



XXXI. OTDK BIOLÓGIA SZEKCIÓ

Melanómasejtek transzmigrációs útvonalainak vizsgálata in vitro vér-agy gát modellen

Várhelyi Zoltán Pál

Biológus MSc szakos hallgató

2. évfolyam

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar

SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT
Biofizika Intézet

Témavezető: Dr. Krizbai István

Tudományos főmunkatárs

MTA SZBK, Biofizikai Intézet

Molekuláris Neurobiológiai Csoport

Konzulens: Dr. Fekete Éva

Egyetemi tanár

SZTE, Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

Szeged, 2012.

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK.....	2
2. RÖVIDÍTÉSEK.....	3
3. BEVEZETÉS.....	5
3.1. A melanóma karakterisztikája, patológiai sajátosságai.....	5
3.2. A vér-agy gát szerkezeti felépítése.....	5
3.2.1. Szoros kapcsolat.....	7
3.3. Sejtes elemek bejutása a központi idegrendszerbe	9
3.3.1. Leukociták átvándorlása az endotélrétegen.....	9
3.3.2. Tumorsejtek átvándorlása az endotélrétegen	10
3.3.3. A melanómasejtek és agyi endotélsejtek közötti interakciók	12
4. CÉLKITŰZÉSEK.....	16
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	17
5.1. Sejtkultúra	17
5.2. Transzmigrációs kísérletek	17
5.3. Immunofluoreszcens mikroszkópiás képalkotás.....	18
5.4. Transzendoteliális elektromos ellenállás (TEER) mérése	18
5.5. Transzmissziós elektronmikroszkópia	18
5.6. Western blot analízis.....	19
6. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK	20
6.1. Melanómasejtek transzendoteliális migrációjának vizsgálata in vitro vér-agy gát modellen.....	20
6.2. Melanómasejtek hatása a transzendoteliális elektromos ellenállásra.....	20
6.3. A szoros kapcsolatok fehérjéinek változásai melanómasejtek hatására...	21
6.4. A transzcelluláris migrációs útvonal vizsgálata	23
7. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	25
8. ÖSSZEFOGLALÁS	27
9. IRODALOMJEGYZÉK	29
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	36
11. NYILATKOZAT	37

2. RÖVIDÍTÉSEK

AJ: adherens junction

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

bFGF: basic fibroblast growth factor

BSA: bovine serum albumin

CCR: C-C chemokine receptor

CAR: coxsackievirus and adenovirus receptor

CLMP: coxsackie- and adenovirus receptor-like membrane protein

CMAC: 7-amino-4-chloromethylcoumarin

CPT-cAMP: 8-(4-chlorophenyl)thio-cyclic adenosine monophosphate

EBM-2: endothelial basal medium -2

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EGM-2: endothelial cell growth medium-2

ESAM: endothelial cell-selective adhesion molecule

FBS: fetal bovine serum

GDNF: glial cell line-derived neurotrophic factor

GUK: guanylate kinase

hCMEC/D3: human Cerebral Microvascular Endothelial Cells, D3 clonal population

HRP: horseradish peroxidase

JAM: junctional adhesion molecule

KIR: központi idegrendszer

MAGUK: membrane-associated guanylate kinase

MEM: minimum essential medium

MLCK: myosin light-chain kinase

MMP: matrix metalloproteinases

MTf: melanotransferrin

NGF: nerve growth factor

NT: neurotrophin

PBS: phosphate buffered saline

PDZ: post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (DlgA) and ZO-1 protein

PKC: protein kinase C

PVDF: polyvinylidene difluoride

RBEC: rat brain endothelial cell
GTPase: guanosine triphosphatase
ROCK: rho-associated protein kinase
RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium
TBS-T: Tris buffered saline with 0,1% Tween-20
TEER: transendothelial electrical resistance
TGF-B2: transforming growth factor-beta 2
TJ: tight junction
VCAM-1: vascular cell adhesion molecule -1
VEGF: vascular endothelial growth factor
ZO: zonula occludens

3. BEVEZETÉS

3.1 A melanóma karakterisztikája, patológiai sajátosságai

A tumorok egészségügyi kockázatát jól példázza, hogy jelenleg Magyarországon és külföldön is a vezető halálokok között szerepelnek a daganatos megbetegedések, rögtön a szív- és érrendszert érintő betegségek után [1]. A bőrrák az egyre gyakrabban megjelenő tumortípusok közé tartoznak, ám nagyrésztük a korai felismerhetőség miatt könnyen gyógyítható [2]. Közülük a melanoma malignum (melanóma) az, amely napjainkban egyre nagyobb figyelmet kap mind az onkológusok, mind a népesség körében. Ez a melanóma incidenciái és patológiás sajátosságainak köszönhető.

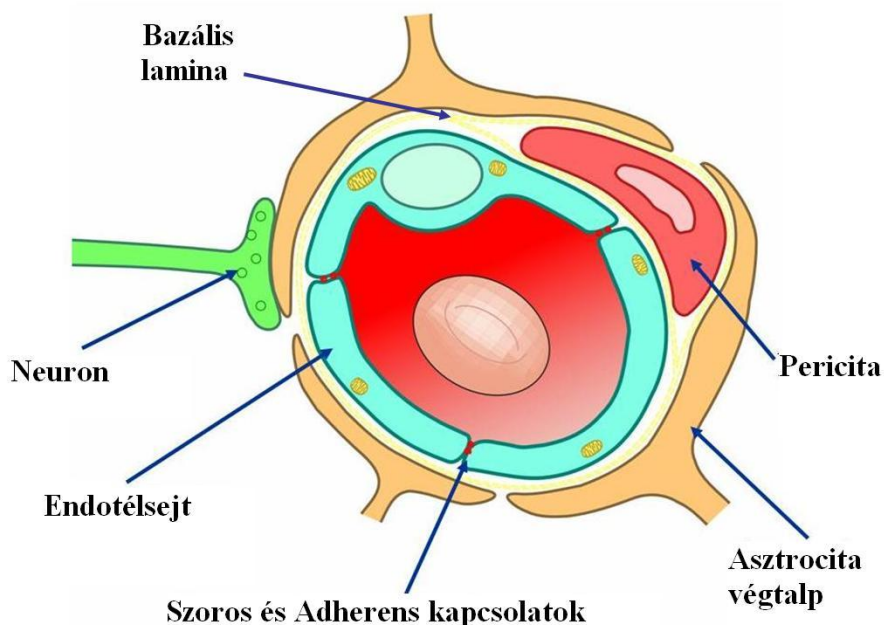
A melanóma a bőr pigmenttermelő sejtjeiből, a melanocitákból fejlődik ki. Kinézete legtöbbször anyajegyszerű, jellemzően szabálytalan körvonallal és pigmentáltsággal, megjelenése azonban változatos lehet [3]. Ezen jellemzők miatt sokszor nehéz elkülöníteni az anyajegyektől vagy az ép bőrfelszíntől, ami felismerését nehezíti. A melanóma esetében az időben történő észrevétel és eltávolítás kritikus az áttétek megelőzésének szempontjából, hisz a tumor erősen invazív jellegű és akár kialakulásától számított fél éven belül képes áttétet képezni a szervezetben [4]. Statisztikai adatok alapján az is megállapítható, hogy a metasztázisok többsége (az összes metasztázis közel 40%-a) a központi idegrendszert (KIR) érinti [4].

Mivel a KIR nem rendelkezik nyirokkeringéssel, ezért a molekulák és sejtek a vérkeringést kihasználva képesek szövetbe jutni. A vér és az agyi parenchyma határfelületén található a vér-agy gát, amelynek ismerete azért igen fontos a melanómakutatás szempontjából, mert a tumorsejtek főleg ezen a támadási ponton keresztül képesek a vérből a központi idegrendszerbe behatolni.

3.2 A vér-agy gát szerkezeti felépítése

A vér-agy gát a KIR homeosztázisa szempontjából elengedhetetlen, fő feladata egy aktív határfelület létrehozása a vér és a központi idegrendszer között. Ennek a több sejttípusból álló képletnek a lényegi részét egy cerebrális endotélsejtekből álló egysejtréteg képezi [5]. Az endotélsejtek apikális felszínhez közel lokalizálódó szoros kapcsolat (tight junction; TJ), és az ez alatt húzódó adherens kapcsolat (adherens junction; AJ) alkotja a vér-agy gát fizikai részét. A két funkció integritása nagyban meghatározza a paracelluláris permeabilitás mértékét. A fizikális gát mellett az endotélsejtek képesek olyan enzimek előállítására, melyekkel metabolikus gátat képeznek a KIR-re potenciálisan káros

molekulákkal szemben [6]. Ezen enzimek mellett speciális efflux pumpák (köztük multidrog rezisztancia proteinek) is részt vesznek a nemkívánatos molekulák és gyógyszerek KIR-be történő beáramlásának megakadályozásában [7].



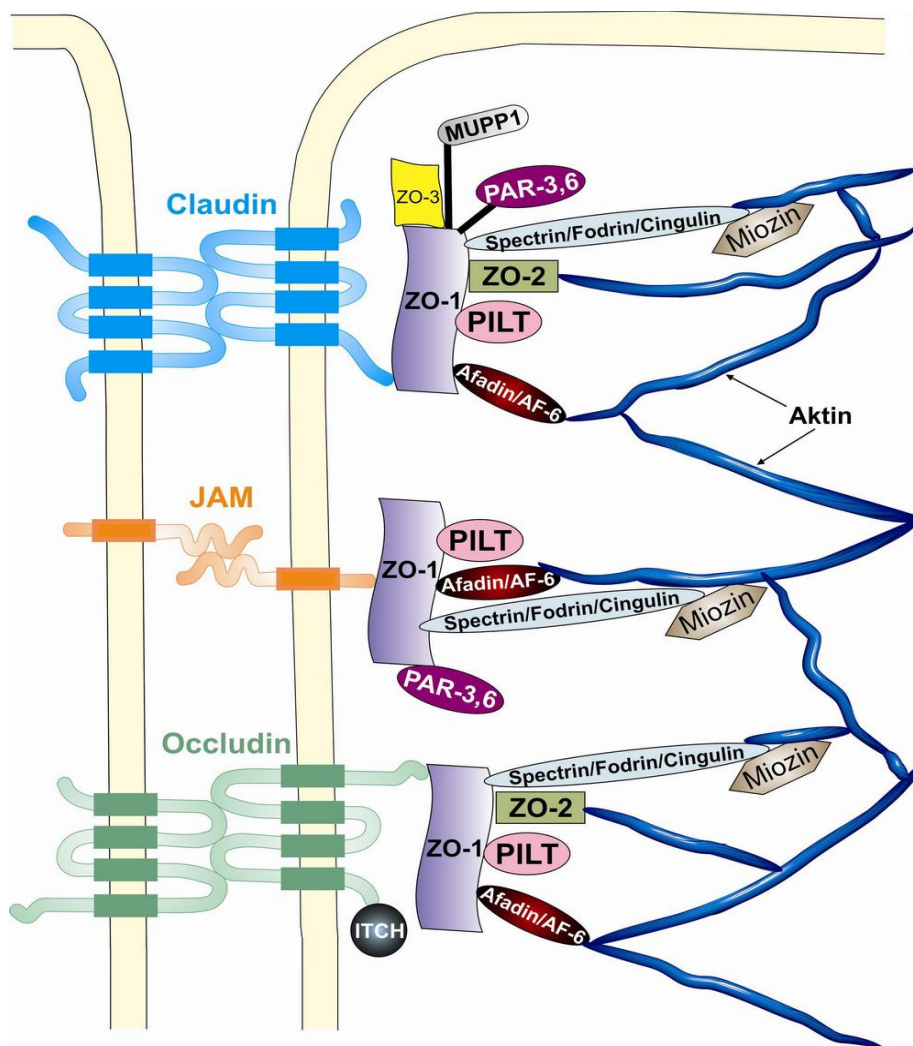
1. ábra: A neurovaszkuláris egység sémája (Armin Kübelbeck (<http://www.hbz-da.de/cms/pmwiki.php?n=Bezirk.ArminK%fcbelbeck>) után, a szerző által módosítva)

Az agyi endotélsejtek vér-agy gát tulajdonságainak kialakítása és fenntartása szempontjából a KIR más sejtjeinek is fontos szerep jut. A periciták a mikroerek falában található sejtek, melyek a vér-agy gát környékén nagyobb arányban fordulnak elő, mint a kardiovaszkuláris rendszerben bárhol máshol. Szerepük van a vazoregulációban és az erek permeabilitásának szabályozásában [8]. Az asztrociták a KIR-re jellemző, jellegzetes morfológiájú gliasejtek. Az asztrociták végtalpaikkal körülölelik a vér-agy gát bazális membránját. Ez a kapcsolat a vér-glia anyagáramlás ellátása mellett bizonyos fokú támasztást is biztosít az ereknek [8]. Pontos funkciójuk a vér-agy gát szabályozásában nem ismert, ám az általuk termelt faktorok (pl.: GDNF, angiopoietin-1) fontosságát több in vitro vér-agy gát modellben kimutatták [8,9].

A sejtes elemek mellett a vér-agy gát részét képezi az endotéliumot abluminális irányból takaró bazális lamina [8]. A bazális laminához rögzülnek az endotélsejtek, emellett feladata a periciták körülfogása, valamint a KIR-rel határos oldalán az asztrocita végtalpakkal való kapcsolat kialakítása.

A vér-agy gát fő részét tehát az endotélsejtek és kapcsolataik alkotják, ám megfelelő működéséhez sok egyéb sejtre és extracelluláris molekulára van szükség. Ilyenek a fentebb tárgyalt periciták, az asztrociták, a bazális lamina alkotók, amelyeket összefoglalóan neurovaszkuláris egységnek hívjuk (1. ábra).

3.2.1. Szoros kapcsolat



2. ábra: A szoros kapcsolat szerkezete (Forrás: Nyúl-Tóth Ádám rajza)

A TJ a paracelluláris gát legfontosabb alkotóeleme (2. ábra). Feladata a vízdékony elemek és ionok sejtek közötti szabad mozgásának korlátozása (gát (barrier) funkció). A megfelelő anyagok vérből az agyba történő átjutását így az endotélsejtek szabályozhatják különböző transzcelluláris transzport folyamatokkal. A TJ egy másik funkciója az ún. kerítés (fence) képzés, amely megakadályozza a lipidek és fehérjék szabad diffúzióját a membránban, ezáltal segít fenntartani a szoros kapcsolattal rendelkező sejt polaritását [10,11].

A TJ-t alkotó fehérjék a sejtkapcsoló struktúrán belüli elhelyezkedésük és funkciójuk alapján két részre oszthatóak: az egyik az intercelluláris kapcsolatokat fenntartó transzmembrán fehérjék csoportja, a másik az intracelluláris plakk fehérjék csoportja. A transzmembrán fehérjék közé több molekula családot sorolunk: az occludint, a claudinokat és a junkcionális adhézis molekulákat vagy JAM-eket.

Ezek közül először a 65 kDa-os occludint írták le 1993-ban [12]. Szerkezetileg négy domén alkotja: két extracelluláris hurok található a membrán külső oldalán, valamint egy hosszabb karboxi- (C) és egy amino-terminális (N) domén, melyek a citoplazmában helyezkednek el. A hurkok feladata az intercelluláris kapcsolat kialakítása a szomszédos sejt occludin molekuláival, míg a C-terminális domén az occludin intracelluláris fehérjéken (cingulin, ZO fehérjék) keresztül történő aktin citoszkeletonhoz való rögzítéséről, illetve az egyes szignál fehérjékkel (pl.: c-YES, PKC) való kapcsolatáról gondoskodik [10]. Az occludin lényeges modulátor funkciót is betölt a szoros kapcsolatokon belül, azonban azok kialakításában nem esszenciális [13].

A claudin molekulacsaládot nem sokkal az occludin után fedezték fel [14]. A 18-27 kDa tömegű claudinok szerkezetileg hasonlítanak az occludin molekulára, de szekvencia homológia nincs köztük [10]. Az ide tartozó fehérjék rövid C-terminálissal rendelkeznek, illetve PDZ-kötő motívumot tartalmaznak, amely a PDZ doménnel rendelkező plakk fehérjéket (ZO-1,-2,-3) köti. Az extracelluláris hurkok közül az első jóval nagyobb, mint a második [10]. Szerepüket tekintve a claudinok a paracelluláris permeabilitás fő szabályozójaként a TJ gerincének is tekinthetők [10]. A vér-agy gát szempontjából a legfontosabb claudin molekula a claudin-5 [15].

A 30-40 kDa tömegű JAM molekulák az immunglobulin (Ig) szupercsalád részei. Extracellulárisan az N-terminális után két Ig szerkezetre emlékeztető domén helyezkedik el [16]. Ezek a transzmembrán régióhoz kapcsolódnak, amely egy hosszú, PDZ kötő aleggységgel rendelkező intracelluláris C-terminálisban végződik. A családon belül két csoportot, a II-típusú (JAM A-t (1), B-t (2/3) és C-t (2/3)), és az I-típusú (CAR, ESAM, JAM-4 és CLMP) PDZ-kötő doménnel rendelkező fehérjéket különböztetjük meg [10]. Funkciójukat tekintve igen változatos folyamatokban vesznek részt. Ilyen a homofil kapcsolatok létrehozása más JAM fehérjékkel [16], vagy a leukociták adhéziójának és migrációjának szabályozása [17]. A vér-agy gát alkotásában a II-típusú PDZ-kötő doménnel rendelkező JAM molekulák vesznek részt [18].

A TJ intracelluláris fehérjéi a plakk molekulák. Ezek fő szerepe a transzmembrán fehérjék citoszkeletális elemekhez (pl.: aktin filamentumhoz) történő rögzítése.

Szerkezetük alapján két csoportra különíthetők, a 80-90 aminosav alkotta PDZ domént tartalmazó, és a PDZ doménnel nem rendelkező plakkk fehérjékre [10].

A legfontosabb plakkk molekulák a zonula occludens, azaz a ZO-1, -2 és -3 fehérjék, melyek a MAGUK (membrane associated guanylate kinase) proteinek családjába tartoznak. A MAGUK fehérjék fontos ismertetőjegye, hogy egy tirozin kináz homológ SH3 domént, valamint egy guanilát kináz (GUK) régiót is tartalmaznak a PDZ domének mellett [10]. A ZO-1 a szoros kapcsolatok számos fehérjéjével (occludin, claudin, JAM, ZO fehérjék), az adherens kapcsolatokba található α -cateninnel és az aktinnal is képes kapcsolatot létesíteni [18]. A ZO fehérjék a sejt proliferációjának és differenciációjának szabályozásában is aktívan részt vesznek [10].

3.3. Sejtes elemek bejutása a központi idegrendszerbe

3.3.1. Leukociták átvándorlása az endotélrétegen

A daganatos sejtek átvándorlása az ereket bélelő endotélsejtek rétegén egy kevésbé ismert folyamat, amely azonban számos hasonlóságot mutathat a fehérvérsejtek transzendoteliális migrációjával [17]. A kilépést megelőzően a leukociták a vér többi alakos eleméhez hasonlóan a vérplazmával együtt áramlanak az erekben, majd a kilépés helyszínéhez közeledve a véráram marginális régiójába vándorolnak (margináció) [17]. Az extravazációs folyamat megkezdésében lokalizációs szignálmolekulák expresszálása által az endotélsejtek is részt vesznek [17].

A leukocita kilépési folyamat három fő lépésre bontható, ezek: gördülő adhézió az érfalon, kitapadás az endotélsejtekhez és végül a leukociták endotélium rétegen való diapedézise [17]. A margináció során lelassult leukociták sejtfelszíni molekuláikkal laza kapcsolatot létesítenek az endotélium sejtjeivel. A leukociták az áramlás hatására tovább gördülnek az érfal felszínén, folyamatosan újabb laza kapcsolatokat hozva létre haladás közben. Ezt a folyamatot nevezzük gördülő adhéziónak [19]. A gördülő adhézió során létrejövő kapcsolatok szelektin molekulákon keresztül valósulnak meg [17].

A extravazáció második lépésében, a kitapadásban a leukociták stabilan, nagy affinitású kötésekkel rögzülnek az endotélsejtekhez [17]. A kitapadásban molekulárisan a leukociták membránjában található integrin fehérjék és az endotélsejtek felszínén expresszált intercelluláris adhéziós molekulák játszanak szerepet. Az integrinek mellett manapság növekvő számú bizonyíték mutat arra, hogy a galektin molekulacsalád tagjai is részt vesznek az extravazációs folyamatban [21,22].

A leukociták kétféle módon juthatnak át az endotéliumon: vagy a sejteken keresztül, azaz transzcellulárisan, vagy a sejtek között, paracellulárisan [17]. A paracelluláris útvonalon két endotélsejt között migrálnak, azaz mind a TJ, mind az AJ szerkezetén át kell haladniuk. Ezt az endotélsejtek közötti junkciók átmeneti megszakításával érik el, melyek helyét a leukocita megfelelő adhézis fehérjéi veszik át [23]. A transzcelluláris diapedézis folyamata kevésbé ismert, mint a paracellulárisé. A jelenlegi adatok szerint transzcellulárisan gyorsabban jutnak át a leukociták. Az, hogy milyen típusú fehérvérsejt mikor használja ezt az utat, valószínűleg az endotélium típusától és a környezetben lévő jelmolekuláktól függ [23,24,26]. Bizonyos sejtadhéziós molekulák szintén fontos szerepet látnak el a transzcelluláris migráció során [25]. Ha a leukociták sikeresen átjutottak az érendotéliumon, annak túloldalán a bazális membrán által jelentett akadályba ütköznek. Ezen a szekretált mátrix-metalloproteinázok (Matrix-metalloproteinase; MMP) segítségével képesek áttörni [27].

A leukociták vérből KIR-be történő kilépése eltér a más szerveknél tapasztalt sémától [17,28]. Fiziológias körülmények között az agyi területekre csak kis mennyiségű fehérvérsejt jut be, az általános agyi immunörjárat részeként [28]. Ez a vér-agy gát nagyfokú anyag- és sejtáramlást limitáló jellegéből adódik.

3.3.2. Tumorsejtek átvándorlása az endotélrétegen

A tumorok metasztázisának extravazációs lépése összetett folyamat, mely nagy vonalakban megegyezik ugyan a fehérvérsejtek kilépési mechanizmusával, részleteiben mégis eltér attól. Statisztikai adatok alapján megállapítható, hogy egyes tumortípusok nagyobb valószínűséggel képeznek bizonyos szövetekben metasztázist, mely jelenség háttérében kemoattraktánsként ható kemokin molekulák állhatnak [29,30].

A tumorok gördülő adhézis mechanizmusa hasonlít a fehérvérsejtekéhez, de az extravazáció megfigyelése során tapasztaltak eltéréseket, mely alternatív molekuláris folyamatok meglétére engednek következtetni [20]. A daganatos sejtek receptorai, és az endotélsejteken található ligandok közötti specifikus kapcsolatok magyarázatot adhatnak a tumor típusok különböző áttétképzési sajátosságaira is [31]. Több tanulmány szerint is találhatóak E-szelektin ligandok a tumorsejtek felszínén, melyekkel képesek voltak gördülő adhéziót és migrációt végrehajtani E-szelektineket expresszáló endotélium rétegen [17]. A tumorsejtek egy része továbbá képes lehet leukocitákon keresztül is kapcsolatba lépni az endotéliummal, bizonyos típusú metasztatikus sejteknél pedig N-cadherin által mediált gördülő adhézis mechanizmust is leírtak [32].

Az integrinokkal szemben a tumorsejtek kitapadási mechanizmusában a fehérvérsejtekével megegyező galektin adhéziós receptorok vehetnek részt [34]. Az elmúlt években tett megfigyelések alapján úgy tűnik, hogy a tumor sejtfelszíni fehérjék megváltozott glikoziláltsága, illetve a tumorsejtek glikoproteineknek való kitettsége elősegítheti az endotéliumhoz való kötődésüket [22].

A transzmigráció folyamán a tumorsejteknek át kell jutniuk az endotélium által képzett akadályon. A daganatos sejtek mérete jóval nagyobb a leukocitákénál, ezért nehezen jutnak át az endotélsejteken keresztül vagy az azok közötti kisméretű réseken az endotélium károsítása nélkül. A tumorsejtek paracelluláris transzmigrációs mechanizmusában az N-cadherin is szerepet játszik [17].

Az áttétképző sejtek transzcelluláris kilépés folyamatáról jelenleg igen keveset tudunk [20]. Az egyetlen tumor transzcelluláris migrációról rendelkezésre álló tanulmány a mellrák sejtek transzcelluláris intravazációjával foglalkozik. Ezen tanulmány szerint ebben a folyamatban az endoteliális miozin könnyű lánc kináz (myosin light chain kinase, MLCK) tölt be fontos szerepet [35]. Extravazáció során hasonló mechanizmust eddig még nem figyeltek meg.

A leukocitákhoz hasonlóan a tumorsejteknek roncsolniuk kell a bazális laminát ahhoz, hogy a környező szövetekbe tudjanak jutni. Tumorsejteknél ezt elősegítő molekulák a különböző MMP-k és egyéb proteázok, amelyek a bazális lamina fő összetevőit bontják [38]. Az MMP-k termelődésének gátlását célzó kísérletek azt mutatják, hogy a fehérjék expresszióját akadályozva a tumor metasztatikus képessége is romlik [36,37].

A metasztatikus sejtek többféle migrációs mechanizmusra képesek, ezért változatos környezeti körülmények között is képesek lehetnek vándorolni. A mozgástípusok közötti váltást a Rho GTP-ázok által mediált útvonalak felügyelik [39]. Mivel ezek a fehérjék igen széleskörű szabályozó szerepet töltenek be, ezért nem meglepő, hogy a motilitás kontrollján kívül szerepet játszanak más tumormigrációval kapcsolatos folyamatokban is. Néhány tanulmány azt sugallja, hogy a RhoA és a RhoC a ROCK-on (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase) keresztül részt vesz az extravazáció szabályozásában [20].

3.3.3. A melanómasejtek és az agyi endotélsejtek közötti interakciók

A tumorsejtek motilitásásával és migrációjával kapcsolatban napjainkban igen gazdag ismeretanyag áll rendelkezésre, ám a metasztázisképzés folyamata részleteiben mégis kevésbé ismert. A daganatos sejtek extravazációjával kapcsolatos kísérletekben ritkán alkalmaznak agyi endotélsejteket, így a tumorsejtek és az agyi endotélium interakcióiban résztvevő specifikus mechanizmusokról szintén hiányosak ismereteink. A daganatok közül a melanóma rendelkezik a legnagyobb központi idegrendszeri affinitással. A következőkben a melanómasejtek agyi áttétképzéséről és annak molekuláris hátteréről alkotott jelenlegi képünket szeretném részletesebben bemutatni.

A melanómasejtek agyi transzmigrációs sémája főbb lépéseiben hasonlít más agyi áttétet képző tumorokéhoz. Agyi metasztázisok esetén a tumorsejtek legtöbbször a kapillárisokban, illetve a posztkapilláris venulákban tapadnak ki, ahol az egyes erek átmérője megközelíti az tumorsejtek nagyságát [41,64]. Jelenlegi ismereteink szerint a tumorsejtek agyi extravazációja jelentősen hosszabb időt vesz igénybe a más szerveknél tapasztaltakhoz képest. A melanómasejtek agyi erekből való kilépése akár 14 napig is tarthat, a makrometasztázisokat kialakító sejtek azonban a kitapadástól számított harmadik nap végére már elhagyják az érlumet [64]. Valószínűsíthető, hogy a folyamat diapedézis része gyorsan lezajlik [42], az endotéliumhoz kitapadt tumorsejteknek tehát az agy esetében hosszabb ideig kell túlélnie az véráramban, mint más szerveknél [41]. Eközben a tumorsejtek membránján folyamatos nyúlványképződés és -regresszió tapasztalható, mely a kilépési folyamat dinamikus voltára utal [64].

Az endotélsejtek tumorsejt extravazációhoz történő hozzájárulása szintén szerv-specifikus tulajdonságokat mutat. Az agyi endotélium más szerveknél tapasztaltakkal szemben nem takarja be a sikeresen transzmigrált tumorsejteket, inkább az endotélsejtek visszahúzódása jellemző a transzmigráció helyéről [42]. Az eddigi ismeretek azt a kérdést is felvetik, hogy az endotélréteg a leukocita extravazációhoz hasonlóan intakt marad-e a tumorsejtek átvándorlását követően, vagy pedig strukturális sérülést szenved. Ennek megválaszolását nehezíti, hogy a vér-agy gát szerkezete a metasztatikus sejtek transzmigrációját követően idővel helyreállhat, ahogy az a mikrometasztázisok által képzett léziók esetében is tapasztalható volt [43].

A tumor- és endotélsejt kapcsolatokban és a metasztázisképzésben szerepet játszó molekulák általánosan rosszul karakterizáltak, és az agyi endotélium-specifikus mechanizmusokról még ennél is kevesebb ismeret áll rendelkezésre. A tumorsejtek részben

képesek a leukociták gyulladásos extravázációját segítő molekuláris mechanizmusok kihasználására transzmigrációjuk folyamán. A transzmigráció folyamatában mind az endotélsejtek, mind a melanómasejtek felszínén lévő molekulák részt vehetnek. Ezen molekulák közül érdemes kiemelni a melanotranszferrint, amely egy elsőként melanómasejtekben kimutatott transzmembrán fehérje. A melanotranszferrin expressziós szint a melanómasejtek vér-agy gáton való transzmigrációs képességével erős korrelációt mutat, míg a fehérjét blokkolva a transzmigrációban szignifikáns csökkenés tapasztalható. A melanotranszferrin valószínűsíthetően a plazmin-metalloproteináz rendszeren keresztül befolyásolja a transzmigráció sikerességét [37].

Agyi eredetű szolúbilis faktorok szintén fontos szerepet játszhatnak a központi idegrendszerbeli metasztázisok kialakulásában. Ez a melanómasejtek esetén különösen igaznak tűnik, hisz az agyi metasztázisok nagyarányú kialakulása mögött valószínűsíthetően eddig ismeretlen kemoattraktáns hatás áll, melyet a melanociták idegsejtekkel közös embriológiai eredete is alátámasztani látszik [45]. Ilyen molekulák például egyes neurotrofinok és kemokinek.

A neurotrofinok közé soroljuk a neuronális növekedési faktort (NGF), az agyi eredetű neurotrofinikus faktort (BDNF) valamint a neurotrofin-3-at és -4/5-öt is (NT-3,-4/5). Ezek a fehérjék olyan növekedési faktorok, melyek a neuronok túlélését, differenciációját és sejthalálát is szabályozzák. Emellett a központi idegrendszerben metasztázist képző melanómasejtek invazivitása és túlélési jellemzői is nagyfokú függést mutatnak bizonyos neurotrofinok jelenlététől, melyet a központi idegrendszert alkotó sejtek maguk szekretálnak. Sőt az agyi metasztatikus melanómasejtek akár saját maguk is indukálhatják az neurotrofinok központi idegrendszerbeli felszabadulását [46].

A kemokinek és receptoraik hatását szintén vizsgálták az agyi metasztázisok során. Egy nemrégiben megjelent átfogó tanulmány számos kemokin receptort és ligand expresszióját igazolta a melanómasejtekben, köztük a CCR3-ét és a CCR4-ét. Ezek közül a CCR4 emelkedett szinten termelődött az agyi metasztázist képző melanómatípusok esetében. A CCR4 CCL22 ligandján keresztül az Akt szignalizációs útvonalat képes aktiválni, mely valószínűleg szintén részt vesz az agyi metasztázisok kialakításában [47]. Emellett agyi eredetű szolúbilis faktorok megnövekedett CCR3 és a CCR4 expressziót okoztak melanómasejtekben, és megnövelték cerebrális mikrovaskuláris endotéliumon keresztüli transzmigrációs képességüket is [48]. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az agyi mikro környezet elemei nem csak a már kialakult agyi metasztázisoknak kedveznek, hanem a vér-agy gáton transzmigráló melanómasejtekre is előnyösen hathatnak.

A melanóma agyi metasztázisképzésében több proteolitikus enzim részvétele is feltételezett, melyek főleg a bazális membrán lebontásában vesznek részt. Ilyenek egyes MMP-k, a plazmin és a heparanáz. Ezeket a molekulákat főképp maguk a daganatos sejtek bocsátják ki, ám tumor indukciós hatásra az endotélsejtek és az asztrociták is képesek lehetnek expresszálni. Az MMP-k cink-dependens endopeptidázok, melyek az extracelluláris mátrix változatos fehérjeit és különböző bioaktív molekulákat is képesek bontani. Közülük főként az MMP-2 szerepét mutatták ki a melanóma agyi metasztázisképzésben [49]. A vér-agy gáton való áthaladásban és az agyi metasztázis kialakításában a fibrinolitikus rendszer is részt vehet, hiszen a plazmin gátlásának hatására szignifikánsan csökkent az agyi endotéliumon sikeresen transzmigrált melanómasejtek száma [50].

A heparanáz egy endoglikozidáz enzim, feladata a heparán-szulfát proteoglikánok lebontása. A heparanáz továbbá lényeges mediátora a tumorsejtek proliferációjának, inváziójának, metasztázisának és angiogenezisének. Az enzim utóbbi hatásait extracelluláris mátrix átépítésén, növekedési faktorok, kemokinek és angiogenikus faktorok felszabadításán, bioaktív sejtfelszíni heparin-szulfát fragmentumok hasításán és nem-ezimikus szignalizációs folyamatok aktiválásán keresztül fejti ki [51]. A heparanáz fontos szerepet tölt be a melanómasejtek agyi metasztázisa során is [52], de meglepő módon a fehérje magas exogenikus koncentrációjának hatására csökkent a melanómasejtek invazivitása [53]. A melanómasejtek mellett asztrociták is előállíthatják a heparanázt, mely szintén hozzájárulhat a melanómasejtek agyi metasztázisképzéséhez [54].

A sejtes elemek endoteliális vagy epiteliális transzmigrációja fiziológiásan és patológiásan is komplex szabályozás alatt áll. Tumorsejtek transzmigrációja során mind az endotél-, mind pedig a tumorsejtek aktív részvétele szükséges. Az ebben szerepet játszó szignalizációs útvonalak molekuláris mechanizmusainak vizsgálata újabb rákterápiás szerek kidolgozását segítheti elő.

Az endothelin receptor B egy G-protein kapcsolt receptor mely a foszfatidilinozitol-calcium másodlagos hírvivő rendszeren keresztül fejti ki hatását. A fehérje melanómasejtekbeli túlexpressziójának következtében megnövekedett a spontán melanómaáttétek száma a központi idegrendszerben [56]. A TGF- β 2 citokin szintén elengedhetetlennek bizonyult a parenchymális melanómametasztázisok kialakulásának szempontjából. A molekula hiányában a K-1735 egér melanómasejtek agyi metasztázisképzési képessége szignifikánsan csökkent [57]. A Stat3 transzkripciós faktor aktivációja az agyi metasztázisok kialakulása mellett az invázióban és az angiogenezisben

részt vesznek a bFGF, VEGF és az MMP-2 expresszió diszregulációján keresztül [49]. A MAP kinázok által mediált útvonalak kritikus szerepét a primer és metasztatikus melanóma esetében is kimutatták. Közülük a melanómasejtek által kondicionált médiummal kezelt endotélsejtekben az ERK 1/2 aktivációja tapasztalható [55]. A fentiek mellett olyan szignalizációs molekulák szerepe is felvetődött a melanómasejtek agyi metasztázisképzésében, melyek részvétele eddig csak más szerváttéteknél bizonyított, ilyen például a p-glikoprotein [58].

4. CÉLKITŰZÉSEK

A melanóma a bőr pigmenttermelő sejtjeiből kiinduló rosszindulatú daganat, amely igen gyakran ad agyi áttétet. Mivel a központi idegrendszer nem rendelkezik nyirokkeringéssel, az agyi parenchyma metasztázisai csupán hematogén úton keletkezhetnek. Ezen folyamat során a daganatos sejteknek át kell jutniuk a vér-agy gáton, amelynek morfológiai alapját az agyi mikroereket bélelő endotélsejtek képezik. Az agyi metasztázisok igen rossz prognózissal bírnak, ezért igen fontos azon mechanizmusok tisztázása, amelyek szerepet játszanak a melanómasejtek vér-agy gáton való átvándorlásában. A tumorsejtek extravazációja számos hasonlóságot mutat a fehérvérsejtekével. Ez utóbbiak képesek a sejtek között (a sejt-sejt kapcsolatok szintjén, paracellulárisan), de ugyanakkor az egyedi endotélsejteken keresztül (transzcellulárisan) is átvándorolni. Munkánk során arra kerestük a választ, hogy a melanómasejtek mely útvonalon jutnak át az agyi endotélsejtretegen. A következő célkitűzéseink voltak:

1. Egy in vitro modell létrehozása, amely alkalmas a tumorsejtek vér-agy gáton való átjutásának vizsgálatára.
2. Annak tisztázása, hogy a melanómasejtek az agyi endotélsejtek között, a szoros kapcsolatok károsítása révén jutnak-e be a központi idegrendszerbe.
3. Annak vizsgálata, hogy a transzcelluláris útvonal szerepet játszik-e a melanómasejtek vér-agy gáton való átvándorlásában.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1 Sejtkultúra

Az A2058 humán melanómasejteket (beszerzési hely: European Collection of Cell Cultures) 5% FBS-sel (Lonza) és Glutamax-szal (Invitrogen) kiegészített MEM-ben (Sigma) tenyésztettük. A B16/F10 egér melanómasejteket 5% FBS-sel (Lonza) és Glutamax-szal (Invitrogen) kiegészített RPMI médiumban (Sigma) tenyésztettük. A hCMEC/D3 [59] humán cerebrális endotélsejteket (human cerebral endothelial cells; rövidítve D3) patkányfarok-kollagén bevonatú csészéken tenyésztettük 2,5 % FBS-sel (Sigma) és EGM-2 Bullet Kit-tel (Lonza) kiegészített EBM-2 médiumban.

A primer patkány agyi endotélsejteket (primary rat brain endothelial cells; RBECs) két hetes patkányokból izoláltuk az előzetes leírásnak megfelelően [60,61]. Közvetlenül az agyhártya eltávolítása után a két cerebrális félteke kéregállományát apró darabokra vágtuk, majd 1 mg/ml-es 2-es típusú kollagenáz (Sigma) oldatban inkubáltuk 75 percig 37 C°-on. A minta mielőtt 20%-os BSA-ban történő centrifugálással való megtisztítása után egy második emésztés történt 1 mg/ml-es kollagenáz-diszpáz (Roche) eleggyel 37 C°-on 50 percig. Ezután Percoll gradiensben (Sigma) történő 1000-g-s 10 perces centrifugálással kinyert mikroér fragmentumokat fibronectin-kollagén eleggyel bevont csészékre helyeztük. Az érfragmentumokból kinyert endotélsejteket 10% plazma-eredetű szérumot (plasma derived serum; PDS, First Link), valamint növekedési faktorokat tartalmazó DMEM/F12 – ben (Invitrogen) tenyésztettük. Az esetleges nem endoteliális sejtek eltávolítása érdekében az első két nap folyamán 4 µg/ml puromycint adtunk a kultúrához.

A primer cerebrális endotélsejtek izolációját a nemzeti és nemzetközi laborállat gondozási és használati irányelveknek szigorúan eleget téve végeztük el. A protokollt a Csongrád Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága jóváhagyta (Engedély Száma: XVI./03839/001/2006). Az állatok szenvedésének minimalizálására minden erőfeszítést megtettünk.

5.2 Transzmigrációs kísérletek

A transzmigrációs kísérletekhez a primer RBEC-ket gyengén tripszinizáltuk, majd fibronectin/kollagén bevonatú filter inszertekre (8 µm pórusméretű, 1,13² cm-es filter; Millipore) helyeztük, melyek egy 12 well-es lemezbe kerültek. A konfluens állapot elérése után a junkciók szorosabbá tételének érdekében az endotélsejtek apikális oldalára 550 nM hidrokortizont, 250 µM CPT-cAMP-t (Sigma) és 17,5 µM RO-201724-t (Roche), míg a

bazolaterális részre asztrocita kondicionált médiumotadtunk 24 órára.

A megfelelő TEER értékek elérése után szérumentes médiumban 10^5 melanómasejtet a filterek apikális részébe juttattunk, míg a bazolaterális kompartmentumba 100 µg/ml I-es típusú kollagént tartalmazó szérumentes médium került. Ezután 200 µM Pefabloc[®]-otadtunk mind az apikális, mind a bazolaterális kompartmentumba. A sejtek 5 óra inkubációs idő után etanol/ecetsav elegyével lettek fixálva, majd a sejteket a filter felső részéből egy vattapálcikával eltávolítottuk. Az endotélrétegen és a pórusokon átvándorolt melanómasejteket ezután megszámoltuk.

5.3 Immunfluoreszcens mikroszkópiás képalkotás

A RBEC sejteket (0 vagy 1-es passzázs számú) a konfluencia eléréséig kollagén/fibronectin bevonatú üveg fedőlemezen tenyésztettük. A melanómasejteket (A2058 vagy B16/F10) fluoreszcensen jelöltük CellTracker[™] Blue CMAC (Invitrogen) segítségével, majd ezt követően az endotélsejtek rétegére helyeztük. 5 óra inkubációs idő után a sejteket mostuk, majd etanol/ecetsav elegyével fixáltuk. 30 perc 3%-os BSA (Sigma) oldattal történő blokkolás után a fedőlemezeket occludin, claudin-5 vagy ZO-1 (Zymed) elleni elsődleges antitestekkel inkubáltuk. A festéseket Cy3- és Cy5-konjugált másodlagos antitestek segítségével tettük láthatóvá. A fedőlemezeket fakulást gátló médium (anti-fading medium, Biomeda) felhasználásával ágyaztuk be, majd a jel eloszlását fluoreszcens mikroszkópia segítségével vizsgáltuk.

5.4 Transzendoteliális elektromos ellenállás (TEER) mérése

RBEC sejteket kollagén/fibronectin bevonatú szemipermeábilis membránon tenyésztettünk (0,4 µm pórusátmérő, 1,12 cm², Costar Corning Transwell Clear). A konfluens állapot elérése után az endotél egysejtrétegre 550 nM hidrokortizont, 250 µM CPT-cAMP-t (Sigma) és 17,5 µM RO-201724-t (Roche) juttattunk, majd a CellZscope[®] készülék (nanoAnalytics) asztrocita kondicionált médium tartalmú rekeszeibe helyeztük. Miután a TEER plató állapotot ért el, az inszert felső kompartmentumába 10^5 melanómasejtet helyeztünk, majd a TEER-t további 24 órán keresztül rögzítettük.

5.5 Transzmissziós elektronmikroszkópia

RBEC sejteket 8 µm pórusátmérőjű filter inszerteken tenyésztettünk. Ezt követően az endotél egysejtrétegre $2 \cdot 10^5$ A2058 melanómasejtet helyeztünk 5 órás inkubációs időre. PBS-sel történő mosás után a sejteket 1% formaldehid és 1% glutáraldehid 0,1 M foszfát

pufferben feloldott keverékével fixáltuk, majd 1% ozmium-tetroxid 0,1 M foszfát pufferrel képzett oldatával utófixáltuk. A fixált sejteket dehidratálás után Spurr gyantába ágyasztuk be. A vékony metszetek Leica ultramikrotóm segítségével készültek, és uranil-acetáttal, valamint ólom-citráttal lettek kontrasztosítva. Az előkészített metszeteket Zeiss 902 típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

5.6 Western blot analízis

A melanómasejteket konfluens agyi endotélsejt-rétegre (RBEC vagy D3) helyeztük majd szérummentes médiumban 24 órán át inkubáltuk. A sejteket ezután PBS-ben mostuk, majd jéghideg lízispufferbe kaparva (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1% nátrium-deoxykolát, 0,1% nátrium-dodecil-szulfát, 1 mM nátrium-vanadát, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM Pefabloc®) 30 percet inkubáltuk jégen. A lizátumot 4 C°-on 10000·g-s 10 perces centrifugálás segítségével tisztítottuk. A fehérjéket ezután poli-akrilamid gélelektroforézis segítségével méret szerint elválasztottuk, majd PVDF (Millipore) vagy nitrocellulóz (Whatman) membránra blottoltuk. A nem-specifikus membránköthelyek blokkolása szobahőmérsékleten TBS-T-ben oldott 3% BSA-val vagy 5% kazeinnel (zsírszegény tejpor) történt 30 percig. A kívánt fehérjék jelölésére anti-claudin-5 (Zymed), illetve anti-occludin (Transduction Laboratories) elsődleges antitesteket használtunk. A membránokat TBS-T-ben történő mosás után másodlagos antitesteket (Pierce) tartalmazó TBS-T oldatban inkubáltuk. Az immunreakciókat az Immobilon Western Chemiluminescent HRP szubsztrát (Millipore) segítségével röntgen-filmen (Agfa) rögzítettük.

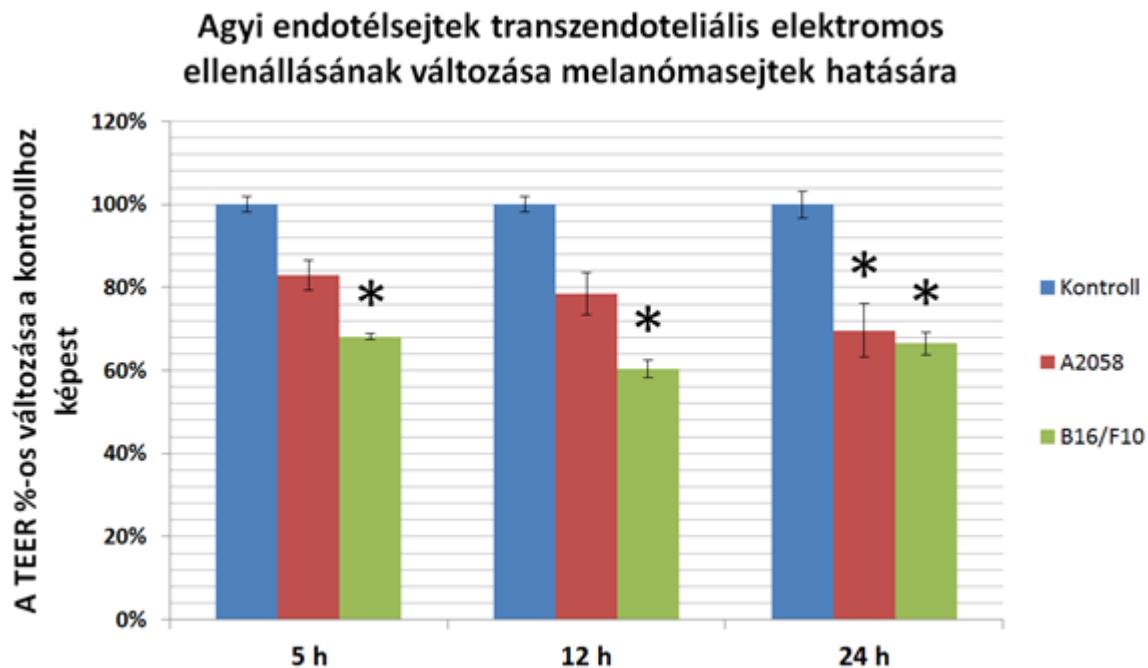
6. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

6.1 Melanómasejtek transzendoteliális migrációjának vizsgálata in vitro vér-agy gát modellen

Ahhoz, hogy melanómasejtek központi idegrendszerbe való transzendoteliális migrációját vizsgálni tudja, kutatócsoportunk egy in vitro migrációs modellt dolgozott ki cerebrális endotélsejt kultúrák (primer patkány agyi endotélsejtek: RBEC és egy humán cerebrális mikrovaskuláris sejtvonal, a hCMEC/D3), illetve két melanóma sejtvonal (A2058 humán és B16/F10 egér sejtvonalak) felhasználásával. Ebben a kísérleti elrendezésben az agyi endotélsejteket 8 μm pórusátmérőjű filtereken a konfluens állapot eléréséig tenyésztettük. A sejtréteg konfluenciáját transzendoteliális elektromos ellenállás (transendothelial electrical resistance; TEER) mérésekkel ellenőriztük a kísérletek elején és végén. A filteren található endotélrétegre ezután $9 \cdot 10^4$ sejt/ cm^2 arányban melanómasejteket adtunk, melyeket előzetesen CellTracker™ Blue flouorórokkal jelöltünk. A kísérletek során mindkét melanóma sejtvonal képesnek bizonyult az endotélsejtek rétegén áthaladva a filter pórusainak túloldalára migrálni, ahol megfigyeléseink szerint a filter aljára tapadtak.

6.2 Melanómasejtek hatása a transzendoteliális elektromos ellenállásra

A melanómasejteknek a vér-agy gátra történő hatásának vizsgálata céljából kutatócsoportunk a transzendoteliális rezisztenciában bekövetkező változásokat mérte. Az A2058 vagy B16/F10 sejtek jelenléte idő függvényében csökkentette a TEER-t (3. ábra). Méréseink alapján megállapítható, hogy a B16/F10 melanómasejtekkel történő inkubáció akár már a kísérlet megkezdése után 5 órával szignifikáns csökkenést okozott a TEER-ben. Az A2058 esetében szignifikáns csökkenést csak a kísérlet kezdetétől számított 24 óra elteltével figyelhetünk meg, ám annak mértéke akár a 30%-ot is elérhette.

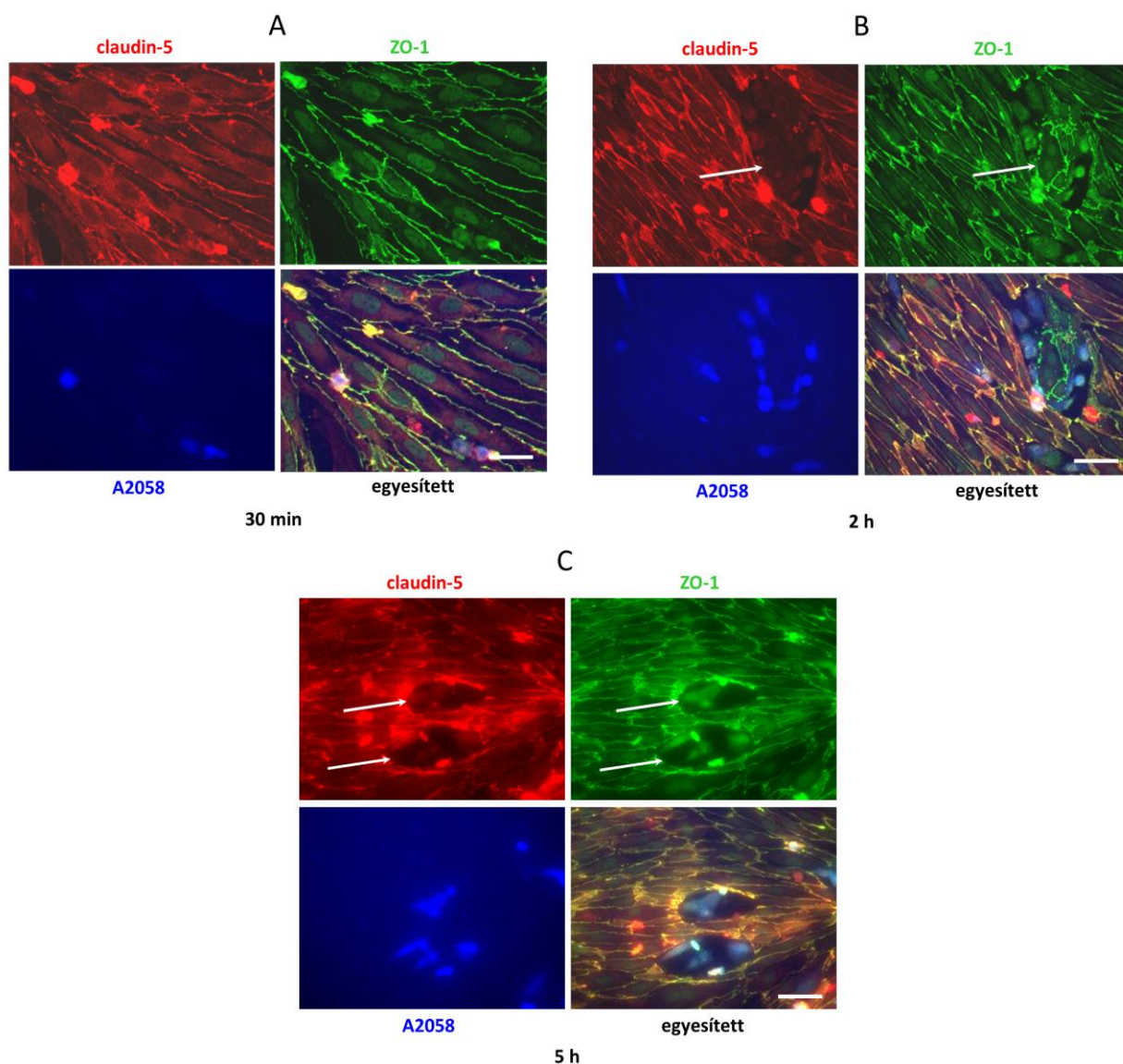


3. ábra: A transzendoteliális elektromos ellenállásban bekövetkezett változások melanómasejtek hatására

Az RBEC sejteket 0,4 μm pórusátérőjű szemi-permeabilis filtereken tenyésztettük. A TEER értékek változását CellZscope készülék segítségével követtük nyomon. A csillag szignifikáns változást jelöl.

6.3 A szoros kapcsolatok fehérjéinek változásai melanómasejtek hatására

A TEER-ben bekövetkező változások arra utaltak, hogy a melanómasejtek hatására az endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok integritása sérül. Ezen folyamatok megértése érdekében kísérleteinkben elsőként a szoros kapcsolatot alkotó fehérjék lokalizációjában bekövetkező változásokat tanulmányoztuk fluoreszcens mikroszkópia segítségével (4. ábra). Megfigyeléseink alapján a melanómasejtek gyakran kisebb csoportokat alkotva tapadtak le az endotélsejtek rétegére. Konfluens endotél tenyészet esetében a junkcionális fehérjék folytonos festődést mutatnak, mintegy kirajzolva az egyes sejtek határait. Azokon a pontokon azonban, ahol a melanómasejtek sikeresen kitapadtak, a junkcionális fehérjék festődése megváltozott: a claudin-5 már két óra után teljesen eltűnt az interendoteliális kapcsolatokból, míg a ZO-1 festődése szaggatottá vált. 5 óra elteltével már a ZO-1 fehérje sem volt kimutatható a melanómasejtekkel közvetlen kapcsolatba került endotélsejtek membránjában. Ezen eredményekből arra következtettünk, hogy a melanómasejtek az interendoteliális junkciókban elsőként a transzmembrán fehérjéket károsítják, majd ezt követően sérülnek a citoplazmatikus fehérjék.

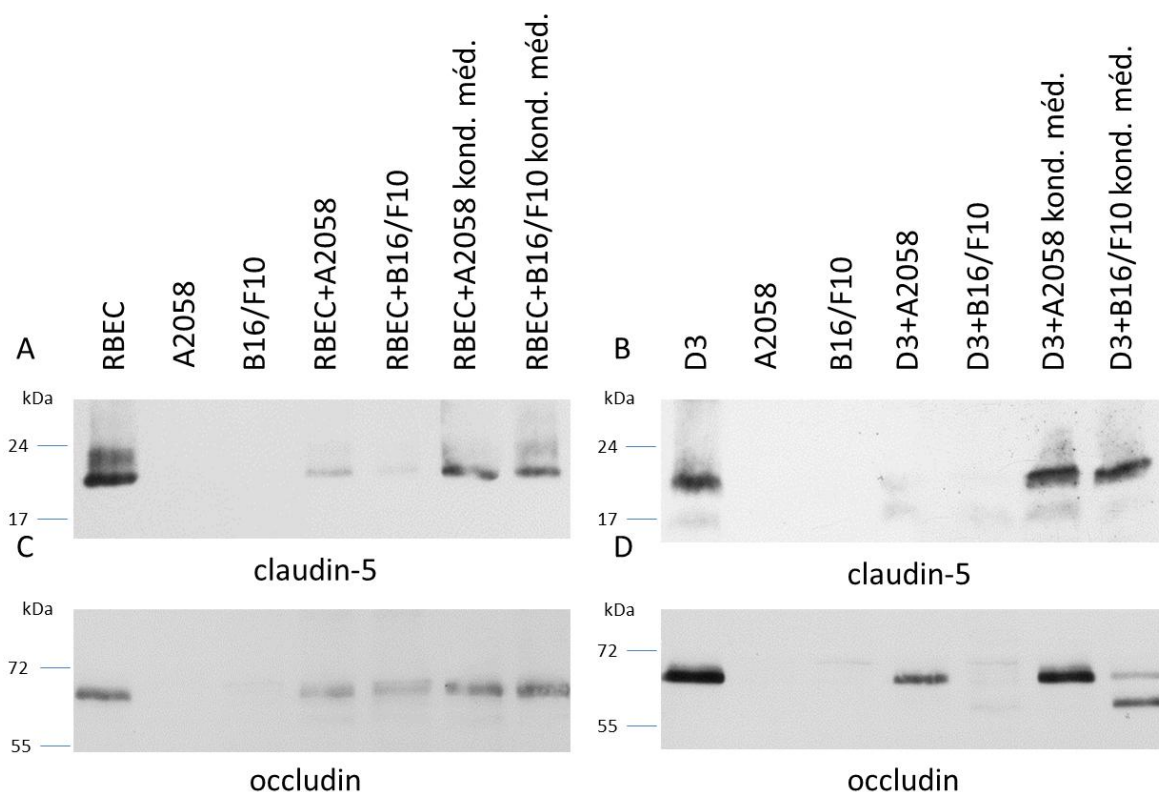


4. ábra: A szoros kapcsolat fehérjéinek sérülése a melanómasejtek transzmigrációjának következtében

CellTracker™ Blue-val fluoreszcensen jelölt A2058 melanómasejteket konfluens RBEC rétegre helyeztünk, majd 30 percig, illetve 2 vagy 5 óráig inkubálni hagytunk. A ki nem tapadt melanómasejteket ezután mosással távolítottuk el, majd fixálás után a claudin-5 és a ZO-1 fehérjéket festettük. A nyilak a sérült interendoteliális junkciókat jelölik. Mércse = 50 μ m.

Fluoreszcens vizsgálataink eredményeinek alátámasztására Western blot módszert alkalmaztunk (5. ábra). Az occludin és a claudin-5 jelenléte a D3 és az RBEC sejtkultúra esetében is megfigyelhető volt. Ezen fehérjék várákozásainknak megfelelően nem expresszálódtak sem az A2058, sem a B16/F10 sejtekben. Ha a melanómasejtekkel közösen inkubáltuk akár az RBEC, akár a D3 sejtek alkotta konfluens endotélium réteget, akkor az occludin és a claudin-5 szintje is szignifikáns csökkenést mutatott a kontroll körülményekhez képest. Ez a hatás RBEC sejtek esetében az A2058 és a B16/F10 sejtek által kondicionált médiummal is kiváltható volt, ám ez a csökkenés a melanómasejtekkel alkotott ko-kultúrához képest jelentősen kisebb volt. D3 sejtek esetében csak az occludin mennyisége csökkent a B16/F10 által kondicionált médium hatására. A megjelenő 60 kDa-

os sáv az occludin bomlására utalhat. Western blot eredményeink alapján feltételezhető, hogy a melanómasejtek az interendoteliális junkcionális fehérjék bomlását indukálják. Ezen kísérleti körülmények között a B16/F10 sejtek junkcionális károsító hatása kifejezettebb volt az A2058 sejtekénél.



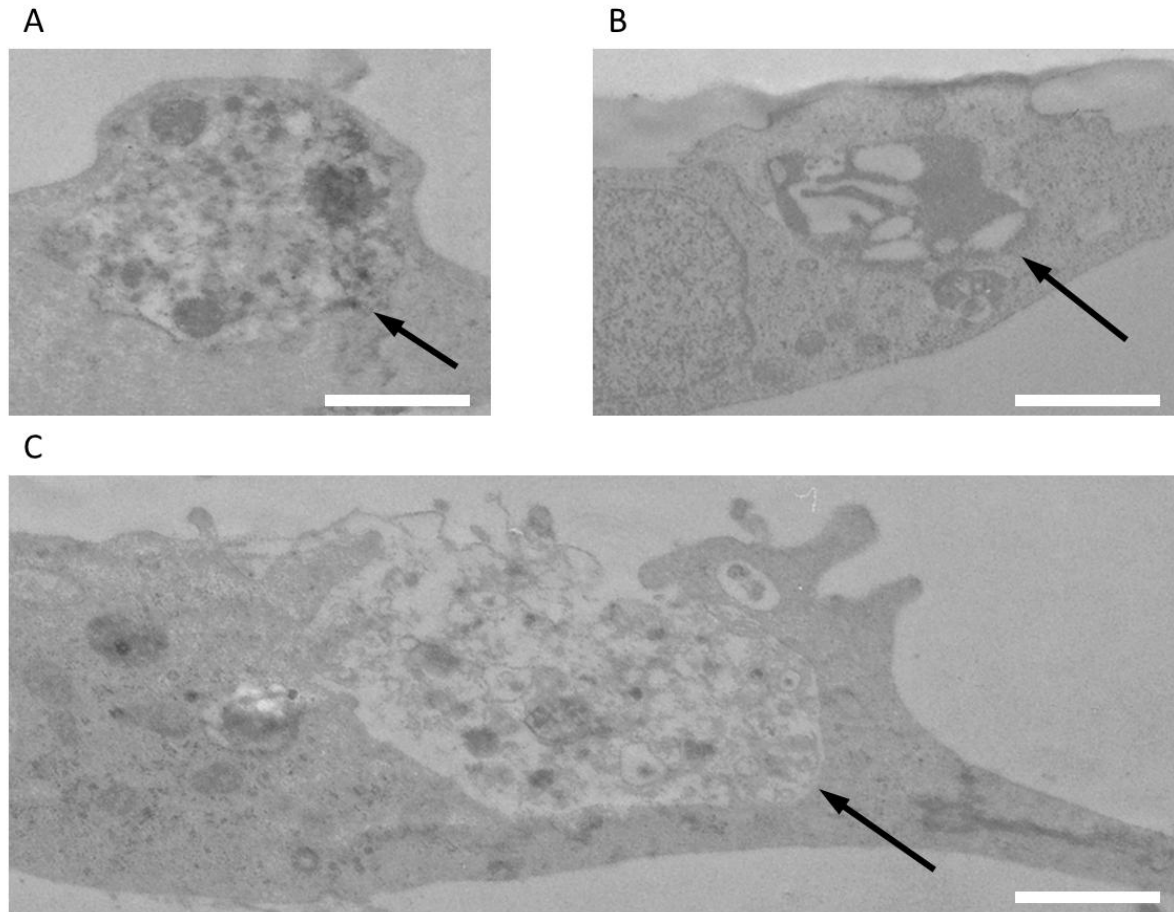
5. ábra: A szoros kapcsolatok fehérjéinek mennyiségi változása melanómasejtek vagy melanóma kondicionált médium jelenlétében

Melanómasejteket illetve melanóma kondicionált médiumot juttatunk konfluens agyi endotéliumrétegre (A,C: RBEC; B,D: D3). A claudin és az occludin fehérjék mennyiségének változását Western blot eljárással vizsgáltuk.

6.4 A transzcelluláris migrációs útvonal vizsgálata

Eddigi eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a melanómasejtek képesek a vér-agy gát barrier funkciójának megzavarására, az interendoteliális junkciók károsítására és ezáltal a cerebrális endotélsejtek közötti paracelluláris transzmigrációra. Eredményeink azonban nem zárják ki annak lehetőségét sem, hogy a melanómasejtek részben a transzcelluláris utat választják migrációjuk során. Ezt több transzmissziós elektronmikroszkóppal készített felvételünk is alátámasztani látszik. A paracelluláris migráció folyamatának megismerését célzó vizsgálatok során olyan melanómasejteket detektáltunk, melyek feltételezhetően transzcelluláris átvándorlást kísérelnek meg (6. ábra). A felvételeken a szekrécións vezikulumok miatt denzebb citoplazmájú melanómasejtek benyomulni látszanak a világosabb plazmával rendelkező endotélsejtek

membránjába. Annak igazolására, hogy a melanómasejtek valóban képesek transzcellulárisan átvándorolni az agyi endotélrétegen, további vizsgálatok (sorozatmetszetek) szükségesek.



6. ábra: Melanómasejtek transzmigrációjának vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóppal

A melanómasejtek endotéliumon keresztüli transzmigrációját transzmissziós elektronmikroszkópiával vizualizáltuk. A képeken a vezikulumokkal telített citoplazmájú melanómasejtek valószínűsíthetően transzcelluláris migrációt kísérelnek meg. A nyilak melanómasejtekből származó sejtfragmentumokat jelölnek az endotélsejtekben. Mércse = 1 μm .

7. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A melanómasejtek transzendoteliális migrációjának vizsgálata érdekében kutatócsoportunk egy in vitro vér-agy gát modellt adaptált kísérleteinkhez. Köszönhetően az in vitro modellekkel járó alacsony kísérleti állat igénynek és költségeknek, azokat egyre gyakrabban használják az in vivo módszerek mellett. Az in vitro megközelítés lehetővé teszi az agyi endotélsejtrétegen keresztüli migráció mechanizmusainak behatóbb tanulmányozását, melyeket in vivo kísérletekben a rendszer összetettsége miatt nem, vagy csak nehezen lehetne vizsgálni. Hasonló in vitro rendszereket már sikerrel alkalmaztak a leukociták endoteliális transzmigrációjának tanulmányozására [62,63].

A kísérleteinkben használt in vitro vér-agy gát modellek primer patkány agyi endotélsejtek (RBEC), illetve a hCMEC/D3 humán cerebrális endoteliális sejtvonal kultúráin alapultak. Az általunk tenyésztett RBEC-k tapasztalataink szerint megtartják az agyi endotéliumra in vivo jellemző sajátosságokat, mint: a felszíni von Willebrand faktor expressziót, a sejtek közötti összefüggő TJ hálózat meglétét, a magas TEER és az alacsony permeabilitási értékeket, valamint a magas P-glikoprotein aktivitást. A tény azonban, hogy rágszálóknál csak igen ritkán alakul ki spontán agyi melanóma metasztázis, arra utal, hogy alapvető különbségek vannak az emberi és állati kórlefolyásban [40]. Emellett kimutatták, hogy a humán melanómasejtek egerekbe injektálva spontán központi idegrendszeri metasztázist okoznak, tehát a xenogenikus modellek alkalmazása megengedhető [64,65]. Ezen indokokból kifolyólag szükségeszerű a humán endotélsejteket használata az RBEC-k mellett, annak ellenére, hogy azok sokkal rosszabb permeabilitási tulajdonságokkal rendelkeznek. A hCMEC/D3 [44] az egyik leginkább alkalmazott humán agyi endotél sejtvonal, melyet gyakran használnak emberi vér-agy gát modellekben [66,67].

A humán melanóma vonalak közül az A2058 sejtvonalat alkalmaztunk, mely transzmigrációs kísérletek során sikerrel okozott agyi metasztázist immundeficiens egerekben [64]. Emellett egér B16/F10 sejteket használtunk, melyeket alapvetően tüdő áttét eredetűek, de esetükben szintén kimutatták az agyi metasztázis kialakításának képességét [68,69]. A tumorsejtek endotélrétegeken (különösen a vér-agy gáton) való átvándorlása egy kevésbé ismert folyamat. Feltételezhető azonban, hogy részben hasonlóan zajlik le, mint a fehérvérsejtek extravazációja. Több in vitro és in vivo kísérlet bizonyította, hogy extravazációjuk során a fehérvérsejtek két útvonalon képesek átvándorolni az (agyi) endotélsejtek rétegén [70,71]. Az egyik a paracelluláris, azaz a sejtek közötti kapcsoló struktúrákon keresztüli, a másik pedig a transzcelluláris, azaz az

egyedi endotélsejteken keresztüli transzmigráció. Fehérvérsejtek esetében a két útvonalban szerepet játszó fehérjék nagy része napjainkban már ismeretes. A központi idegrendszer azonban a leukociták számára nagyrészt elszigetelt szerv, azok szinte csak neuroinflammatorikus folyamatok során képesek a vér-agy gáton átjutni. Megfigyelték azt is, hogy a gyulladt vér-agy gáton keresztül is főleg csak a mononukleáris sejtek képesek extravazációra akár a para- [72], akár pedig a transzcelluláris útvonalat kihasználva [73].

Arról, hogy a metasztatikus sejtek mely útvonalon képesek átjutni az endotélrétegeken, kevés adat áll rendelkezésre. Feltételezhető hogy, főleg folyamatos szoros kapcsolatokkal nem rendelkező endotélrétegek esetén, a tumorsejtek elsősorban a paracelluláris útvonalon keresztül jutnak ki a keringésből. Tumorsejtek esetében transzcelluláris migrációt csak mellráksejtek intravazációja kapcsán írtak le [35]. Eredményeink azt mutatják, hogy a melanómasejtek és agyi endotélsejtek interakciója során csökken az endotélréteg elektromos ellenállása. Ugyanakkor az endotélrétegre letapadt melanómasejtek közelében károsodnak az interendoteliális kapcsolatok, valószínűleg a junkcionális fehérjék bomlása révén. A melanómasejtek tehát képesek az agyi endotélsejtek közötti sejtkapcsoló struktúrák károsítására és ezáltal a paracelluláris migrációra. Elektronmikroszkópos megfigyeléseink alapján azonban a transzcelluláris migrációs útvonal használata sem zárható ki, pontos konklúzió eléréséhez azonban további vizsgálatokra van szükség.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A melanóma a melanocitákból származó daganat, amely rövid időn belül képes áttétet képezni a szervezetben, és ezen áttétek jelentős része a központi idegrendszert érinti. A központi idegrendszer nem rendelkezik nyirokkeringéssel, ezért a daganatos sejtek csupán a vérkeringés útján képesek szövetébe jutni. Emiatt az áttétképző sejtek egyik fő támadási pontja a vérkeringést és a központi idegrendszert elválasztó vér-agy gát. A melanómasejtek vér-agy gáton való transzmigrációjában szerepet játszó mechanizmusok igen kevésbé ismertek. A tumorsejtek extravazációja számos hasonlóságot mutat a fehérvérsejtekével. Ez utóbbiak képesek a sejtek között (a sejt-sejt kapcsolatok szintjén, paracellulárisan), és az egyes endotélsejteken keresztül (transzcellulárisan) is átvándorolni. Kutatásaink során arra kerestük a választ, hogy a melanómasejtek mely útvonalon képesek az agyi extravazációra.

Kísérleteinkhez egy in vitro vér-agy gát modellt használtunk, amelyet tumorsejtek transzendoteliális migrációjának vizsgálatára adaptáltunk. Az endotélsejtréteg konfluenciáját, majd a melanómasejtek hatását az endotéliumra először a transzendoteliális elektromos ellenállás (transendothelial electrical resistance, TEER) mérésével vizsgáltuk. A2058 és B16/F10 melanómasejtek hatására az RBEC-rétegen mért TEER értékek jelentős csökkenést mutattak az idő függvényében a kontroll tenyészetekhez képest. Mivel a TEER-t jelentősen befolyásolja az interendoteliális junciók épsége, ezért feltételeztük ezek sérülését a melanómasejtek transzmigrációja folyamán. Feltételezésünk megerősítésére több módszerrel is megfigyeltük a szoros kapcsolat fehérjéinek változását a melanómasejtek jelenlétében. Immunfluoreszcens vizsgálataink azt mutatták, hogy a melanómasejtek az interendoteliális junciókban először a transzmembrán fehérjéket károsítják, majd ezt követően sérülnek a plakk fehérjék. Western blot kísérleteinkben kimutattuk, hogy a melanómasejtek az agyi endotélsejtek occludin és claudin-5 fehérjéinek mennyiségi csökkenését okozzák, valószínűleg a fehérjék degradációja által. Mindezen eredmények azt bizonyítják, hogy a melanómasejtek képesek az agyi endotélsejtek közötti szoros kapcsolatokat károsítani, és ezáltal az endotélsejtek között, paracellulárisan átvándorolni az extravazáció során. Ezen eredményeink mellett azonban - a transzmigráció tanulmányozását célzó elektronmikroszkópos vizsgálataink során, - a transzcelluláris migráció lehetőségét felvető képeket is sikerült rögzítenünk. Ezeken a felvételeken a melanómasejtek benyomulni látszanak az endotélsejtek citoplazmájába.

Kísérleteink alapján kijelenthetjük, hogy a melanómasejtek főként paracelluláris úton képesek átjutni a vér-agy gáton, ám a transzcelluláris migrációs útvonal sem zárható ki.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Forrás: Központi Statisztikai Hivatal
http://portal.ksh.hu/pls/ksh/docs/hun/xtabla/halalozasok/tablha07_01.html
Elérés dátuma: 2010.11.16.
2. Forrás: American Cancer Society
<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/acspc-024113.pdf>, Elérés dátuma: 2010.11.16.
3. Davis N.C., McLeod G.R., Beardmore G.L., Little J.H., Quinn R.L. and Holt J.: Primary Cutaneous Melanoma: A Report from the Queensland Melanoma Project, CA-A Cancer J. for Clinicians (1976) 26(2).
4. Sloan A.E., Nock C.J., and Einstein D.B.: Diagnosis and Treatment of Melanoma Brain Metastasis: A Literature Review, Cancer Cont. (2009) 16(3):248-55.
5. Wolburg H., Noell S., Mack A., Wolburg-Buchholz K. and Fallier-Becker P.: Brain endothelial cells and the glio-vascular complex, Cell Tissue Res. (2009) 335:75–96.
6. Deli M.A. and Joó F.: Cultured vascular endothelial cells of the brain, Keio J. Med. (1996) 45:183-199.
7. Kusuhara H. and Sugiyama Y.: Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier (Part 1), Drug. Discov. Today (2001) 6:150-156.
8. Weiss N., et al.: The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases, Biochim. et Biophys. Acta (2009) 1788:842-857.
9. Janzer R.C., Raff M.C.: Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells, Nature (1987) 325:253-257.
10. González-Mariscal L., et al.: Role of tight junctions in cell proliferation and cancer, Prog. in Histochem. and Cytochem. (2007) 42:1–57.
11. Baas A.F., Kuipers J., Wel N.N. van der, Batlle E., Koerten H.K., Peters P.J., et al.: Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD, Cell (2004) 116:457–66.
12. Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S., and Tsukita S.: Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions, J. Cell Biol. (1993) 123:1777-1788.

13. Saitou M., Furuse M., Sasaki H., Schulzke J. D., Fromm M., Takano H., Noda T., and Tsukita S.: Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands, *Mol. Biol. Cell* (2000) 11, 4131–4142.
14. Furuse M., Fujita K., Hiiragi T., Fujimoto K. and Tsukita S.: Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin, *J. Cell Biol.* (1998) 141(7):1539-50.
15. Nitta T., Hata M., Gotoh S., Seo Y., Sasaki H., Hashimoto N., Furuse M., Tsukita S.: Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice, *J. Cell Biol.* (2003) 161(3):653-60.
16. Kostreva D., Brockhaus M., D'Arcy A., Dale G.E., Nelboeck P., Schmid G., et al.: X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif, *EMBO J.* (2001) 20:4391–8.
17. Strell C. and Entschladen F.: Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells, *Cell Comm. and Sign.* (2008) 4;6:10.
18. Nagasawa K., Chiba H., Fujita H., Kojima T., Saito T., Endo T., Sawada N.: Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells, *J. Cell. Physiol.* (2006) 208(1):123-32.
19. Tang J. and Hunt C.A.: Identifying the Rules of Engagement Enabling Leukocyte Rolling, Activation, and Adhesion, *PLoS Comput. Biol.* (2010) 19;6(2):e1000681.
20. Miles F.L., Pruitt F.L., van Golen K.L. and Cooper C.R.: Stepping out of the flow: capillary extravasation in cancer metastasis, *Clin. Exp. Metastasis* (2008) 25(4):305-324.
21. Hughes R.C.: Galectins as modulators of cell adhesion, *Biochimie* (2001) 83(7):667-676.
22. Thijssen V.L., Poirier F., Baum L.G. and Griffioen A.W.: Galectins in the tumor endothelium: opportunities for combined cancer therapy, *Blood* (2007) 110(8):2819-2827.
23. Vestweber D.: Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium, *Immunol. Rev.* (2007) 218:178-196.
24. Ley K., Laudanna C., Cybulsky M.I. and Nourshargh S.: Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated, *Nat. Rev. Immunol.* (2007) 7(9):678-689.

25. Carman C.V. and Springer T.A.: A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them, (2004) *The Journal of Cell Biology*, 167:377-388.
26. Yang L., Froio R.M., Sciuto T.E., Dvorak A.M., Alon R. and Luscinskas F.W.: ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow, *Blood* (2005) 106:584–592.
27. Leppert D., Waubant E., Galaray R., Bunnett N.W. and Hauser S.L.: T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro, *J. Immunol.* (1995) 154(9):4379-4389.
28. Cayrol R., Wosik K., Berard J.L., Dodelet-Devillers A., Ifergan I., Kebir H., Haqqani A.S., Kreymborg K., Krug S., Moundjian R., Bouthillier A., Becher B., Arbour N., David S., Stanimirovic D. and Prat A.: Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system, *Nat. Immunol.* (2008) 9(2):117-118.
29. Balkwill F.: Cancer and the chemokine network, *Nat. Rev. Cancer* (2004) 4(7):540-550.
30. Kakinuma T. and Hwang S.T.: Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis, *J. Leukoc. Biol.* (2006) 79(4):639-651.
31. Barthel S.R., Gavino J.D., Descheny L. and Dimitroff C.J.: Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer, *Expert Opin. Ther. Targets.* (2007) 11(11):1473-1491.
32. Strell C., Lang K., Niggemann B., Zaenker K.S. and Entschladen F.: Surface molecules regulating rolling and adhesion to endothelium of neutrophil granulocytes and MDA-MB-468 breast carcinoma cells and their interaction, *Cell Mol. Life Sci.* (2007) (24):3306-16.
33. Voura E.B., Ramjeesingh R.A., Montgomery A.M. and Siu C.H.: Involvement of integrin alpha(v)beta(3) and cell adhesion molecule L1 in transendothelial migration of melanoma cells, *Mol. Biol. Cell.* (2001) 12(9):2699-2710.
34. Clausse N., Brule F. van den, Waltregny D., Garnier F. and Castronovo V.: Galectin-1 expression in prostate tumor-associated capillary endothelial cells is increased by prostate carcinoma cells and modulates heterotypic cell-cell adhesion, *Angiogenesis* (1999) 3(4):317-325.
35. Khuon S., Liang L., Dettman R.W., Sporn P.H.S., Wysolmerski R.B. and Chew T.L.: Myosin light chain kinase mediates transcellular intravasation of breast cancer cells

- through the underlying endothelial cells: a three-dimensional FRET study, *J. of Cell Sci.* (2010) 123:431-440.
36. Durko M., Navab R., Shibata H.R. and Brodt P.: Suppression of basement membrane type IV collagen degradation and cell invasion in human melanoma cells expressing an antisense RNA for MMP-1, *Biochim. Biophys. Acta.* (1997) 1356(3):271-80.
 37. Rolland Y., Demeule M., Fenart L. and Béliveau R.: Inhibition of melanoma brain metastasis by targeting melanotransferrin at the cell surface, *Pigment Cell Melanoma Res.* (2009) Feb;22(1):86-98.
 38. Iida J., Wilhelmson K.L., Price M.A., Wilson C.M., Pei D., Furcht L. T. and McCarthy J.B.: Membrane type-1 matrix metalloproteinase promotes human melanoma invasion and growth, *J. Invest. Dermatol.* (2004) 122:167-76.
 39. Parri M. and Chiarugi P.: Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control, *Cell Comm. and Sign.* (2010) 8:23.
 40. Cranmer L.D., Trevor K.T., Bandlamuri S. and Hersh. E.M.: Rodent models of brain metastasis in melanoma, *Melanoma Res.* (2005) 15:325–356.
 41. Loriger, M., Felding-Habermann B. : Capturing changes in the brain microenvironment during initial steps of breast cancer brain metastasis, *Am. J. Pathol.* (2010), 176 :2958-2971.
 42. Paku S., Dome B., Toth R., Timar J.: Organ-specificity of the extravasation process: an ultrastructural study, *Clin. Exp. Metastasis* (2000), 18:481-492.
 43. Fidler I.J.: The role of the organ microenvironment in brain metastasis, *Semin. Cancer Biol.* (2011) 21:107-112.
 44. Qi J., Chen N., Wang J. and Siu C.H.: Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the β -catenin signaling pathway, *Molecular Biology of the Cell* (2005) 16:4386–4397.
 45. Denkins Y., Reiland J., Roy M., Sinnappah-Kang N.D., Galjour J., Murry B.P., Blust J., Aucoin R., Marchetti D.: Brain metastases in melanoma: roles of neurotrophins, *Neuro Oncol.* (2004) 6:154-165.
 46. Nicolson G.L., Menter D.G.: Trophic factors and central nervous system metastasis, *Cancer Metastasis Rev.* (1995) 14:303-321.
 47. Izraely S., Klein A., Sagi-Assif O., Meshel T., Tsarfaty G., Hoon D.S., Witz I.P.: Chemokine-Chemokine receptor axes in melanoma brain metastasis, *Immunol. Lett.* (2010) 130:107-114.

48. Klein A., Sagi-Assif O., Izraely S., Meshel T., Pasmanik-Chor M., Nahmias C., Couraud P.O., Erez N., Hoon D.S., Witz I.P.: The metastatic microenvironment: brain-derived soluble factors alter the malignant phenotype of cutaneous and brain-metastasizing melanoma cells, *Int. J. Cancer* (2012) 131:2509-2518.
49. Xie T.X., Huang F.J., Aldape K.D., Kang S.H., Liu M., Gershenwald J.E., Xie K., Sawaya R., Huang S. : Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis, *Cancer Res.* (2006) 66:3188-3196.
50. Perides G., Zhuge Y., Lin T., Stins M.F., Bronson R.T., Wu J.K.: The fibrinolytic system facilitates tumor cell migration across the blood-brain barrier in experimental melanoma brain metastasis, *BMC Cancer* (2006) 6:56.
51. Ilan N., Elkin M., Vlodavsky I.: Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2006) 38:2018-2039.
52. Roy M., Marchetti D.: Cell surface heparan sulfate released by heparanase promotes melanoma cell migration and angiogenesis, *J. Cell. Biochem.* (2009) 106:200-209.
53. Ridgway L.D., Wetzel M.D., Marchetti D. : Modulation of GEF-H1 induced signaling by heparanase in brain metastatic melanoma cells, *J. Cell. Biochem.* (2010) 111 :1299-1309.
54. Marchetti D., Li, J.; Shen R.: Astrocytes contribute to the brain-metastatic specificity of melanoma cells by producing heparanase, *Cancer Res.* (2000) 60:4767-4770.
55. Anfuso C.D., Giurdanella G., Motta C., Muriana S., Lupo G., Ragusa N., Alberghina M. : PKC α -MAPK/ERK-Phospholipase A2 signaling is required for human melanoma-enhanced brain endothelial cell proliferation and motility, *Microvasc. Res.* (2009) 78:338-357.
56. Cruz-Muno, W., Jaramillo M.L., Man S., Xu P., Banville M., Collins C., Nantel A., Francia G., Morgan S.S., Cranmer L.D. et al.: Roles for endothelin receptor B and BCL2A1 in spontaneous CNS metastasis of melanoma, *Cancer Res.* 2012.
57. Zhang C., Zhang F., Tsan R., Fidler I.J.: Transforming growth factor-beta2 is a molecular determinant for site-specific melanoma metastasis in the brain, *Cancer Res.* (2009) 69:828-835.
58. Colone M., Calcabrini A., Toccaceli L., Bozzuto G., Stringaro A., Gentile M., Cianfriglia M., Ciervo A., Caraglia M., Budillon A. et al.: The multidrug transporter P-glycoprotein: A mediator of melanoma invasion?, *J. Invest. Dermatol.* (2008) 128:957-971.

59. Weksler B.B., Subileau E.A., Perrière N., Charneau P., Holloway K., et al.: Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line, *FASEB J.* (2005) 19: 1872–1874.
60. Hutamekalin P., Farkas A.E., Orbók A., Wilhelm I., Nagyősz P., et al.: Effect of nicotine and polyaromatic hydrocarbons on cerebral endothelial cells, *Cell Biol. Int.* (2008) 32: 198–209.
61. Wilhelm I., Farkas A.E., Nagyősz P., Váró G., Bálint Z., et al.: Regulation of cerebral endothelial cell morphology by extracellular calcium, *Phys. Med. Biol.* (2007) 52:6261–6274.
62. Kügler S., Böcker K., Heusipp G., Greune L., Kim K.S. and Schmidt M.A.: Pertussis toxin transiently affects barrier integrity, organelle organization and transmigration of monocytes in a human brain microvascular endothelial cell barrier model, *Cell Microbiol.* (2007) 9: 619–632.
63. Man S., Ubogu E.E., Williams K.A., Tucky B., Callahan M.K. and Ransohoff R.M.: Human brain microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells differentially facilitate leukocyte recruitment and utilize chemokines for T cell migration, *Clin. Dev. Immunol.* (2008) 2008: 384982.
64. Kienast Y., von Baumgarten L., Fuhrmann M., Klinkert W.E., Goldbrunner R., et al.: Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation, *Nat. Med.* (2010) 16: 116–122.
65. Cruz-Munoz W., Man S., Xu P. and Kerbel R.S.: Development of a preclinical model of spontaneous human melanoma central nervous system metastasis, (2008) *Cancer Res.* 68: 4500–4505.
66. Carl S.M., Lindley D.J., Couraud P.O., Weksler B.B., Romero I., et al.: ABC and SLC transporter expression and pot substrate characterization across the human MEC/D3 blood-brain barrier cell line, *Mol. Pharm.* (2010) 7: 1057–1068.
67. Förster C., Burek M., Romero I.A., Weksler B., Couraud P.O. and Drenckhahn D.: Differential effects of hydrocortisone and TNF α on tight junction proteins in an in vitro model of the human blood-brain barrier, *J. Physiol.* (2008) 586:1937–1949.
68. Raz A. and Hart I.R.: Murine melanoma: a model for intracranial metastasis, *Br. J. Cancer* (1980) 42: 331–341.
69. Bridle B.W., Li J., Jiang S., Chang R., Lichty B.D., et al.: Immunotherapy can reject intracranial tumor cells without damaging the brain despite sharing the target antigen, *J. Immunol.* (2010) 184: 4269–4275.

70. Carman C.V.: Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by ‘invadosome-like protrusions’, (2009) *J. Cell Sci.* 122: 3025–3035.
71. Dejana E.: The transcellular railway: insights into leukocyte diapedesis, *Nat. Cell. Biol.* (2006) 8: 105–107.
72. Reijerkerk A., Kooij G., van der Pol S.M., Khazen S., Dijkstra C.D. and de Vries H.E.: Diapedesis of monocytes is associated with MMP-mediated occludin disappearance in brain endothelial cells, *FASEB J.* (2006) 20: 2550–2552.
73. Wolburg H., Wolburg-Buchholz K. and Engelhardt B.: Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact, *Acta Neuropathol.* (2005) 109: 181–190.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton köszönöm

Dr. Krizbai Istvánnak, az MTA SZBK, Biofizikai Intézet, Neurobiológiai Csoport tudományos főmunkatársának, témavezetőmnek a munkámhoz nyújtott segítségét, hasznos tanácsait és támogatását;

Dr. Fekete Évának, az SZTE TTIK Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék tanárának, belső konzulensemnek a támogatását;

Dr. Wilhelm Imolának, Dr. Nagyórsi Péternek, Fazakas Csillának, Nyúl-Tóth Ádámnak, Haskó Jánosnak és Molnár Juditnak az MTA SZBK, Biofizikai Intézet, Molekuláris Neurobiológiai Csoport tagjainak segítségüket, hasznos tanácsaikat, és nem utolsósorban a kellemes légkört;

Dr. Siklós Lászlónak, az MTA SZBK, Biofizikai Intézet, Molekuláris Neurobiológiai Csoport vezetőjének, hogy lehetővé tette a munkacsoportban munkám elvégzését.

Családomnak és barátaimnak, akik mindenben támogattak és ott voltak, amikor szükségem volt rájuk.

11. NYILATKOZAT

Alulírott **Várhelyi Zoltán Pál, BIOLÓGIA_MSc** szakos hallgató, kijelentem, hogy az OTDK dolgozatomban foglaltak kutatócsoportom és saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel. Részt vettem az agyi endotélsejtek és melanómasejtek tenyésztésében, a transzmigrációs és a TEER kísérletekben. Immunfluoreszcens vizsgálatokat és Western blot kísérleteket önállóan is végeztem.

.....

Várhelyi Zoltán Pál

2012. november 5.