.1073/pnas.1324140111
- Caffarel, M. M., & Braza, M. S. (2022). Microglia and metastases to the central nervous system: victim, ravager, or something else? *J Exp Clin Cancer Res*, *41*(1), 327. doi:10.1186/s13046-022-02535-7
- Cailleau, R., Olive, M., & Cruciger, Q. V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, *14*(11), 911-915. doi:10.1007/BF02616120
- Campbell, J. P., Merkel, A. R., Masood-Campbell, S. K., Elefteriou, F., & Sterling, J. A. (2012). Models of bone metastasis. *J Vis Exp*(67), e4260. doi:10.3791/4260
- Carriere, J., Dorfleutner, A., & Stehlik, C. (2021). NLRP7: From inflammasome regulation to human disease. *Immunology*, *163*(4), 363-376. doi:10.1111/imm.13372
- Chan, W. L., Marinho, J., Chavarri-Guerra, Y., Hincapie-Echeverri, J., Velasco, R. N., Jr., Akagunduz, B., Roy, M., Kwong, W. T. G., Wu, W. F., Battisti, N. M. L., & Soto-Perez-de-Celis, E. (2022). Systemic treatment for triple negative breast cancer in older patients: A Young International Society of Geriatric Oncology Review Paper. *J Geriatr Oncol*, *13*(5), 563-571. doi:10.1016/j.jgo.2022.01.002
- Chen, P. Y., Yen, J. C., Liu, T. T., Chen, S. T., Wang, S. J., & Chen, S. P. (2023). Neuronal NLRP3 inflammasome mediates spreading depolarization-evoked trigeminovascular activation. *Brain*, *146*(7), 2989-3002. doi:10.1093/brain/awad045
- Chen, Q., Boire, A., Jin, X., Valiente, M., Er, E. E., Lopez-Soto, A., Jacob, L., Patwa, R., Shah, H., Xu, K., Cross, J. R., & Massague, J. (2016). Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature*, *533*(7604), 493-498. doi:10.1038/nature18268
- Chen, Q. L., Yin, H. R., He, Q. Y., & Wang, Y. (2021). Targeting the NLRP3 inflammasome as new therapeutic avenue for inflammatory bowel disease. *Biomed Pharmacother*, *138*, 111442. doi:10.1016/j.biopha.2021.111442
- Chow, M. T., Sceneay, J., Paget, C., Wong, C. S., Duret, H., Tschopp, J., Moller, A., & Smyth, M. J. (2012). NLRP3 suppresses NK cell-mediated responses to carcinogen-induced tumors and metastases. *Cancer Res*, *72*(22), 5721-5732. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0509
- Coll, R. C., Hill, J. R., Day, C. J., Zamoshnikova, A., Boucher, D., Massey, N. L., Chitty, J. L., Fraser, J. A., Jennings, M. P., Robertson, A. A. B., & Schroder, K. (2019). MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nat Chem Biol*, *15*(6), 556-559. doi:10.1038/s41589-019-0277-7
- Coll, R. C., Robertson, A. A., Chae, J. J., Higgins, S. C., Munoz-Planillo, R., Inserra, M. C., Vetter, I., Dungan, L. S., Monks, B. G., Stutz, A., Croker, D. E., Butler, M. S., Haneklaus, M., Sutton, C. E., Nunez, G., Latz, E., Kastner, D. L., Mills, K. H., Masters, S. L., Schroder, K., Cooper, M. A., & O'Neill, L. A. (2015). A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med*, *21*(3), 248-255. doi:10.1038/nm.3806
- Colombo, E., & Farina, C. (2016). Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol*, *37*(9), 608-620. doi:10.1016/j.it.2016.06.006

- Cross, R. (2020). Could an NLRP3 inhibitor be the one drug to conquer common diseases? *C&EN*, 98(7), 26-31. doi:10.1021/cen-09807-cover
- Cunha, L. D., Silva, A. L. N., Ribeiro, J. M., Mascarenhas, D. P. A., Quirino, G. F. S., Santos, L. L., Flavell, R. A., & Zamboni, D. S. (2017). AIM2 Engages Active but Unprocessed Caspase-1 to Induce Noncanonical Activation of the NLRP3 Inflammasome. *Cell Rep*, 20(4), 794-805. doi:10.1016/j.celrep.2017.06.086
- Csonti, K., Fazakas, C., Molnár, K., Wilhelm, I., Krizbai, I. A., & Vég, A. G. (2024). Breast adenocarcinoma cells adhere stronger to brain pericytes than to endothelial cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 234, 113751. doi:10.1016/j.colsurfb.2024.113751
- Davis, T., & Kipling, D. (2006). Werner Syndrome as an example of inflamm-aging: possible therapeutic opportunities for a progeroid syndrome? *Rejuvenation Res*, 9(3), 402-407. doi:10.1089/rej.2006.9.402
- de Carvalho Ribeiro, M., & Szabó, G. (2022). Role of the Inflammasome in Liver Disease. *Annu Rev Pathol*, 17, 345-365. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-032521-102529
- Dempsey, C., Rubio Araiz, A., Bryson, K. J., Finucane, O., Larkin, C., Mills, E. L., Robertson, A. A. B., Cooper, M. A., O'Neill, L. A. J., & Lynch, M. A. (2017). Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid-beta and cognitive function in APP/PS1 mice. *Brain Behav Immun*, 61, 306-316. doi:10.1016/j.bbi.2016.12.014
- Deshpande, K., Martirosian, V., Nakamura, B. N., Iyer, M., Julian, A., Eisenbarth, R., Shao, L., Attenello, F., & Neman, J. (2022). Neuronal exposure induces neurotransmitter signaling and synaptic mediators in tumors early in brain metastasis. *Neuro Oncol*, 24(6), 914-924. doi:10.1093/neuonc/noab290
- Dick, M. S., Sborgi, L., Ruhl, S., Hiller, S., & Broz, P. (2016). ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes. *Nat Commun*, 7, 11929. doi:10.1038/ncomms11929
- Domblides, C., Soubeyran, I., Lartigue, L., Mahouche, I., Lefort, F., Velasco, V., Barnette, T., Blanco, P., Dechanet-Merville, J., & Faustin, B. (2020). Prognostic Role of Inflammasome Components in Human Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*, 12(12). doi:10.3390/cancers12123500
- Doron, H., Pukrop, T., & Erez, N. (2019). A Blazing Landscape: Neuroinflammation Shapes Brain Metastasis. *Cancer Res*, 79(3), 423-436. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1805
- Dupaul-Chicoine, J., Arabzadeh, A., Dagenais, M., Douglas, T., Champagne, C., Morizot, A., Rodrigue-Gervais, I. G., Breton, V., Colpitts, S. L., Beauchemin, N., & Saleh, M. (2015). The Nlrp3 Inflammasome Suppresses Colorectal Cancer Metastatic Growth in the Liver by Promoting Natural Killer Cell Tumoricidal Activity. *Immunity*, 43(4), 751-763. doi:10.1016/j.immuni.2015.08.013
- Ebersole, J. L., Graves, C. L., Gonzalez, O. A., Dawson, D., 3rd, Morford, L. A., Huja, P. E., Hartsfield, J. K., Jr., Huja, S. S., Pandravad, S., & Wallet, S. M. (2016). Aging, inflammation, immunity and periodontal disease. *Periodontol 2000*, 72(1), 54-75. doi:10.1111/prd.12135
- Edye, M. E., Lopez-Castejon, G., Allan, S. M., & Brough, D. (2013). Acidosis drives damage-associated molecular pattern (DAMP)-induced interleukin-1 secretion via a caspase-1-independent pathway. *J Biol Chem*, 288(42), 30485-30494. doi:10.1074/jbc.M113.478941
- El-Sharkawy, L. Y., Brough, D., & Freeman, S. (2020). Inhibiting the NLRP3 Inflammasome. *Molecules*, 25(23). doi:10.3390/molecules25235533
- Elgohary, S., & El Tayebi, H. M. (2023). Inflammasomes in breast cancer: the ignition spark of progression and resistance? *Expert Rev Mol Med*, 25, e22. doi:10.1017/erm.2023.14

- Ershaid, N., Sharon, Y., Doron, H., Raz, Y., Shani, O., Cohen, N., Monteran, L., Leider-Trejo, L., Ben-Shmuel, A., Yassin, M., Gerlic, M., Ben-Baruch, A., Pasmanik-Chor, M., Apte, R., & Erez, N. (2019). NLRP3 inflammasome in fibroblasts links tissue damage with inflammation in breast cancer progression and metastasis. *Nat Commun*, *10*(1), 4375. doi:10.1038/s41467-019-12370-8
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhauser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W. T., Cohen-Salmon, M., Cunningham, C., Deneen, B., De Strooper, B., Diaz-Castro, B., Farina, C., Freeman, M., Gallo, V., Goldman, J. E., Goldman, S. A., Gotz, M., Gutierrez, A., Haydon, P. G., Heiland, D. H., Hol, E. M., Holt, M. G., Iino, M., Kastanenka, K. V., Kettenmann, H., Khakh, B. S., Koizumi, S., Lee, C. J., Liddelov, S. A., MacVicar, B. A., Magistretti, P., Messing, A., Mishra, A., Molofsky, A. V., Murai, K. K., Norris, C. M., Okada, S., Oliet, S. H. R., Oliveira, J. F., Panatier, A., Parpura, V., Pekna, M., Pekny, M., Pellerin, L., Perea, G., Perez-Nievas, B. G., Pfrieger, F. W., Poskanzer, K. E., Quintana, F. J., Ransohoff, R. M., Riquelme-Perez, M., Robel, S., Rose, C. R., Rothstein, J. D., Rouach, N., Rowitch, D. H., Semyanov, A., Sirko, S., Sontheimer, H., Swanson, R. A., Vitorica, J., Wanner, I. B., Wood, L. B., Wu, J., Zheng, B., Zimmer, E. R., Zorec, R., Sofroniew, M. V., & Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci*, *24*(3), 312-325. doi:10.1038/s41593-020-00783-4
- Evavold, C. L., & Kagan, J. C. (2022). Diverse Control Mechanisms of the Interleukin-1 Cytokine Family. *Front Cell Dev Biol*, *10*, 910983. doi:10.3389/fcell.2022.910983
- Farshchian, M., Nissinen, L., Siljamaki, E., Riihila, P., Piipponen, M., Kivisaari, A., Kallajoki, M., Grenman, R., Peltonen, J., Peltonen, S., Quint, K. D., Bavinck, J. N. B., & Kahari, V. M. (2017). Tumor cell-specific AIM2 regulates growth and invasion of cutaneous squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, *8*(28), 45825-45836. doi:10.18632/oncotarget.17573
- Fielding, J. E. (1999). Public health in the twentieth century: advances and challenges. *Annu Rev Public Health*, *20*, xiii-xxx. doi:10.1146/annurev.publhealth.20.1.0
- Figueira, I., Galego, S., Custodio-Santos, T., Vicente, R., Molnár, K., Haskó, J., Malho, R., Videira, M., Wilhelm, I., Krizbai, I., & Brito, M. A. (2021). Picturing Breast Cancer Brain Metastasis Development to Unravel Molecular Players and Cellular Crosstalk. *Cancers (Basel)*, *13*(4). doi:10.3390/cancers13040910
- Fitzgerald, D. P., Palmieri, D., Hua, E., Hargrave, E., Herring, J. M., Qian, Y., Vega-Valle, E., Weil, R. J., Stark, A. M., Vortmeyer, A. O., & Steeg, P. S. (2008). Reactive glia are recruited by highly proliferative brain metastases of breast cancer and promote tumor cell colonization. *Clin Exp Metastasis*, *25*(7), 799-810. doi:10.1007/s10585-008-9193-z
- Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., & De Benedictis, G. (2000a). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*, *908*, 244-254. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x
- Franceschi, C., & Campisi, J. (2014). Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *69 Suppl 1*, S4-9. doi:10.1093/gerona/glu057
- Franceschi, C., Capri, M., Garagnani, P., Ostan, R., Santoro, A., Monti, D., & Salvioli, S. (2019). In: Fulop, T., Franceschi, C., Hirokawa, K., Pawelec, G. (eds) *Handbook of Immunosenescence*.: Springer, Cham.

- Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Olivieri, F., Sevini, F., Panourgia, M. P., Invidia, L., Celani, L., Scurti, M., Cevenini, E., Castellani, G. C., & Salvioli, S. (2007). Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev*, *128*(1), 92-105. doi:10.1016/j.mad.2006.11.016
- Franceschi, C., Garagnani, P., Morsiani, C., Conte, M., Santoro, A., Grignolio, A., Monti, D., Capri, M., & Salvioli, S. (2018a). The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. *Front Med (Lausanne)*, *5*, 61. doi:10.3389/fmed.2018.00061
- Franceschi, C., Garagnani, P., Parini, P., Giuliani, C., & Santoro, A. (2018b). Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol*, *14*(10), 576-590. doi:10.1038/s41574-018-0059-4
- Franceschi, C., Garagnani, P., Vitale, G., Capri, M., & Salvioli, S. (2017). Inflammaging and 'Garb-aging'. *Trends Endocrinol Metab*, *28*(3), 199-212. doi:10.1016/j.tem.2016.09.005
- Franceschi, C., Monti, D., Sansoni, P., & Cossarizza, A. (1995). The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunol Today*, *16*(1), 12-16. doi:10.1016/0167-5699(95)80064-6
- Franceschi, C., Valensin, S., Bonafe, M., Paolisso, G., Yashin, A. I., Monti, D., & De Benedictis, G. (2000b). The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol*, *35*(6-7), 879-896. doi:10.1016/s0531-5565(00)00172-8
- Franchi, L., Warner, N., Viani, K., & Nunez, G. (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*, *227*(1), 106-128. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x
- Fu, J., & Wu, H. (2023). Structural Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Assembly and Activation. *Annu Rev Immunol*, *41*, 301-316. doi:10.1146/annurev-immunol-081022-021207
- Fujiwara, S. (2018). Humanized mice: A brief overview on their diverse applications in biomedical research. *J Cell Physiol*, *233*(4), 2889-2901. doi:10.1002/jcp.26022
- Fülöp, T., Larbi, A., Pawelec, G., Khalil, A., Cohen, A. A., Hirokawa, K., Witkowski, J. M., & Franceschi, C. (2023). Immunology of Aging: the Birth of Inflammaging. *Clin Rev Allergy Immunol*, *64*(2), 109-122. doi:10.1007/s12016-021-08899-6
- Fülöp, T., Larbi, A., & Witkowski, J. M. (2019). Human Inflammaging. *Gerontology*, *65*(5), 495-504. doi:10.1159/000497375
- Gaidt, M. M., Ebert, T. S., Chauhan, D., Ramshorn, K., Pinci, F., Zuber, S., O'Duill, F., Schmid-Burgk, J. L., Hoss, F., Buhmann, R., Wittmann, G., Latz, E., Subklewe, M., & Hornung, V. (2017). The DNA Inflammasome in Human Myeloid Cells Is Initiated by a STING-Cell Death Program Upstream of NLRP3. *Cell*, *171*(5), 1110-1124 e1118. doi:10.1016/j.cell.2017.09.039
- Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., Perfettini, J. L., Schlemmer, F., Tasdemir, E., Uhl, M., Genin, P., Civas, A., Ryffel, B., Kanellopoulos, J., Tschopp, J., Andre, F., Lidereau, R., McLaughlin, N. M., Haynes, N. M., Smyth, M. J., Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med*, *15*(10), 1170-1178. doi:10.1038/nm.2028
- Gong, X., Hou, Z., Endsley, M. P., Gronseth, E. I., Rarick, K. R., Jorns, J. M., Yang, Q., Du, Z., Yan, K., Bordas, M. L., Gershan, J., Deepak, P., Geethadevi, A., Chaluvally-Raghavan, P., Fan, Y., Harder, D. R., Ramchandran, R., & Wang, L. (2019).

- Interaction of tumor cells and astrocytes promotes breast cancer brain metastases through TGF-beta2/ANGPTL4 axes. *NPJ Precis Oncol*, 3, 24. doi:10.1038/s41698-019-0094-1
- Gritsenko, A., Diaz-Pino, R., & Lopez-Castejon, G. (2022). NLRP3 inflammasome triggers interleukin-37 release from human monocytes. *Eur J Immunol*, 52(7), 1141-1157. doi:10.1002/eji.202149724
- Gritsenko, A., Yu, S., Martin-Sanchez, F., Diaz-Del-Olmo, I., Nichols, E. M., Davis, D. M., Brough, D., & Lopez-Castejon, G. (2020). Priming Is Dispensable for NLRP3 Inflammasome Activation in Human Monocytes In Vitro. *Front Immunol*, 11, 565924. doi:10.3389/fimmu.2020.565924
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*, 12(1), 31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
- Haskó, J., Fazakas, C., Molnár, K., Mészáros, Á., Patai, R., Szabó, G., Erdélyi, F., Nyúl-Tóth, Á., Győri, F., Kozma, M., Farkas, A. E., Krizbai, I. A., & Wilhelm, I. (2019). Response of the neurovascular unit to brain metastatic breast cancer cells. *Acta Neuropathol Commun*, 7(1), 133. doi:10.1186/s40478-019-0788-1
- Herman, H., Fazakas, C., Haskó, J., Molnár, K., Mészáros, Á., Nyúl-Tóth, Á., Szabó, G., Erdélyi, F., Ardelean, A., Hermenean, A., Krizbai, I. A., & Wilhelm, I. (2019). Paracellular and transcellular migration of metastatic cells through the cerebral endothelium. *J Cell Mol Med*, 23(4), 2619-2631. doi:10.1111/jcmm.14156
- Hernandez, C., Huebener, P., & Schwabe, R. F. (2016). Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene*, 35(46), 5931-5941. doi:10.1038/onc.2016.104
- Hoss, F., Rodriguez-Alcazar, J. F., & Latz, E. (2017). Assembly and regulation of ASC specks. *Cell Mol Life Sci*, 74(7), 1211-1229. doi:10.1007/s00018-016-2396-6
- Hourani, T., Holden, J. A., Li, W., Lenzo, J. C., Hadjigol, S., & O'Brien-Simpson, N. M. (2021). Tumor Associated Macrophages: Origin, Recruitment, Phenotypic Diversity, and Targeting. *Front Oncol*, 11, 788365. doi:10.3389/fonc.2021.788365
- Hu, Z., & Chai, J. (2023). Assembly and Architecture of NLR Resistosomes and Inflammasomes. *Annu Rev Biophys*, 52, 207-228. doi:10.1146/annurev-biophys-092922-073050
- Huang, Y., Wang, H., Hao, Y., Lin, H., Dong, M., Ye, J., Song, L., Wang, Y., Li, Q., Shan, B., Jiang, Y., Li, H., Shao, Z., Kroemer, G., Zhang, H., Bai, L., Jin, T., Wang, C., Ma, Y., Cai, Y., Ding, C., Liu, S., Pan, Y., Jiang, W., & Zhou, R. (2020). Myeloid PTEN promotes chemotherapy-induced NLRP3-inflammasome activation and antitumour immunity. *Nat Cell Biol*, 22(6), 716-727. doi:10.1038/s41556-020-0510-3
- Indalao, I. L., Sawabuchi, T., Takahashi, E., & Kido, H. (2017). IL-1beta is a key cytokine that induces trypsin upregulation in the influenza virus-cytokine-trypsin cycle. *Arch Virol*, 162(1), 201-211. doi:10.1007/s00705-016-3093-3
- Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J., & Nunez, G. (1999). Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem*, 274(21), 14560-14567. doi:10.1074/jbc.274.21.14560
- Ismael, S., Nasoohi, S., & Ishrat, T. (2018). MCC950, the Selective Inhibitor of Nucleotide Oligomerization Domain-Like Receptor Protein-3 Inflammasome, Protects Mice against Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*, 35(11), 1294-1303. doi:10.1089/neu.2017.5344
- Jang, J. H., Kim, D. H., Lim, J. M., Lee, J. W., Jeong, S. J., Kim, K. P., & Surh, Y. J. (2020). Breast Cancer Cell-Derived Soluble CD44 Promotes Tumor Progression by Triggering Macrophage IL1beta Production. *Cancer Res*, 80(6), 1342-1356. doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-2288

- Janneh, A. H., Kassir, M. F., Atilgan, F. C., Lee, H. G., Sheridan, M., Oleinik, N., Szulc, Z., Voelkel-Johnson, C., Nguyen, H., Li, H., Peterson, Y. K., Marangoni, E., Saatci, O., Sahin, O., Lilly, M., Atkinson, C., Tomlinson, S., Mehrotra, S., & Ogretmen, B. (2022). Crosstalk between pro-survival sphingolipid metabolism and complement signaling induces inflammasome-mediated tumor metastasis. *Cell Rep*, *41*(10), 111742. doi:10.1016/j.celrep.2022.111742
- Kalantari, P., DeOliveira, R. B., Chan, J., Corbett, Y., Rathinam, V., Stutz, A., Latz, E., Gazzinelli, R. T., Golenbock, D. T., & Fitzgerald, K. A. (2014). Dual engagement of the NLRP3 and AIM2 inflammasomes by plasmodium-derived hemozoin and DNA during malaria. *Cell Rep*, *6*(1), 196-210. doi:10.1016/j.celrep.2013.12.014
- Kang, H., Seo, E., Oh, Y. S., & Jun, H. S. (2022). TGF-beta activates NLRP3 inflammasome by an autocrine production of TGF-beta in LX-2 human hepatic stellate cells. *Mol Cell Biochem*, *477*(5), 1329-1338. doi:10.1007/s11010-022-04369-5
- Karki, R., & Kanneganti, T. D. (2019). Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. *Nat Rev Cancer*, *19*(4), 197-214. doi:10.1038/s41568-019-0123-y
- Karki, R., Man, S. M., Malireddi, R. K. S., Gurung, P., Vogel, P., Lamkanfi, M., & Kanneganti, T. D. (2015). Concerted activation of the AIM2 and NLRP3 inflammasomes orchestrates host protection against *Aspergillus* infection. *Cell Host Microbe*, *17*(3), 357-368. doi:10.1016/j.chom.2015.01.006
- Karki, R., Sundaram, B., Sharma, B. R., Lee, S., Malireddi, R. K. S., Nguyen, L. N., Christgen, S., Zheng, M., Wang, Y., Samir, P., Neale, G., Vogel, P., & Kanneganti, T. D. (2021). ADAR1 restricts ZBP1-mediated immune response and PANoptosis to promote tumorigenesis. *Cell Rep*, *37*(3), 109858. doi:10.1016/j.celrep.2021.109858
- Karreman, M. A., Bauer, A. T., Solecki, G., Berghoff, A. S., Mayer, C. D., Frey, K., Hebach, N., Feinauer, M. J., Schieber, N. L., Tehranian, C., Mercier, L., Singhal, M., Venkataramani, V., Schubert, M. C., Hinze, D., Holzel, M., Helfrich, I., Schadendorf, D., Schneider, S. W., Westphal, D., Augustin, H. G., Goetz, J. G., Schwab, Y., Wick, W., & Winkler, F. (2023). Active Remodeling of Capillary Endothelium via Cancer Cell-Derived MMP9 Promotes Metastatic Brain Colonization. *Cancer Res*, *83*(8), 1299-1314. doi:10.1158/0008-5472.CAN-22-3964
- Kenessey, I., Nagy, P., & Polgár, C. (2022). A rosszindulatú daganatok hazai epidemiológiai helyzetét a XXI. század második évtizedében. *Magyar Onkológia*, *66*, 175–184.
- Kennedy, C. R., Goya Grocin, A., Kovacic, T., Singh, R., Ward, J. A., Shenoy, A. R., & Tate, E. W. (2021). A Probe for NLRP3 Inflammasome Inhibitor MCC950 Identifies Carbonic Anhydrase 2 as a Novel Target. *ACS Chem Biol*, *16*(6), 982-990. doi:10.1021/acscchembio.1c00218
- Kienast, Y., von Baumgarten, L., Fuhrmann, M., Klinkert, W. E., Goldbrunner, R., Herms, J., & Winkler, F. (2010). Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med*, *16*(1), 116-122. doi:10.1038/nm.2072
- Kirkwood, K. L., Zhang, L., Thiyagarajan, R., Seldeen, K. L., & Troen, B. R. (2018). Myeloid-Derived Suppressor Cells at the Intersection of Inflammation and Bone Fragility. *Immunol Invest*, *47*(8), 844-854. doi:10.1080/08820139.2018.1552360
- Klein, A., Schwartz, H., Sagi-Assif, O., Meshel, T., Izraely, S., Ben Menachem, S., Bengaiev, R., Ben-Shmuel, A., Nahmias, C., Couraud, P. O., Witz, I. P., & Erez, N. (2015). Astrocytes facilitate melanoma brain metastasis via secretion of IL-23. *J Pathol*, *236*(1), 116-127. doi:10.1002/path.4509
- Knier, N. N., Pellizzari, S., Zhou, J., Foster, P. J., & Parsyan, A. (2022). Preclinical Models of Brain Metastases in Breast Cancer. *Biomedicines*, *10*(3). doi:10.3390/biomedicines10030667

- Kolb, R., Phan, L., Borchering, N., Liu, Y., Yuan, F., Janowski, A. M., Xie, Q., Markan, K. R., Li, W., Potthoff, M. J., Fuentes-Mattei, E., Ellies, L. G., Knudson, C. M., Lee, M. H., Yeung, S. J., Cassel, S. L., Sutterwala, F. S., & Zhang, W. (2016). Obesity-associated NLR4 inflammasome activation drives breast cancer progression. *Nat Commun*, 7, 13007. doi:10.1038/ncomms13007
- Kovács, N., Pikó, P., Juhász, A., Nagy, C., Oroszi, B., Ungvári, Z., & Ádány, R. (2024). Comparative analysis of health status and health service utilization patterns among rural and urban elderly populations in Hungary: a study on the challenges of unhealthy aging. *Geroscience*, 46(2), 2017-2031. doi:10.1007/s11357-023-00926-y
- Kozma, M., Mészáros, Á., Nyúl-Tóth, Á., Molnár, K., Costea, L., Hernádi, Z., Fazakas, C., Farkas, A. E., Wilhelm, I., & Krizbai, I. A. (2021). Cerebral Pericytes and Endothelial Cells Communicate through Inflammasome-Dependent Signals. *Int J Mol Sci*, 22(11). doi:10.3390/ijms22116122
- Krizbai, I. A., Gasparics, A., Nagyoszi, P., Fazakas, C., Molnar, J., Wilhelm, I., Bencs, R., Rosivall, L., & Sebe, A. (2015a). Endothelial-mesenchymal transition of brain endothelial cells: possible role during metastatic extravasation. *PLoS One*, 10(3), e0123845. doi:10.1371/journal.pone.0123845
- Krizbai, I. A., Gasparics, A., Nagyoszi, P., Fazakas, C., Molnár, J., Wilhelm, I., Bencs, R., Rosivall, L., & Sebe, A. (2015b). Endothelial-mesenchymal transition of brain endothelial cells: possible role during metastatic extravasation. *PLoS One*, 10(3), e0119655. doi:10.1371/journal.pone.0119655
- Krizbai, I. A., Nyúl-Tóth, Á., Bauer, H. C., Farkas, A. E., Traweger, A., Haskó, J., Bauer, H., & Wilhelm, I. (2016). Pharmaceutical Targeting of the Brain. *Curr Pharm Des*, 22(35), 5442-5462. doi:10.2174/1381612822666160726144203
- Kumar, M., Kaur, K., & Singh, T. G. (2023). Neuroprotective Effects of Carbonic Anhydrase Inhibition and Cyclic Adenosine Monophosphate Activation in Mouse Model of Transient Global Cerebral Ischemia and Reperfusion. *Neuromolecular Med*, 25(2), 217-229. doi:10.1007/s12017-022-08728-9
- Laliberte, R. E., Perregaux, D. G., Hoth, L. R., Rosner, P. J., Jordan, C. K., Peese, K. M., Egger, J. F., Dombroski, M. A., Geoghegan, K. F., & Gabel, C. A. (2003). Glutathione s-transferase omega 1-1 is a target of cytokine release inhibitory drugs and may be responsible for their effect on interleukin-1beta posttranslational processing. *J Biol Chem*, 278(19), 16567-16578. doi:10.1074/jbc.M211596200
- Lamkanfi, M., Kanneganti, T. D., Van Damme, P., Vanden Berghe, T., Vanoverberghe, I., Vandekerckhove, J., Vandenabeele, P., Gevaert, K., & Nunez, G. (2008). Targeted peptide-centric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes. *Mol Cell Proteomics*, 7(12), 2350-2363. doi:10.1074/mcp.M800132-MCP200
- Lamkanfi, M., Vande Walle, L., & Kanneganti, T. D. (2011). Deregulated inflammasome signaling in disease. *Immunol Rev*, 243(1), 163-173. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01042.x
- Land, W. G. (2021). Role of DAMPs in respiratory virus-induced acute respiratory distress syndrome-with a preliminary reference to SARS-CoV-2 pneumonia. *Genes Immun*, 22(3), 141-160. doi:10.1038/s41435-021-00140-w
- Latz, E., & Duweil, P. (2018). NLRP3 inflammasome activation in inflammaging. *Semin Immunol*, 40, 61-73. doi:10.1016/j.smim.2018.09.001
- Lee, S., Toft, N. J., Axelsen, T. V., Espejo, M. S., Pedersen, T. M., Mele, M., Pedersen, H. L., Balling, E., Johansen, T., Burton, M., Thomassen, M., Vahl, P., Christiansen, P., & Boedtkjer, E. (2023). Carbonic anhydrases reduce the acidity of the tumor microenvironment, promote immune infiltration, decelerate tumor growth, and

- improve survival in ErbB2/HER2-enriched breast cancer. *Breast Cancer Res*, 25(1), 46. doi:10.1186/s13058-023-01644-1
- Lénárt, N., Brough, D., & Dénes, Á. (2016). Inflammasomes link vascular disease with neuroinflammation and brain disorders. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36(10), 1668-1685. doi:10.1177/0271678X16662043
- Li, D., & Wu, M. (2021). Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*, 6(1), 291. doi:10.1038/s41392-021-00687-0
- Li, Y., Hodge, J., Liu, Q., Wang, J., Wang, Y., Evans, T. D., Altomare, D., Yao, Y., Murphy, E. A., Razani, B., & Fan, D. (2020). TFEB is a master regulator of tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Immunother Cancer*, 8(1). doi:10.1136/jitc-2020-000543
- Li, Y., Slavik, K. M., Toyoda, H. C., Morehouse, B. R., de Oliveira Mann, C. C., Elek, A., Levy, S., Wang, Z., Mears, K. S., Liu, J., Kashin, D., Guo, X., Mass, T., Sebé-Pedrós, A., Schwede, F., & Kranzusch, P. J. (2023). cGLRs are a diverse family of pattern recognition receptors in innate immunity. *Cell*, 186(15), 3261-3276 e3220. doi:10.1016/j.cell.2023.05.038
- Lim, J., Kim, M. J., Park, Y., Ahn, J. W., Hwang, S. J., Moon, J. S., Cho, K. G., & Kwack, K. (2019). Upregulation of the NLRC4 inflammasome contributes to poor prognosis in glioma patients. *Sci Rep*, 9(1), 7895. doi:10.1038/s41598-019-44261-9
- Lin, T. Y., Tsai, M. C., Tu, W., Yeh, H. C., Wang, S. C., Huang, S. P., & Li, C. Y. (2020). Role of the NLRP3 Inflammasome: Insights Into Cancer Hallmarks. *Front Immunol*, 11, 610492. doi:10.3389/fimmu.2020.610492
- Liu, H., Sun, Y., Zhang, Q., Jin, W., Gordon, R. E., Zhang, Y., Wang, J., Sun, C., Wang, Z. J., Qi, X., Zhang, J., Huang, B., Gui, Q., Yuan, H., Chen, L., Ma, X., Fang, C., Liu, Y. Q., Yu, X., & Feng, S. (2021). Pro-inflammatory and proliferative microglia drive progression of glioblastoma. *Cell Rep*, 36(11), 109718. doi:10.1016/j.celrep.2021.109718
- Liu, X., Németh, D. P., McKim, D. B., Zhu, L., DiSabato, D. J., Berdysz, O., Gorantla, G., Oliver, B., Witcher, K. G., Wang, Y., Negray, C. E., Vegesna, R. S., Sheridan, J. F., Godbout, J. P., Robson, M. J., Blakely, R. D., Popovich, P. G., Bilbo, S. D., & Quan, N. (2019). Cell-Type-Specific Interleukin 1 Receptor 1 Signaling in the Brain Regulates Distinct Neuroimmune Activities. *Immunity*, 50(2), 317-333 e316. doi:10.1016/j.immuni.2018.12.012
- Liu, Y., Wu, W., Cai, C., Zhang, H., Shen, H., & Han, Y. (2023). Patient-derived xenograft models in cancer therapy: technologies and applications. *Signal Transduct Target Ther*, 8(1), 160. doi:10.1038/s41392-023-01419-2
- Livshits, G., & Kalinkovich, A. (2019). Inflammaging as a common ground for the development and maintenance of sarcopenia, obesity, cardiomyopathy and dysbiosis. *Ageing Res Rev*, 56, 100980. doi:10.1016/j.arr.2019.100980
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243-278. doi:10.1016/j.cell.2022.11.001
- López-Teros, M., Alarcón-Aguilar, A., López-Diazguerrero, N. E., Luna-López, A., & Königsberg, M. (2022). Contribution of senescent and reactive astrocytes on central nervous system inflammaging. *Biogerontology*, 23(1), 21-33. doi:10.1007/s10522-022-09952-3
- Lorger, M., & Felding-Habermann, B. (2010). Capturing changes in the brain microenvironment during initial steps of breast cancer brain metastasis. *Am J Pathol*, 176(6), 2958-2971. doi:10.2353/ajpath.2010.090838

- Lv, Y., Ma, X., Du, Y., & Feng, J. (2021). Understanding Patterns of Brain Metastasis in Triple-Negative Breast Cancer and Exploring Potential Therapeutic Targets. *Oncotargets Ther*, *14*, 589-607. doi:10.2147/OTT.S293685
- Ma, W., Oliveira-Nunes, M. C., Xu, K., Kossenkov, A., Reiner, B. C., Crist, R. C., Hayden, J., & Chen, Q. (2023). Type I interferon response in astrocytes promotes brain metastasis by enhancing monocytic myeloid cell recruitment. *Nat Commun*, *14*(1), 2632. doi:10.1038/s41467-023-38252-8
- Ma, Y. Y., Zhang, G. H., Li, J., Wang, S. B., Hu, Z. M., Zhang, C. W., & Li, E. (2018). The correlation of NLRC3 expression with the progression and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol*, *82*, 273-281. doi:10.1016/j.humpath.2018.07.031
- Machinami, R. (1973). A study of the invasive growth of malignant tumors. II. Ultrastructural features of the metastatic growth of Yoshida ascites hepatoma 7974 in the rat brain. *Acta Pathol Jpn*, *23*(2), 261-278. doi:10.1111/j.1440-1827.1973.tb00791.x
- Man, S. M., Hopkins, L. J., Nugent, E., Cox, S., Gluck, I. M., Tourlomousis, P., Wright, J. A., Cicuta, P., Monie, T. P., & Bryant, C. E. (2014). Inflammasome activation causes dual recruitment of NLRC4 and NLRP3 to the same macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(20), 7403-7408. doi:10.1073/pnas.1402911111
- Marín-Aguilar, F., Ruiz-Cabello, J., & Cordero, M. D. (2018). Aging and the Inflammasomes. *Exp Suppl*, *108*, 303-320. doi:10.1007/978-3-319-89390-7_13
- Martin-Medina, A., Ceron-Pisa, N., Martinez-Font, E., Shafiek, H., Obrador-Hevia, A., Sauleda, J., & Iglesias, A. (2022). TLR/WNT: A Novel Relationship in Immunomodulation of Lung Cancer. *Int J Mol Sci*, *23*(12). doi:10.3390/ijms23126539
- Martin-Sanchez, F., Martinez-Garcia, J. J., Munoz-Garcia, M., Martinez-Villanueva, M., Noguera-Velasco, J. A., Andreu, D., Rivas, L., & Pelegrin, P. (2017). Lytic cell death induced by melittin bypasses pyroptosis but induces NLRP3 inflammasome activation and IL-1beta release. *Cell Death Dis*, *8*(8), e2984. doi:10.1038/cddis.2017.390
- Martinon, F., Mayor, A., & Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*, *27*, 229-265. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132715
- Maruta, N., Burdett, H., Lim, B. Y. J., Hu, X., Desa, S., Manik, M. K., & Kobe, B. (2022). Structural basis of NLR activation and innate immune signalling in plants. *Immunogenetics*, *74*(1), 5-26. doi:10.1007/s00251-021-01242-5
- Mészáros, Á., Molnár, K., Fazakas, C., Nógrádi, B., Lüvi, A., Dudás, T., Tiszlavicz, L., Farkas, A. E., Krizbai, I. A., & Wilhelm, I. (2023). Inflammasome activation in peritumoral astrocytes is a key player in breast cancer brain metastasis development. *Acta Neuropathol Commun*, *11*(1), 155. doi:10.1186/s40478-023-01646-2
- Mészáros, Á., Molnár, K., Nógrádi, B., Hernádi, Z., Nyúl-Tóth, Á., Wilhelm, I., & Krizbai, I. A. (2020). Neurovascular Inflammation in Health and Disease. *Cells*, *9*(7). doi:10.3390/cells9071614
- Miarka, L., & Valiente, M. (2021). Animal models of brain metastasis. *Neurooncol Adv*, *3*(Suppl 5), v144-v156. doi:10.1093/noonadv/vdab115
- Minciullo, P. L., Catalano, A., Mandraffino, G., Casciaro, M., Crucitti, A., Maltese, G., Morabito, N., Lasco, A., Gangemi, S., & Basile, G. (2016). Inflammation and Anti-Inflammation: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, *64*(2), 111-126. doi:10.1007/s00005-015-0377-3
- Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., Viale, A., Olshen, A. B., Gerald, W. L., & Massague, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, *436*(7050), 518-524. doi:10.1038/nature03799
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*, *22*(2), 240-273, Table of Contents. doi:10.1128/CMR.00046-08

- Mogilenko, D. A., Shchukina, I., & Artyomov, M. N. (2022). Immune ageing at single-cell resolution. *Nat Rev Immunol*, 22(8), 484-498. doi:10.1038/s41577-021-00646-4
- Molnár, K., Mészáros, Á., Fazakas, C., Kozma, M., Györi, F., Reisz, Z., Tizslavicz, L., Farkas, A. E., Nyúl-Tóth, Á., Haskó, J., Krizbai, I. A., & Wilhelm, I. (2020). Pericyte-secreted IGF2 promotes breast cancer brain metastasis formation. *Mol Oncol*, 14(9), 2040-2057. doi:10.1002/1878-0261.12752
- Molnár, K., Nógrádi, B., Kristóf, R., Mészáros, Á., Pajer, K., Siklós, L., Nógrádi, A., Wilhelm, I., & Krizbai, I. A. (2022). Motoneuronal inflammasome activation triggers excessive neuroinflammation and impedes regeneration after sciatic nerve injury. *J Neuroinflammation*, 19(1), 68. doi:10.1186/s12974-022-02427-9
- Moossavi, M., Parsamanesh, N., Bahrami, A., Atkin, S. L., & Sahebkar, A. (2018). Role of the NLRP3 inflammasome in cancer. *Mol Cancer*, 17(1), 158. doi:10.1186/s12943-018-0900-3
- Motallebnejad, P., Rajesh, V. V., & Azarin, S. M. (2022). Evaluating the Role of IL-1beta in Transmigration of Triple Negative Breast Cancer Cells Across the Brain Endothelium. *Cell Mol Bioeng*, 15(1), 99-114. doi:10.1007/s12195-021-00710-y
- Mullard, A. (2019). NLRP3 inhibitors stoke anti-inflammatory ambitions. *Nat Rev Drug Discov*, 18(6), 405-407. doi:10.1038/d41573-019-00086-9
- Naeem, A., Prakash, R., Kumari, N., Ali Khan, M., Quaiyoom Khan, A., Uddin, S., Verma, S., Ab Robertson, A., Boltze, J., & Shadab Raza, S. (2024). MCC950 reduces autophagy and improves cognitive function by inhibiting NLRP3-dependent neuroinflammation in a rat model of Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun*, 116, 70-84. doi:10.1016/j.bbi.2023.11.031
- Nagar, A., Rahman, T., & Harton, J. A. (2021). The ASC Speck and NLRP3 Inflammasome Function Are Spatially and Temporally Distinct. *Front Immunol*, 12, 752482. doi:10.3389/fimmu.2021.752482
- Netea, M. G., Nold-Petry, C. A., Nold, M. F., Joosten, L. A., Opitz, B., van der Meer, J. H., van de Veerdonk, F. L., Ferwerda, G., Heinhuis, B., Devesa, I., Funk, C. J., Mason, R. J., Kullberg, B. J., Rubartelli, A., van der Meer, J. W., & Dinarello, C. A. (2009). Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood*, 113(10), 2324-2335. doi:10.1182/blood-2008-03-146720
- Netea, M. G., van de Veerdonk, F. L., van der Meer, J. W., Dinarello, C. A., & Joosten, L. A. (2015). Inflammasome-independent regulation of IL-1-family cytokines. *Annu Rev Immunol*, 33, 49-77. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112306
- OECD. (2022). *Health at a Glance: Europe 2022: State of Health in the EU Cycle*: OECD Publishing, Paris.
- Oh, S., Lee, J., Oh, J., Yu, G., Ryu, H., Kim, D., & Lee, S. (2023). Integrated NLRP3, AIM2, NLRC4, Pyrin inflammasome activation and assembly drive PANoptosis. *Cell Mol Immunol*, 20(12), 1513-1526. doi:10.1038/s41423-023-01107-9
- Ohashi, K., Wang, Z., Yang, Y. M., Billet, S., Tu, W., Pimienta, M., Cassel, S. L., Pandol, S. J., Lu, S. C., Sutterwala, F. S., Bhowmick, N., & Seki, E. (2019). NOD-like receptor C4 Inflammasome Regulates the Growth of Colon Cancer Liver Metastasis in NAFLD. *Hepatology*, 70(5), 1582-1599. doi:10.1002/hep.30693
- Okamoto, M., Liu, W., Luo, Y., Tanaka, A., Cai, X., Norris, D. A., Dinarello, C. A., & Fujita, M. (2010). Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1beta. *J Biol Chem*, 285(9), 6477-6488. doi:10.1074/jbc.M109.064907

- Paik, S., Kim, J. K., Silwal, P., Sasakawa, C., & Jo, E. K. (2021). An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol*, *18*(5), 1141-1160. doi:10.1038/s41423-021-00670-3
- Paku, S., Döme, B., Tóth, R., & Timár, J. (2000). Organ-specificity of the extravasation process: an ultrastructural study. *Clin Exp Metastasis*, *18*(6), 481-492. doi:10.1023/a:1011858925376
- Pinteaux, E., Parker, L. C., Rothwell, N. J., & Luheshi, G. N. (2002). Expression of interleukin-1 receptors and their role in interleukin-1 actions in murine microglial cells. *J Neurochem*, *83*(4), 754-763. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.01184.x
- Prattichizzo, F., Giuliani, A., Recchioni, R., Bonafe, M., Marcheselli, F., De Carolis, S., Campanati, A., Giuliadori, K., Rippo, M. R., Bruge, F., Tiano, L., Micucci, C., Ceriello, A., Offidani, A., Procopio, A. D., & Olivieri, F. (2016). Anti-TNF-alpha treatment modulates SASP and SASP-related microRNAs in endothelial cells and in circulating angiogenic cells. *Oncotarget*, *7*(11), 11945-11958. doi:10.18632/oncotarget.7858
- Priego, N., & Valiente, M. (2019). The Potential of Astrocytes as Immune Modulators in Brain Tumors. *Front Immunol*, *10*, 1314. doi:10.3389/fimmu.2019.01314
- Próchnicki, T., Vasconcelos, M. B., Robinson, K. S., Mangan, M. S. J., De Graaf, D., Shkarina, K., Lovotti, M., Standke, L., Kaiser, R., Stahl, R., Duthie, F. G., Rothe, M., Antonova, K., Jenster, L. M., Lau, Z. H., Rösing, S., Mirza, N., Gottschild, C., Wachten, D., Günther, C., Kufer, T. A., Schmidt, F. I., Zhong, F. L., & Latz, E. (2023). Mitochondrial damage activates the NLRP10 inflammasome. *Nat Immunol*, *24*(4), 595-603. doi:10.1038/s41590-023-01451-y
- Pulaski, B. A., & Ostrand-Rosenberg, S. (2001). Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 20, Unit 20 22. doi:10.1002/0471142735.im2002s39
- Rahrman, E. P., Shorthouse, D., Jassim, A., Hu, L. P., Ortiz, M., Mahler-Araujo, B., Vogel, P., Paez-Ribes, M., Fatemi, A., Hannon, G. J., Iyer, R., Blundon, J. A., Lourenco, F. C., Kay, J., Nazarian, R. M., Hall, B. A., Zakharenko, S. S., Winton, D. J., Zhu, L., & Gilbertson, R. J. (2022). The NALCN channel regulates metastasis and nonmalignant cell dissemination. *Nat Genet*, *54*(12), 1827-1838. doi:10.1038/s41588-022-01182-0
- Rébé, C., & Ghiringhelli, F. (2020). Interleukin-1beta and Cancer. *Cancers (Basel)*, *12*(7). doi:10.3390/cancers12071791
- Roh, J. S., & Sohn, D. H. (2018). Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw*, *18*(4), e27. doi:10.4110/in.2018.18.e27
- Rojas, L. K., Trilla-Fuertes, L., Gamez-Pozo, A., Chiva, C., Sepulveda, J., Manso, L., Prado-Vazquez, G., Zapater-Moros, A., Lopez-Vacas, R., Ferrer-Gomez, M., Mendiola, C., Espinosa, E., Sabido, E., Ciruelos, E., & Vara, J. A. F. (2019). Proteomics characterisation of central nervous system metastasis biomarkers in triple negative breast cancer. *Ecancermedicalscience*, *13*, 891. doi:10.3332/ecancer.2019.891
- Rolim, G. B., Dantas Lima, A. J. P., Dos Santos Cardoso, V. I., de Fatima Machado Soares, E., Nunes, D. N., Barros, H. C. S., Leite, A. B., Alexandre-Moreira, M. S., Duarte, A. W. F., de Sales Marques, C., de Carvalho Fraga, C. A., & de Queiroz, A. C. (2022). Can inflammasomes promote the pathophysiology of glioblastoma multiforme? A view about the potential of the anti-inflammasome therapy as pharmacological target. *Crit Rev Oncol Hematol*, *172*, 103641. doi:10.1016/j.critrevonc.2022.103641
- Ross, C., Chan, A. H., von Pein, J. B., Maddugoda, M. P., Boucher, D., & Schroder, K. (2022). Inflammatory Caspases: Toward a Unified Model for Caspase Activation by Inflammasomes. *Annu Rev Immunol*, *40*, 249-269. doi:10.1146/annurev-immunol-101220-030653

- Santoro, A., Zhao, J., Wu, L., Carru, C., Biagi, E., & Franceschi, C. (2020). Microbiomes other than the gut: inflammaging and age-related diseases. *Semin Immunopathol*, *42*(5), 589-605. doi:10.1007/s00281-020-00814-z
- Saxena, M., & Yeretssian, G. (2014). NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer. *Front Immunol*, *5*, 327. doi:10.3389/fimmu.2014.00327
- Schroeder, T., Bittrich, P., Kuhne, J. F., Noebel, C., Leischner, H., Fiehler, J., Schroeder, J., Schoen, G., & Gellissen, S. (2020). Mapping distribution of brain metastases: does the primary tumor matter? *J Neurooncol*, *147*(1), 229-235. doi:10.1007/s11060-020-03419-6
- Schulz, M., Michels, B., Niesel, K., Stein, S., Farin, H., Rodel, F., & Sevenich, L. (2020). Cellular and Molecular Changes of Brain Metastases-Associated Myeloid Cells during Disease Progression and Therapeutic Response. *iScience*, *23*(6), 101178. doi:10.1016/j.isci.2020.101178
- Schulz, M., & Sevenich, L. (2021). TAMs in Brain Metastasis: Molecular Signatures in Mouse and Man. *Front Immunol*, *12*, 716504. doi:10.3389/fimmu.2021.716504
- Schwartz, H., Blacher, E., Amer, M., Livneh, N., Abramovitz, L., Klein, A., Ben-Shushan, D., Soffer, S., Blazquez, R., Barrantes-Freer, A., Muller, M., Muller-Decker, K., Stein, R., Tsarfaty, G., Satchi-Fainaro, R., Umansky, V., Pukrop, T., & Erez, N. (2016). Incipient Melanoma Brain Metastases Instigate Astrogliosis and Neuroinflammation. *Cancer Res*, *76*(15), 4359-4371. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0485
- Seaman, J. E., Julien, O., Lee, P. S., Rettenmaier, T. J., Thomsen, N. D., & Wells, J. A. (2016). Caspases: caspases can cleave after aspartate, glutamate and phosphoserine residues. *Cell Death Differ*, *23*(10), 1717-1726. doi:10.1038/cdd.2016.62
- Seike, T., Fujita, K., Yamakawa, Y., Kido, M. A., Takiguchi, S., Teramoto, N., Iguchi, H., & Noda, M. (2011). Interaction between lung cancer cells and astrocytes via specific inflammatory cytokines in the microenvironment of brain metastasis. *Clin Exp Metastasis*, *28*(1), 13-25. doi:10.1007/s10585-010-9354-8
- Seok, J. K., Kang, H. C., Cho, Y. Y., Lee, H. S., & Lee, J. Y. (2020). Regulation of the NLRP3 Inflammasome by Post-Translational Modifications and Small Molecules. *Front Immunol*, *11*, 618231. doi:10.3389/fimmu.2020.618231
- Sereno, M., Haskó, J., Molnár, K., Medina, S. J., Reisz, Z., Malhó, R., Videira, M., Tiszlavicz, L., Booth, S. A., Wilhelm, I., Krizbai, I. A., & Brito, M. A. (2020). Downregulation of circulating miR 802-5p and miR 194-5p and upregulation of brain MEF2C along breast cancer brain metastasization. *Mol Oncol*, *14*(3), 520-538. doi:10.1002/1878-0261.12632
- Shadab, A., Mahjoor, M., Abbasi-Kolli, M., Afkhami, H., Moeinian, P., & Safdarian, A. R. (2023). Divergent functions of NLRP3 inflammasomes in cancer: a review. *Cell Commun Signal*, *21*(1), 232. doi:10.1186/s12964-023-01235-9
- Sharma, B. R., & Kanneganti, T. D. (2021). NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. *Nat Immunol*, *22*(5), 550-559. doi:10.1038/s41590-021-00886-5
- Sochocka, M., Diniz, B. S., & Leszek, J. (2017). Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol*, *54*(10), 8071-8089. doi:10.1007/s12035-016-0297-1
- Stein, G. S., & Luebbers, K. P. (2019). *Cancer: Prevention, Early Detection, Treatment and Recovery* (2nd ed.): Wiley-Blackwell.
- Strilic, B., & Offermanns, S. (2017). Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. *Cancer Cell*, *32*(3), 282-293. doi:10.1016/j.ccell.2017.07.001
- Stutz, A., Horváth, G. L., Monks, B. G., & Latz, E. (2013). ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. *Methods Mol Biol*, *1040*, 91-101. doi:10.1007/978-1-62703-523-1_8

- Supino, D., Minute, L., Mariancini, A., Riva, F., Magrini, E., & Garlanda, C. (2022). Negative Regulation of the IL-1 System by IL-1R2 and IL-1R8: Relevance in Pathophysiology and Disease. *Front Immunol*, *13*, 804641. doi:10.3389/fimmu.2022.804641
- Swanson, K. V., Deng, M., & Ting, J. P. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*, *19*(8), 477-489. doi:10.1038/s41577-019-0165-0
- Tarassishin, L., Casper, D., & Lee, S. C. (2014). Aberrant expression of interleukin-1beta and inflammasome activation in human malignant gliomas. *PLoS One*, *9*(7), e103432. doi:10.1371/journal.pone.0103432
- Tengesdal, I. W., Li, S., Powers, N. E., May, M., Neff, C. P., Joosten, L. A. B., Marchetti, C., & Dinarello, C. A. (2022). Activation of Host-NLRP3 Inflammasome in Myeloid Cells Dictates Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Breast Cancers. *Pharmaceuticals (Basel)*, *15*(5). doi:10.3390/ph15050574
- Tengesdal, I. W., Menon, D. R., Osborne, D. G., Neff, C. P., Powers, N. E., Gamboni, F., Mauro, A. G., D'Alessandro, A., Stefanoni, D., Henen, M. A., Mills, T. S., De Graaf, D. M., Azam, T., Vogeli, B., Palmer, B. E., Pietras, E. M., DeGregori, J., Tan, A. C., Joosten, L. A. B., Fujita, M., Dinarello, C. A., & Marchetti, C. (2021). Targeting tumor-derived NLRP3 reduces melanoma progression by limiting MDSCs expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *118*(10). doi:10.1073/pnas.2000915118
- Valiente, M., Obenauf, A. C., Jin, X., Chen, Q., Zhang, X. H., Lee, D. J., Chافت, J. E., Kris, M. G., Huse, J. T., Brogi, E., & Massague, J. (2014). Serpins promote cancer cell survival and vascular co-option in brain metastasis. *Cell*, *156*(5), 1002-1016. doi:10.1016/j.cell.2014.01.040
- Vande Walle, L., Stowe, I. B., Sacha, P., Lee, B. L., Demon, D., Fossoul, A., Van Hauwermeiren, F., Saavedra, P. H. V., Simon, P., Subrt, V., Kostka, L., Stivala, C. E., Pham, V. C., Staben, S. T., Yamazoe, S., Konvalinka, J., Kayagaki, N., & Lamkanfi, M. (2019). MCC950/CRID3 potently targets the NACHT domain of wild-type NLRP3 but not disease-associated mutants for inflammasome inhibition. *PLoS Biol*, *17*(9), e3000354. doi:10.1371/journal.pbio.3000354
- Vandenhoute, E., Stump-Guthier, C., Lasierra Losada, M., Tenenbaum, T., Rudolph, H., Ishikawa, H., Schwerk, C., Schrotten, H., Durken, M., Marz, M., & Karremann, M. (2015). The choroid plexus may be an underestimated site of tumor invasion to the brain: an in vitro study using neuroblastoma cell lines. *Cancer Cell Int*, *15*, 102. doi:10.1186/s12935-015-0257-2
- Vanlandewijck, M., He, L., Mae, M. A., Andrae, J., Ando, K., Del Gaudio, F., Nahar, K., Lebouvier, T., Lavina, B., Gouveia, L., Sun, Y., Raschperger, E., Rasanen, M., Zarb, Y., Mochizuki, N., Keller, A., Lendahl, U., & Betsholtz, C. (2018). A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature*, *554*(7693), 475-480. doi:10.1038/nature25739
- Vasto, S., Candore, G., Balistreri, C. R., Caruso, M., Colonna-Romano, G., Grimaldi, M. P., Listi, F., Nuzzo, D., Lio, D., & Caruso, C. (2007). Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev*, *128*(1), 83-91. doi:10.1016/j.mad.2006.11.015
- Vogelbaum, M. A., Brown, P. D., Messersmith, H., Brastianos, P. K., Burri, S., Cahill, D., Dunn, I. F., Gaspar, L. E., Gatson, N. T. N., Gondi, V., Jordan, J. T., Lassman, A. B., Maues, J., Mohile, N., Redjal, N., Stevens, G., Sulman, E., van den Bent, M., Wallace, H. J., Weinberg, J. S., Zadeh, G., & Schiff, D. (2022). Treatment for Brain Metastases: ASCO-SNO-ASTRO Guideline. *J Clin Oncol*, *40*(5), 492-516. doi:10.1200/JCO.21.02314

- von Bartheld, C. S., Bahney, J., & Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol*, 524(18), 3865-3895. doi:10.1002/cne.24040
- Walker, K. A., Basisty, N., Wilson, D. M., 3rd, & Ferrucci, L. (2022). Connecting aging biology and inflammation in the omics era. *J Clin Invest*, 132(14). doi:10.1172/JCI158448
- Wang, L., Cossette, S. M., Rarick, K. R., Gershan, J., Dwinell, M. B., Harder, D. R., & Ramchandran, R. (2013). Astrocytes directly influence tumor cell invasion and metastasis in vivo. *PLoS One*, 8(12), e80933. doi:10.1371/journal.pone.0080933
- Wang, L., Fu, H., Nanayakkara, G., Li, Y., Shao, Y., Johnson, C., Cheng, J., Yang, W. Y., Yang, F., Lavalley, M., Xu, Y., Cheng, X., Xi, H., Yi, J., Yu, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. (2016). Novel extracellular and nuclear caspase-1 and inflammasomes propagate inflammation and regulate gene expression: a comprehensive database mining study. *J Hematol Oncol*, 9(1), 122. doi:10.1186/s13045-016-0351-5
- Wang, Y., Zhang, H., Xu, Y., Peng, T., Meng, X., & Zou, F. (2021). NLRP3 induces the autocrine secretion of IL-1beta to promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 560, 72-79. doi:10.1016/j.bbrc.2021.04.122
- Ward, R., Li, W., Abdul, Y., Jackson, L., Dong, G., Jamil, S., Filosa, J., Fagan, S. C., & Ergul, A. (2019). NLRP3 inflammasome inhibition with MCC950 improves diabetes-mediated cognitive impairment and vasoneuronal remodeling after ischemia. *Pharmacol Res*, 142, 237-250. doi:10.1016/j.phrs.2019.01.035
- Weichand, B., Popp, R., Dziumbila, S., Mora, J., Strack, E., Elwakeel, E., Frank, A. C., Scholich, K., Pierre, S., Syed, S. N., Olesch, C., Ringleb, J., Oren, B., Doring, C., Savai, R., Jung, M., von Knethen, A., Levkau, B., Fleming, I., Weigert, A., & Brune, B. (2017). S1PR1 on tumor-associated macrophages promotes lymphangiogenesis and metastasis via NLRP3/IL-1beta. *J Exp Med*, 214(9), 2695-2713. doi:10.1084/jem.20160392
- Weir, A., & Vince, J. E. (2022). No longer married to inflammasome signaling: the diverse interacting pathways leading to pyroptotic cell death. *Biochem J*, 479(10), 1083-1102. doi:10.1042/BCJ20210711
- Wellenstein, M. D., Coffelt, S. B., Duits, D. E. M., van Miltenburg, M. H., Slagter, M., de Rink, I., Henneman, L., Kas, S. M., Prekovic, S., Hau, C. S., Vrijland, K., Drenth, A. P., de Korte-Grimmerink, R., Schut, E., van der Heijden, I., Zwart, W., Wessels, L. F. A., Schumacher, T. N., Jonkers, J., & de Visser, K. E. (2019). Loss of p53 triggers WNT-dependent systemic inflammation to drive breast cancer metastasis. *Nature*, 572(7770), 538-542. doi:10.1038/s41586-019-1450-6
- WHO. (2023). *World health statistics 2023: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals*. Geneva: World Health Organization.
- Wilhelm, I., Fazakas, C., Molnár, K., Végh, A. G., Haskó, J., & Krizbai, I. A. (2018). Foe or friend? Janus-faces of the neurovascular unit in the formation of brain metastases. *J Cereb Blood Flow Metab*, 38(4), 563-587. doi:10.1177/0271678X17732025
- Wilhelm, I., Molnár, J., Fazakas, C., Haskó, J., & Krizbai, I. A. (2013). Role of the blood-brain barrier in the formation of brain metastases. *Int J Mol Sci*, 14(1), 1383-1411. doi:10.3390/ijms14011383
- Wilhelm, I., Nyúl-Tóth, Á., Kozma, M., Farkas, A. E., & Krizbai, I. A. (2017). Role of pattern recognition receptors of the neurovascular unit in inflamm-aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 313(5), H1000-H1012. doi:10.1152/ajpheart.00106.2017
- Wu, K., Fukuda, K., Xing, F., Zhang, Y., Sharma, S., Liu, Y., Chan, M. D., Zhou, X., Qasem, S. A., Pochampally, R., Mo, Y. Y., & Watabe, K. (2015). Roles of the cyclooxygenase

- 2 matrix metalloproteinase 1 pathway in brain metastasis of breast cancer. *J Biol Chem*, 290(15), 9842-9854. doi:10.1074/jbc.M114.602185
- Wu, T. C., Xu, K., Martinek, J., Young, R. R., Banchereau, R., George, J., Turner, J., Kim, K. I., Zurawski, S., Wang, X., Blankenship, D., Brookes, H. M., Marches, F., Obermoser, G., Lavecchio, E., Levin, M. K., Bae, S., Chung, C. H., Smith, J. L., Cepika, A. M., Oxley, K. L., Snipes, G. J., Banchereau, J., Pascual, V., O'Shaughnessy, J., & Palucka, A. K. (2018). IL1 Receptor Antagonist Controls Transcriptional Signature of Inflammation in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res*, 78(18), 5243-5258. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0413
- Xing, F., Kobayashi, A., Okuda, H., Watabe, M., Pai, S. K., Pandey, P. R., Hirota, S., Wilber, A., Mo, Y. Y., Moore, B. E., Liu, W., Fukuda, K., Iizumi, M., Sharma, S., Liu, Y., Wu, K., Peralta, E., & Watabe, K. (2013). Reactive astrocytes promote the metastatic growth of breast cancer stem-like cells by activating Notch signalling in brain. *EMBO Mol Med*, 5(3), 384-396. doi:10.1002/emmm.201201623
- Xing, F., Liu, Y., Sharma, S., Wu, K., Chan, M. D., Lo, H. W., Carpenter, R. L., Metheny-Barlow, L. J., Zhou, X., Qasem, S. A., Pasche, B., & Watabe, K. (2016). Activation of the c-Met Pathway Mobilizes an Inflammatory Network in the Brain Microenvironment to Promote Brain Metastasis of Breast Cancer. *Cancer Res*, 76(17), 4970-4980. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-3541
- Xu, S., Li, X., Liu, Y., Xia, Y., Chang, R., & Zhang, C. (2019). Inflammasome inhibitors: promising therapeutic approaches against cancer. *J Hematol Oncol*, 12(1), 64. doi:10.1186/s13045-019-0755-0
- Yao, Z., van Velthoven, C. T. J., Kunst, M., Zhang, M., McMillen, D., Lee, C., Jung, W., Goldy, J., Abdelhak, A., Aitken, M., Baker, K., Baker, P., Barkan, E., Bertagnolli, D., Bhandiwad, A., Bielstein, C., Bishwakarma, P., Campos, J., Carey, D., Casper, T., Chakka, A. B., Chakrabarty, R., Chavan, S., Chen, M., Clark, M., Close, J., Crichton, K., Daniel, S., DiValentin, P., Dolbeare, T., Ellingwood, L., Fiabane, E., Fliss, T., Gee, J., Gerstenberger, J., Glandon, A., Gloe, J., Gould, J., Gray, J., Guilford, N., Guzman, J., Hirschstein, D., Ho, W., Hooper, M., Huang, M., Hupp, M., Jin, K., Kroll, M., Lathia, K., Leon, A., Li, S., Long, B., Madigan, Z., Malloy, J., Malone, J., Maltzer, Z., Martin, N., McCue, R., McGinty, R., Mei, N., Melchor, J., Meyerdierks, E., Mollenkopf, T., Moonsman, S., Nguyen, T. N., Otto, S., Pham, T., Rimorin, C., Ruiz, A., Sanchez, R., Sawyer, L., Shapovalova, N., Shepard, N., Slaughterbeck, C., Sulc, J., Tieu, M., Torkelson, A., Tung, H., Valera Cuevas, N., Vance, S., Wadhvani, K., Ward, K., Levi, B., Farrell, C., Young, R., Staats, B., Wang, M. M., Thompson, C. L., Mufti, S., Pagan, C. M., Kruse, L., Dee, N., Sunkin, S. M., Esposito, L., Hawrylycz, M. J., Waters, J., Ng, L., Smith, K., Tasic, B., Zhuang, X., & Zeng, H. (2023). A high-resolution transcriptomic and spatial atlas of cell types in the whole mouse brain. *Nature*, 624(7991), 317-332. doi:10.1038/s41586-023-06812-z
- Yu, X., Chen, X., Tang, X., Cao, Y., Tang, L., He, T., & Liu, Y. (2020). P2X7 blockade inhibits the growth of breast cancer in 4T1 breast cancer-bearing mice by NLRP3/caspase 1 pathway. *Arch Med Sci*. doi:10.5114/aoms.2020.99013
- Zhai, Z., Liu, W., Kaur, M., Luo, Y., Domenico, J., Samson, J. M., Shellman, Y. G., Norris, D. A., Dinarello, C. A., Spritz, R. A., & Fujita, M. (2017). NLRP1 promotes tumor growth by enhancing inflammasome activation and suppressing apoptosis in metastatic melanoma. *Oncogene*, 36(27), 3820-3830. doi:10.1038/onc.2017.26
- Zhang, C., Lowery, F. J., & Yu, D. (2017). Intracarotid Cancer Cell Injection to Produce Mouse Models of Brain Metastasis. *J Vis Exp*(120). doi:10.3791/55085
- Zhang, L., Zhang, S., Yao, J., Lowery, F. J., Zhang, Q., Huang, W. C., Li, P., Li, M., Wang, X., Zhang, C., Wang, H., Ellis, K., Cheerathodi, M., McCarty, J. H., Palmieri, D.,

- Saunus, J., Lakhani, S., Huang, S., Sahin, A. A., Aldape, K. D., Steeg, P. S., & Yu, D. (2015). Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. *Nature*, *527*(7576), 100-104. doi:10.1038/nature15376
- Zhang, X., Wang, R., Hu, D., Sun, X., Fujioka, H., Lundberg, K., Chan, E. R., Wang, Q., Xu, R., Flanagan, M. E., Pieper, A. A., & Qi, X. (2020). Oligodendroglial glycolytic stress triggers inflammasome activation and neuropathology in Alzheimer's disease. *Sci Adv*, *6*(49). doi:10.1126/sciadv.abb8680
- Zhang, Z., Li, X., Wang, Y., Wei, Y., & Wei, X. (2023). Involvement of inflammasomes in tumor microenvironment and tumor therapies. *J Hematol Oncol*, *16*(1), 24. doi:10.1186/s13045-023-01407-7
- Zhang, Z., Tan, Q., Guo, P., Huang, S., Jia, Z., Liu, X., Feng, H., & Chen, Y. (2022). NLRP3 inflammasome-mediated choroid plexus hypersecretion contributes to hydrocephalus after intraventricular hemorrhage via phosphorylated NKCC1 channels. *J Neuroinflammation*, *19*(1), 163. doi:10.1186/s12974-022-02530-x
- Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., & Tschopp, J. (2010). Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol*, *11*(2), 136-140. doi:10.1038/ni.1831
- Zhu, J., Hu, Z., Han, X., Wang, D., Jiang, Q., Ding, J., Xiao, M., Wang, C., Lu, M., & Hu, G. (2018). Dopamine D2 receptor restricts astrocytic NLRP3 inflammasome activation via enhancing the interaction of beta-arrestin2 and NLRP3. *Cell Death Differ*, *25*(11), 2037-2049. doi:10.1038/s41418-018-0127-2
- Zito, G., Buscetta, M., Cimino, M., Dino, P., Bucchieri, F., & Cipollina, C. (2020). Cellular Models and Assays to Study NLRP3 Inflammasome Biology. *Int J Mol Sci*, *21*(12). doi:10.3390/ijms21124294

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az öregedés az ember esetében egy elkerülhetetlen, törvényszerűen progresszív, természetes biológiai folyamat, amelyet többek között a fiziológiai funkciók hanyatlása jellemez. Egyik fontos pillére az inflammaging, egy krónikus, alacsony szintű gyulladással járó adaptív folyamat, amelynek lehetnek előnyös vagy káros következményei. Attól függően, hogy az immunválaszokat milyen tényezők kombinációja formálja, ezek összessége vezethet egészséges, hosszú élettartamhoz vagy patológiás öregedéshez és az azzal járó betegségekhez. A legtöbb központi idegrendszeri betegségnek, így például a stroke-nak és a neurodegeneratív megbetegedéseknek egyik fő kísérő jelensége a krónikus gyulladás. A neurovaszkuláris inflammagingról szóló átfogó tanulmányunk az öregedésben és az előbb említett öregedéssel járó betegségekben lejátszódó gyulladással járó folyamatokba nyújt betekintést. Közleményünkben különös hangsúlyt fektettünk az NVE sejteinek gyulladásban betöltött szerepére az egészséges és patológiás öregedés során. Az inflammaging számos strukturális és funkcionális következménnyel jár a vaszkuláris, glia- és idegsejtekre nézve. Az ezen és más sejtek hálózata által szabályozott pro- és antiinflammatorikus mechanizmusok közötti egyensúly felborulásával az öregedés folyamata felgyorsulhat és az öregedéssel járó betegségek súlyosbodhatnak.

A gyulladás 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 hematogén úton érkező tumorsejtek és az NVE sejtei között jönnek létre. Az agyi metasztázisok kezelésének legkézenfekvőbb célpontjai a tumorsejtek. A velük létesített reciprok kapcsolatok révén az NVE elemei azonban a transzlációs kutatások szempontjából szintén fokozott figyelmet érdemelnek. Csoportunk és más kutatócsoportok korábbi tanulmányaiból kiderült, hogy az NVE egyes sejtípusai közül az endotélsejtek, habár szoros barriert képeznek a tumorsejtekkel szemben, aktívan segíthetik az extravazációjukat és kemoprotekciót biztosítanak számukra, a periciták képesek fokozni az adhéziójukat és proliferációjukat, az asztrociták pedig kettős szerepet töltenek be a metasztázisok kialakulásában, képesek gátolni, valamint támogatni is a tumorsejteket.

Az inflammaszómák olyan intracelluláris multiprotein komplexek, amelyek az életkor előrehaladtával is feldúsuló DAMP-ok érzékelése révén az IL-1 β és IL-18 gyulladással járó citokinek érett formájának szintéziséért felelősek. Saját és mások eredményei alapján az

inflammaszómák egyik legismertebb tagjának, az NLRP3 inflammaszómának az aktivációját kóros körülmények között az NVE szinte mindegyik sejttypusában kimutatták már. A primer és extracerebrális szekunder tumorok esetén az inflammaszómák gyulladós reakciókban betöltött szerepéről szerzett ismereteink viszonylag részletesek, azonban az agyi metasztázisokban az inflammaszómák szerepe megválaszolatlan kérdés.

Kísérleteinkhez az NLRP3 inflammaszóma szerepének vizsgálatára *in vivo* agyi metasztázis modelleket és sejtenyészeti modelleket alkalmaztunk, valamint humán agyszövet mintákat használtunk fel. Vizsgálatainkkal megállapítottuk, hogy az NLRP3 inflammaszóma komponensek közül az NLRP3 és ASC, valamint az IL-1 β nagymértékben és specifikusan a peritumorális asztrocitákban expresszálódik. Ezeknek a fehérjéknek az expressziója nem volt kimutatható sem a tumorsejtekben, sem más strómasejtekben, sem a tumortól távoli asztrocitákban, mint ahogy a kontroll, egészséges agyminták asztrocitáiban sem. Immunhisztokémiai vizsgálataink során továbbá az IL-1 β idő- és tumorméretfüggő expresszió változását tapasztaltuk. Egyrészt az áttétképzés időbeli lefolyásával párhuzamosan nőtt az IL-1 β expresszió a tumor körüli asztrocitákban, másrészt minél nagyobb volt a tumor, annál markánsabb volt a peritumorális IL-1 β expresszió. A tumor indukálta inflammaszóma aktiváció mechanizmusának feltárása végett a továbbiakban *in vitro* emlőkarcinóma és asztrocita sejtenyészeten tápfolyadékot kondicionáltunk, majd a két sejttypus közötti kommunikáció hatását vizsgáltuk az NLRP3 inflammaszóma primingra, aktivációra, valamint a tumorsejtek inflammaszóma-függő proliferációjára. Kísérleteink igazolták, hogy a tripla negatív emlőráksejtekben származó szolubilis faktorok az NLRP3 és az IL-1 β upregulációját és aktivációját indukálják az asztrocitákban, míg az asztrocitákból származó mediátorok fokozzák a metasztatikus tumorsejtek proliferációját. Eredményeink összhangban vannak a szakirodalmi adatokkal, miszerint a gyulladós citokinek meghatározó szerepet játszanak a metasztázisképzés több lépésében, köztük a tumornövekedésben. Ugyanakkor eredményeink elsőként szolgáltatnak bizonyítékot arról, hogy a tripla negatív emlőkarcinóma agyi metasztázisaiban az NLRP3 inflammaszóma primingja és aktivációja a peritumorális asztrocitákban következik be, aminek következtében felszabaduló IL-1 β pedig elősegíti a metasztatikus sejtek proliferációját. A karcinómasejtek asztrociták általi fokozott proliferációját kétféleképpen akadályoztuk meg. Egyrészt az NLRP3 inflammaszóma aktiváció gátlásával, amely az MCC950 inhibitorral történt, másrészt az IL-1 β szignalizáció blokkolásával, amelyhez specifikus IL-1 β neutralizáló antitestet használtunk. Előbbi megközelítést nemcsak az *in vitro* sejtproliferációs esszéikben, hanem *in vivo* metasztázis modelljeinkben is alkalmaztuk az MCC950 vér-agy gáton való átjutása miatt. Eredményeink

alapján az inflammaszóma inhibitor csökkentette az IL-1 β expresszióját a peritumorális asztrocitákban, valamint az inflammaszóma komponensek és az aktív IL-1 β szintjét is. Terápiás szempontból – legalábbis alapmechanizmusát tekintve – legszámottevőbb 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 β 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 inflammaszómák farmakológiai célzása új stratégiát jelenthet az agyi áttétek kezelésében.

9. SUMMARY

Human aging is an inevitable, progressive, natural biological process characterized by, among others, a deterioration in physiological functions. One of its important pillars is inflammaging, a chronic adaptive process with low-grade inflammation, which can have beneficial or harmful consequences. Depending on the combination of multiple factors that shape the immune responses, healthy aging and longevity or pathological aging and age-related diseases can represent individual life trajectories. The majority of CNS diseases, including stroke and neurodegenerative diseases, are associated with chronic inflammation. Our review on neurovascular inflammaging provides insight into the inflammatory processes involved in aging and age-related diseases such as the ones mentioned before. We put special emphasis on the role of cells of the neurovascular unit (NVU) in inflammation in healthy and pathological aging. Inflammaging poses a number of structural and functional consequences to vascular, glial and neuronal cells. With the imbalance between pro- and anti-inflammatory mechanisms governed by the network of these and other cells, the aging process may be accelerated and exacerbation of age-related diseases may occur.

Inflammation is a major contributor to tumorigenesis as well. Secondary brain tumors, such as triple-negative breast cancer metastases, have extremely poor prognosis. Therefore, understanding of the processes that occur between tumor cells arriving via the circulation and the NVU cells is fundamental to improve prognosis in patients with such malignancies. Tumor cells are the most obvious targets for the treatment of brain metastases. However, through their reciprocal interactions with the metastatic cells, elements of the NVU also deserve increased attention for translational research. Previous studies by our group and other research groups have shown that among the different cell types of the NVU, endothelial cells, although forming a robust physical barrier to invading cells, can actively promote tumor cell extravasation and provide chemoprotection to them, pericytes enhance their adhesion and proliferation, and astrocytes play a dual role in metastasis, inhibiting and supporting tumor cells.

Inflammasomes are intracellular multiprotein complexes that induce production of the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 in response to DAMPs, which also accumulate with age. Based on our own and others' results, activation of NLRP3 inflammasome, one of the best known member of inflammasomes, has been demonstrated in almost all cell types of the NVU under pathological conditions. Our knowledge of the role of inflammasomes in

inflammatory responses in primary and extracerebral secondary tumors is rather granular, but their role in brain metastases remains to be unanswered.

By using *in vivo* and *in vitro* models, as well as human samples to study the role of the NLRP3 inflammasome in triple-negative breast cancer brain metastases, we found NLRP3 inflammasome components, namely NLRP3 and ASC, and IL-1 β to be highly and specifically expressed in peritumoral astrocytes. Expression of these proteins was not detected in tumor cells, in stromal cells other than astrocytes or in astrocytes distant from the metastatic lesions, nor in astrocytes in control, healthy brain samples. Furthermore, our immunohistochemical studies showed time- and tumor size-dependent changes in IL-1 β expression. On the one hand, IL-1 β was upregulated in peritumoral astrocytes gradually with time, and on the other hand, the expression level of IL-1 β was more pronounced in large metastases than in small lesions or tumor-free areas. In order to elucidate the mechanism of tumor-induced inflammasome activation, we used conditioned media and investigated their effects on astrocytes and, in turn, on breast cancer cells. Specifically, the effect of this mode of communication on NLRP3 inflammasome priming, activation and inflammasome-dependent proliferation of tumor cells was examined. Soluble factors from triple-negative breast cancer cells induced upregulation and activation of NLRP3 and IL-1 β in astrocytes, while astrocyte-derived mediators augmented the proliferation of metastatic cells. Our results are in line with previous studies demonstrating that inflammatory cytokines play a crucial role in several steps of metastasis, including tumor growth. However, our results are the first to provide evidence that NLRP3 inflammasome priming and activation occurs in peritumoral astrocytes in breast cancer brain metastases, resulting in IL-1 β release that fosters tumor cell proliferation. Astrocyte-induced increased proliferation of carcinoma cells was prevented in two alternative ways, either by inhibiting NLRP3 inflammasome activation using the inhibitor MCC950 or by dampening the downstream effect of IL-1 β using a specific IL-1 β neutralizing antibody. The former approach was used not only in our *in vitro* cell proliferation assays but also in our *in vivo* metastasis models due to the ability of MCC950 to cross the blood-brain barrier. Our results clearly show that MCC950 reduced the IL-1 β expression in peritumoral astrocytes, as well as the levels of inflammasome components and active IL-1 β . From a therapeutic perspective, at least mechanistically, our most compelling finding is that we were able to significantly reduce the growth of brain metastatic tumors in mice treated with MCC950. Overall, astrocytes can activate NLRP3 inflammasome and subsequently release IL-1 β in response to triple-negative breast cancer cells. 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.