

“VASILE GOLDIȘ” WESTERN UNIVERSITY OF ARAD

HABILITATION THESIS

**Role of the Blood-Brain Barrier in the Pathomechanism of
Central Nervous System Disorders**

Dr. Imola Wilhelm

2016

Summary: Scientific and professional achievements

The habilitation thesis entitled “Role of the Blood-Brain Barrier in the Pathomechanism of Central Nervous System Disorders” comprises my scientific achievements obtained in the field of the blood-brain barrier (BBB) (Part I), perspectives of future career development (Part II), followed by a reference list (Part III). Part I consists of an introductory chapter, followed by Chapter 2 describing the scientific achievements before obtaining the PhD degree. The core of the thesis is presented in Chapters 3-5 of Part I, which contain results published in international journals (listed in Chapter 6).

Part I. Chapter 3: Interaction of metastatic cells with the cerebral endothelium

Brain metastases are common and devastating complications of both breast cancer and melanoma. Since the central nervous system (CNS) lacks a lymphatic system, tumor cells can only reach the brain parenchyma by hematogenous metastasis formation, i.e. through the BBB. The BBB is a complex system formed by cerebral endothelial cells (CECs). CECs – coming in contact with pericytes and astrocytes – form a single cell layer lining the blood vessels, and are sealed with a continuous belt of tight junctions (TJs). The process of transendothelial migration of tumor cells is largely uncharacterized (reviewed in: **Wilhelm et al., Int J Mol Sci 2013**).

Using in vitro approaches (reviewed in: **Wilhelm et al., Acta Neurobiol Exp (Wars) 2011**) we focused on the elucidation of the mechanisms of transmigration of tumor cells through the BBB. We have shown that release of serine proteases by melanoma cells and disintegration of the interendothelial junctional complex are main steps in the formation of brain metastases in malignant melanoma (**Fazakas et al., PLoS One 2011**). We have identified tumor cell-induced endothelial-mesenchymal transition as an underlying mechanism of junctional disassembly in brain endothelial cells (**Krizbai et al., PLoS One 2015**).

We have also described that inhibition of the Rho/ROCK pathway in melanoma cells enhances transmigration of melanoma cells through the BBB (**Wilhelm et al., Pigm Cell Mel Res 2014**). We have identified increased attachment of melanoma cells to the brain endothelium as an underlying mechanism. Our results indicated that the mesenchymal type of tumor cell movement is primordial in the transmigration of melanoma cells through the BBB. This appears to have clinical consequences, since pharmacological inhibitors of ROCK signaling (e.g. fasudil) are emerging as potent therapeutic agents. Based on our results, induction of the amoeboid tumor phenotype – by inhibition of Rac signaling – decreases the transmigration rate of both melanoma and breast cancer cells (**Molnár et al., Cell Adh Migr 2015**).

We have characterized adhesion and stress relaxation forces between melanoma and cerebral endothelial cells using atomic force microscopy (**Végh et al., Eur Biophys J 2012**). Moreover, we have shown that type 2 cannabinoid receptor is a potential target in reducing the number of brain metastases originating from melanoma (**Haskó et al., Int J Mol Sci 2014**). In addition, we identified two lignans (heliioxanthin and (7E)-7,8-dehydroheliobuphthalmin) from *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* which may have the potential to interfere with melanoma brain metastasis formation (**Hajdu et al., J Nat Prod 2014**).

Part I. Chapter 4: Role of pattern recognition receptors in cerebral endothelial cells

Sensing of infectious agents by the innate immunity relies on a limited number of pattern recognition receptors (PRRs) that are mainly expressed on macrophages, neutrophils, dendritic cells and other innate immune cells. There is growing experimental evidence that PRRs are expressed on different non-immune cell types as well; however, few data is available about their expression and function of in CECs. We identified the presence and role of several members of two major PRR families – namely the family of TLRs (Toll-like receptors) and NLRs (NOD-like receptors) – in CECs.

Our studies were the first to identify the presence of TLR6 besides TLR2, 3 and 4 in CECs. We showed that TLR2/6 activation causes TJ disruption, mediated partly by ERK1/2 kinases. Furthermore, we demonstrated that TLRs can be regulated by oxidative stress and inflammatory stimuli in CECs (**Nagyószzi et al., Neurochem Int 2010**).

We have also characterized the expression profile and the regulation of NLRs and of inflammasome components in CECs. Moreover, we demonstrated for the first time that inflammasomes can be activated in CECs in a MAPK-dependent manner, resulting in the secretion of active IL-1 β . Activation of inflammasomes in CECs is a yet unidentified, but presumably important mechanism of the BBB to regulate the neuroimmune axis (**Nagyószzi et al., J Neurochem 2015**).

Part I. Chapter 5: Transport processes at the BBB

The objective of these experiments was to investigate two aspects of barrier function: efflux transporters and tight junctions. The majority of our studies were performed on in vitro BBB models (reviewed in: **Wilhelm et al., Mol Pharm 2014**). We showed that calcein assay is a selective and sensitive method to assess ABCB1 function in CECs (**Glavinas et al., Xenobiotica 2011**) and we provided evidence that quinidine/PSC-833 is a good substrate/reference inhibitor combination in testing candidate drugs for interaction with the ABCB1 transporter at the BBB (**Sziráki et al., J Biomol Screen 2011 and 2013**). We have also tested the response of the BBB to opioid peptides (**Mallareddy et al., Chem Biol Drug Des 2012; Kosson et al., Acta Neurobiol Exp (Wars) 2014**). Moreover, we were the first to describe that PACAP enhances barrier properties of cerebral microvessels (**Wilhelm et al., J Mol Neurosci 2014**).

Rezumat: Realizări științifice și profesionale

Teza de abilitare intitulată “Rolul barierei hematoencefalice în mecanismele patologice ale bolilor sistemului nervos central” cuprinde rezultatele științifice obținute în domeniul cercetărilor barierei hematoencefalice (Partea I), perspective de dezvoltare a carierei viitoare (Partea II), urmată de bibliografie (Partea III). Partea I este formată dintr-un capitol introductiv, urmat de Capitolul 2 care descrie realizările științifice obținute înainte de obținerea titlului de doctor. Cea mai mare parte a tezei este cuprinsă în capitolele 3-5 din Partea I, care conține rezultatele cercetărilor efectuate după doctorat și publicate în jurnale internaționale (listate în capitolul 6).

Partea I. Capitolul 3: Interacțiunea celulelor metastatice cu endoteliul cerebral

Metastazele cerebrale sunt complicații frecvente și devastatoare ale cancerelor de sân și ale melanoamelor. Deoarece în sistemul nervos central lipsește rețeaua limfatică, celulele tumorale pot ajunge la nivelul parenchimului cerebral prin bariera hematoencefalică. Bariera hematoencefalică este un sistem complex format din celulele endoteliale cerebrale. La rândul lor, celulele endoteliale cerebrale – care vin în contact cu pericitele și astrocitele – mărginesc vasele sanguine, și sunt înlănțuite prin joncțiuni strânse. Migrarea transendotelială a celulelor tumorale nu este complet caracterizată până în prezent (**Wilhelm și colab., Int J Mol Sci 2013**). Utilizând tehnici in vitro (**Wilhelm și colab., Acta Neurobiol Exp (Wars) 2011**) ne-am concentrat pe elucidarea mecanismelor de transmigrare a celulelor tumorale prin bariera hematoencefalică. Am demonstrat faptul că eliberarea unor proteaze de către celulele de melanom și dezintegrarea complexului joncțional interendotelial reprezintă pași principali în formarea metastazelor cerebrale în melanomul malign (**Fzakas și colab., PLoS One 2011**). Am identificat de asemenea că celulele tumorale induc tranziția endothelial-mezenchimală a endoteliului vascular, mecanism care rezultă în dezasamblarea joncțiilor celulelor endoteliale cerebrale (**Krizbai și colab., PLoS One 2015**).

Am descris de asemenea faptul că inhibiția căii Rho/ROCK în celulele de melanom stimulează transmigrarea celulelor tumorale prin bariera hematoencefalică (**Wilhelm și colab., Pigm Cell Mel Res 2014**). Am identificat că la baza acestui proces stă creșterea gradului de aderare a celulelor de melanom la endoteliul cerebral. Rezultatele noastre au indicat faptul că mișcarea mezenchimală a celulelor tumorale este primordială în transmigrarea celulelor de melanom prin bariera hematoencefalică. Această constatare pare să aibă consecințe clinice, mai ales de când inhibitorii farmacologici ai semnalizării ROCK (ex. fasudil) au început să fie dezvoltați ca posibili agenți terapeutici. Bazat pe rezultatele noastre, inducerea fenotipului tumoral amoeboid – prin inhibarea semnalizării Rac – descrește rata de transmigrare pentru celulele de melanom și cancer de sân (**Molnár și colab., Cell Adh Migr 2015**).

Am caracterizat forțele de adeziune și de relaxarea de stres dintre celulele de melanom și celulele endoteliale cerebrale prin utilizarea microscopiei de forță atomică (**Végh și colab., Eur Biophys J 2012**). Mai mult, am demonstrat faptul că tipul 2 de receptor cannabinoid este o țintă potențială pentru reducerea numărului de metastaze cerebrale originare din melanom (**Haskó și colab., Int J Mol Sci 2014**). În plus, am identificat doi lignani (heliioxanthin și (7E)-7,8-dehidroheliobuphthalmin) din *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* care se pare că pot

influența formarea metastazelor cerebrale originare din melanom (**Hajdu și colab., J Nat Prod 2014**).

Partea I. Capitolul 4: Rolul receptorilor de recunoaștere a configurațiilor moleculare (PRR) în celulele endoteliale cerebrale

Sistemul imun înnăscut se bazează pe un număr limitat de receptori de recunoaștere a configurațiilor moleculare (PRR), care sunt în special exprimați în macrofage, neutrofile, celule dendritice și alte celule imune. Rezultatele experimentale recente au evidențiat faptul că receptorii PRR sunt exprimați de asemenea și în diferite tipuri de celule non-imune; totuși, câteva date sunt disponibile referitoare la expresia și funcția acestora în celulele endoteliale cerebrale. Am identificat prezența și rolul câtorva membri a două familii majore PRR – familia TLR (receptori Toll-like) și NLR (receptori NOD-like) – în celulele endoteliale cerebrale.

Studiile noastre au evidențiat pentru prima dată prezența TLR6, pe lângă TLR2, 3 și 4 în celulele endoteliale cerebrale. Am demonstrat faptul că activarea TLR2/6 cauzează ruperea joncțiunilor strânse, mediată parțial de către kinazele ERK1/2. De asemenea am demonstrat că receptorii TLR pot să regleze stresul oxidativ și stimulii inflamatori în celulele endoteliale cerebrale (**Nagyószsi și colab., Neurochem Int 2010**).

Am caracterizat de asemenea profilul expresiei și reglarea receptorilor NLR și a componentelor inflamazomului în celulele endoteliale cerebrale. Mai mult, am demonstrat pentru prima dată că inflamazomii pot fi activați în celulele endoteliale cerebrale în maniera dependentă de MAPK, rezultând în secreția de IL-1 β activ. Activarea inflamazomilor în celulele endoteliale cerebrale este un mecanism care joacă probabil un rol important în mecanismul de reglare a axei neuroimune de către bariera hematoencefalică (**Nagyószsi și colab., J Neurochem 2015**).

Partea I. Capitolul 5: Procesele de transport la bariera hematoencefalică

Obiectivele acestor experimente au constat în investigarea a două aspecte ale funcției barierei: transportorii de eflux și joncțiunile strânse. Majoritatea studiilor noastre au fost realizate asupra modelelor de barieră hematoencefalică in vitro (**Wilhelm și colab., Mol Pharm 2014**). Am demonstrat faptul că testul de calceină este o metodă selectivă și senzitivă pentru a evalua funcția transportorilor ABCB1 în celulele endoteliale cerebrale (**Glavinas și colab., Xenobiotica 2011**) și am furnizat dovezi asupra faptului că chinidina/PSC-833 este o bună combinație substrat/inhibitor de referință pentru testarea medicamentelor candidate pentru interacțiunea cu ABCB1 transportor la bariera hematoencefalică (**Sziráki și colab., J Biomol Screen 2011 și 2013**). Am testat de asemenea răspunsul barierei hematoencefalice la peptidele opioide (**Mallareddy și colab., Chem Biol Drug Des 2012; Kosson și colab., Acta Neurobiol Exp (Wars) 2014**). Mai mult, am fost primii care am descris faptul că peptida PACAP întărește proprietățile barierei microvascularizației cerebrale (**Wilhelm și colab., J Mol Neurosci 2014**).