sciendo

Orvostudományi Értesítő
Bulletin of Medical Sciences

A vér-agy gát területi heterogenitásainak vizsgálata emberben és egérben

Nyúl-Tóth Ádám, Mészáros Ádám, Győri Fanni, Wilhelm Imola, Krizbai István A.

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet

AUTHOR AFFILIATION

Institute of Biophysics, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences

CORRESPONDING AUTHOR

Krizbai István
Institute of Biophysics, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences
Temesvári krt. 62, 6726 Szeged, Hungary
Email: krizbai.istvan@brc.mta.hu

ARTICLE HISTORY

Received: 3 April, 2018
Accepted: 21 May, 2018

DOI: 10.2478/orvtudert-2018-0005

Analysis of regional heterogeneities of the blood-brain barrier in humans and mice

ABSTRACT

Proper functioning of the nervous system is largely dependent on the precise regulation of the neuronal environment. By shielding the central nervous system (CNS) from potentially harmful substances, the blood-brain barrier (BBB) has an indispensable role in this process. The BBB is a specialized system of endothelial cells lining brain microvessels, which – supported by pericytes and glial cells – form a selective barrier between the blood and the neural tissue. Under abnormal conditions, permeability of the BBB may increase, which may either trigger or aggravate the disease. Since CNS disorders – at least in their initial phase – usually do not involve the whole brain and spinal cord, but are localized to a certain region, our aim was to understand whether the BBB is regionally heterogeneous at the molecular level. By using bioinformatics tools, we analyzed expression levels of genes specific to cerebral endothelial cells, pericytes or astrocytes in different brain territories. Our results revealed regional heterogeneities in the expression of BBB-associated genes in both human and mouse. Expression pattern of efflux transporters – which have a major role in blocking passage of therapeutic agents through the BBB – proved to be diverse both among brain regions and between mouse and human. Our results indicate that: (1) *in silico* database analyses are suitable for group-based studies on gene functions, overcoming the limitations of single-gene analyses; (2) high-throughput tests should always be validated using other methods; (3) when using animal models, inter-species differences have to be always considered; (4) when comparing different brain regions, the BBB is heterogeneous at the molecular level, and this might have clinical significance.

Keywords: blood-brain barrier (BBB), regional heterogeneity, efflux transporter, *in silico* database analysis

KIVONAT

Az idegrendszer működéséhez elengedhetetlen az idegsejtek környezetének pontos szabályozása. Ebben a vér-agy gátnak döntő szerepe van. A vér-agy gát morfológiai alapját az agyi kisereket bélelő endothelsejtek képezik, amelyek szoros együttműködésben a gliasejtekkel és a pericitákkal egy szelektív barriert alkotnak a vér és az idegszövet között. Ez akadályozza meg a káros anyagoknak, ugyanakkor számos terápiás szernek is a központi idegrendszerbe való bejutását. Patológiás körülmények között azonban sérülhet a vér-agy gát, és ez akár kiváltó oka vagy súlyosbító tényezője is lehet a kórfolyamatnak. Az agyi megbetegedések azonban gyakran nem a teljes agy- és gerincvelőt érintik, hanem – legalábbis a kezdeti szakasz-

ban – annak csak valamelyik régióját. Ezért megvizsgáltuk, hogy vannak-e különbségek a vér-agy gát molekuláris felépítésében a központi idegrendszer különböző területein. Bioinformatikai eszközök segítségével feltérképeztük számos, agyi endothelsejtekhez, pericitákhoz, illetve asztrocitákhoz köthető gén regionális kifejeződését az agyban. Eredményeink alapján a vér-agy gáthoz köthető gének expressziója regionális heterogenitást mutat úgy humánban, mint egérben. Az efflux transzporterek esetében – amelyek alapvető jelentőségűek a gyógyszermolekulák vér-agy gáton keresztüli átjutásának megakadályozásában – nemcsak területi, de fajspecifikus expressziós mintázatot is találtunk. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy: (1) az *in silico* adatbázis-elemzések lehetővé teszik, hogy a gének működését ne csak izoláltan, hanem egymással összefüggésben vizsgáljuk; (2) a nagy áteresztőképességű módszerekkel nyert adatokat minden esetben validálni kell más eszközökkel; (3) az állatkísérletes modellekkel nyert adatok esetében figyelembe kell venni a fajok közötti eltéréseket; (4) molekuláris szinten a vér-agy gát regionális különbségeket mutat, amelyeknek klinikai jelentősége lehet.

Kulcsszavak: vér-agy gát, területi heterogenitás, efflux transzporter, *in silico* adatbázis-elemzés

Bevezetés

Agyunk legfontosabb védelmi vonala, a vér-agy gát szabályozza az oldott anyagok és a vérben keringő sejtek bejutását a központi idegrendszerbe. A vér-agy gátat a mikroereket bélelő endothelsejtek képezik, amelyek az agyi mikrokörnyezet, elsősorban a pericíták és az asztrociták hatására olyan specifikus tulajdonságokra tesznek szert, amelyek meghatározzák az agyi endothelsejtek barrier funkcióját [1].

A gát alapját egy négyszeres védvonal képezi [2], amelyek közül klinikai szempontból a folytonos szoros kapcsolatok és az efflux transzporterek lehetnek a legfontosabbak. A szoros kapcsolatok olyan sejtkapcsoló struktúrák, amelyek transzmembrán fehérjéik révén annyira lezárják a sejtek közötti rést, hogy még az ionok átjutása is gátolt a paracelluláris (sejtek közötti) útvonalon [3]. Így a vér és az agyszövet közötti anyagtranszport jelentős része az endothelsejteken keresztül, a transzcelluláris úton zajlik. A sejteken keresztüli útvonal szabályozásában fontos szerepe van az efflux transzportereknek, amelyek az ABC- (ATP-binding cassette = adenozin-trifoszfátkötő kazetta) család tagjai. Az efflux transzporterek legfontosabb képviselői a P-gp (P-glikoprotein, MDR1 = multidrog rezisztencia fehérje 1, ABCB1; amelynek egérhomológja az Mdr1a/Abcb1a), a BCRP (breast cancer resistance protein = emlőrák drogrezisztencia fehérje, ABCG2; amelynek egérhomológja az Abcg2) és az MRP (multidrug resistance-associated protein = multidrog-rezisztenciához társuló fehérjék, ABCC/Abcc) alcsalád néhány tagja [4].

Amint azt az elnevezések is jelzik, ezek a fehérjék nemcsak a vér-agy gát szabályozásában játszanak szerepet, hanem a tumorsejtek multidrog-rezisztenciáját is alapvetően befolyásolják. Mivel alacsony a specificitásuk, különböző szerkezetű (terápiás) molekulákat képesek kipumpálni a sejtekből, akár a tumorsejtekből, akár az agyi endothelsejtekből. Így biztosítják azt, hogy a káros anyagok, illetve a gyógyszerek ne jussanak be a rákos sejtekbe, illetve az agyszövetbe. Mindezek alapján könnyen érthető, hogy miért olyan nehéz az agyi tumorok kezelése, amelyek kettős efflux pumparendszer védelmét élvezik (az agyi endothelsejtekét és magukét a rákos sejtekét) [5].

A vér-agy gát tehát nemcsak a káros anyagok, hanem a terápiás szerek bejutását is gátolja a központi idegrendszerbe. Ennek is köszönhető, hogy számos neurológiai kórkép terápiája a mai napig komoly nehézségekbe ütközik, és nagy erőkkel zajlik a kutatás, hogy olyan hatóanyagokat, hordozóanyagokat, illetve eljárásokat dolgozzanak ki, amelyek hatékony agyi gyógyszerbejuttatást tesznek lehetővé [6].

Klinikai szempontból a vér-agy gát jelentősége nem merül ki a gyógyszerbejuttatás akadályozásában. Ismert ugyanis, hogy csaknem az összes központi idegrendszeri patológiás folyamat a vér-agy gát valamilyen fokú megnyílásával jár, amely akár a kórfolyamat kiváltó oka is lehet, vagy súlyosbíthatja azt [7]. Az agyi megbetegedések azonban gyakran nem a teljes agy- és gerincvelőt érintik, hanem – legalábbis a kezdeti szakaszban – annak csak valamelyik régióját (a Parkinson-kór például a nigrostriatalis rendszert, a sclerosis multiplex elsősorban a fehérállományt, az Alzheimer-kór főként a hippokampuszt, míg az amiotrófiás laterálszklerózis a gerincvelőt).

Mindezeket figyelembe véve felmerül a kérdés, hogy a vér-agy gát egységes képet mutat-e a központi idegrendszer különböző régióiban. Régóta ismert, hogy az agykamrák közelében vannak olyan kitüntetett területek, a cirkumventrikuláris szervek, amelyek nem rendelkeznek vér-agy gáttal. Ezeken a neuroendokrin szempontból fontos területeken a kapillárisok átjárhatók, azonban a diffúzió gátolt a cirkumventrikuláris szervekből az agyi parenchima irányába [8, 9], így ezen területek jelentősége az agyi gyógyszerbejuttatás szempontjából elhanyagolható.

Ismert, hogy a vér-gerincvelő gát – amely sejtes és molekuláris felépítésében is hasonló a vér-agy gáthoz – átjárhatóbb az

agyi endothelialis gátnál. Ezt a szoros kapcsolatok fehérjéinek alacsonyabb expressziója okozza, ami összefüggésben állhat a gerincvelői erek alacsonyabb pericita lefedettségével [10]. A periciták ugyanis elengedhetetlenül fontos szabályozó szereppel bírnak a vér-agy gát működésében [11].

Az agyi endothelsejtek gátfunkcióinak kialakulásában és fenntartásában nemcsak a periciták, hanem az asztrocitáknak is meghatározó jelentősége van [1]. Az asztrociták nyúlványokat bocsátanak ki az erek felé, amelyek ún. végtalpakban végződnek, amelyek szinte teljes mértékben beborítják az erek külső felszínét [12]. A végtalpak specifikus fehérjéje az aquaporin-4 (AQP4) vízcsatorna.

Korábbi immunfluoreszcens vizsgálataink nem mutattak jelentős különbségeket a periciták és az asztrocitavégtalpak szintjén a szürke- és a fehérállomány között. Ugyanakkor kimutattuk, hogy a kérgi szürkeállományban futó erek permeábilisabbak, és kevesebb szoros kapcsolati fehérjét expresszálnak a fehérállományi vér-agy gáthoz képest [13]. Azonban ennél nagyobb felbontású térkép a vér-agy gát regionális heterogenitásáról nem áll rendelkezésünkre. Mivel a vér-agy gát területi különbségeinek fontos szerepe lehet a betegségek patomechanizmusában, illetve kezelésében, megvizsgáltuk számos, agyi endothelsejtekhez, pericitákhoz, illetve asztrocitákhoz köthető gén regionális kifejeződését az agyban. Az általunk vizsgált gének közé endothelialis, pericita- és asztrocitamarkerek, sejtkapcsoló fehérjék, transzporterek, adhéziós molekulák, növekedési faktorok és receptoraik, illetve az alaphártya fehérjéit kódoló mRNS-ek tartoznak [13]. Ezek regionális eloszlásának és sejtszintű expressziójának analízisét bioinformatikai módszerekkel végeztük el, a rendelkezésünkre álló online adatbázisokban közzétett adatok felhasználásával.

Anyag és módszer

Vegyszerek

Minden reagens, ha másként nincs jelölve, a Sigma-Aldrich Kft. terméke.

Adatbázis-elemzés

Az *in silico* elemzéshez a humán *Allen Brain Atlas* (http://www.brain-map.org/), az egér *Brainstars* (http://brainstars.org/), illetve két, egérből származó adatokat tartalmazó, sejttípustranszkriptom-adatbázis [„Transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex" (https://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_rnaseq.html) és a „Vascular single cells database" (http://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html)] adatait használtuk fel. A sejttípustranszkriptom-adatbázisok kvalitatív elemzése során összevetettük a vér-agy gát sejtjeire jellemző marker gének abszolút abundanciáját (FPKM, lásd **1. táblázat**) a két adatbázisban. Ezek után 112 vér-

1. táblázat. Az elemzett teljes agyi génexpressziós adatbázisok.

Adatbázis	Rövid leírás	Faj	Adattípus	Módszer	Kiterjesztések	Előnyök	Hátrányok	Ref.
Allen Brain Atlas	multimodális* anatómiai alapú génexpressziós adatbázis	humán, (egér)	normalizált *log2* expressziós érték	mikrodisszekció; microarray	MRI, DTI, hisztológia, konnektivitásatlasz, fejlődésbiológiai és demenciaexpressziós tanulmányok	humán, nagy elemszám, multimodális, nagy anatómiai lefedettség, remek vizualizációs opciók	egyes részatlaszai csak kvalitatív adatokat tartalmaznak (lásd egératlasz csak ISH)	[22]
Brainstars	anatómiai alapú génexpressziós adatbázis	egér	normalizált *log2* expressziós érték	mikrodisszekció; microarray	területi marker gének, géncsaládannotáció	napszaki változást figyelembevevő mintavételezés, könnyen elérhető teljes adathalmaz	kisebb lefedettség, kevés minta (n=2/terület)	[23]
Transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex	összehasonlító transzkriptóm- és splicing variáns adatbázis	egér	*FPKM***	„egysejtszuszpenzió"-szekvenálás	sejttípus-összehasonlítás, sejttípusspecifikus, splicing adatbázis	splicing adatkiterjesztés, nagy elemszám	egyes sejtpopulációk nem tökéletes elkülönüléséből adódó pontatlanság, hiányos sejttípuspaletta	[24]
Vascular single cells database	összehasonlító transzkriptóm-adatbázis	egér	RNS darabszám	egysejtszekvenálás	sejttípus-összehasonlítás	széles sejttípuspaletta, nagy elemszám	egysejtszekvenálásból adódó nagy szórás	[25]

*multimodális: anatómiai és genomikai információ, amely több adatmodalitásban is elérhető, mint például MRI-, DTI-képek; hisztológia és génexpressziós adatok (microarray és *in situ* hibridizáció)

**FPKM – ezer bázis transzkriptum szekvenciára eső fragmensszám, egymillió leképezett fragmensenként

agy gáthoz asszociált gén adatait – amelyek úgy az *Allen Brain Atlasban*, mint a *Brainstarsban* szerepelnek (tehát van humán és egérhomológjuk) – log2 intenzitás formában töltöttük le az online elérhető adatbázisokból. Ezen gének között sejttípusmarkerek (endothelsejt, pericita, asztrocita), transzporterek, junkcionális és adhéziós fehérjék vannak. Ezek sejttípus-specificitását a két transzkriptom-adatbázis segítségével validáltuk. Ezután mindkét adathalmaz agyterületenként és génenként átlagolt értékeit – a korábban általunk leírt módszerrel – néhány korábban kiválasztott érmarker gén átlag log2 értékeire normalizáltuk [13]. Az így kapott normalizált log2 adatokat génenként standardizáltuk, így megkapva a normalizált z-értékeket. A normalizációra azért volt szükség, mert a felhasznált adatbázisokban a technikai okokból adódó különbségeket kiküszöbölő normalizációt végeztek el, és nem vették figyelembe az adott terület vaszkularizációját. További információkért lásd: help.brain-map.org/download/attachments/2818165/Normalization_WhitePaper.pdf?version=1%26modificationDate=1361836502191. Az így kapott értékeket leszűkítettük azon agyterületekre, amelyek mindkét adatbázisban megtalálhatóak, majd duplán klaszterezett hőtérképek segítségével vizualizáltuk. Az adatbázisok parallel információtartalom alapján való összehasonlítása agyterületenkénti korrelációs vizsgálattal történt. Minden agyterületet összehasonlítottunk mindkét adatbázis összes vizsgált agyterületével, majd az így kapott korrelációs együtthatókat klaszterezett hőtérképen ábrázoltuk.

Az *ex vivo* kísérletekhez használt állatok

A kísérletekhez az MTA SZBK Állatházában tenyésztett fiatal *BALB/c* egereket használtunk, amelyeket *ad libitum* élelem- és vízhozzáférés mellett tartottunk, 12 órás világos-sötét ciklusban, 22–24 °C hőmérsékleten. Az állatokat intraperitoneális Avertin injekcióval elaltattuk, ezután transzkardiális perfúzió során a szöveteket előbb fiziológiás sóoldattal átmostuk, majd 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk. Az agyat eltávolítottuk a koponyából, 24 órán át paraformaldehidben posztfixáltuk, majd 30%-os szacharózoldatba tettük. Fagyasztó mikrotóm segítségével 30 µm vastag metszeteket készítettünk, amelyeket 4 °C-on PBS-ben (phosphate buffered saline = foszfátpufferolt sóoldat) tároltuk az immunfluoreszcens festésig.

Immunfluoreszcens festések

Az egéragyból készített metszeteket metanol és aceton 1:1 arányú elegyével -20 °C-on permeabilizáltuk, majd mosás után PBS-ben feloldott 30 g/L BSA-val blokkoltuk. Ezután a metszeteket az elsődleges antitesteket tartalmazó oldatokban (10 g/L BSA, PBS-ben) inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C-on. Az antitesteket a következő hígításokban alkalmaztuk: anti-GFAP (Abcam) 1:300, anti-AQP4 (Santa Cruz Biotechnology) 1:300. A metszeteket, PBS-sel való mosás után, a másodlagos antitestet tartalmazó oldatokba helyeztük 1 órára, szobahőmérsékleten. Az Alexa Fluor 488- és Cy3-konjugált egér és nyúl IgG elleni antitesteket (Jackson Immunoresearch) 1:1000-es hígításban alkalmaztuk. Ezután a mintákat ismét PBS-sel mostuk, majd vízbázisú oldat (Fluoromount-G) segítségével lefedtük. A fluoreszcens jeleket Nikon Eclipse 80i fluoreszcens feltéttel rendelkező fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A képeket invertáltuk, és szürkeárnyalatos verzióban mutatjuk be.

Matematikai és statisztikai analízis

Minden bemutatott adat z-érték vagy korrelációs együttható (R). A z-értékeket a következő formula alapján számoltuk ki: $z = (x - \mu)/\sigma$, ahol az x a log2 génexpressziós értéke az adott agyterületnek, μ a génexpresszió átlaga az összes vizsgált agyterületen, σ pedig a génexpresszió szórása az összes vizsgált agyterületen. Minden bemutatott analízist és grafikát az R Statistical Software 3.2.3 verziójával készítettük.

Eredmények

Az agyi génexpressziós adatbázisok keresztvalidálása sejtmarkerek segítségével

A génexpressziós különbségeket nagy területi felbontásban technikailag nehéz vizsgálni – leginkább a nagy biológiai variabilitás miatt, ami magában foglalja a faji, korbeli, nemi, sőt az egyéni különbségeket is. Ennélfogva érdemes olyan, nagy áteresztőképességű módszerekre támaszkodni, amelyek elég robusztusak, hogy kiküszöböljék ezt a problémát. Jó példák erre a különböző, egyre nagyobb számban elérhető, ingyenes génexpressziós adatbázisok. A nagy elemszám és az egyre jobban standardizált tartalom hasznos kiindulási alap az orvosbiológiai kutatásokhoz. Ilyen az általunk is használt négy adatbázis, amelyek mind központi idegrendszeri génexpressziós adatokat tartalmaznak (**1. táblázat**).

Az adatbázisokban található adathalmazok összevetéséből megtudhatjuk, hogy egy adott gén adott agyterületen való kifejeződése milyen mértékű a többi agyterülethez képest (*Allen Brain Atlas*, *Brainstars*), illetve hogy egy adott génnek mely agyi sejttípusban a legmagasabb

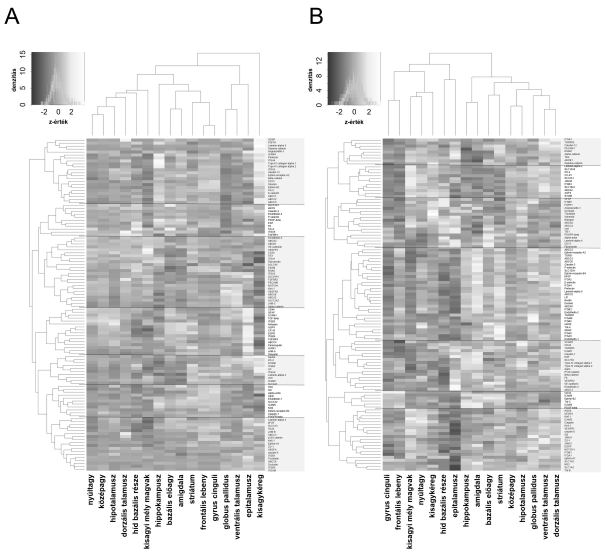
az expressziója (transzkriptom-adatbázisok). Először a transzkriptom-adatbázisok segítségével ellenőriztük a sejtmarker gének specificitását. A leggyakrabban használt (és a vér-agy gát szempontjából is fontos) asztrocitamarkerek a GFAP (glial fibrillary acidic protein = gliális fibrilláris savas protein) és az AQP4, amelyek mindkét adatbázis szerint túlnyomó többségben (gyakorlatilag kizárólag) az asztrocitákban expresszálódnak. Így a továbbiakban ezen két gén expressziós különbségeit úgy tekintettük, hogy azok az adott területen lévő asztrocitákban levő összkópiaszámot tükrözik.

A pericitamarkerek ennél kevésbé egyértelműek, mivel maga a sejttípus is nehezen meghatározható, és a simaizomsejtektől nehezen elkülöníthető [14]. Ennek megfelelően mindkét transzkriptom-adatbázis szerint a PDGFRβ (platelet-derived growth factor receptor β = vérlemezke-eredetű növekedési faktor receptor β) és a CD13/ANPEP (alanyl aminopeptidase) pericitamarkerek megtalálhatók más sejttípusokban is, leginkább endothelsejtekben és simaizomsejtként azonosított fali sejtekben, esetleg fibroblasztokban. Tehát a pericíták esetében az endothelsejtek anatómiai közelségéből, illetve a sejttípus meghatározásából adódó hibák megjelennek a letöltött adatokban. Mivel azonban a PDGFRβ és a CD13 legnagyobb mennyiségben a pericitákban expresszálódott, és specifikusabb gént nem találtunk, ezt a két markert tekintettük reprezentatívnak.

Az agyi endothelsejtek esetén vannak egyértelmű sejttípusmarkerek: a klaudin-5 és a VEGFR2/KDR/Flk1 (vascular endothelial growth factor receptor 2 = vaszkuláris endothelialis növekedési faktor receptor 2) kizárólag endothelsejtekben expresszálódik. Azonban az endothelialis markerek között is találtunk olyanokat (pl. okkludin, VE-kadherin, VEGFR1/Flt1, vWf – von Willebrand-faktor, PECAM1/CD31 – platelet endothelial cell adhesion molecule = vérlemezke endothelsejt adhéziós molekula 1), amelyeket az érfal más sejtjeiben (pericitákban, simaizomsejtekben) is kimutattak. Összességében az általunk kijelölt legfontosabb marker gének reprezentatívnak tekinthetők az adott sejttípusra, azonban a módszerekben rejlő hibalehetőségeket nem szabad figyelmen kívül hagyni.

A vér-agy gát asszociált gének expressziójának anatómiai alapú heterogenitása

A következő lépes az volt, hogy megvizsgáltuk a kiválasztott gének területi eloszlását az anatómiai alapú adatbázisokban. Korábbi tanulmányunkban leírtuk a szürkeállomány és fehérállomány közötti génexpressziós



1. ábra. Vér-agy gát asszociált gének expressziós profilja az *Allen Brain Atlas* és a *Brainstars* adatbázisok átszámolt értékeiből. A logaritmikus expressziós értékeket az *Allen Brain Atlas* „durva felbontású" adathalmazából és a *Brainstars* adatbázisából töltöttük le, majd az értékeket normalizáltuk a kiválasztott érmarker génekre. Az újraszámolt expressziós értékeket z-értékekké standardizáltuk, a vizsgált gének expresszióját a két adatbázis metszeteként mindkettőben szereplő anatómiai területeket klasztereztük, és hőtérképen vizualizáltuk. A) A vér-agy gát asszociált gének expressziója az *Allen Brain Atlasban*. B) A vér-agy gát asszociált gének expressziója a *Brainstarsban*. Mindkét hőtérkép bal felső sarkában elhelyezkedő panelen látható, hogy az adatok normál eloszlásúak. A világos színárnyalatok a magas, míg a sötétek az alacsony expressziót jelölik. Az Y tengelyen ábrázolt gének megtalálhatók a **2**. és **3. táblázatban**.

különbségeket [13]. Jelen munkánk során az *Allen Brain Atlas* és a *Brainstars* adatbázisokat használva tovább vizsgáltuk a kisebb agyi régiók expressziós különbségeit.

A kiválasztott 112, a vér-agy gát kialakításában és működésében fontos szerepet játszó gén expressziós mintázata az 1. ábrán látható, humán (***Allen Brain Atlas***; **1. A ábra**), illetve egéragyban (***Brainstars***; **1. B ábra**). Mindkét adatbázis alapján a 112 gén 7 nagy klaszterbe volt osztható. Az egyes klaszterekbe tartozó gének a két hőtérkép jobb oldalán (**1. ábra**), illetve a **2.** és **3. táblázatban** találhatók. Ahogy azt korábbi eredményeink alapján vártuk, kisebb különbségek voltak a különböző szürkeállományi agyterületek között, mint amekkorát a szürkeállomány-fehérállomány összevetésekor kimutattunk [13]. A humán adathalmazban a kisagykéreg teljesen elkülönül a többi agyterülettől. Jól elkülöníthető csoportot alkot még a globus pallidus, a ventralis thalamus és az epithalamus.

2. táblázat. A 112 vér-agy gáthoz köthető gén klasztereződése az *Allen Brain Atlasból* származó adatok alapján.

1. klaszter	2. klaszter	3. klaszter	4. klaszter	5. klaszter	6. klaszter	7. klaszter
GDNF	SLC12A1	Endothelin-3	CD44	Nestin	TEK	Laminin-alpha 4
FGFR1	eNOS	ABCG2	GFAP	ZO-2	GS	bFGF
Laminin-alpha 5	Claudin-3	ABCB1	VCAM1	S100B	Alpha-actin	SLC1A3
Gamma-catenin	Endothelin-2	VE-cadherin	TGF-beta	ITGB2	Agrin	Trk-B
Angiopoietin-1	P-selectin	VEGFR1	ITGB3	LIF	Endothelin-1	JAM-B
ICAM4	PDGF-beta	CD34	Nidogen	ITGAV	SLC1A2	ABCC3
Perlecan	EGF	TIE1	AQP4	Laminin-alpha 2	ICAM5	p120 catenin
ITGA4	F8	ITGA1	CX-43	vWf	NG2	Kir6.1
Collagen IV-alpha 1	Trk-A	Fibronectin	EGFR	ICAM2	Ephrin-receptor-B4	Ephrin-A1
Collagen IV-alpha 2	ITGA5	SCL7A5	ITGB4	SLC2A1	Claudin-1	ZO-1
ITGA3	TGFBR1	ESAM	TGFBR3		PDGFR-beta	VEGFA
claudin-12		RGS5	ABCC4			claudin-5
Ephrin-receptor-A2		ITGA2	Paracingulin			ITGB1
Beta-catenin		SLC16A1	ICAM1			Tricellulin
CD13		TGFBR2	JAM-A			ABCC6
Desmin		PECAM1	Vimentin			Occludin
Ephrin-B2		NOTCH1				ITGB5
Trk-C		Kir4.1				ITGAM
E-selectin		VEGFR2				
ABCC1		ABCA8				
ABCC2		ABCA2				
ABCC5		SLC12A2				
		JAM-C				
		Alpha-catenin				

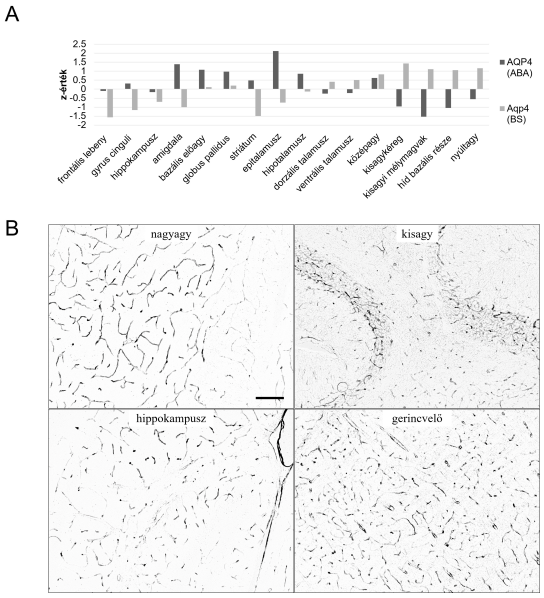
Ezután a sorrendben a kérgi területek jönnek, melyek sorát a hippokampusz zárja. A vizsgált gének alapján a kisagykéregtől legeltérőbb csoportba az agytörzsi régiók és a kisagyi mély magvak tartoznak. Az egéradatbázis esetében a klaszterezés nagyban eltér a humán csoportoktól. A két adatbázis közötti hasonlóságok közé tartozik, hogy a gyrus cinguli és a frontális lebeny, a globus pallidus és ventralis thalamus, valamint a hypothalamus és a középagy mindkét adathalmazban közel klasztereződik egymáshoz.

Az asztrocitaspecifikus fehérjék közül az AQP4-et és a GFAP-t vizsgáltuk tovább (**2. és 3. ábra**).

Összehasonlítottuk a két adatbázisból származó génexpressziós adatokat (**2. A és 3. A ábra**), és megvizsgáltuk a fehérjék lokalizációját az egér központi idegrendszer négy régiójában, a nagyagyban, a kisagyban, a hippokampuszban és a gerincvelőben (**2. B és 3. B ábra**).

Az AQP4 expressziója jelentős különbségeket mutat a különböző agyi régiók között (**2. ábra**).

Ezt részben az okozza, hogy a fehérállományi területeken kisebb az érsűrűség, mint a szürkeállományban, és az AQP4 az erek mentén, az asztrocita végtalpakban expresszálódik.

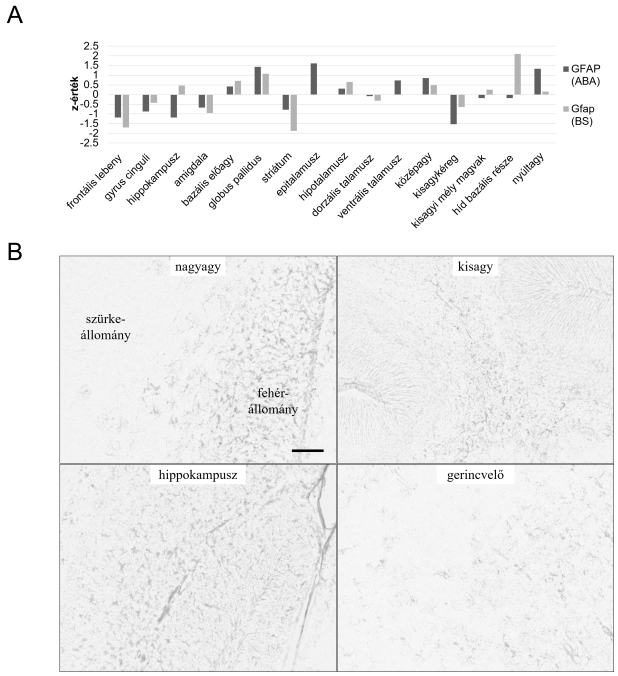


2. ábra. Az AQP4 expressziója különböző agyterületeken. A) Az AQP4 gén átlagos expressziója az *Allen Brain Atlas* és a *Brainstars* adatbázisokból átszámolt, majd standardizált z-érték formájában ábrázolva. B) Az AQP4 fehérje eloszlása egér nagyagyi, kisagyi, hippokampális és gerincvelői metszeteken (mérce = 100 µm).

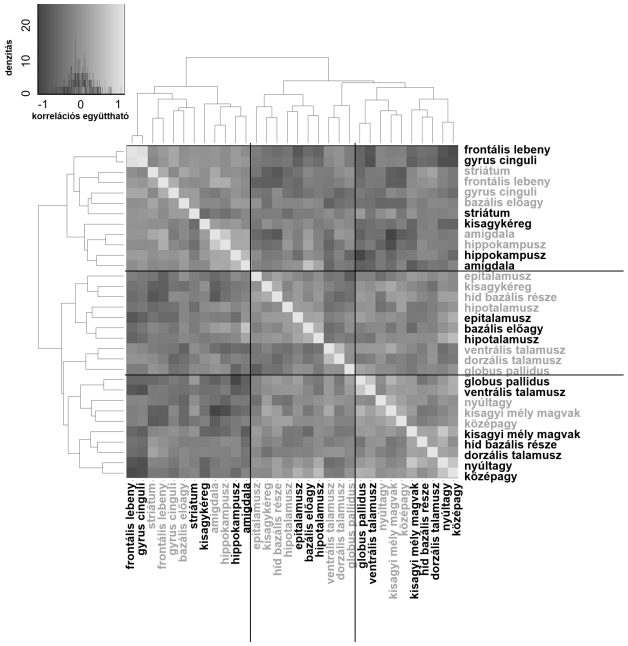
3. táblázat. A 112 vér-agy gáthoz köthető gén klaszterződése a *Brainstarsból* származó adatok alapján.

1. klaszter	2. klaszter	3. klaszter	4. klaszter	5. klaszter	6. klaszter	7. klaszter
ITGA3	Laminin-alpha 2	GFAP	ABCC3	VCAM1	CD34	RGS5
TGFBR2	SLC12A2	ITGB5	Ephrin-receptor-A2	CD44	ICAM5	VEGFA
Claudin-12	ZO-2	FGFR1	TGFB1	TGFBR3	Ephrin-B2	Kir6.1
PECAM1	CX-43	Angiopoietin-1	ABCC2	ICAM1	Trk-C	ICAM2
ESAM	SLC2A1	Occludin	ABCC6	Claudin-1	ICAM4	Cingulin
Alpha-catenin	JAM-B	Tricellulin	Claudin-3	EGF	PDGF-beta	Kir4.1
TEK	ITGB4	Vimentin	P-selectin	SLC7A5		VEGFR1
ABCB1	SLC16a1	Nidogen	SLC12A1	Collagen IV-alpha 1		claudin-5
Gamma-catenin	ABCA2	ABCG2	Ephrin-receptor-B4	Collagen IV-alpha 2		GS
	AQP4	ABCC4	bFGF	Agrin		JAM-A
	S100B	vWf	ITGA2	P120-catenin		ZO-1
		TIE1	E-selectin	Beta-catenin		JAM-C
		PDGFR-beta	ITGA4	F8		EGFR
		Alpha-actin	Perlecan	VEGFR2		NOTCH1
		Laminin-alpha 4	Laminin-alpha 5	VE-cadherin		ITGB1
		CD13	ABCC5	Endothelin-3		ITGA1
		Fibronectin	LIF	ABCC1		ephrin-A1
			Nestin			SLC1A2
			Desmin			NG2
			ABCA8			SLC1A3
			ITGB3			Trk-B
			Endothelin-2			
			TGFBR1			
			ITGAM			
			ITGB2			
			eNOS			
			Trk-A			
			GDNF			
			ITGA5			
			ITGAV			
			Endothelin-1			

A génexpressziós vizsgálatok során ezt a problémát az érmarkerekre történő normalizálással igyekeztük kiküszöbölni. Azonban a mintavétel pontos helye nagyban befolyásolhatja az adatokat. Az egér kisagykéregben a génepressziós adatbázis (*Brainstars*) alapján és fehérjeszinten is magas AQP4-expressziót láttunk, míg a hippokampuszban relatív alacsony ezen mRNS/fehérje kifejeződése. A kortikális területeken azonban – valószínűleg a szubkortikális fehérállomány nem megfelelő kiküszöbölése miatt – a *Brainstars* adatai nem egyeznek az immunfluoreszcens vizsgálatainkkal kapott eredményekkel. Feltűnő ugyanakkor az alacsony korreláció, gyakran akár ellentétes tendencia az egér (*Brainstars*) és a humán (*Allen Brain Atlas*) adatok között. Mivel a GFAP az asztrocita sejttestekben expresszálódik, tehát nem közvetlenül a vér-agy gáthoz köthetően, a **3. A ábrán** bemutatott adatok nem érsűrűségre normált értékek. Figyelemre méltó, hogy a részletesen vizsgált gének közül a GFAP mutatta a legnagyobb expressziós hasonlóságot a humán és egéradatbázisok között. A GFAP fehérjéről ismert, hogy kisebb mennyiségben van jelen a szürkeállományi, mint a fehérállományi asztrocitákban [15]. Ez mRNS-szinten főleg a frontális kérgi régióban nyilvánvaló. A **3. B ábrán** látható nagyagymetszeten jól látható a szürkeállomány és fehérállomány közötti kontraszt a GFAP-festésben.



3. ábra. A GFAP expressziója különböző agyterületeken. A) A GFAP gén átlagos expressziója az *Allen Brain Atlas* és a *Brainstars* adatbázisokból átszámolt, majd standardizált z-érték formájában ábrázolva. B) A GFAP eloszlása egér nagyagyi, kisagyi, hippokampális és gerincvelői metszeteken (mérce = 100 µm).



4. ábra. Az *Allen Brain Atlas*-ból és a *Brainstars*-ból származó adatok korrelációs vizsgálata. Az adatbázisok adatait közös mátrixba rendeztük, és az értékeket anatómiai területek alapján korrelációs analízisnek vetettük alá. Az így kapott korrelációs együtthatókat (-1-től +1-ig) klaszterezetük, és anatómiai alapon rendezve hőtérképként ábrázoltuk. A feketével jelölt agyterületek értékeit az *Allen Brain Atlas*-ból míg a világosszürkével jelölt agyterületek adatait a *Brainstars* adatbázisból nyertük. A hőtérkép bal felső sarkában elhelyezkedő panelen látható, hogy az adatok normál eloszlásúak. A világos színárnyalatok a magas, míg a sötétek az alacsony korrelációt jelölik.

A humán és egéradatbázisok összevetése anatómiai alapú génexpressziós mintázatok alapján

A humán (*Allen Brain Atlas*) és az egér adatbázis (*Brainstars*) génexpressziós mintázatait korrelációs analízissel is összevetettük, ahol a korreláció alapjának az egyes agyterületeket vettük. Minden agyterületet összehasonlítottunk az összes többivel, és az így kapott korrelációs értékeket a **4. ábrán** látható korrelációs hőtérképen ábrázoltuk. Az értékek normál eloszlása azt jelzi, hogy a két adatbázis kevéssé korrelál a közös anatómiai struktúrák expressziós mintázata alapján, de vannak lokális hasonlóságok, ahol van korreláció, mint például a hippokampusz, az amygdala és a gyrus cinguli esetében. A klaszterezés három nagyobb csoportot különít el, amelyekben mindkét adatbázisból találhatunk agyterületeket. Ezekben megfigyelhető, hogy az azonos agyterületek a két adatbázisból közel klasztereződnek egymáshoz (pl. frontális lebeny, hippokampusz, amygdala, thalamusmagok, hypothalamus). Ez azt jelenti, hogy bár a két adatbázis megfeleltethető agyterületei nem feltétlenül mutatnak nagyfokú korrelációt, de a többi agy területettől hasonló módon térnek el mindkét adatbázisban. A különböző agyterületek expressziós mintázata tehát várható módon fajspecificitást mutatott, de az agyterületek közötti eltérések esetén hasonló mintázatot kapunk egérben, mint humánban.

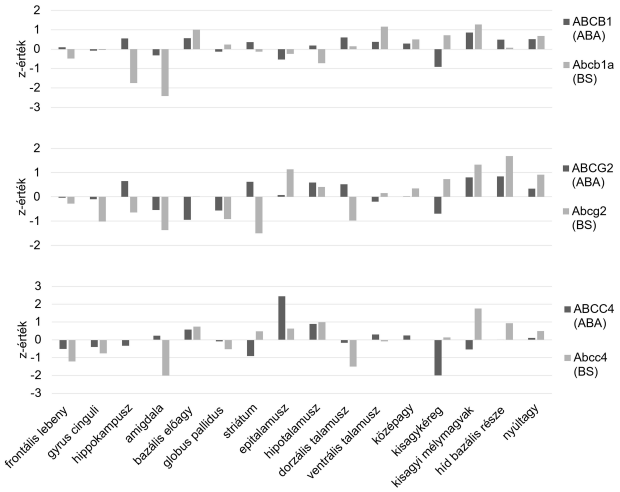
Az ABC-transzporterek anatómiai alapú expressziós mintázata emberben és egérben

Az általunk vizsgált 112 mRNS között számos orvosi szempontból fontos gén van. Ezek közül az efflux transzportereket vizsgáltuk meg részletesebben. Az ABC-transzporterek esetében jól látható a fajspecifikus expressziós mintázat megnyilvánulása. A sejttípustranszkriptom-adatbázisokból kiderül, hogy az Abcb1a és az Abcc4 túlnyomórészt az endothelsejtekben expresszálódik az agyban, míg az Abcg2 kifejeződése diffúzabb (pl. pericitákban is jelen van).

Mielőtt a transzporterek regionális expresszióját megvizsgáltuk – amely azt mutatja meg, hogy egy adott agyterületen a teljes agy átlagához képest mennyivel kisebb vagy

nagyobb az adott gén expressziója –, azt is megnéztük, hogy egyes transzporterek expressziója globálisan különbözik-e a humán és az egéragy között. Mivel erre vonatkozóan vannak szakirodalmi adatok, ez az összehasonlítás tulajdonképpen validálja az adatbázisokból letölthető számértékeket. A humán adatokat az *Allen Brain Atlasból*, míg az egéradatokat a *Brainstarsból* nyertük ki. Az összehasonlítást tartalmazó **4. táblázat** adatai nagymértékben egybevágnak eddigi ismereteinkkel, miszerint emberben az ABCG2 nagyobb, az ABCB1 és ABCC4 pedig kisebb mennyiségben expresszálódik, mint egérben [16].

A regionális különbségeket tekintve a humán és az egéragyban az ABC-transzporterek expressziója (az átlagtól való eltérés iránya és mértéke) hasonlónak bizonyult a kisagyi mély magvak, a híd és a nyúltagy területein (5. ábra). Az ABCB1 regionális expressziója a gyrus cinguli, a középagy, az epithalamus, a kisagyi mély magvak és a nyúltagy területén is hasonló volt a két adatbázisban. Az ABCC4 a frontális lebenyben és a hypothalamusban mutatott még hasonló értékeket. A legnagyobb korrelációt az ABCG2 adta, ugyanis a vizsgált agyterületek felében hasonló tendenciát mutatott a két fajban (**5. ábra**).



5. ábra. A legfontosabb ABC transzporterek expressziója különböző agyterületeken. Az ABCB1, ABCC1, ABCG2 gének átlagos expressziója az *Allen Brain Atlas* és a *Brainstars* adatbázisokból átszámolt, majd standardizált z-érték formájában ábrázolva.

Az eredmények megbeszélése

A modern orvosbiológiai kísérletes módszerek nagy mennyiségű adatot generálnak, amelyeknek feldolgozásához bioinformatikai eszközökre van szükség. Ezek lehetővé teszik, hogy az egyes adatokat ne izoláltan, hanem egymással összefüggésben értékeljük.

Fontos felismerni ugyanis, hogy a gének egyéni vizsgálata nem elegendő ahhoz, hogy komplex sejt- vagy szervezet szintű folyamatokat megértsünk. A legtöbb biológiai funkcióhoz egymással együttműködő gének tucatjai társulnak. Az olyan funkcionális csoportosításon alapuló vizsgálatok, mint a génontológia (jelentős bioinformatikai kezdeményezés, amely egy, a fajokon átívelő, génekre és géntermékekre vonatkozó standardizált funkcionális „szótár" létrehozását célozza meg), felhívják a figyelmet arra, hogy fel kell tárnunk azon rejtett kapcsolatokat, amelyek eddig elkerülték a figyelmünket az egyes gének izolált vizsgálata során. Amióta Eisen és munkatársai bevezették a hőtérképet a gének biológiai relevancia szerinti csoportosítására [17], ez a módszer széles körben elterjedt a nagy áteresztőképességű genetikai vizsgálatok adatainak vizualizálására.

4. táblázat. Az ABC-transzporterek expressziójának aránya humán (*Allen Brain Atlas*) és egér (*Brainstars*) génexpressziós adatbázisok adatai alapján.

	Allen Brain Atlas átlag log2 expresszió	Brainstars átlag log2 expresszió	Δlog2	2^(Δlog2)	egér/humán arány	humán/egér arány
ABCB1	4,76	7,83	-3,06	0,12	8,35	0,12
ABCG2	9,40	7,85	1,55	2,93	0,34	2,93
ABCC4	3,40	7,45	-4,05	0,06	16,62	0,06
humán ABCB1/ABCG2	-4,64			0,04		
egér ABCB1/ABCG2		-0,03		0,98		
humán ABCB1/ABCC4	1,37			2,58		
egér ABCB1/ABCC4		0,37		1,30		
humán ABCG2/ABCC4	6,00			64,22		
egér ABCG2/ABCC4		0,40		1,32		

A klaszterezett hőtérkép alkalmas arra, hogy megvizsgáljuk, mely gének kifejeződése vagy szabályozása mutat hasonló mintázatot, így feltárva a rejtett biológiai kapcsolatokat. Két ilyen (hőtérkép formájában analizált) adathalmaz összehasonlítható egy korrelációs mátrix létrehozásával, amely egy új matematikai dimenziót, a korrelációs együtthatót adja meg. Ez a korrelációs együttható a két adathalmaz hasonlóságán alapul, és a korrelációs mátrix minden pontjában külön számítható. Ezt a módszert használtuk, hogy összehasonlítsuk a vér-agy gáthoz köthető gének expresszióját különböző agyi régiókban humán és egéragyban.

A nagy áteresztőképességű módszerekkel nyert adatokat azonban minden esetben validálni kell más eszközökkel. Ezt igazolja a kisfokú korreláció, amelyet az *Allen Brain Atlasból* és a *Brainstars* adatbázisból nyert adatok összevetéséből számoltunk (**3. ábra**). A viszonylag alacsony korreláció oka kettős lehet: egyrészt módszertani, másrészt a fajok közötti különbségekből adódó. Az *Allen Brain Atlas* jelen állapotában 6 különböző humán agy expressziós adatait tartalmazza, donorra lebontva. Nagy hangsúlyt fektettek a megismételhetőségre, éppen ezért négy különböző microarray platformmal is végeztek analízist (http://help.brain-map.org/display/humanbrain/Documentation). Ezeket korrelációs analízissel keresztvalidálták egymással, és ebben az Affymetrix GeneChip genom array adta a legalacsonyabb korrelációs értékeket (~0,8). A *Brainstarsban*, bár 6 különböző időpontban vettek 2-2 mintát az egerektől, azokat egyként kezelték, hogy az esetleges napszakos eltérések ne befolyásolják a génexpressziós vizsgálatot. Ennek következtében viszont mintaszámot vesztettek. Ezen adatbázis elkészítéséhez pedig csak Affymetrix array-t használtak, az eredményeket nem validálták más microarray platformokkal. Mindezeket figyelembe véve, az *Allen Brain Atlas* adatait megbízhatóbbaknak ítéljük a *Brainstarsból* nyert értékekhez képest.

Ugyanakkor a fajok közötti különbségek sem elhanyagolhatók, és ezt minden állatkísérletes modellen nyert adat esetében figyelembe kell vennünk. Jó példa erre az efflux transzporterek eltérő expressziója emberben és egérben. A rágcsálók agyi hajszálereiben 2-4-szer magasabb P-gp-expressziót és ~2-szer alacsonyabb Bcrp-szintet mértek, mint humán agyi kapillárisokban [18]. Ehhez hasonló átlagexpressziót figyeltünk meg a humán és egéranatómiai alapú adatbázisok összevetése során (**4. táblázat**). Ennek fényében nem meglepő, hogy számos különbséget tapasztaltunk az efflux pumpák regionális expressziójában is a két vizsgált adatbázisban (**3. ábra**). Ezek alapján hasznosabb lenne két olyan adatbázisból nyert adatoknak az összevetése, amelyek azonos fajból származnak. Ezt két okból nem tettük meg. Orvosbiológiai szempontból a humán adatok értékesebbnek tekinthetők, mint a kísérleti állatokból származó adatok, ezért vizsgálatunkba mindenképp be akartuk vonni a humán génexpressziós atlaszt. Azonban nem áll rendelkezésünkre két humán génexpressziós térkép. Másrészt, egéradatok vannak ugyan az *Allen Brain Atlasban* is, ám – a humán adatbázistól eltérően – az *Allen Brain Atlas* egéradatbázisa in situ hibridizáción alapul, ami csupán kvalitatív adatokkal szolgál. Így az anatómiai alapú génexpressziós mintázatok összehasonlításához egy humán (*Allen Brain Atlas*) és egy egéradatbázist (*Brainstars*) vettünk alapul.

Eredményeink alapján a vér-agy gáthoz köthető gének expressziója regionális heterogenitást mutat úgy humánban, mint egérben. Mivel a szürkeállományban sűrűbb az érhálózat, adatainkat vaszkuláris markerekre normalizátuk, hogy elkerüljük az eltérő kapillárisdenzitásból adódó különbségeket. Fontos megemlíteni, hogy az adatbázisok az mRNS-szintű expresszióról adtak információt, az immunfluoreszcens vizsgálatok pedig a megfelelő fehérjék expressziójáról. A kettő kapcsolata természetesen nem kérdéses, de érdemes tekintettel lenni arra, hogy előfordulhat, hogy egy adott gén terméke mRNS formájában jelen van, de fehérjévé csak bizonyos körülmények között transzlálódik. Más fehérjék pedig hosszabb életidejüknek köszönhetően relatíve nagyobb mennyiségben vannak jelen, mint a megfelelő mRNS.

Fontosnak tartjuk megemlíteni, hogy az általunk használt anatómiai alapú adatbázisokat szövetdarabok analízisével készítették, és nem tudni, hogy bizonyos sejttípusok milyen eloszlásban kerültek az adott mintába (lásd kapillárissűrűség). Mindazonáltal minél nagyobb felbontásban vizsgáljuk a génexpressziót, annál pontosabb adatokat kaphatunk a nagyobb agyterületekre vetítve. Az egyes adatokat azonban minden esetben validálni kell alacsonyabb áteresztőképességű, nagyobb precizitású módszerekkel, mint pl. valós idejű polimeráz-láncreakcióval, fehérjeszinten pedig immunhisztokémiával (**2. B ábra**) vagy izolált mikroereken végzett Western-blot vizsgálatokkal. Így jelen tanulmányunk további kísérletes munkákat vetít előre.

A vér-agy gát kisebb agyterületekre lebontott különbségeit fontos lenne megismernünk, hiszen ennek jelen-

tősége lehet a különböző agyi régiókra lokalizálódó neurológiai kórképek kialakulásában és gyógyszeres kezelésében is. Jelenleg igen kevés adat áll rendelkezésükre a vér-agy gát területi heterogenitására vonatkozóan [13, 19], és ezen adatok csupán kisfelbontású gén-, illetve fehérjeexpressziós adatokat tartalmaznak. Ennek alapján különbségek vannak a vér-agy gát és a vér-gerincvelő gát között, illetve a kortikális szürkeállomány és az összefüggő fehérállomány kapillárisai között. Az egyre részletesebb és pontosabb gén- és fehérjeexpressziós adatbázisokból kiindulva, azokat más módszerekkel validálva, feltérképezhetjük az agyi endothelsejtek, periciták és asztrociták szintjén levő molekuláris különbségeket, amelyek akár klinikai relevanciával is bírhatnak.

A központi idegrendszeri betegségek fontos vele-járója a gyulladás [20], és a vér-agy gát sejtjei a neuroinflammációban is fontos szerepet vállalhatnak [21]. Ennek megfelelően a vér-agy gát regionális eltéréseit nemcsak fiziológiás, de patológiás körülmények között (pl. gyulladásban) is fontos lenne feltárni.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat a következő pályázati szervek és források támogatták: Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap (K-116158, FK-124114, GINOP-2.3.2-15-2016-00020, GINOP-2.3.3-15-2016-00030 és GINOP-2.3.2-15-2016-00034), Unitatea Executivă pentru Finanţarea Invăţământului Superior, a Cercetării, Dezvoltării şi Inovării (PN-III-P4-ID-PCE-2016-0408 (188 / 2017)). W. I. MTA Bolyai János ösztöndíjban részesül (BO/00334/16/8).

Irodalom

1. Abbott, N.J., L. Ronnback, and E. Hansson, Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nat Rev Neurosci, 2006. 7(1): p. 41-53.
2. Wilhelm, I., C. Fazakas, and I.A. Krizbai, In vitro models of the blood-brain barrier. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2011. 71(1): p. 113-28.
3. Bauer, H.C., et al., "You Shall Not Pass"-tight junctions of the blood brain barrier. Front Neurosci, 2014. 8: p. 392.
4. Nagy, I., et al., Membrane Transporters in Physiological Barriers of Pharmacological Importance. Curr Pharm Des, 2016. 22(35): p. 5347-5372.
5. Wilhelm, I., et al., Foe or friend? Janus-faces of the neurovascular unit in the formation of brain metastases. J Cereb Blood Flow Metab, 2018. 38(4): p. 563-587.
6. Krizbai, I.A., et al., Pharmaceutical Targeting of the Brain. Curr Pharm Des, 2016. 22(35): p. 5442-5462.
7. Liebner, S., et al., Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. Acta Neuropathol, 2018. 135(3): p. 311-336.
8. Wang, Q.P., et al., A diffusion barrier between the area postrema and nucleus tractus solitarius. Neurochem Res, 2008. 33(10): p. 2035-43.
9. Morita, S., et al., Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain. Cell Tissue Res, 2016. 363(2): p. 497-511.
10. Winkler, E.A., et al., Blood-spinal cord barrier pericyte reductions contribute to increased capillary permeability. J Cereb Blood Flow Metab, 2012. 32(10): p. 1841-52.
11. Winkler, E.A., R.D. Bell, and B.V. Zlokovic, Central nervous system pericytes in health and disease. Nat Neurosci, 2011. 14(11): p. 1398-1405.
12. Mathiisen, T.M., et al., The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. Glia, 2010. 58(9): p. 1094-103.
13. Nyul-Toth, A., et al., Differences in the molecular structure of the blood-brain barrier in the cerebral cortex and white matter: an in silico, in vitro, and ex vivo study. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016. 310(11): p. H1702-14.
14. Attwell, D., et al., What is a pericyte? J Cereb Blood Flow Metab, 2016. 36(2): p. 451-5.
15. Lundgaard, I., et al., White matter astrocytes in health and disease. Neuroscience, 2014. 276: p. 161-73.
16. Wilhelm, I. and I.A. Krizbai, In vitro models of the blood-brain barrier for the study of drug delivery to the brain. Mol Pharm, 2014. 11(7): p. 1949-63.
17. 17. Eisen, M.B., et al., Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(25): p. 14863-8.
18. Uchida, Y., et al., Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. J Neurochem, 2011. 117(2): p. 333-45.
19. Wilhelm, I., et al., Heterogeneity of the blood-brain barrier. Tissue Barriers, 2016. 4(1): p. e1143544.
20. Ransohoff, R.M., et al., Neuroinflammation: Ways in Which the Immune System Affects the Brain. Neurotherapeutics, 2015. 12(4): p. 896-909.
21. Wilhelm, I., et al., Role of pattern recognition receptors of the neurovascular unit in inflamm-aging. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017. 313(5): p. H1000-H1012.
22. Hawrylycz, M.J., et al., An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. Nature, 2012. 489(7416): p. 391-399.
23. Kasukawa, T., et al., Quantitative expression profile of distinct functional regions in the adult mouse brain. PLoS One, 2011. 6(8): p. e23228.
24. Zhang, Y., et al., An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. J Neurosci, 2014. 34(36): p. 11929-47.
25. Vanlandewijck, M., et al., A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. Nature, 2018. 554(7693): p. 475-480.