



Pázmány Péter Katolikus Egyetem
Információs Technológiai és Bionikai Kar



TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIADOLGOZAT
36. OTDK Biológia Szekció

**A PECAM-1 adhéziós fehérje
mechanotranszdukciójának BRAF általi
szabályozása humán endotél sejtekben**

Lehoczky Csilla

Molekuláris bionika mérnöki BSc, 2019-es évfolyam

2022

Témavezető:

Matkovicsné Dr. Varga Andrea

(Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet)

Belső konzulens:

Dr. Gáspári Zoltán

(Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai és Bionikai Kar)

Tartalom

1	Szakirodalmi bevezetés.....	3
1.1	Diapedezis folyamata	3
1.1.1	Az adherens sejtkapcsoló sturtúrák meggyengülése	4
1.1.2	Az aktin citoszkeleton átrendeződése.....	6
1.2	Rho jelátvitel szabályozása.....	7
1.3	PECAM-1 általi mechanotranszdukció:	8
2	Célkitűzések	10
3	Eszközök és módszerek	11
3.1	HUVEC sejtenyészet fenntartása	11
3.2	HUVEC sejtek felolvasztása	11
3.3	HUVEC sejtek passzálása	12
3.4	Csendesítés RNS interferenciával	13
3.5	Permeabilitás esszé	13
3.6	Mágneses kísérlet	14
3.6.1	Mágneses gyöngy előkészítése.....	14
3.6.2	Kísérlet kivitelezése immunfluoreszcencia vizsgálatához	15
3.6.3	Kísérlet kivitelezése western blot analízishez	15
3.7	Immunfestés.....	16
3.8	Fluoreszcens konfokális mikroszkópia.....	17
3.9	Mikroszkópos felvételek kiértékelése	18
3.10	Western blot.....	20
3.10.1	Immunprecipitáció	20
3.10.2	Poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)	20
3.10.3	Előhívás	22
4	Eredmények, értékelés	24
4.1	A BRAF és PECAM-1 csendesítés hatása human endotél sejtekre	24
4.2	A PLX8394 inhibitor hatása human endotél sejtekre	25
4.3	A PLX8394 hatása PECAM-1-en keresztül kifejtett mechanikai erőt követő mechanotranszdukcióra	28
5	Diszkusszió	36
6	Köszönetnyilvánítás	37
7	Irodalomjegyzék	38

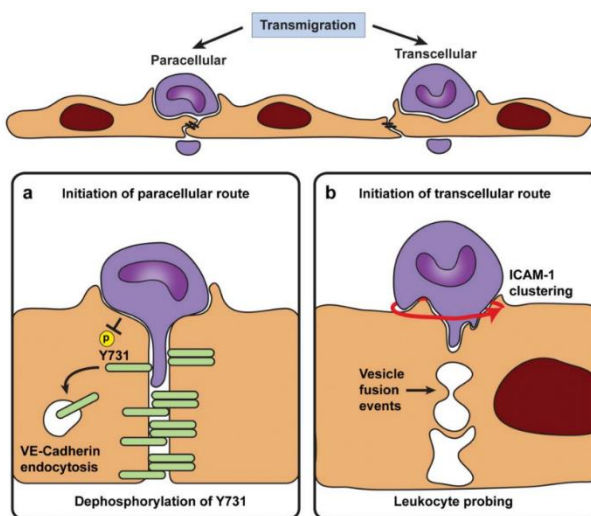
1 Szakirodalmi bevezetés

Az endotél sejtek az erek belső felszínét borító hámsejtek, amelyek szerepe kettős. Egyrészt szemi-permeabilis fizikai gátat képeznek a vér és a szövetközi folyadék tere között, és így a makromolekulák érpályában tartásáért felelnek, valamint biztosítják a mélyebb szövetek tápanyagellátását. Másrészt viszont komplex jelátviteli hálózatokon keresztül lehetővé teszik az endotél barrier fellazulását és immunsejtek kijutását az érpályából, ezáltal fontos szerepet töltenek be a gyulladásra adott immunválasz során is. Sajnálatos módon a vérben utazó rákos sejtek is ezt a mechanizmust veszik igénybe az extravazációhoz a metasztázis során. A transzendotél migráció (TEM) kóros formája figyelhető meg a trombocitopénia, iszkémia és a reumatoid arthritis során, ahol a túlzott extravazáció, az immunsejtek felgyülemzése okozza a szövetek károsodását. A diapedezis szabályozása részleteiben még nem ismert, pedig az említett betegségek terápiás kezeléséhez a transzmigráció mélyebb megértése szükséges.

1.1 Diapedezis folyamata

Szöveti sérülés, vagy fertőzés hatására gyulladásos faktorok szabadulnak fel, amelyek a sejteket citokinek (trombin, IL-1 β , TNF α , IFN γ ...) termelésére ösztönzik. Az endotél sejtek a gyulladásos mediátorok hatására növelik a sejtfelszíni adhéziós molekuláik expresszióját, mint az ICAM (Inter Cellular Adhesion Molecule) és VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule). [1] A vérben utazó leukociták az endotél sejtek sejtfelszíni molekuláival

érintkeznek, és a szelektinokkal való kapcsolódás révén sebességük lecsökken. A molekuláris asszociáció lehetővé teszi, hogy a leukociták filopódium képzéssel végigpróbálgassák az endotéliumot, és megkeressék a transzmigrációra alkalmas helyet. Amennyiben az endotél réteg egy pontján már megvalósult a transzmigráció, további sejtek is nagyobb valószínűséggel választják azt a helyet a transzmigrációra, [2] ezt hívjuk „transzmigrációs hotspot”-nak. A diapedezis megvalósulhat paracelluláris úton az endotél sejt-sejt kapcsolatok szabályozott fellazításával, illetve transzcelluláris úton az endotél sejten belüli vezikulák fúziójával. (1. ábra)

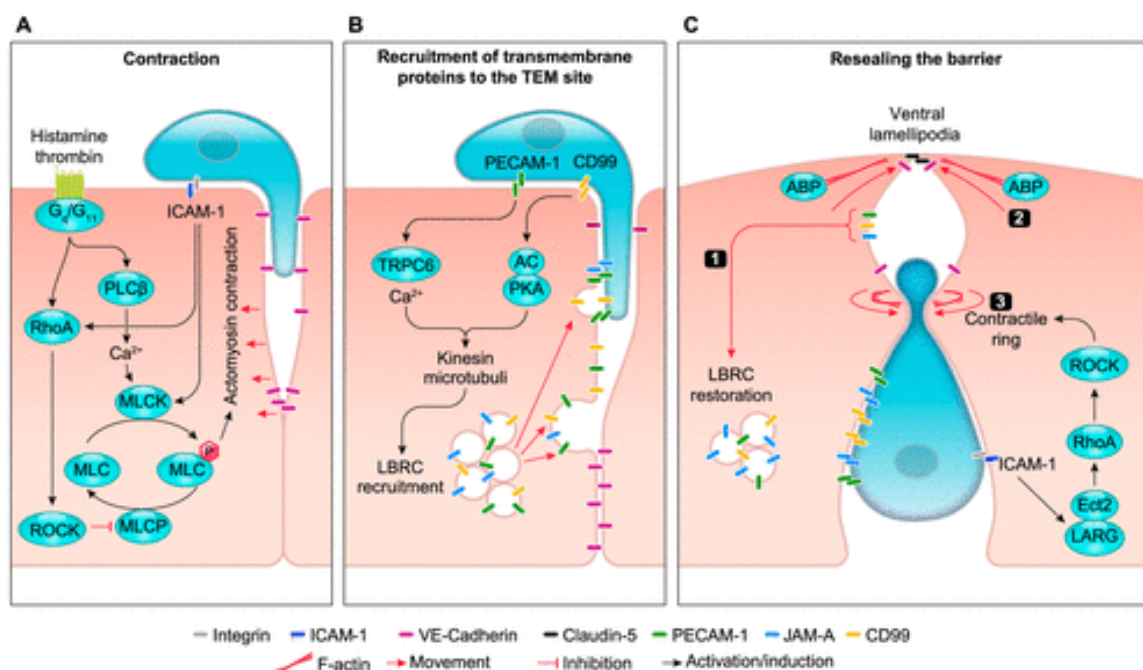


1. ábra: A transzmigráció típusai: a paracelluláris és az intracelluláris útvonal [3]

Humán endotél sejtekben a paracelluláris út a jellemző, de transzcelluláris migráció dominál például a nyirokcsomókban.[3] A paracelluláris út inicializálásában olyan sejtfelszíni fehérjék játszanak szerepet, mint az ICAM-1 és PECAM-1, amelyek a leukocitával való kapcsolódás révén komplex jelátviteli folyamatokat indítanak meg az endotél sejtekben. (2. ábra) A transzmigráció során rések keletkeznek az összefüggő endotél sejtrétegben, amelyek a meglazuló sejtkapcsoló struktúrák és az aktomiozin kontrakció eredményei. A transzmigrációt követően viszont ezek a rések hamar bezárulnak, amelyben a lokális Rho aktiváció játszik szerepet az aktin polimerizációt és a miozin foszforilációját elősegítve.[4]

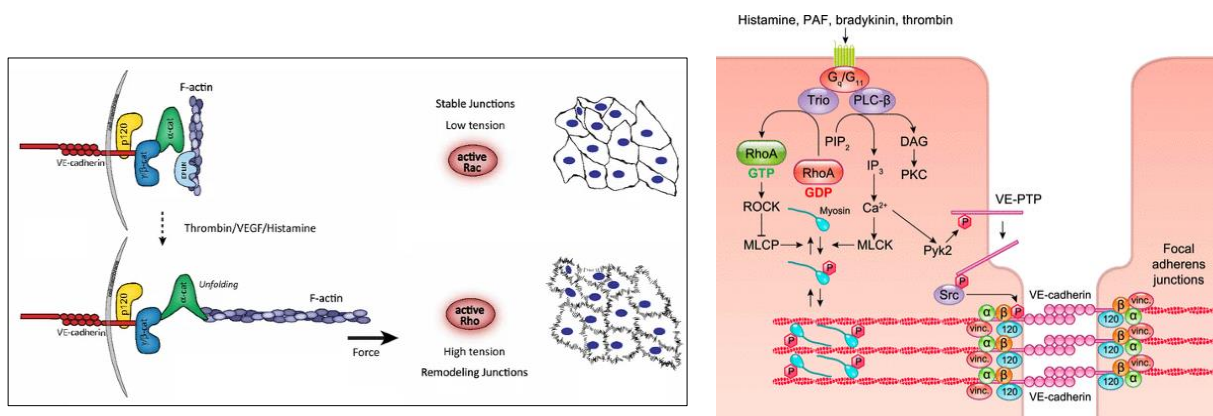
1.1.1 Az adherens sejtkapcsoló struktúrák meggyengülése

Az adherens sejtkapcsoló struktúrák fő alkotóeleme a VE-cadherin, az endotél sejtek specifikus membránfehérjéje, amely a sejt-sejt kapcsolatokban lokalizálódik és nélkülözhetetlen az endotél barrier fenntartásában, valamint az angiogenezisben. Kiütése embrionális letalitást okoz, csendesítése és antitestes elfedése pedig az endotél permeabilitás jelentős növekedésével jár.[5] Megfigyelték, hogy a VE-cadherin eltűnik a diapedézis helyéről, és helyette ICAM-1 és PECAM-1 molekulák képeznek gyűrűt a transzmigráló sejt körül.[6] Ezzel konszenzusban áll a tapasztalat, miszerint az adherens kapcsolatok megerősítése csökkenti a transzmigráló



2. ábra: Endotél jelátvitel a transzmigráció folyamatában. Gyulladásos faktor (hisztamin) és leukocita adhézio (ICAM-1 által) hatására az aktomiozin kontrakció meglazítja a sejt-sejt kapcsolatokat (A). A diapedézis helyébe adhézio molekulák gyűlnek (PECAM-1, CD99), amelyek segítik az extravazációt. (B) A transzmigráló sejt mögött visszaalakulnak a sejt-sejt kapcsolatok (C) [36]

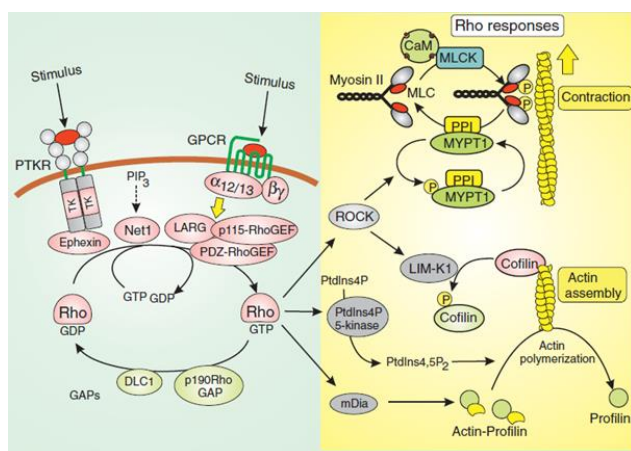
immunsejtek számát gyulladásos mediátorok hatására [7]. A legújabb tanulmányok szerint a VE-cadherinnek szerepe van ugyan a permeabilitás és a transzmigráció szabályozásában is, azonban ez a két folyamat egymástól időben és térben is elválasztható, és más jelátviteli szabályozottság alatt áll. Az erek permeabilitását növelő szerek, mint a trombin, hisztamin, VEGF (vascular endothelial growth factor) hatására a VE-cadherin tirozin-685 oldallánca (továbbiakban Y685) foszforilálódik, míg a leukocita adhéziora a tirozin-731 oldallánc (Y731) gyors defoszforilációja a válasz, amely a VE-cadherin internalizációjának előfeltétele. Érdekes módon az említett specifikus foszforiláció és defoszforiláció csak a kapillárisokban és kis vénákban figyelhető meg, ahol az extravazáció is megvalósul.[8] A VE-cadherin tirozinfoszforilációja szükséges feltétele a sejt-sejt kapcsolatok fellazulásának, viszont önmagában nem elegendő a transzmigráció sikerességéhez.[9] Ennek oka, hogy az Y731 foszforilációs hely alapesetben el van fedve a sejtekben [8], így a defoszforilációjához a foszfatáz SHP2-n kívül a foszforilációs hely foszfatáz számára történő hozzáférhetősége is szükséges. A VE-cadherin citoplazmatikus doménjeihez cateninek asszociálódnak, melyek adaptor szerepet töltenek be a VE-cadherin és az aktin citoszkeleton között. Az aktin citoszkeleton által a cateninekre kifejtett mechanikai erő hatására kerül az Y731-es foszforilációs hely a VE-cadherin molekula felszínére, így lehetővé téve az SHP2 foszfatáz általi defoszforilációt és ezáltal az internalizációt. [10] (3. ábra)



3. ábra: Az adherens sejtkapcsoló struktúrák átrendeződése gyulladásos mediátorok hatására. Nyugalmi helyzetben az endotél sejtek érintkező sejt-hártyája összefüggő, lineáris, míg a gyulladásos mediátorok és az aktomiozin kontrakció hatására a sejtkapcsolatok átrendeződnek, zipzár szerű struktúrát alkotnak. [37] (balra) A VE-cadherin tartalmú adherens sejtkapcsoló struktúrák átrendeződésének szabályozása.[36] (jobbra)

1.1.2 Az aktin citoskeleton átrendeződése

A sejtek kontrakciója az aktin citoskeleton átrendeződésével, valamint a miozin könnyű lánc



4. ábra: A Rho jelátviteli útvonal fehérjéi [11]

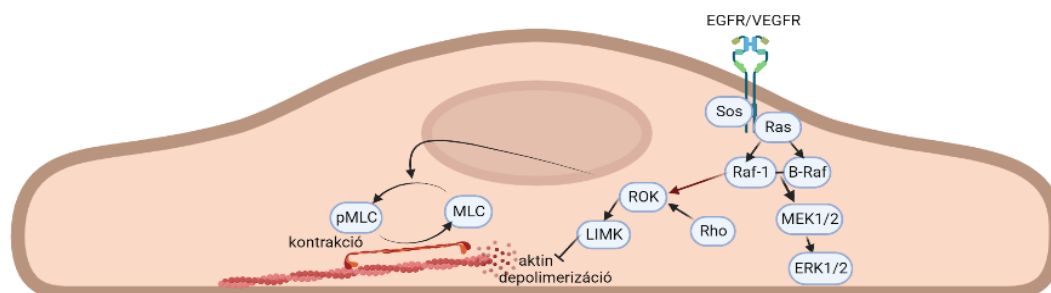
(MLC) foszforilációjával valósul meg. Gyulladásos faktorok hatására vastag, az egész sejten átívelő stressz-szálak képződnek, amelyek a cadherin tartalmú adherens sejtkapcsoló struktúrákban végződnek. A stressz-szálak kialakulásáért a Ca^{2+} ion és a RhoA fehérje által kiváltott jelátviteli útvonalak felelősek.[11][12] A Rho fehérje a kisméretű G-fehérjék családjába tartozó

kapcsolófehérje, amely GTP kötött állapotában aktív, majd a GTP GDP-vé alakulásával inaktiválódik. A Rho fehérjének több aktivátora van, amelyek a kötött GDP GTP-re cserélését serkentik (GEF-ek), illetve olyan partnerei is vannak, amelyek a GTP defoszforilációját segítik elő (GAP-ok). Az aktív Rho-GTP komplex az aktin polimerizáció és a miozin foszforiláció szabályozásán keresztül fejt ki a hatását. (4. ábra) A jelátvitel egyik fontos szereplője a $\text{ROK}\alpha$ (Rho-kináz, ROK, ROCK), amelyet a RhoA-GTP komplex aktivál. Effektora, a LIM-kináz-1 révén gátolja az aktin filamentumok depolimerizációját a cofilin foszforilációjával, valamint növeli a miozin könnyű lánc (MLC) foszforiláltságát a MYPT1 (myosin phosphatase targeting protein) gátlásával.

Gyulladásos mediátorok (például trombin) és leukocita transzmigráció hatására is megfigyeltek Rho aktivációt endotél sejtekben.[12] Egyrészt Rho aktiváció szükséges a stressz-szálak kialakulásához és az endotél kontrakcióhoz, másrészt viszont lokális RhoA aktiváció figyelhető meg a transzmigráló immunsejt körül, amely a transzmigráció hatására megjelenő permeabilitás növekedést hivatott csökkenteni, illetve az áthaladó sejt nyomában a sejt-sejt kapcsolatok visszaépítésében vesz részt.[4] A Rho citoskeletonot átrendező működésével ellentétes hatást gyakorol a szintén G-fehérje Rap1, amely az aktint a sejtthártya alatti perifériás gyűrűbe rendezi ezzel megerősítve a sejt-sejt kapcsolatokat. Megfigyelték, hogy permeabilitást növelő szerek hatására csökken a sejten belüli cAMP szint, amely a Rap1-GEF Epac aktiválásához szükséges, így végső soron a Rho-Rap1 egyensúly a Rho irányába tolódik el, és megindul a stressz-szálak képződése, valamint a sejtkapcsoló struktúrák lebontása.[13]

1.2 Rho jelátvitel szabályozása

A Rho útvonal szabályozásába más jelátviteli útvonalak fehérjéi is beleszólhatnak. Ilyenek például a növekedési faktorok hatására aktiválódó MAPK/ERK útvonal RAF fehérjéi, amelyek citoszkeletális átrendeződésekre kifejtett pontos hatásáról még hiányosak az ismereteink. A RAF1 (másnéven CRAF) a RAF család tagjaival történő homo-, és heterodimerizáción túl képes a ROK α -hoz kötődni, és annak sejten belüli elhelyezkedését, lokális aktivitását befolyásolni. (5. ábra)



5. ábra: A Ras/MEK/ERK útvonal hatása az aktin citoszkeleton szabályozására

Endotél sejtekben RAF1 hiányában kisebb mennyiségű ROK α lokalizálódik a sejtmembránnál, amely hiányában meglazulnak a VE-cadherinen keresztüli sejt-sejt kapcsolatok. BRAF hiányában viszont a sejtkecsolatokban megnövekedett mennyiségű RAF1/ROK α komplex egy perifériás aktingyűrű kialakulását eredményezi, amely végső soron a sejtkecsolók struktúrák megerősödéséhez vezet. BRAF hiányos sejtekben továbbá a permeabilitást fokozó anyagok hatására sem alakulnak ki stressz szálak, és csökken a cofilin foszforiláltsága. [13] A BRAF a RAF1 kötés révén befolyásolja a RAF1/ROK α komplex mennyiségét és lokalizációja által annak funkcióját a sejt-sejt kapcsolatokban, így elképzelhető, hogy a RAF heterodimerizációt gátló anyagokkal csökkenthető az endotél sejtréteg átjárhatósága, azaz a permeabilitás és a transzmigráció mértéke.

A PLX8394 egy új generációs BRAF inhibítor, amely a BRAF V600E monomer gátlásával fejt ki sejtosztódást gátló hatását, és ezen túl csökkenti a MAP/ERK aktivációra szintén képes BRAF heterodimerek mennyiségét is. Korábbi RAF dimerizációt gátló hatóanyagok (vemurafenib, dabrafenib, encorafenib) a mutáns, monomerként is aktív BRAF gátlása mellett paradox módon aktiválták a MAPK/ERK útvonalat, mivel a vad típusú RAF dimereket aktív konformációjukban stabilizálták [14]. Az új generációs RAF inhibítorokra már nem jellemző ez a mellékhatás. A PLX8394 szelektíven gátolja az ERK útvonalat, mivel csak a BRAF tartalmú homo-és heterodimereket gátolja, a CRAF homodimerek jelátvitelét nem érinti [15].

Mivel az aktin citoszkeleton átrendeződéséhez vezető jelátviteli útvonalban a BRAF:RAF1 heterodimer mennyisége befolyásolja a ROK α aktivitását és sejtkapcsolati lokalizációját, felvetődik a kérdés, hogy a sejtek PLX8394 inhibitorral történő kezelése hasonló hatást gyakorol-e az aktin citoszkeleton dinamikus átrendeződésére, valamint a cofilin és pMLC lokalizációjára, mint a BRAF csendesítés.

1.3 PECAM-1 általi mechanotranszdukció:

A PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule, másnéven CD31) a vérlemezkék, leukociták és endotél sejtek sejtfelszíni fehérjéje. Extracelluláris része immunoglobulin-szerű doméneket tartalmaz, amelyekkel a szomszédos sejtek homodimereket létesítenek. Ennek megfelelően a PECAM-1 fehérje az endotél sejtekben a sejt-sejt kapcsolatokban lokalizálódik, az apikális felszínről szinte teljesen hiányzik.[16] Amennyiben a sejtek közötti homodimerek kialakítása sérül - rövidebb extracelluláris régió vagy plusz glikolizáció miatt-, a sejt-sejt kapcsolatok nehezebben záródnak vissza trombin kezelést illetve transzmigrációt követően.[16], [17] A PECAM-1 intracelluláris részén egy úgynevezett ITIM-régió található (immunoreceptor tyrosine inhibitory motifs), amely Src homológ kinázokat gyűjt maga köré, például az SHP2-t, amely a PECAM-1 foszforilációjának következtében leválik az ITIM régióról és a VE-cadherin tirozin oldalláncának defoszforilációjával módosítja a sejtkapcsoló struktúrák erősségét. [10] A PECAM-1-re lokálisan kifejtett mechanikai erő a PI3K aktiválását váltja ki, amely az integrin jelátvitelen keresztül a teljes sejtre ható globális Rho és ERK aktivációt eredményez. [18] A PECAM-1 általi ERK aktivációt mások is megfigyelték endotél sejtekben. A véráram megindulása PECAM-1 mechanoreceptor közreműködésével aktiválja az ERK útvonalat konfluens endotél sejtekben,[19] illetve kiváltja a citoszkeleton átrendeződését.[20] A PECAM-1-re specifikusan kifejtett mechanikai erő hatására Rho-GEF-ek aktiválódnak, mint a LARG és GEF-H1,[4] amelyek közül csupán a GEF-H1 aktivitása függ az ERK útvonaltól és a FAK (fokális adhézis kináz) foszforilációjától, míg a LARG az ERK útvonaltól függetlenül fejt ki hatását. [18] Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PECAM-1 mechanotranszdukciója bonyolult, több párhuzamos jelátviteli útvonalon keresztül megvalósuló folyamat.

A PECAM-1 szerepe régóta kutatott az endotél sejtek biológiájában. PECAM-1 hiányos endotél sejtekben sérül az aktin citoszkeleton átrendeződése a véráramlásból eredő nyíróerő hatására. Míg a kontroll sejtekben az aktin citoszkeleton a véráramlással megegyező irányban stressz-szálatokat alakít ki, addig PECAM hiányában az aktin továbbra is a sejthártya alatti

perifériás gyűrűben helyezkedik el.[20] Amennyiben a sejtek kisebb mennyiségben expresszálják a PECAM-1-et, könnyebben leválnak a tenyésztőedényről az áramlás által kifejtett nyíróerő következtében, azaz meggyengül a sejt-extracelluláris mátrix kapcsolat.[19] Abban az esetben azonban, ha az endotél sejtek kizárólag a PECAM-1 extracelluláris régióit expresszálják, nem sérül az endotélium barrier funkciója, és hamarabb visszarendeződnek a sejtkapcsoló struktúrák a pórusképzés után.[16]. PECAM-1 hiányában, vagy extracelluláris doménjének antitestes elfedésével sérül viszont a leukocita transzmigráció, és az immunsejtek megrekednek az endotél sejtek és a bazális membrán között.[21]. Legújabb tanulmányok szerint a leukocitával való kapcsolódás a PECAM-1 intracelluláris doménjének foszforilációját okozza, amely hatására az SHP2 disszociál a PECAM-ról és ez a folyamat segíti elő a VE-cadherin Y731 oldalláncának defoszforilációját (amelyhez azonban az aktin kontrakciója is szükséges, ld. korábban). A PECAM-1-re kifejtett mechanikai erő hatására megfigyelték az endotél sejtek extracelluláris mátrixhoz történő adhéziójának növekedését, [18] amely összhangban van azzal az eredménnyel, hogy a PECAM megfelelő mennyisége valóban esszenciális a megfelelő mértékű sejt-ECM adhézióhoz. Ebben a tanulmányban azonban a PECAM molekulán keresztüli mechanikai jelátvitel sejt-sejt kapcsolatokra kifejtett hatását nem vizsgálták. Megfigyeléseink szerint már a PECAM-1 adhézió hatására is változások következnek be a HUVEC sejtek aktin citoszkeletonjának szerkezetében, kérdéses viszont, hogy ez milyen mechanizmusokat indít el az endotél sejtekben, és ez mennyiben különbözik a mechanikai erőhatás következtében kialakuló változásokól az aktin citoszkeletonban, a sejtkapcsoló struktúrákban és a sejt-extracelluláris mátrix kötés erősségében.

2 Célkitűzések

1. Korábban a szakirodalomban egymástól függetlenül leírták, hogy BRAF knockout és PECAM-1 knockout egér endotél sejtekben is hasonló fenotípus alakul ki: az aktin vastag perifériás gyűrűben helyezkedik el. Ezzel párhuzamosan megfigyelték azt is, hogy sérül az F-aktin dinamikus átrendeződése is, ugyanis gyulladásos faktorok jelenlétében sem alakulnak a kontrakcióért felelős stressz-szálak és ezzel egyidőben csökken az endotélium átjárhatósága. Első kísérletemben arra kerestem a választ, hogy humán endotél sejteken is megfigyelhető-e az egerekben leírt BRAF és PECAM-1 hiányában kialakuló perifériás aktin gyűrű, illetve a fehérjék hiánya miképp befolyásolja a gyulladásos faktorok által előidézett aktin reorganizációt.
2. BRAF knockout egér endotél sejtekben korábban megfigyelték, hogy BRAF hiányában megnő az endotél réteg permeabilitása, továbbá csökken a rákos sejtek extravazációja. Kutatócsoportunk megmutatta, hogy ez a fenotípus humán endotél sejtekben is megfigyelhető BRAF siRNS kezelés hatására. Ezekhez a folyamatokhoz elengedhetetlen az aktin citoszkeleton dinamikus átrendeződése, amelyet a citoszkeletális ROK α lokális aktivitása is befolyásol. A ROK α sejten belüli megfelelő lokalizációjához egy másik RAF izoforma, a RAF1 jelenléte szükséges. A RAF1-ROK α komplex mennyiségét viszont a BRAF mennyisége is befolyásolja. Melanóma kezelésére eddig csak olyan BRAF inhibitorokat alkalmaztak, amelyek megnövelték a BRAF-RAF1 heterodimer mennyiségét, azonban egy új generációs inhibitorral a heterodimer mennyisége csökkenthető. A fent említett mechanizmus alapján egy ilyen inhibitorral kettős hatást érhetünk el: a melanóma és az áttétképzés csökkenését. Mindezek alapján célul tűztem ki, hogy megvizsgáljam vajon a PLX8394 inhibitor valóban képes-e a BRAF-hiányos sejtekre jellemző módon csökkenteni a transzmigráció mértékét és a trombin hatására kialakuló permeabilitás-növekedést.
3. Az immun- és rákos sejtek transzmigrációjuk során erősen fejtenek ki különböző adhéziós molekulákon keresztül az endotél rétegre, ezzel szabályozva az endotél sejtek aktin citoszkeletonjának dinamikáját az átjutásuk sikerességének növelése érdekében. Célul tűztem ki az egyik ilyen adhéziós molekula, a PECAM-1-en keresztüli jelátvitel mechanizmusának tanulmányozását PLX8394 inhibitor jelen- és távollétében. Kísérletemben MEK inhibitor is alkalmaztam, hogy szét tudjam választani a BRAF MEK/ERK útvonalon keresztül történő, illetve a RAF1-ROK α dimer-függő aktin citoszkeletont szabályozó jelátvitelt.

3 Eszközök és módszerek

3.1 HUVEC sejtenyészet fenntartása

A kísérletekhez használt HUVEC (Human Umbilical Vein Endothel Cell) sejteket ezzel foglalkozó cégektől szerezzük be, és hozzánk p1-es sejtörzsként érkeznek folyékony nitrogénben lefagyasztva. Az endotél sejtek letapadó hámsejtek, így életben maradásukhoz szükséges a megfelelő mátrix biztosítása, melyet a tenyésztő edény zselatinozásával érünk el. Az endotél sejtek természetes struktúrájukhoz hasonlóan sejtenyészetben is egyrétegű (monolayer) kultúrát alakítanak ki, így amint majdnem teljesen benőtték a rendelkezésre álló felületet (konfluens a kultúra), passzálás szükséges. A passzáláshoz a sejteket szuszpenzióba kell vinni, amelyet mi tripszines emésztéssel érünk el.[22] A sejtek kirakása után és a kísérletek megkezdése előtt érdemes várni néhány napot, amíg a sejtek ismét letapadnak a tenyésztőedény falára és kialakítják a konfluens monolayer.

Az in vitro sejtenyészetekkel való munka során végig steril fülkében dolgoztam, a fülkébe bevitt eszközöket és puffereket 70%-os etanollal fertőtlenítettem, valamint a steril fülkét használat előtt és után is UV fénnel csíramentesítettem. Az élő sejttel érintkező eszközöket használat után hipóval és etanollal fertőtlenítettem.

3.2 HUVEC sejtek felolvasztása

A HUVEC sejtek felolvasztásához szükséges puffereket és felhasználandó mennyiségüket az 1. táblázat foglalja össze.

	Hőmérséklet	Térfogat	
		6-well plate (375 000 sejt / 2well)	T25 flaska (1 100 000 sejt / 2 flaska)
0,5% zselatin	37°C	500 µl/well	2 ml
K2	4 °C	10 ml	10 ml
MCDB ¹	37°C	2 ml/well	8 ml

1. táblázat: Szükséges pufferek és tenyésztő edények a felolvasztott sejtszámhoz

Bemelegítjük a HUVEC sejtek tenyésztő médiumát, az MCDB-t 37°C-ra. A sejtek kitételére szánt tenyésztő edényt bevonjuk 0,5%-os zselatin oldattal, majd 15 percre betesszük a 37°C-os

¹ kiegészítve 5% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 1% HEPES, 1% Gluta-MAX Supplement, 0,3% inzulin-transzferrin-szelén, 1 ng/ml fibroblaszt növekedési faktor, 2 ng/ml EGF, 5 µg/ml C-vitamin, 250 nM hidrokortizon és 7,5 U/ml heparin hozzáadásával.

inkubátorba. Ez idő alatt kivesszük a sejteket tartalmazó csövet a folyékony nitrogénes tartályból és addig melengetjük amíg teljesen felolvad és ezután rögtön 10 ml 4°C-os K2 oldatba mérjük át a cső teljes tartalmát és összekeverjük. Centrifugáljuk 1200 rpm-en 7 percig, ezalatt a zselatinozott edényről leszívjuk a maradék zselatint. A centrifuga lejárta követően Pasteur pipetta segítségével vákuummal leszívjuk a felülúszót, majd a sejteket tartalmazó pelletet felfuszpendáljuk MCDB médiumban, és egyenletesen eloszlatjuk a zselatinozott edényben. Másnap reggel megnézzük, és ha szükséges (sok a halott sejt), lecseréljük a médiumot.

3.3 HUVEC sejtek passzálása

Bemelegítjük a puffereket (2. táblázat), az új tenyésztő edényt bevonjuk zselatinnal és betesszük 37°C-ra.

	Hőmérséklet	Térfogat		
		6-well plate-re (max 400 000 sejt)	T25 flaskára (max 1 000 000 sejt)	T75 flaskára (max 2,5-3 000 000 sejt)
0,5% zselatin	37°C	1 ml	2 ml	5 ml
PBS	37°C	2*1 ml	2*2ml	2*5 ml
tripszin	37°C	0,5 ml	1 ml	2 ml
K2	37°C	2,5 ml	5 ml	10 ml
MCDB	37°C	3 ml/well	5 ml	12-13 ml

2. táblázat: Szükséges pufferek mennyisége különböző tenyésztő edényekre

A sejteket a flaskában mossuk kétszer 2 ml PBS-sel és a felülúszót leszívjuk Pasteur pipettával. A sejtekhez hozzáadjuk a tripszint, és betesszük 37°C-ra. Percenként ellenőrizzük fénymikroszkóppal, hogy a sejtek felkerekedtek-e, illetve felúsztak-e már. Ha ez megtörtént, általában 2-2,5 perc múlva a tripszin aktivitását leállítjuk K2 médiummal, és centrifugáljuk 1200 rpm-en 7 percig. A felülúszót leszívjuk, a sejteket pedig felfuszpendáljuk MCDB-ben. Amennyiben kísérlethez rakjuk ki a sejteket, ahol fontos tudnunk a sejtszámot, az MCDB-ben felfuszpendált sejtekből kiveszünk és Bürker kamrában megszámloljuk a sejtek számát 0,1 µl térfogatban és ebből hígítással vagy nagyobb térfogat kirakásával érjük el a kívánt sejtszámot.

Tenyésztő edény	Kirakandó sejtszám	Ajánlott térfogat
8-well chamber slide	65 000-80 000 sejt/well	200-300 µl
96-well plate	60 000 sejt/well	100 µl
24-well plate	100 000 sejt/well	300-500 µl
6-well plate	400 000-430 000 sejt/well	1 500 µl
Imaging dish	85 000 sejt	200 µl

3. táblázat: *Kísérletek során használt tenyésztő edények tulajdonságai, ajánlott sejtszámok*

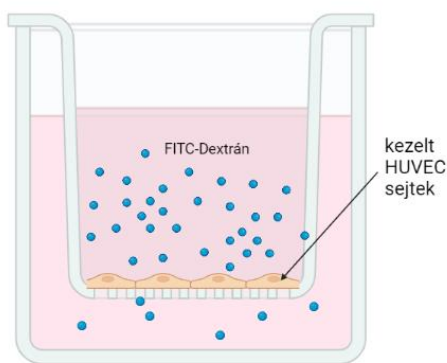
3.4 Csendesítés RNS interferenciával

Az RNS interferencia természetes körülmények között is megfigyelhető génexpresszió-szabályozó eszköze a sejteknek. A már átíródott mRNS-ekről képződő fehérje mennyiségét lehet gyorsan csökkenteni a rövid kettős szálú RNS-ekkel, és a microRNS-ekkel. A kettős szálú RNS-eket a RISC komplex ismeri fel és az egyik szálát beépíti a komplexbe, a másik szál pedig lebomlik. Amennyiben RISC komplexbe épült 19-29 nukleotid hosszúságú RNS komplementer szekvenciát talál, akkor hibridizálódik azzal, és megkezdődik a lebontása a Dicer enzim közreműködésével. Kis kettős szálú RNS-t könnyen a sejtekbe juttathatunk mesterségesen is, sejthártyán átjutó komplexbe csomagolva az RNS-t. [23]

A transzfekciónál letapadt sejtekkel dolgozunk 6-well platen. Először az siRNS komplexet készítjük el oly módon, hogy minden lyukra 6 µl 5 µM siRNS-t hígítunk 100 µl OPTI-MEM médiumban, valamint egy másik eppendorfban 6 µl RNAiMAX-ot hígítunk szintén 100 µl OPTI-MEM-ben, majd az első cső tartalmát a másodikhoz adjuk. A mixet 20 percig inkubáljuk szobahőn. Ez idő alatt a sejteket kétszer mossuk PBS-sel, és 800 µl OPTI-MEM médiumot teszünk rájuk. A 20 perc lejárta után az RNS mixet cseppenként a sejtekhez adjuk, majd 4 órán át 37°C-on inkubáljuk. Ezalatt a sejtek felveszik az siRNS-eket és az idő lejárta után már tripszinezhetők és kitehetők a kísérletnek megfelelő tenyésztő edénybe.

3.5 Permeabilitás esszé

A kísérlethez egy 96-well plate-re és egy 96-transzwell plate-re van szükség. A transzwell plate alja pórusos, így a folyadék átjut rajta, de a sejtek nem. A transzwell plate lyukait 0,5%-os zselatin oldattal inkubáljuk, hogy a HUVEC sejtek ki tudjanak tapadni a felületre. A 96-well plate lyukait feltöltjük MCDB médiummal, ebbe fog merülni a transzwell plate, majd a transzwell plate lyukjait is feltöltjük médiummal a sejtek felett. A transzwell plate-re



6. ábra: Permeabilitás esszé összeállítása

1U/ μ l trombint keverünk. További 3 óra inkubálást követően az alsó 96-welll plate lyukjaiból alapos szuszpendálás után kiveszünk 100-100 μ l-t és fekete 96-well plate megfelelő lyukaiba mérjük át. A sejtrétegen átjutott fluoreszcens molekulák (FITC-dextrán) mennyiségét plate readerrel határozzuk meg a 488 nm hullámhosszon való elnyelés és a 535 nm-en való kibocsátás intenzitása alapján.

lyukanként kirakott 60 000 sejt 2 nap alatt konfluensen benövi a transzwell alját. (6. ábra) A sejteket inhibítorral kezeljük, amelyhez a médiumot alul és fölül is kicseréljük AIMV²-ben 1:1000-hez hígított PLX8394, vagy a kontroll sejtekben hígított DMSO oldatra. 1 óra inkubálás után az alsó részen visszacseréljük a médiumot MCDB-ben oldott PLX8394/DMSO-ra, felül pedig 30 μ l AIMV oldatba 2 μ l FITC-dextránt és

3.6 Mágneses kísérlet

3.6.1 Mágneses gyöngy előkészítése

2.8 μ m-es mágneses gyöngyből 28 μ l-t kiveszünk levágott hegyű pipettaheggyel egy 1,5 ml-es fehérjéket rosszul kötő (low protein bind) Eppendorf csőbe és háromszor mossuk Buffer B-vel (0,1 M-os Nátrium-foszfát puffer, pH=7,4).[24] A gyöngyöket erős (neodímium) mágnessel ki lehet halászni az Eppendorf cső falára és ekkor a felülúszó könnyen leszívható. A harmadik mosás után 160 μ l Buffer B-t hagyunk rajta, majd 140 μ l-t átmérünk belőle egy PCR csőbe és a csőhöz 7 μ l 0,5 mg/ml-es PECAM-1 antitestet (ez 3,5 μ g PECAM-1-nek felel meg) adunk. A PCR csövet levágott tetejű Eppendorf csőbe tesszük és alufóliába csomagoljuk. Szobahőmérsékleten körülbelül 48-72 órán át inkubáljuk rotoron.

Az idő lejártá után levágott végű pipettaheggyel átmérjük a PCR cső tartalmát egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe és háromszor mossuk 1 ml PBS-sel, majd 700 μ l PBS-ben vesszük fel. 1 well sejtre 1 ml MCDB-ben hígított gyöngyre van szükség, amelyhez körülbelül 30 μ l előkészített gyöngyöt adunk 1 ml MCDB-hez. A kísérletnél ideálisan minden sejtre 2-3 gyöngy jut, ezért

² AIMV médium kiegészítve 1% FBS-sel, 1 ng/ml bFGF-fel, 2 ng/ml EGF-fel és 7,5 U/ml heparinnal

az MCDB-ben hígított gyöngyök koncentrációját megszámloljuk Bürker kamrában, és addig hígítjuk amíg 80-90 gyöngyöt nem számlolunk 0,1 μ l térfogatban.

3.6.2 Kísérlet kivitelezése immunfluoreszcencia vizsgálathoz

A kísérletek kivitelezésére 35 mm átmérőjű Imaging dish-t használunk, amelynél a petricsésze alja üvegből készül, így a rajta növő sejtek könnyen vizsgálhatók konfokális mikroszkóppal. Mivel az üveg rész kisebb a teljes átmérőnél, az ilyen edényekbe elég 85 000 sejtet kirakni. A sejteket 200 μ l térfogatban tesszük ki, majd 1 óra múlva - mikor már letapadtak – a térfogatot kiegészítjük 1,5 ml MCDB médiummal. Két nap növesztés után elvégezhetjük az inhibítor kezelést, és a sejtek aktivációját.

PLX8394 inhibítorból 10-szeres hígítást készítünk DMSO-ban, így 1 mM-os koncentrációt kapunk, U0126 inhibítorból pedig 10 mM-os oldatot készítünk DMSO-ban. Az PLX8394 és U0126 oldatokból 1 μ l-t pipettázunk 1 ml MCDB médiumba, a kontrollnál pedig 1 μ l DMSO-t oldunk 1 ml MCDB-ben. Imaging dish-re 200 μ l-t teszünk a médiumban oldott inhibítorból, majd 1 órán keresztül 37°C-on inkubáljuk.

Az inkubációs idő lejártát követően a kontroll sejteket rövid időre jégre tesszük, leszívjuk róluk az inhibítoros médiumot és szobahőmérsékletű PFA-val fixáljuk 15 percig a billegtetőn. A fixálás után kétszer mossuk PBS-sel, majd 4°C-ra tesszük a további felhasználásig. A többi sejtet a kísérletnek megfelelő ideig inkubáljuk az előkészített MCDB-ben hígított gyöngyökkel. Ekkor a mágneses gyöngyökhöz asszociált anti-PECAM-1 antitestek hozzákapcsolódnak a sejtek felszínén található PECAM-1 fehérjékhez. Ezután változó hosszú ideig neodímium mágnezt helyezünk a sejtek fölé, amely 40 pN erőt fejt ki a 2.8 μ m-es gyöngyökre, ezáltal specifikusan a PECAM-1 fehérjékre. A mechanikai aktiválást követően a sejteket PFA-val fixáljuk, mossuk kétszer PBS-sel és PBS-ben 4°C-on tároljuk az immunfestésig. [24][20]

3.6.3 Kísérlet kivitelezése western blot analízishez

A kísérletekhez vagy 35 mm-es Imaging dish-t használunk, vagy pedig ha nagyobb mennyiségre van szükség (például pull down-hoz), akkor normál 35 mm-es petri csészét használunk. A normál petri csészékre 400 000-430 000 sejtet teszünk ki. Az inhibítoros kezelés és a sejtek aktiválása az immunfluoreszcencia vizsgálathoz végzett kísérlethez hasonlóan zajlik, viszont a mágneses aktivációs idő lejártát követően a sejteket jégre tesszük és a fixálás helyett kétszer mossuk jégbe hűtött PBS-sel, majd BufferA-val lizáljuk a sejteket. (4. táblázat) A lizátumot vortexeljük, 5 percre jégre tesszük, ismét vortexeljük, ezután pedig lecentrifugáljuk

BufferA				
Komponensek	Törzsoldat	Törzsoldat tárolása	1 ml térfogathoz	Szerepe
25 mM HEPES	1 M HEPES, pH=7,4	hűtő	25 µl	
MQ			573 µl	
150 mM NaCl	5 M NaCl	polc	30 µl	
1 mM EGTA	0,5 M EGTA, pH=7,4	hűtő	2 µl	Ca-függő metalloproteáz gátló
10 mM NaPPi	0,2M NaPPi	polc	50 µl	általános foszfatáz gátló
10 mM NaF	0,5 M NaF	hűtő	20 µl	Ser/Thr foszfatáz inhibitor
5 mM Na ₃ VO ₄	100 mM Na ₃ VO ₄	-20°C	50 µl	Tyr foszfatáz inhibitor
1 mM PMSF	100 mM PMSF(izopropanolban)	-20°C	10 µl	Ser/Cys proteázok inhibitora
Teljes, EDTA mentes PIC	25x(Sigma:11873580001)	-20°C	40 µl	többféle proteáz gátló
10% glicerin			10 µl	
1% NP-40	10% NP-40	hűtő	10 µl	
Az összetevők összemérése után az oldatot átszűrjük 0,22 µm pórusátmérőjű steril szűrőn				

4. táblázat: *BufferA* komponensei, elkészítése

5000g-n, 4°C-on 5 percig. A felülúszót áttesszük 0°C-ra hűtött eppendorf csőbe és folyékony nitrogénben lefagyasztva -80°C-on tároljuk a további felhasználásig.

3.7 Immunfestés

A 4°C-on tárolt sejteket kétszer 5 percig mossuk HBSS-sel (Ca²⁺ tartalmú), majd 10 percig permeabilizáljuk (0,25%-os Triton TBST-ben oldva). Ismét háromszor 5 perc mosás következik HBSS-sel, majd 1 órán keresztül inkubáljuk blokkoló oldattal (1% BSA TBST-ben oldva), hogy csökkentsük az aspecifikus kötődéseket. A blokkolást követően hozzáadjuk a

fehérje	származás	katalógusazám (Cell Signaling)	hígítás
VEC	nyúl	cs2500	1:400
pMLC (Ser19)	egér	cs3675	1:200
PECAM-1	egér	cs3528	1:2000
tCof	nyúl	cs5175	1:100

5. táblázat: *Használt elsődleges antitestek*

sejtekhez a BSA-oldatban hígított elsődleges antitesteket (5. táblázat), és 16 órán át (éjszaka) együtt inkubáljuk 4°C-on, billegtetőn.

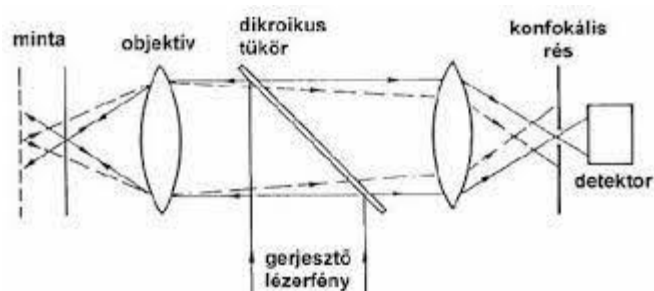
Másnap reggel a mintákat háromszor 5 percig mossuk TBST-ben, majd 1 órán át inkubáljuk a másodlagos antitestekkel (6. táblázat), illetve phalloiddinnel, amely az aktin filamentumokat festi. Mivel a másodlagos antitestek fényérzékenyek, ettől a lépéstől kezdve a lehető legkevesebb megvilágítással dolgozunk. Az inkubálást követően háromszor mossuk TBST-ben, majd egyszer PBS-ben. Rátesszük a sejtekre a Hoechst festéket, amely a sejtmagokat jelöli, és rajta hagyjuk 2 percig. Végül kétszer mossuk PBS-sel és Dabco-val (1 ml 1% BSA PBS-ben oldva + 1 ml glicerín + 20 µl Dabco 100x) borítjuk be a sejteket, hogy ne száradjanak ki a mikroszkópos felvételek készítése közben és minél hosszabb ideig megmaradjon a fluoreszcens jel.

	gerjesztés	hígítás
α -rabbit	488	1:2000
α -mouse	546	1:2000
phalloidin	640	1:1000
Hoechst	405	1:1000

6. táblázat: Használt fluoreszcens másodlagos antitestek

3.8 Fluoreszcens konfokális mikroszkópia

A konfokális mikroszkópnak két nagy előnye van a hagyományos fénymikroszkóphoz, illetve a fluoreszcens mikroszkóphoz képest: jobb felbontású képeket érhetünk el, mivel hatékony a zajsztűrés, azaz a tört és szórt fénysugarak a keskeny konfokális résen nem jutnak át a detektorhoz, így élesebb, kontrasztosabb képeket kapunk. A másik nagy előnye, hogy képes az optikai szelektelésre, azaz a mintából meghatározott magasságú síkokban képes felvételt készíteni. Az rétegek összeillesztésével később rekonstruálható a minta háromdimenziós



7. ábra: A konfokális fluoreszcens mikroszkóp szerkezete [25]

szerkezete. A konfokális detektálás miatt a felvétel során mindig csak a minta egy kis részét világítjuk meg monokromatikus fénnel. A fluoreszcensen jelölt minta elnyeli a neki megfelelő energiájú fotonokat, majd kisebb energiával, nagyobb hullámhosszal kisugározza azokat. A

konfokális mikroszkóp fontos építő eleme a dikroikus tükör, amely meghatározott hullámhosszú fényt visszaver, másik hullámhosszon viszont áteresztő. (7. ábra) Ily módon a gerjesztés és az emittált fény detektálása a minta ugyanazon oldaláról történik. [25]

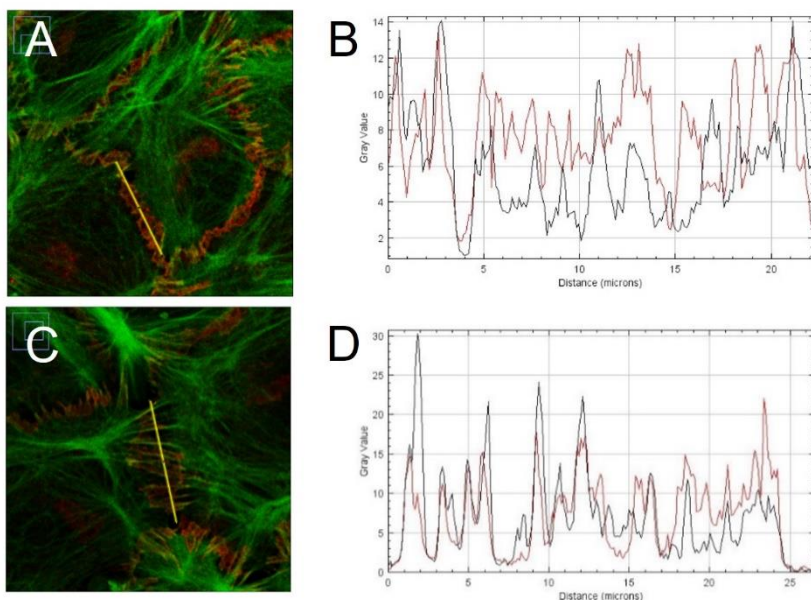
Lehetőség nyílik több fluorofór egyidejű detektálására, amennyiben a mikroszkóp képes több hullámhosszúságú monokromatikus fénynyaláb egyidejű előállítására, ha rendelkezünk olyan fluoreszcens markerekkel, amelyeknek abszorpciós és emissziós spektruma jól elválasztható.

Kísérleteim során az Abberior Instruments STED konfokális mikroszkópját használtam, ahol 5 különböző hullámhosszúságú gerjesztő lézer áll rendelkezésre, melyből én általában négyet használtam. A mikroszkóp működtetése a hozzá tartozó Inspector programon keresztül zajlott, ahol be lehet állítani a mérési paramétereket, mint a kép felbontása (a felvett terület mérete és a képpontok száma alapján), felvett rétegek száma, egymástól való távolsága, alkalmazott hullámhosszok, és a konfokális rés átmérője. [26]

A felvételek készítése során azonos helyről, 5-7 rétegben, 4 csatornán vettük fel az intenzitásokat, amelyet később a Fiji (ImageJ) képelemző és képszerkesztő programjával értékeltünk ki.

3.9 Mikroszkópos felvételek kiértékelése

A felvett rétegekből kiválasztottam azokat a síkokat, ahol a kép éles, és ezeket használtam fel



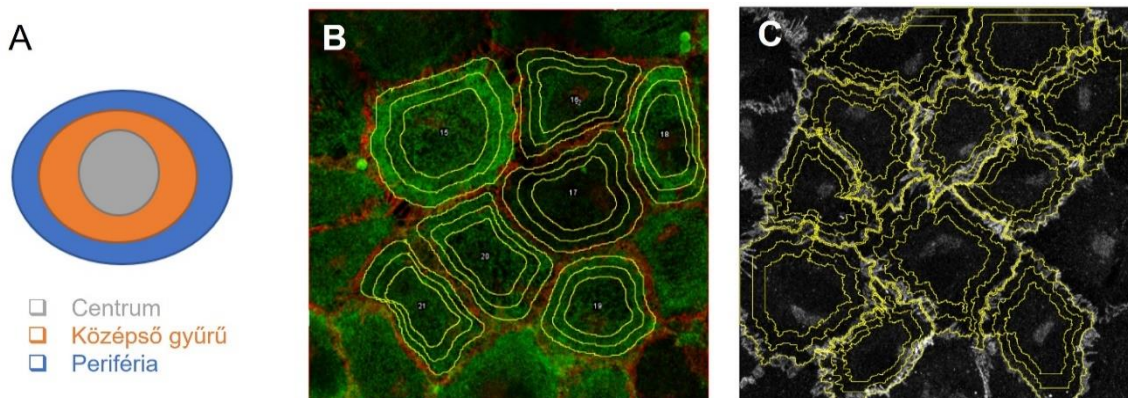
8. ábra: Aktin (zöld) és VE-cadherin (piros) kolokalizációja a stabil (A) és átrendeződő (C) adherens kapcsolatokban. Az átrendeződő sejt-sejt kapcsolatokban az aktin és a VE-cadherin együttesen lokalizálódik, amelyet a vonal menti intenzitás görbe mutat (B és D)

a rétegek összefésülésére az adott pixel pozícióban maximális értéket megtartva a rétegekből (MAX intensity stack). Ily módon kiszűrhetők az analízisből azok a rétegek, amik nem adnak plusz információt, csak a háttérrel növelik, vagy valamilyen műterméket tartalmaznak.

Mivel a különböző csatornákon felvett képek pixel intenzitás tartománya

különböző, ezért mielőtt a különböző csatornákon felvett MAX intensity képekből kompozitot készítettem, normalizáltam a pixel intenzitásokat, mint ahogy a protocols.io oldalán javasolják. [27] Ily módon elméletileg a különböző csatornákon felvett fehérjék intenzitása egy nagyságrendbe esik, és az együtt lokalizálódó fehérjék a kompozit képeken a két szín összegét adják. (Például zöld és sárga kompozit képen a kolokalizáció sárga, kék és piros kompoziton magenta.) Ahol a színkeverés nem ad látványos eredményt, ott a vonal menti intenzitásokat közös diagrammon ábrázolva bizonyíthatjuk a fehérjék együttes elhelyezkedését. (8. ábra)

A fehérjék sejten belüli lokalizációjának aránya kiszámolható periféria és a centrum között, mivel az egy felvételen belüli intenzitások összehasonlíthatók és értékes információt hordoznak. A lokalizáció kvantifikálása során a nyers felvételekkel dolgoztam, a pixelintenzitások módosítása nélkül. A VE-cadherint ábrázoló csatornán bejelöltem a sejthatárokat, majd a pMLC csatornáján végeztem el a méréseket. Minden sejtet három, közel azonos területű részre osztottam koncentrikus körökkel, így külön mértem a pixelintenzitást a



9. ábra: A fehérjék sejten belüli lokalizációjának kvantifikálása. A sejtek felosztása három térrészre koncentrikus körökkel (A), gyakorlati megvalósulása kézi kijelöléssel (B), és automatikus szegmentálással (C).

sejtek perifériáján, a centrumban és a kettő közé eső gyűrűben. (9. ábra) Az automatikus szegmentálást megjelenítő 9.C ábrán sárgával a gépi szegmentálás látható, fehérrel pedig a valós sejthatár. Kontroll sejtekben az automatikus kijelölés jól követte a valós sejthatárt, és hasonló eredményeket produkált, mint a sejtek szabad kézi kijelölése. A permabilitást növelő szerekkel kezelt sejtekben viszont, ahol átrendeződnek a sejtkapcsolatok és a VE-cadherin folytonossága megszakad a sejthatárokon, az automatikus szegmentálás nem ismerte fel jól a sejthatárokat, így az intenzitások mérését kézi kijelöléssel végeztem el.

A kiértékelés megkönnyítésének érdekében ImageJ makro kódokat írtam, amelyek automatikusan elvégzik az összefésülést és a kompozíció készítést a nyers felvételeket tartalmazó teljes mappa fájljaira.

3.10 Western blot

A Western blotnál fontos, hogy a minták fehérje mennyisége nagyjából megegyezzen, ezért a fehérje koncentráció mérésére BCA esszét használhatunk. 96-lyukú plate-n BSA hígítási sort készítünk és meghatározzuk az egyes lyukak abszorbanciáját 562 nm-en. A BSA hígítási sor mintáira mért abszorbancia értékek lineáris illesztésével kapott paraméterek segítségével a mintákra mért abszorbancia értékekből kiszámolható a minta fehérje koncentrációja, és ebből számoljuk ki a géltre felvivendő minta térfogatát.

A mintákat előkészítjük oly módon, hogy merkaptóetanollal denaturáljuk és SDS-sel bevonva állandó töltést kölcsönzünk a fehérjéknek. A gyakorlatban SB5x-et adunk a mintához oly módon, hogy az 5-ször híguljon a végtérfogatban. A hasonló végtérfogat és a könnyebb pipetázás kedvéért kiegészíthetjük a keveréket BufferA-val. A kapott keveréket inkubáljuk 95°C-on 5 percig, majd lecentrifugáljuk 13000 rpm-en 3 percig.

3.10.1 Immunprecipitáció

Amennyiben fehérje foszforilációs mintázatát, vagy pedig kölcsönható partnereit szeretnénk vizsgálni, érdemes feldúsítani az adott fehérjét, hogy a gyenge foszforiláció és a gyenge kölcsönható partnerek is detektálhatók legyenek. Én VE-cadherin immunprecipitációt végeztem, amely során a sejtlizátum felülúszójához anti-VE-cadherin (cs2500) antitestet teszünk, majd éjszakára 4°C-on rotátoron hagyjuk, hogy az antitest kötődjön a lizátum VE-cadherin fehérjéjéhez. Másnap Protein G gyöngyöt teszünk a lizátumhoz, amellyel 2 órán keresztül inkubáljuk 4 °C-on, így a gyöngyökhöz kapcsolódik a VE-cadherin és kötőpartnerei. Ezt követően háromszor mossuk a gyöngyöket 1ml BufferA-val, a mosások között centrifugáljuk 1000g-n, 4°C-on 5 percig. Az utolsó centrifugálás után teljesen leszívjuk a felülúszót és SB5x-el eluáljuk a gyöngyön kötődött fehérjéket. Ezután a mintát kiforraljuk 95°C-on 5 percig, amely során az összes gyöngyön kötött fehérje a felülúszóba kerül és denaturálódik. Újabb centrifugálás során (1000 g, 3 perc) a gyöngyök az eppendorf cső alján maradnak és mellőlük a kívánt fehérjéket tartalmazó felülúszó leszívható.

3.10.2 Poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A gélelektroforézishez tömörítő, és 7,5%-os és 12%-os elválasztó poliakrilamid gél-t használunk, melynek összetevőit a 7. táblázat foglalja össze. A polimerizáció az APS és temed hozzáadása után gyorsan megindul, ezért ekkor már rögtön bele kell pipetázni az összeszerelt gélöntőbe, amit előtte desztillált vízzel tesztelünk, hogy nem folyik-e. A gél tetejére

izopropanolt rétegzünk, hogy egyenes legyen a gél felszíne. Körülbelül 20 perc alatt teljesen megszilárdul, ekkor leöntjük a tetejéről az izopropanolt, óvatosan mossuk desztillált vízzel és szárazra itatgatjuk szűrőpapírral. Összemérjük a tömörítő gél is, és az elválasztó gél tetejére pipetázzuk, amelybe belehelyezzük a fésűt, és így szilárdul meg.

	Elválasztó 12%	Elválasztó 7,5%	Tömörítő
MQ	3,235 ml	4,48 ml	1,975 ml
1,5 M Tris, pH=8,8	2,5 ml	2,5 ml	0,9375 ml
Akrilamid	4,4 ml	2,75 ml	0,625 ml
APS	100 µl	100 µl	37,5 µl
Temed	6,5 µl	6,5 µl	3 µl

7. táblázat: Vegyszerek poliakrilamid gélhez

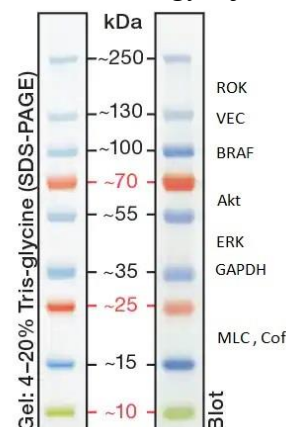
Ez idő alatt kihigítjuk 10x RB puffert, amely 60 g TRIS-t, 144 g glicint és 10 g SDS-t tartalmaz 1 l desztillált vízben oldva. A gél megszilárdulását követően üveglapokkal együtt áthelyezzük a futtató kádba, és itt is ellenőrizzük, hogy a puffer nem folyik az üveglapok közötti belső részből. Miután megbizonyosodtunk róla, hogy a gélek a futtatás során végig pufferbe merülnek, kiszedjük a fésűt és megkezdjük a minták zsebekbe töltését. A futás akkor lesz szép, ha minden zsebbe egyforma mennyiséget töltünk, így az üres zsebeket is feltöltjük SB1x-el. A futtató kádat előra csatlakoztatjuk és kis gél esetén 70V-ra állítjuk, majd amikor elérte a frontvonal a tömörítő gél alját, és elkezdtek szétválni a marker jelzései, felvisszük a feszültséget 120V-ra. Nagy tank esetén ha 1 gélünk van, akkor kezdetben 35mA-ren futtatjuk és ezt emeljük 45mA-re, 2 gél esetén 70mA-ról 90mA-re állítjuk amikor a frontvonal eléri a tömörítő alját.

Amint a frontvonal kifut a gélből, lekapcsoljuk az elfőt, kivesszük a géleket és 15 percre 1x transzfer pufferbe helyezzük, melynek célja, hogy minél kevesebb SDS maradjon a gélben, mivel az zavarja a blottolást. A transzfer puffert 1/10 részben 96%-os etanol, 1/10 részben 10x transzfer puffer (30 g TRIS és 144g glicin 1 l MQ-ban oldva) és 8/10 részben MQ vegyítésével készítjük el. A méretre vágott PVDF membránt 1-2 másodpercre 96%-os etanolba áztatjuk, majd áthelyezzük transzfer pufferbe és addig rázogatom amíg már nem taszítja a puffert. Ezután összeszereljük a blot készüléket figyelve a pólusokra. A gél és membránt szűrőpapír és szivacsok alkotta szendvicsbe helyezzük ügyelve rá, hogy ne maradjon buborék a gél és a membrán között. A blottolás kis tank esetén 16 órán át tart 4°C-on 30V-on a transzfer puffer folyamatos keverése közben. Nagy tank esetén 16 órán keresztül 200 mA-ren blottolunk, majd reggel felvesszük az áramerősséget 400 mA-re 2 órára. Ezt követően szétszereljük a készüléket

és a membránokat etanolba tesszük 1-2 másodpercre, majd szűrőpapíron hagyjuk száradni. Előnyös, ha a membránok egy teljes napot száradhatnak előhívás előtt, erősebb lesz így a jel.

3.10.3 Előhívás

A membránokat feldaraboljuk annak megfelelően, hogy melyik fehérjét szeretnénk előhívni, és azok hol futnak. (10. ábra³) A membránokat etanolba helyezzük, majd 5 percig mossuk TBST-ben. Ezután blokkoló oldatban (5g sovány tejpor 100 ml TBST-ben feloldva) 45-90 percig inkubáljuk, így az aspecifikus kötődéseket minimalizáljuk. Eközben kikeressük a -20°C-ról az elsődleges antitest oldatokat, amelyek az antitestre jellemző arányban BSA oldatban vannak hígítva. (8. táblázat)



10. ábra: Gélfuttatásnál használt molekulatömeg-marker⁵

Antitest	Származás	Hígítás	Gyártó	Katalógusszám
GAPDH	egér	1:1000	Cell Signalling	97166S
BRAF	nyúl	1:1000	Cell Signalling	14814
ROK	nyúl	1:1000	Merck Life Science	04-841
ERK	nyúl	1:2000	Cell Signalling	9102
pERK	nyúl	1:2000	Cell Signalling	9101
MLC	egér	1:500	Cell Signalling	8505S
pMLC	nyúl	1:500	Cell Signalling	3674S
VEC	nyúl	1:1000	Cell Signalling	2500S
pVEC Y731	nyúl	1:1000	Invitrogen	44-1145G #CP1981
pVEC Y731	patkány	1:500	Vestweber csoporttól	-
pVEC Y685	patkány	1:500	Vestweber csoporttól	-

8. táblázat: Western blothoz használt elsődleges antitestek

Az idő lejártá után átöblítjük TBST-vel, majd mossuk 5 percig TBST-ben. A membránokat behelyezzük az antitest oldatokba és egy éjszakán át benne hagyjuk inkubálódni 4°C-on a billegtetőn. Másnap reggel visszamentjük az antitest-oldatokat a falcon csöveikbe, és visszatesszük -20°C-ra. A membránokat háromszor 5 percig mossuk TBST-ben úgy, hogy az első mosásoknál a hasonló molekulatömegű fehérjét tartalmazó membránok ne érintkezzenek. Ezalatt összemérjük a másodlagos antitestet tartalmazó oldatokat; tejporos blokkolóban készítjük el a megfelelő hígításokat. (9. táblázat) A másodlagos antitesttel 45-90 percet inkubáljuk a membránokat, majd az idő lejártá után háromszor 10 percig mossuk TBST-

³ <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/figures/26619-ladder-002.jpg-650.jpg>

ben. A másodlagos antitestekhez HRP enzim van kötve, amely a szubsztrátjait fotonok keletkezése közben alakítja át. Az utolsó mosás közben összemérjük a szubsztrátokat, melyekben megmártjuk a membránokat és kazettába helyezzük fóliák közé, így nem száradnak ki. Fotópapírral hívjuk elő a jelölt fehérjéket sötét szobában. [28]

Antitest	Származás	Hígítás	Gyártó	Katalógus szám
anti-egér	kecske	1:4000	Jackson ImmunoResearch	115-035-003
anti-nyúl	kecske	1:4000	Jackson ImmunoResearch	111-035-003
anti-patkány	kecske	1:4000	Jackson ImmunoResearch	112-035-003

9. táblázat: *HRP-kapcsolt másodlagos antitestek Western blothoz*

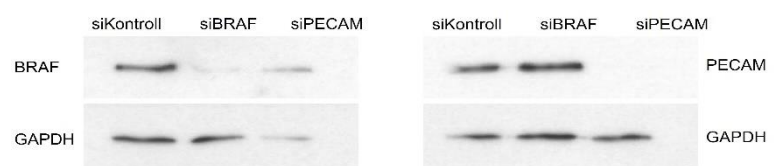
Előhívás után a membránokat desztillált vízben mossuk és kiteszük száradni. Amennyiben több hasonló molekulatömegű fehérjét is elő szeretnénk hívni (például a fehérjék foszforilált változatát is), akkor következő alkalommal strippelni kell a membránokat (vízben kiforralni), és az első TBST-s mosástól kezdve végrehajtani újra a protokollt.

4 Eredmények, értékelés

4.1 A BRAF és PECAM-1 csendesítés hatása human endotél sejtekre

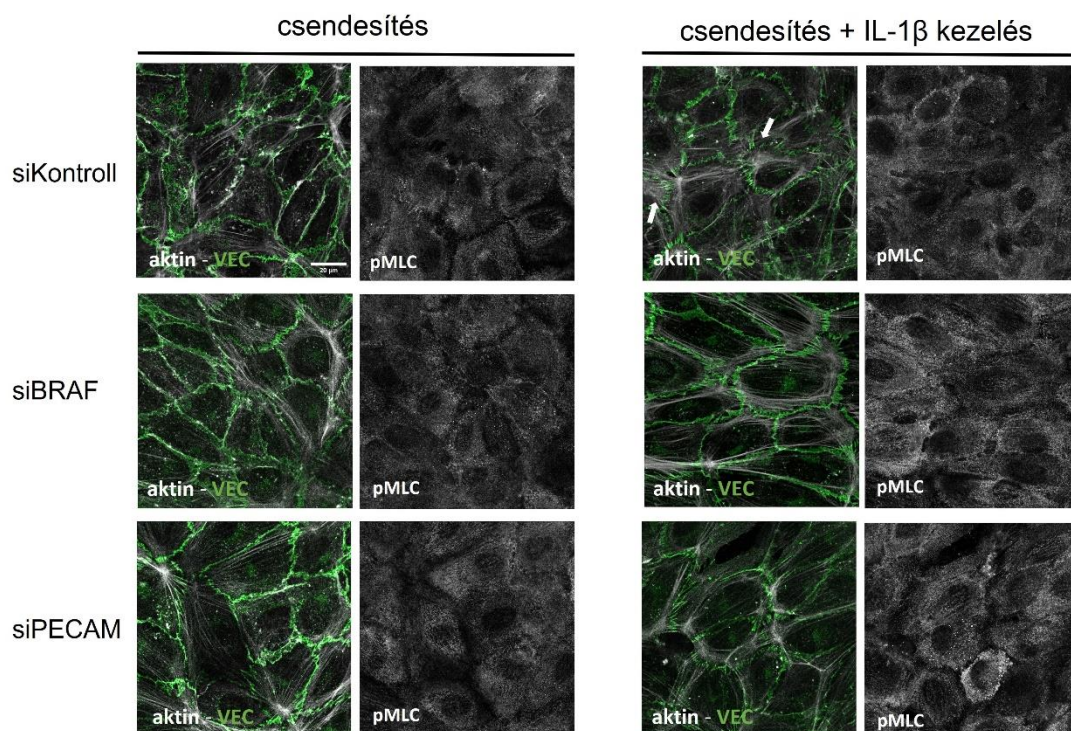
Az irodalomban korábban megfigyelték a vastag perifériás aktinyűrű kialakulását egér endotél sejtekben, [13] illetve hasonló fenotípust figyeltek meg PECAM-1 hiányos egér sejtekben. [20] Mindkét esetben sérült az F-aktin dinamikus átrendeződése, így nem alakultak ki a stressz-szálak gyulladásos faktorok, vagy a folyadék áramlása általi mechanikai ingerlésre. Felvetődik a kérdés, hogy ez vajon humán endotél sejtekben is megfigyelhető-e?

A kérdés megválaszolásához csendesítettem HUVEC sejtekben a BRAF és PECAM-1 fehérjét (11. ábra) és immunfluoreszcenciával vizsgáltam a csendesítés hatását az aktin, a



11. ábra: A csendesítés sikerességét igazoló western blotok. A felvitt minták fehérjemennyiségét a GAPDH (glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz) mennyiségével ellenőriztem.

pMLC és a VE-cadherin lokalizációjára. Összehasonlítottam továbbá a csendesített sejtekben IL-1 β gyulladásos faktorról való kezelés hatására kialakuló választ. Az IL-1 β olyan citokin,



12. ábra: A BRAF és PECAM-1 csendesített sejtekben, illetve siRNS-sel és IL-1 β -val kezelt sejtekben az aktin, a VE-cadherin (VEC) és a foszfo-MLC (pMLC) lokalizációja.

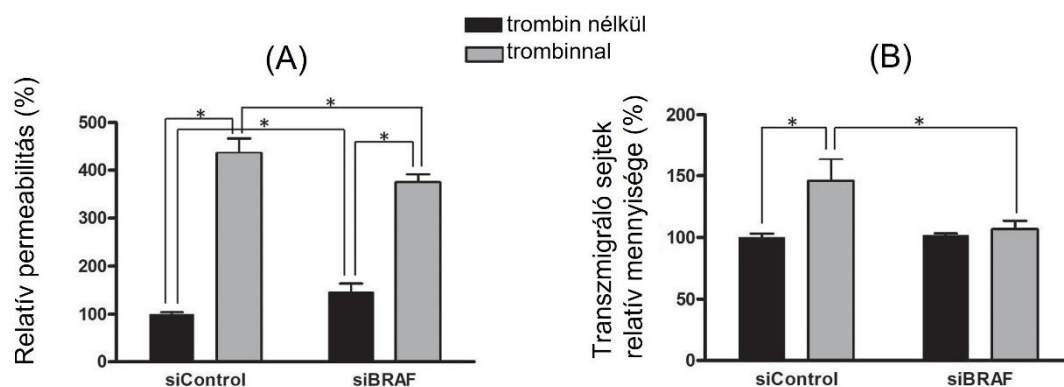
amely hatására megnő az endotél sejtréteg permeabilitása és a transzmigráló leukociták 40%-al gyakrabban választják a paracelluláris utat.[29] Ily módon feltételezhető, hogy az IL-1 β a sejtkapcsoló struktúrák átrendeződését indukálja.

Az aktin a csendesített sejtekben a sejthártya melletti perifériás gyűrűben helyezkedik el, amely vastagabb, mint a kontroll sejtekben. (12. ábra) A citokines kezelés hatására a kontroll sejtekben kialakulnak a sejthártyára merőleges stressz szálak, amelyek átrendeződő adherens kapcsolatokban végződnek (nyilak). A csendesített sejtekben ez nem figyelhető meg, az aktin továbbra is a sejthártya mentén látható, és a miozin mennyisége is kevesebb a sejt belsejében.

Az siBRAF és siPECAM csendesített sejtek hasonló viselkedése arra utal, hogy a PECAM-1 és a BRAF jelátviteli folyamata összekapcsolódik, az aktin átrendeződés sérül mindkét fehérje hiányában. Az egymásra gyakorolt hatás molekuláris folyamata ezidáig nem tisztázott.

4.2 A PLX8394 inhibítor hatása human endotél sejtekre

Kutatócsoportom korábbi eredményei alapján a trombin permeabilitást növelő hatása kisebb az siBRAF csendesített endotél sejtrétegen a kontrollhoz képest. Ezzel párhuzamosan a trombin stimuláciú hatására a kontroll sejtekben megnőtt a transzmigráló A375 melanóma sejtek mennyisége, míg a BRAF-csendesített sejtek esetén nem volt szignifikáns növekedés a transzmigráló sejtek számában.[30] (13. ábra)



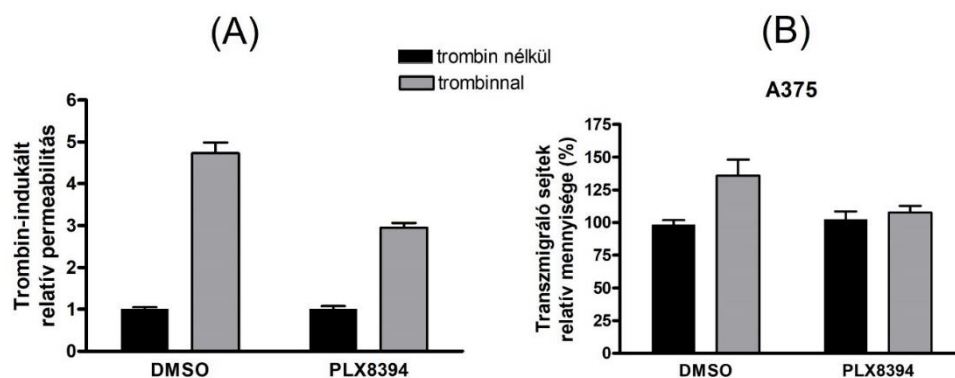
13. ábra: Az siRNS-sel és trombinnal kezelt endotél sejteken végzett permeabilitás-, (A) és transzmigrációs esszé eredményei. (B) Az endotél transzmigrációt A375 melanóma sejtekkel vizsgálták. [31]

A BRAF-csendesített sejtek csökkent permeabilitása és csökkent transzmigrációja molekuláris okát western blottal vizsgálták. Azt találták, hogy a trombin kezelés hatására megnő az MLC és ERK foszforilációja és ez az siBRAF sejtekben is megfigyelhető, csak sokkal kisebb mértékben. Ezen túl a foszforiláció dinamikája is hasonló volt, a trombin kezelés után 2 perccel

volt a legmagasabb mind az ERK, mind az MLC foszforiláltsága, és ez későbbi időpontokban csökkent a kontroll és a BRAF-csendesített sejtekben is.

Trombin kezelés hatására a foszforilált MLC (pMLC) a sejt perifériájáról beljebb húzódott és a sejtek belsejében megjelenő aktin szálakhoz asszociálódott. Ezzel szemben siBRAF sejtekben a trombin kezelés hatására nem mozdult beljebb a pMLC és aktin szálak sem jelentek meg a sejtek belsejében, hanem a perifériás gyűrű vastagodott meg. BRAF-csendesített endotél sejtekben lecsökkent a cofilin mennyisége a periférián, amely a ROK perifériás aktivitásának a következménye, [13] mivel az Y27632 ROK inhibitoros kezelés eltüntette az anomáliát. A perifériás aktingyűrű megvastagodása a cofilin hiányának következménye is lehet, mivel cofilin-csendesített HeLa sejtekben is megfigyelték ezt a fenotípust.[31] Az U0126 MEK inhibitoros kezelés hasonló fenotípust alakít ki, mint a BRAF csendesítés, tehát kevesebb az aktin szál a sejt belsejében, és lecsökken a MLC foszforiláció, viszont a cofilin sejten belüli lokalizációját nem befolyásolja. Ezek alapján a BRAF MEK/ERK aktivitásán keresztül (is) szabályozhatja az MLC, míg a ROK szabályozásán keresztül a cofilin lokalizációját befolyásolja.

Az általam használt PLX8394 inhibitor a BRAF-RAF1 heterodimerizációt gátolja, így módosítja az aktin citoskeleton átrendeződéséhez vezető jelátvitelt, mivel a ROK sejten belüli lokalizációját és aktivitását a BRAF:RAF1 heterodimer mennyisége modulálja. Kísérleteimmel arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a PLX8394 az elméleti hatásmechanizmusával megegyező módon valóban képes-e a BRAF-hiányos sejtekre jellemző fenotípus kialakítására és ezzel a BRAF csendesítéshez hasonlóan csökkenti-e a transzmigráló sejtek számát és a trombin kezelés nyomán kialakuló permeabilitás-növekedés mértékét.

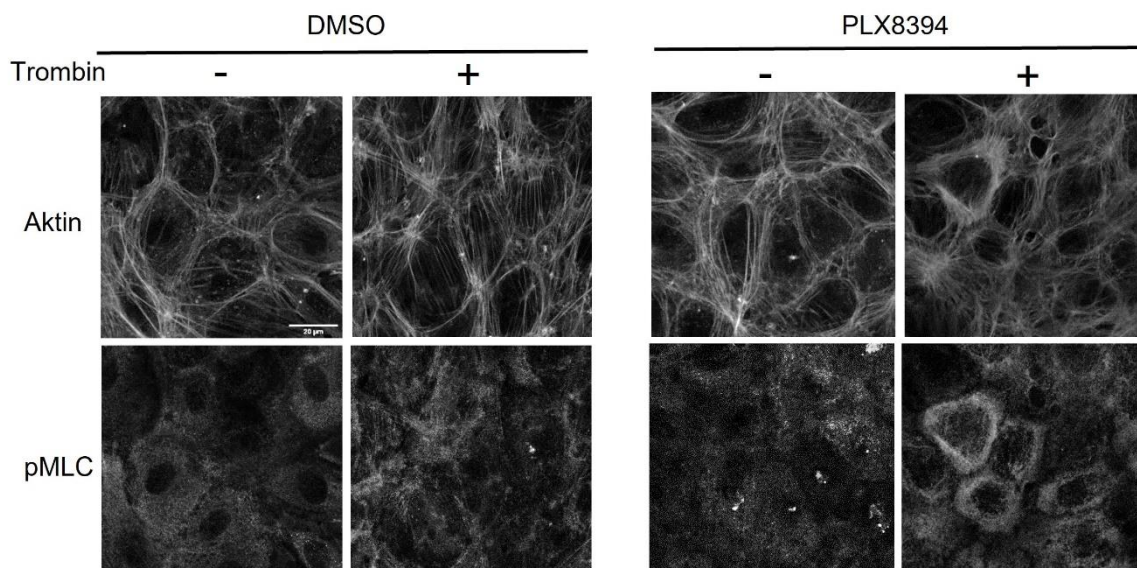


14. ábra: A PLX8394 inhibitoros kezelés hatása az endotélium permeabilitására (A) és a transzmigráció mértékére (B) [32]

A PLX8394 endotélium permeabilitására gyakorolt hatásának kiderítésére transzwell esszét használtam, ahol a PLX8394-el kezelt endotél sejtréteg permeabilitását vizsgáltam meg fluoreszcens FITC-dextránt használva. A 16. ábrán látható módon a trombin kezelés hatására határozottan megnő a kontroll, DMSO-val kezelt sejtréteg permeabilitása, a PLX8394-el kezelt sejtek esetében viszont az aktiválás hatására ugyan megnő a permeabilitás, de sokkal kisebb mértékben. Ezzel párhuzamosan a transzmigráló sejtek mennyisége is csak a kontroll sejteknél nőtt meg, a PLX8394-el kezelt sejtrétegen az A375 melanóma sejtek transzmigrációja nem fokozódott jelentősen a trombin kezelés hatására. Ezek az eredmények hasonlítanak az siBRAF csendesítéssel kapott eredményekhez, amely azt sugallja, hogy a PLX8394 inhibítorral kiváltható az siRNS kezelés. (14. ábra) [32]

A PLX8394 BRAF-csendesítést mimikáló hatásának igazolására immunfluoreszcenciával is megvizsgáltam az aktin citoszkeleton átrendeződését a PLX8394 inhibitor kezelést követően, valamint inhibitor és trombin kombinált kezelés hatására. (15. ábra)

Szemben a BRAF csendesítéssel, a PLX8394 kezelés önmagában nem okozott eltérést sem az aktin, sem a pMLC, sem pedig a cofilin lokalizációjában. Trombin kezelés hatására viszont a kontroll (DMSO) sejtekben megjelentek a sejteket átszelő stressz-szálak és a stabilizálódott

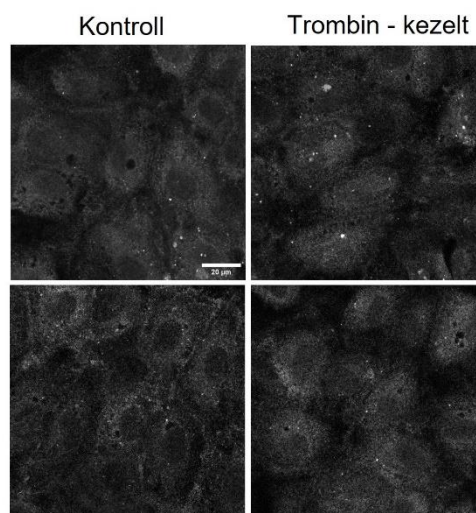


15. ábra.: Az aktin és a foszfo-MLC lokalizációja DMSO, DMSO és trombin kezelés, illetve PLX8394, PLX8394 és trombin kezelés hatására

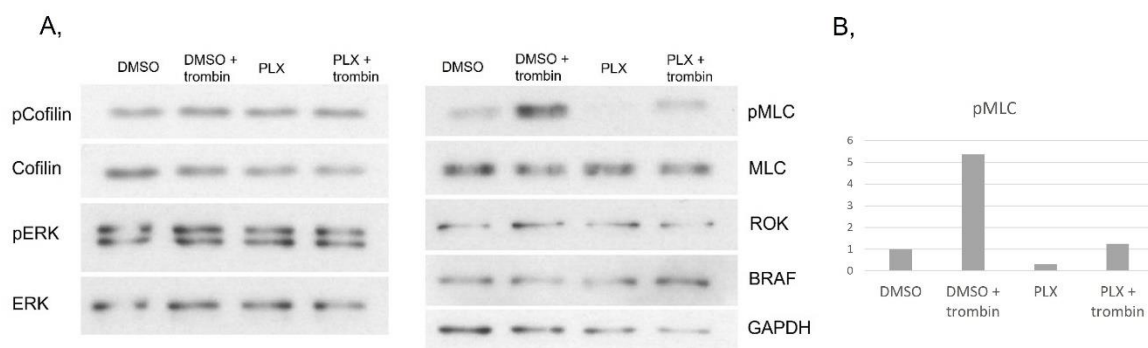
szálakhoz pMLC is asszociálódott. Ezzel szemben az inhibítorral kezelt sejtekben az aktin egy vastag perifériás gyűrűben stabilizálódik, ahova a pMLC is lokalizálódik. Ez a lokalizáció hasonló az siBRAF sejtekben megfigyeltékhez. A cofilin kicsit beljebb húzódik csupán a

trombin kezelés hatására is, PLX8394 kezelés hatására pedig csökken a mennyisége a sejt perifériáján, az siBRAF sejtekben kapott megfigyelésekhez hasonlóan. (16. ábra) [33] [30]

Az immunfestéssel párhuzamosan western blot analízist is végeztem a sejten belüli foszforilációs folyamatok nyomon követésére. (17. ábra)



A PLX8394 inhibítoros kezelés lecsökkentette a foszforilált MLC mennyiségét és a trombin kezelés hatására is kisebb mértékben nőtt a foszforilációja a DMSO-val kezelt kontroll sejtekhez képest. (17.B ábra) Ez konzekvens az siBRAF sejteknél megfigyelttel. Az ERK foszforilációjában viszont nem figyelhető meg változás a trombinos aktiválás hatására sem, és a PLX8394 kezelés sem csökkentette le a pERK mennyiségét. Ez utóbbi magyarázható azzal, hogy ugyan a PLX8394 lecsökkenti a BRAF dimerek mennyiségét,



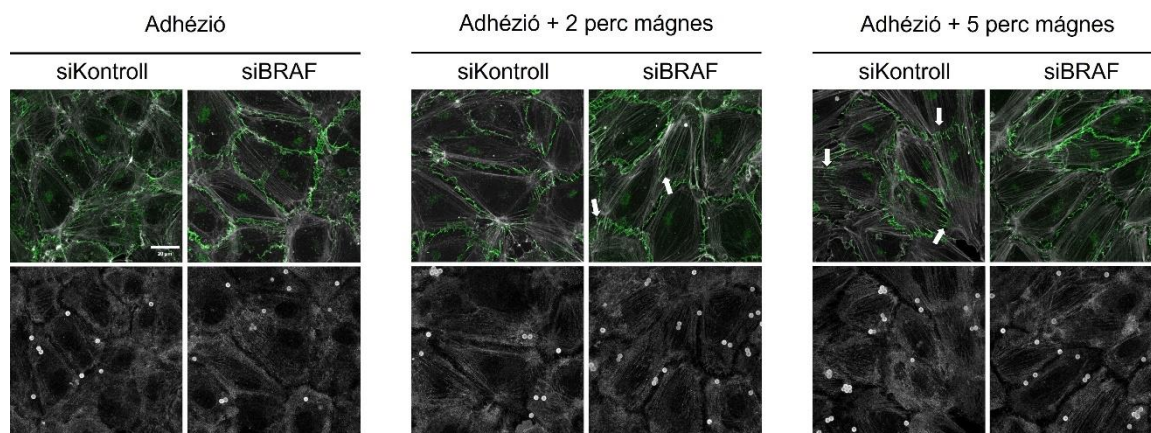
17. ábra: Western blot eredmények (A) és a foszfo-MLC DMSO kontrollhoz viszonyított relatív mennyiségének kvantifikálása (B). A fehérjék foszforilált változatát a 'p' előtaggal jelölöm.

de az ARAF és RAF1 dimerek mennyiségét nem befolyásolja, és a RAF1 homodimer is képes az ERK aktivációra.

4.3 A PLX8394 hatása PECAM-1-en keresztül kifejtett mechanikai erő követő mechanotranszdukcióra

Kutatócsoportomban korábban megvizsgálták a BRAF csendesítés hatását a PECAM-1 mechanotranszdukcióra.[32] A 18. ábra alapján a BRAF hiánya befolyásolja a PECAM-1 mechanotranszdukciójának normál folyamatát, mivel hiányában a sejteket átszelő aktin szálak

és a VE-cadherin tartalmú sejtkapcsoló struktúrák átrendeződése a kontrollhoz képest hamarabb, már 2 perces erőhatásra kialakul. Korábbi tanulmány szerint a stressz-szálak



18. ábra: *siBRAF* és kontroll *siRNS*-el kezelt sejteket anti-PECAM-1 antitesttel borított mágneses gyönggyel inkubáltuk és ezután a sejtekhez asszociálódott gyöngyökre mágneses térrel erőhatást fejtettünk ki. Az aktin, VE-cadherin és foszfo-MLC átrendeződése látható a 0, 2 és 5 perces erőhatás következtében. A nyilak az átrendeződő adhéziós sejtkapcsoló struktúrákra mutatnak.

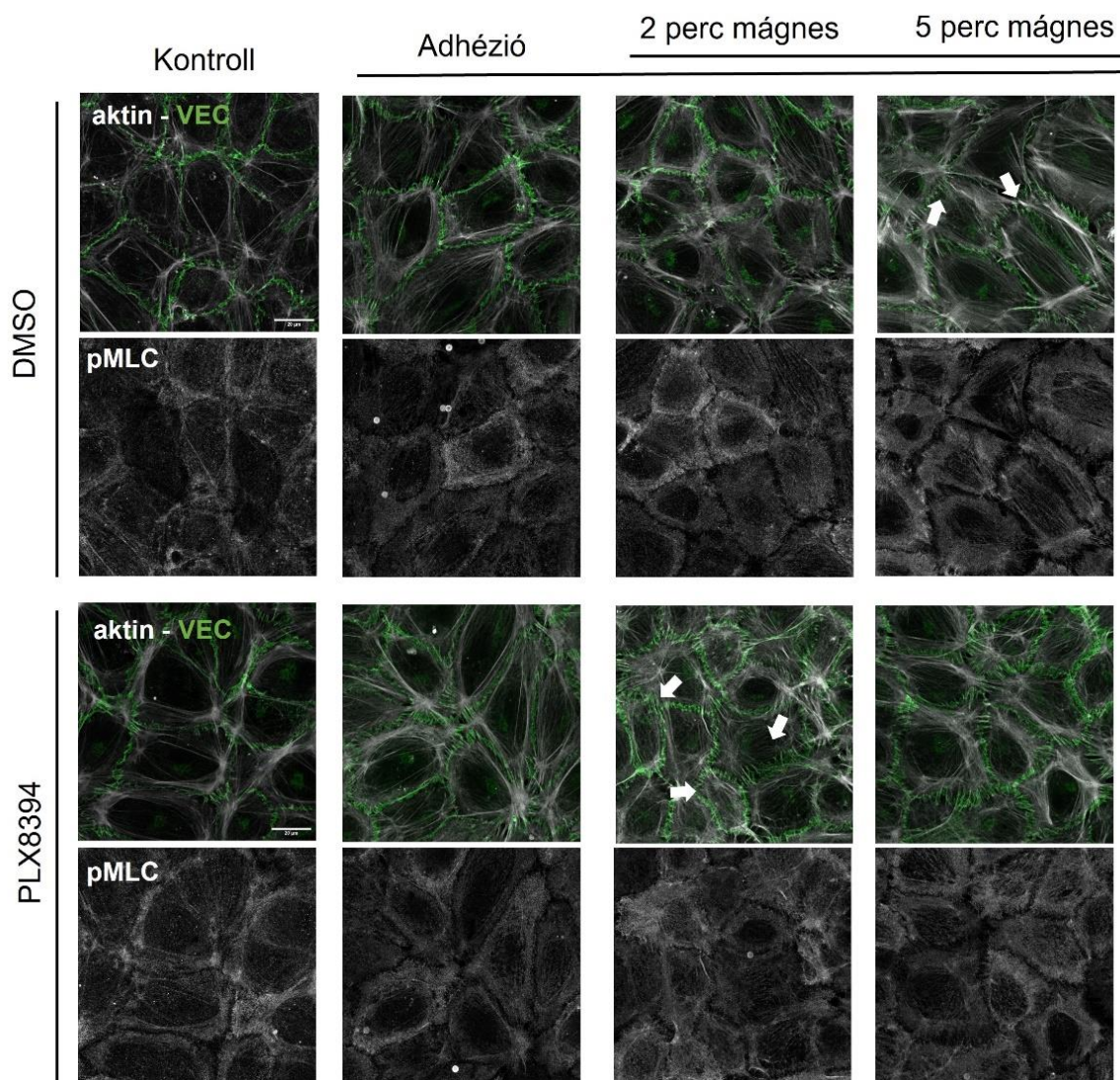
kialakulásával szoros összefüggésbe hozható RhoA aktiváció a PECAM-1-re kifejtett mechanikai erő kezdete után 5 perccel alakul ki [18], amely összhangban van a kontroll sejteknél tapasztaltakkal. Az *siBRAF* sejtekben a stressz-szálak korábbi kialakulása viszont arra utal, hogy a BRAF ROK α lokalizációját szabályozó hatásán túl más szerepet is betölt a folyamatban és a VE-cadherint tartalmazó sejtkapcsolatok bár átalakulnak, de nem a kontroll sejtekre jellemző módon. Az 18. ábra első képei alapján a BRAF szerepe a PECAM-1 által mechanotranszdukció során kialakuló válaszban jelenik meg, az adhézióra hasonlóképp reagáltak a kontroll és BRAF-csendesített sejtek.

Saját kísérleteimben megvizsgáltam a PLX8394 inhibitor hatását hasonló kísérleti körülmények között a PECAM-1 mechanotranszdukciójára. Ezzel párhuzamosan vizsgáltam az U0126 MEK inhibitor hatását is a mechanotranszdukcióra annak érdekében, hogy a megfigyelt változásokat összevegyessük a tisztán MEK/ERK útvonal gátlásával megfigyelt változásokkal, hiszen a BRAF is része ennek az útvonalnak, de ezen felül szabályozza a ROK lokalizációját is a RAF1-en keresztül.

A mágneses gyöngyökre anti-PECAM-1 antitestet kötöttem, majd ezzel inkubáltam a kezelt sejteket, oly módon, hogy a koncentrációk alapján egy sejtre átlagosan két gyöngy jutott. A kialakított sejtfelszíni PECAM-1 – anti-PECAM-1 kötéseket követően a sejteket a hozzájuk asszociálódott gyöngyökkel együtt konstans mágneses térbe helyeztem 0/2/5 percre. Az aktivált

sejtekben bekövetkezett változásokat western blot analízissel, illetve immunfestést követően fluoreszcens konfokális mikroszkóppal is nyomon követtem.

Az 19. ábrán bemutatott módon a kontroll csoport sejtjeiben kevés, erős aktin szál látható a sejthártya közelében, és ezek a 'kábelek' átszelik a sejtet is. Kezeletlen sejtekben ezek az aktin szálak nem végződnek átrendeződő sejtkapcsolatokban. A pMLC intenzitása erősebb a periférián, követi az aktin lokalizációját, de a sejtek belsejében is megtalálható. A PLX8394-el

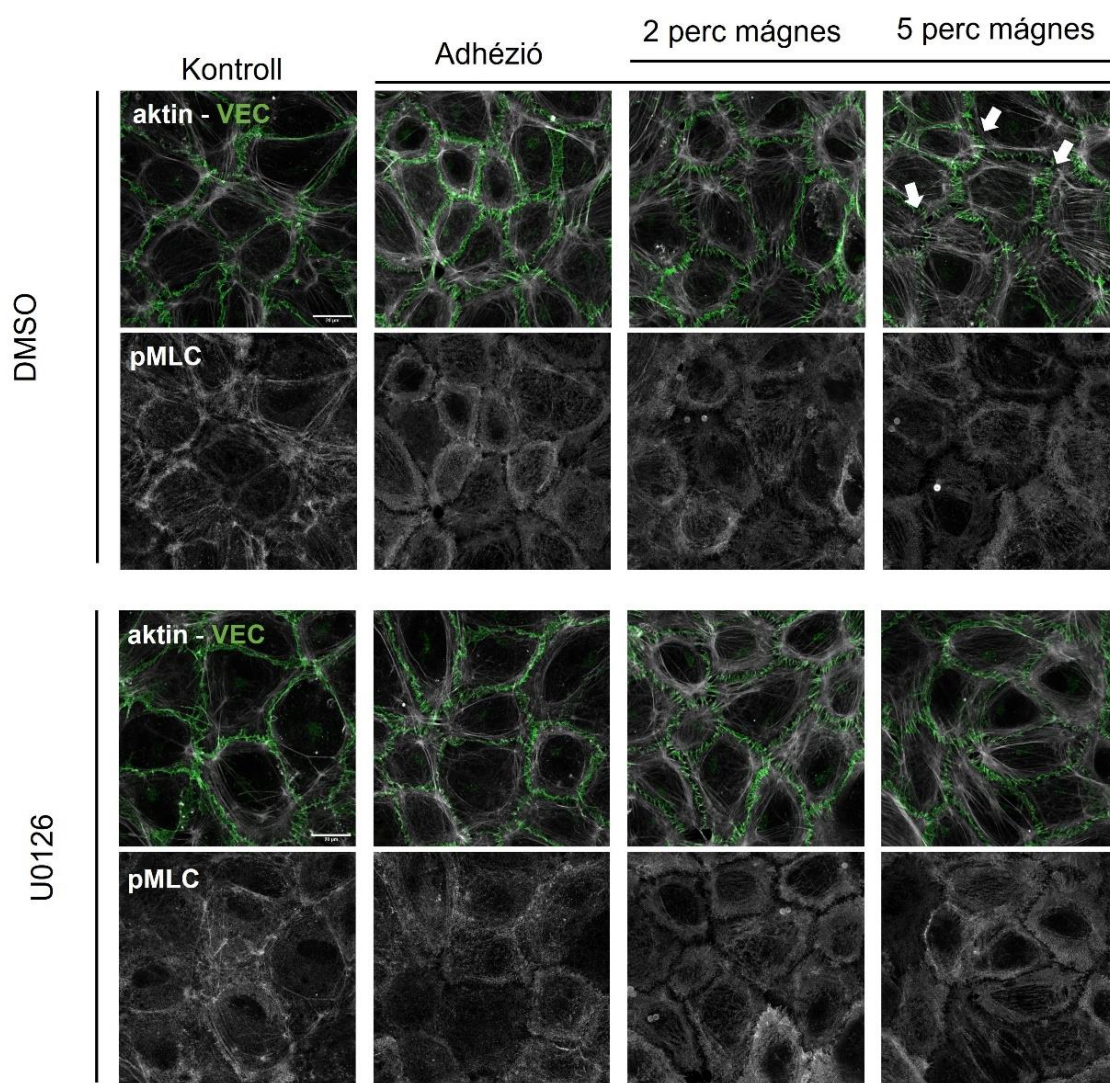


19. ábra: A PECAM-1 adhézió illetve a PECAM-1-re kifejtett mechanikai erő hatása az aktin citoszkeleton fehérjéinek lokalizációjára PLX8394-el kezelt és kontroll (DMSO-val kezelt) sejtekben. Zölddel a VE-cadherin, szürkével az aktin illetve a foszfo-MLC lokalizációját jelölöm. A nyilak átrendeződő sejtkapcsolatokban végződő stressz-szálakat jelölnek.

kezelt sejtekben hasonló az aktin és a pMLC lokalizációja, csak kicsivel szélesebb gyűrűt alakítanak ki a periférián és inkább a több, vékonyabb aktin szál, aktin 'köteg' a jellemző.

Korábbi tanulmányok a PECAM-1-re kifejtett erő következtében kialakuló átrendeződésekről írtak, a PECAM-1 adhézió hatását nem vizsgálták. [18] Eredményeim szerint az adhézió hatására megvastagodik az aktin és pMLC gyűrű a periférián, viszont a PECAM-1-re kifejtett erőhatás szükséges a stressz-szálak kialakulásához. A PLX8394-el kezelt sejtekben előbb, már 2 perc erőhatásra kialakulnak a stressz-szálak, míg ez a kontroll sejtekben később, csak 5 perc alatt következik be. A stressz-szálak gyorsabb kialakulása az siBRAF sejtekben is megfigyelhető volt a PECAM-1 mechanoaktivációjára, alátámasztva a PLX8394 hasonló hatásmechanizmusát.

Az U0126 MEK inhibitorral kezelt sejtekben vékonyabb a perifériás aktin, a pMLC pedig homogénen kitölti a sejteket, csupán egy-egy aktin szálhoz kapcsolódik. (20. ábra). A PECAM-

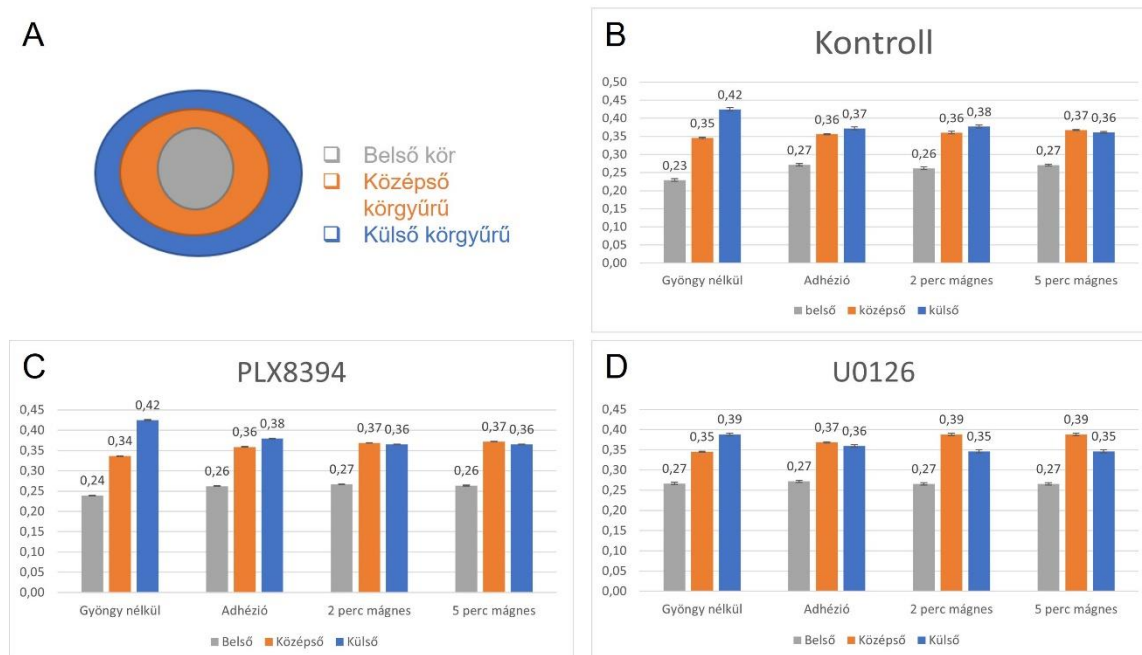


20. ábra: A PECAM-1 adhézió illetve a PECAM-1-re kifejtett mechanikai erő hatása az aktin citoszkeleton fehérjéinek lokalizációjára U0126 inhibitorral kezelt és kontroll (DMSO-val kezelt) sejtekben. Zölddel a VE-cadherin, szürkével az aktin illetve a foszfo-MLC lokalizációját jelölöm. A nyilak átrendező sejtkapcsolatokban végződő stressz-szálakat jelölnek.

1 adhézió hatására az U0126 inhibitorral kezelt sejtekben is megvastagodik a perifériás aktin és pMLC gyűrű, viszont a mágneses térrel a gyöngyökre és így a sejtfelszíni PECAM-1-re kifejtett 2-5 percig tartó erő hatására nem alakulnak ki stressz-szálak. Ezzel szemben a VE-cadherin tartalmú sejtkapcsoló struktúrák átrendeződnek, a VE-cadherin folytonossága megszűnik, viszont ezekhez a sejtkapcsolatokhoz csak rövidebb, a perifériás aktingyűrűben végződő aktin szálak csatlakoznak.

A miozin könnyű lánc foszforilált formájának sejten belüli lokalizációja számszerűsítésére a felvételeken a sejteket három közelítőleg egyenlő területű körgyűrűre osztottam és megmértem mindegyik gyűrűben a teljes sejtre vetített relatív fluoreszcens intenzitást. A folyamatot és az eredményeket a 21. ábra szemlélteti. A kontroll és a PLX8394 kezelt sejtek eredményei nagyon hasonlóak lettek. Mindkét esetben a foszfo-MLC átrendeződése a PECAM-1 adhézió hatására szignifikáns volt, míg az erőhatásra nem változott jelentősen az arányuk. Az U0126 kezelt sejtek eredményei jobban eltérnek a kontrolltól, mivel az adhézió és a gyöngyökre kifejtett mágneses erő hatására megnő a középső gyűrű relatív foszfo-MLC tartalma a külső gyűrű relatív foszfo-MLC intenzitásához viszonyítva. Ez arra utal, hogy a mechanikai erő hatására az ERK útvonal szabályozása befolyásolja a foszfo-MLC lokalizációját, míg a BRAF általi RAF1-ROK α dimer szabályozása nem számottevő.

Megvizsgáltam azt is, hogy milyen mértékben változik a mechanikai erő hatására az ERK, valamint az aktin citoskeleton szabályozó MLC foszforilációja. A 22. ábrán bemutatott

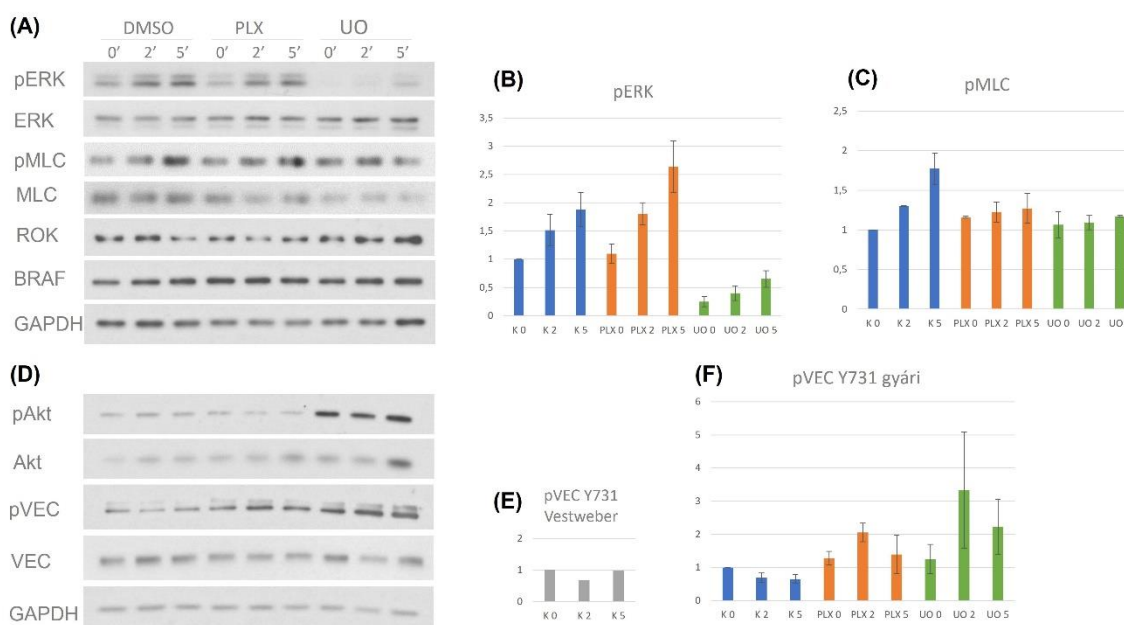


21. ábra: A pMLC sejten belüli relatív lokalizációjának kvantifikálása, A: A körgyűrűk szinkódolása, B-D: Kvantifikálás eredményei

western blot eredmények alapján a ROK és BRAF mennyisége nem változott kezelések hatására és a többi vizsgált fehérje expressziója sem fokozódott, a megfigyelt változások csupán a fehérjék foszforilációjának illetve defoszforilációjának következményei. (22. A és D ábra)

Az ERK foszforilációjának mértéke a mechanoszenzoros aktiváció hatására hasonló mértékben nőtt a kontroll és a PLX8394-el kezelt sejtekben. (22.A és B ábra) Az U0126 kezelés hatására viszont jelentősen kisebb mértékű az ERK foszforilációja (mivel az U0126 az ERK foszforilációért felelős MEK-et gátolja), habár a mágnes általi erőhatásra itt is megtörténik az ERK foszforilációjának fokozódása. Az ERK foszforilációja a PECAM-1-re kifejtett erőhatás következtében már ismert folyamat, a szakirodalom szerint az endotélium felett áramló folyadék nyíró ereje is a PECAM-1 mechanotranszdukciós útvonalat aktiválja, és ekkor is megnő az ERK foszforiláció 2 perccel az áramlás elindítása után, és a maximumot 5 percnél éri el. [19] Kísérletemben az anti-PECAM-1-el borított mágneses gyöngyök által a sejtekre kifejtett erő az ERK foszforilációjának hasonló változását okozta.

Az MLC foszforilációja nagyobb mértékben nő a kontroll sejtekben, míg a PLX8394 inhibitorral kezelt sejtekben alig változik az erőhatás nyomán. (22.A és C ábra) Érdekes módon a PLX8394-el kezelt sejtekben az adhézió során kissé magasabb volt a pMLC mennyisége a



22. ábra: Western blot eredmények. A 12,5%-os (A) és 7,5%-os (D) gélen futtatott minták előhívásának eredményei, illetve az eredmények kvantifikálásai (B,C,E,F). A diagramok x tengelyén a mintákat jelölöm: DMSO (K), PLX8394 (PLX) és U0126 (UO) kezelt sejtek 0, 2 és 5 perces mágneses aktivációt követő sejtlizátumai. Az intenzitás értékeket a DMSO-val kezelt (kontroll) 0 perchez viszonyítva ábrázolom. Az adatok rendre két kísérlet eredményeit mutatják, az E ábra egy kísérlet eredménye. Rövidítések: pERK, pMLC, pAkt – a fehérjék foszforilált változata, VEC: VE-cadherin, GAPDH: glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz

kontroll sejtekhez képest, viszont az erőhatásra a további foszforiláció mértéke csekélyebb. Az MLC foszforilációja az U0126 inhibítorral kezelt sejtekben sem nő olyan mértékben, mint a kontroll sejtekben, mennyiségi változása a PLX8394-es kezeléshez hasonló. Megvizsgáltam az Akt foszforilációját is, mivel mechanikai erő hatására PI3K aktivitás növekedést figyeltek meg korábbi vizsgálatok során, bár ez a hatás csak lokálisan alakult ki a mágneses gyöngy közelében. A két független kísérlet különböző eredményeket hozott az U0126-kezelt sejtek Akt foszforilációs mintázatában, amely különbség valószínűleg a sejtek LOT számából adódik. A 22.D ábrán bemutatott kísérletben az U0126 kezelés hatására megnőtt az Akt foszforilációja. Ez a jelenség egyébként ismert mellékhatása a MEK inhibítoroknak, hiszen a MEK aktivitásának növekedése az ERK általi negatív visszacsatolás miatt csökken, ez pedig az Akt aktivitásának csökkenéséhez vezet.

Ez magyarázza, hogy alacsony MEK aktivitás esetén az Akt hiperaktívvá válhat. [34] Az U0126 inhibítor PECAM-1 mechanotranszdukcióra gyakorolt hatásának feltérképezéséhez még további kísérletekre van szükség.

A sejt-sejt kapcsolatok meglazulásának folyamatában fontos lépés a VE-cadherin tirozin oldalláncainak foszforilációja, illetve defoszforilációja. Az Y685 tirozin oldallánc foszforilációja az endotélium permeabilitásának növekedésével áll kapcsolatban, míg a Y731 tirozin oldallánc defoszforilációja a transzmigráció megvalósulásához szükséges VE-cadherin internalizáció kiváltója. Szerettem volna megvizsgálni, hogy a PECAM-1 általi mechanotranszdukció során melyik oldallánc foszforilációja változik meg, az Y685 tirozin foszforilációja, vagy pedig az Y731 tirozin defoszforilációja. Sajnálatos módon a kereskedelmi forgalomban kapható egyetlen Y685 foszfo-VE-cadherin antitest nem specifikus a foszforilációs helyre [8] és a kutatócsoportunk tesztelő kísérleteinek eredményei alapján sajnos a VE-cadherinre sem. A Vestweber kutatócsoport 2014-es cikke vízvázlatzó a témában, az ez előtt íródott, foszfo-VE-cadherin antitesteket használó tanulmányokat sajnos fenntartásokkal kell kezelni, mivel ezek az antitestek valamilyen más, azonos molekulatömegű fehérje tirozin-foszforilációját is felismerik. Mivel jelenleg kereskedelemben nem kapható megbízható foszfo-VE-cadherin antitest, így elkértük a Vestweber csoporttól a kísérleteikben használt, saját előállítású anti-pVEC Y731 és anti-pVEC Y685 elsődleges antitesteket. Ezek az antitestek bár specifikus, de gyenge jelet adnak, csak immunprecipitációval, VE-cadherinre feldúsított mintákon alkalmazhatók. Néhány előkísérletben optimalizáltam a kísérleti körülményeket, azonban a dolgozat elkészítéséig csak egy kísérlet eredményét tudom bemutatni az Y731 foszforilációs hely analíziséből. (22.E ábra) Az eredményeink alapján mind a gyári (22. D és F

ábra), mind a Vestweber csoport által készített antitest a Y731 foszforilációjának mechanikai erő hatására bekövetkező csökkenését mutatja. Egyelőre az még kérdéses, hogy időben mikor áll vissza az eredeti foszforilációs szint, ennek a kérdésnek a megválaszolásához további kísérletek szükségesek. A PLX8394 inhibítor hatására az Y731 foszforilációja nő, ami a sejt-sejt kapcsolatok megerősödésére utal, azonban ezt az eredményt még alá szeretném támasztani a Vestweber csoporttól kapott antitesttel is. Az U0126 esetén eltérő eredményeket kaptunk a két független kísérletben, ezért felmerül a kérdés, hogy vajon ez a defoszforiláció összefüggésben lehet-e az említett két LOT eltérő Akt aktivitásával. Mindenesetre a kontroll sejtekben kapott defoszforiláció korrelálhat a szakirodalmi adatok alapján a sejt-sejt kapcsolatok fellazulásával.[3][8][35] A PLX8394 inhibítorral kapott növekedés utalhat a sejt-sejt kapcsolatok megerősödésére, amely összhangban van a csökkent permeabilitás és transzmigráció jelenségével a PLX8394-gyel kezelt endotél rétegek esetén.

5 Diszkusszió

Első eredményeim a PECAM-1 és BRAF hiányos sejtek humán sejtekben is megfigyelhető hasonló fenotípusáról megalapozták további tevékenységemet, amellyel az említett fehérjék egymásra és endotél jelátvitelre gyakorolt hatásának mechanizmusát vizsgáltam.

Kutatócsoportom eredményeihez kapcsolódva megvizsgáltam a közelmúltban kifejlesztett PLX8394 inhibítor hatását az endotél sejtek citoszkeletális átrendeződéseire trombin kezelést követően. A bemutatott eredmények alapján a PLX8394 inhibítor RAF dimereket gátló hatásmechanizmusának megfelelően hasonló hatást gyakorolt az endotél sejtek aktin citoszkeletonjára, mint a BRAF siRNS-sel történő csendesítése. Csökken a BRAF inhibítorral és a BRAF siRNS-sel kezelt sejtréteg permeabilitásnövekedése, és csökken az A375 melanóma transzmigrációja is. A PECAM-1-re kifejtett mechanikai erőhatásra is hasonló módon reagáltak a PLX8394 inhibítorral és BRAF siRNS-sel kezelt sejtek, mindkét esetben a kontroll sejtekhez képest hamarabb, 2 perces mechanikai aktiváció hatására kialakultak a sejteket átszelő aktin szálak. Kutatócsoportom legújabb eredményei szerint BRAF-csendesített sejtekben megerősödik a FAK foszforilációja, és ez az aktiváció tovább erősödik a PECAM-1-re kifejtett mechanikai erőhatással. Ily módon elképzelhető, hogy a BRAF csendesített, illetve a PLX8394 inhibítorral kezelt sejtekben a PECAM-1-re kifejtett 2 perces mechanikai erő hatására kialakuló aktin szálak valójában nem a sejt-sejt kapcsolatokat meglazító stressz-szálak, hanem a sejteket az extracelluláris mátrixhoz kapcsoló, fokális adhézióban végződő struktúrák.

Az U0126 MEK inhibítor használatával bemutattam, hogy a PLX8394 inhibítor hatására az endotél sejtekben bekövetkező változások nem, illetve nem csupán a MEK/ERK útvonal gátlásából származnak, hanem megfigyelhető a BRAF RAF1/ROK α dimert szabályozó aktivitása, illetve hiánya.

A PECAM-1-re kifejtett mechanikai erő a sejt és az extracelluláris mátrix közötti kapcsolat erősségén túl sejt-sejt kapcsolatok struktúráját is befolyásolja, amelyben meghatározó a VE-cadherin különböző oldalláncainak foszforilációs állapota. Előzetes eredményeim alapján a kontroll sejtekben a mechanikai erő hatására csökken a VE-cadherin Y731 oldalláncának foszforilációja, amely korrelál a pMLC mennyiségi növekedésével. A PLX8394 inhibítoros kezelés növeli a VE-cadherin Y731 oldalláncának foszforiláltságát, az Y685 foszforilációjára gyakorolt hatásának kvantitatív analíziséhez viszont még további kísérletek szükségesek.

6 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Matkovicsné Dr. Varga Andreának, aki nélkül nem jöhetett volna létre ez a dolgozat, hiszen ő biztosította a lehetőséget, hogy kísérleteimet a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai intézetén belül, a kutatócsoportjában végezhessem. Ezen túl hálás vagyok részletes útmutatásáért mind a technikai, mind pedig az elméleti kérdésekben. Köszönettel tartozom továbbá a kutatócsoport többi munkatársának, Dr Gráczér Évának, Dr Csókay Katalinnak, Kovács Zsuzsannának és Hollósi Annának amiért a kísérletek során segítettek figyelték a mozdulataimat és segítettek bármilyen kérdésben. Köszönöm belső konzulensem, Dr Gáspári Zoltán fáradozásait annak érdekében, hogy a Semmelweisen végzett kutatómunkám a Pázmány Péter Katolikus Egyetemen elfogadott módon megvalósulhasson, és az ehhez szükséges dokumentumok mindig időre és megfelelő formátumban leadhatók legyenek. Köszönöm továbbá az Új Nemzeti Kiválóság Programnak az anyagi támogatást. Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani páromnak, családomnak, barátaimnak, akik végig mellettem álltak és bíztattak a kutatómunka és a dolgozat elkészítése közben.

7 Irodalomjegyzék

- [1] A. C. I. van Steen, W. J. van der Meer, I. E. Hoefer, and J. D. van Buul, “Actin remodelling of the endothelium during transendothelial migration of leukocytes,” *Atherosclerosis*, vol. 315, pp. 102–110, Dec. 2020, doi: 10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2020.06.004.
- [2] J. J. G. Arts *et al.*, “Endothelial junctional membrane protrusions serve as hotspots for neutrophil transmigration,” *Elife*, vol. 10, pp. 1–26, 2021, doi: 10.7554/eLife.66074.
- [3] L. Schimmel, N. Heemskerk, and J. D. van Buul, “Leukocyte transendothelial migration: A local affair,” *Small GTPases*, vol. 8, no. 1, pp. 1–15, Jan. 2017, doi: 10.1080/21541248.2016.1197872.
- [4] N. Heemskerk *et al.*, “F-actin-rich contractile endothelial pores prevent vascular leakage during leukocyte diapedesis through local RhoA signalling,” *Nat. Commun.*, vol. 7, Jan. 2016, doi: 10.1038/NCOMMS10493.
- [5] S. Sukriti, M. Tauseef, P. Yazbeck, and D. Mehta, “Mechanisms regulating endothelial permeability,” *Pulm Circ*, vol. 4, no. 4, pp. 535–551, 2014, doi: 10.1086/677356.
- [6] W.-H. Su, H. Chen, and C. J. Jen, “Differential movements of VE-cadherin and PECAM-1 during transmigration of polymorphonuclear leukocytes through human umbilical vein endothelium,” *Blood*, vol. 100, no. 10, 2002, doi: 10.1182/blood-2002-01-0303.
- [7] D. Schulte *et al.*, “Stabilizing the VE-cadherin - catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability,” *EMBO J.*, vol. 30, no. 20, pp. 4157–4170, Oct. 2011, doi: 10.1038/EMBOJ.2011.304.
- [8] F. Wessel *et al.*, “Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin,” *Nat. Immunol.*, vol. 15, no. 3, pp. 223–230, Mar. 2014, doi: 10.1038/NI.2824.
- [9] A. P. Adam, A. L. Sharenko, K. Pumiglia, and P. A. Vincent, “Src-induced Tyrosine Phosphorylation of VE-cadherin Is Not Sufficient to Decrease Barrier Function of Endothelial Monolayers,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 10, p. 7045, Mar. 2010, doi: 10.1074/JBC.M109.079277.
- [10] N. Arif *et al.*, “PECAM-1 supports leukocyte diapedesis by tension-dependent dephosphorylation of VE-cadherin,” *EMBO J.*, vol. 40, no. 9, p. e106113, May 2021, doi: 10.15252/EMBJ.2020106113.
- [11] B. Michael J., “Cell Signalling Pathways,” doi: 10.1042/csb0001002.
- [12] D. Kugelmann, L. Thomas Rotkopf, M. Yosifova Radeva, A. Garcia-Ponce, E. Walter, and J. Waschke, “Histamine causes endothelial barrier disruption via Ca²⁺-mediated RhoA activation and tension at adherens junctions OPEN,” *Sci. Rep.*, vol. 8, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-31408-3.
- [13] C. Dorard *et al.*, “RAF dimers control vascular permeability and cytoskeletal rearrangements at endothelial cell-cell junctions,” *FEBS J.*, vol. 286, no. 12, pp. 2277–2294, Jun. 2019, doi: 10.1111/FEBS.14802.

- [14] F. A. Cook and S. J. Cook, “Inhibition of RAF dimers: it takes two to tango,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 49, no. 1, pp. 237–251, Feb. 2021, doi: 10.1042/BST20200485.
- [15] Z. Yao *et al.*, “RAF inhibitor PLX8394 selectively disrupts BRAF dimers and RAS-independent BRAF-mutant-driven signaling,” *Nat. Med.* 2018 252, vol. 25, no. 2, pp. 284–291, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41591-018-0274-5.
- [16] D. Liao, H. Mei, Y. Hu, D. K. Newman, and P. J. Newman, “CRISPR-mediated deletion of the PECAM-1 cytoplasmic domain increases receptor lateral mobility and strengthens endothelial cell junctional integrity,” *Life Sci.*, vol. 193, pp. 186–193, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.LFS.2017.11.002.
- [17] H. Mei *et al.*, “Regulation of Endothelial Cell Barrier Function by Antibody-driven Affinity Modulation of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1),” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 30, pp. 20836–20844, Jul. 2014, doi: 10.1074/JBC.M114.557454.
- [18] C. Collins *et al.*, “Localized tensional forces on PECAM-1 elicit a global mechanotransduction response via the integrin-RhoA pathway,” *Curr. Biol.*, vol. 22, no. 22, pp. 2087–2094, Nov. 2012, doi: 10.1016/J.CUB.2012.08.051.
- [19] M. Osawa, M. Masuda, K.-I. Kusano, and K. Fujiwara, “Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule?,” *J. Cell Biol.*, vol. 158, no. 4, pp. 773–785, 2002, doi: 10.1083/jcb.200205049.
- [20] E. Tzima *et al.*, “A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress,” *Nature*, vol. 437, no. 7057, pp. 426–431, Sep. 2005, doi: 10.1038/NATURE03952.
- [21] M. G. Bixel *et al.*, “CD99 and CD99L2 act at the same site as, but independently of, PECAM-1 during leukocyte diapedesis,” *Blood*, vol. 116, no. 7, pp. 1172–1184., 2010, doi: 10.1182/blood-2009-12-256388.
- [22] T. Pap, “Sejttenyésztési alapismeretek.” <https://docplayer.hu/14069724-Sejttenyesztési-alapismeretek.html>
- [23] E. P. O’Keefe, “siRNAs and shRNAs: Tools for Protein Knockdown by Gene Silencing,” *Mater. Methods*, vol. 3, Jun. 2013, doi: 10.13070/MM.EN.3.197.
- [24] R. J. Marjoram, C. Guilluy, and K. Burridge, “Using magnets and magnetic beads to dissect signaling pathways activated by mechanical tension applied to cells,” *Methods*, vol. 94, 2015, doi: 10.1016/j.ymeth.2015.09.025.
- [25] “konfokális mikroszkópia Konfokális mikroszkópia-elméleti bevezető.” http://muszeroldal.hu/measurenotes/konfok_elm.pdf (accessed Sep. 14, 2022).
- [26] “Abberior Instruments STED.” http://imcf.natur.cuni.cz/IMCF/wp-content/uploads/2020/06/Abberior_Instruments_STED.pdf (accessed Sep. 16, 2022).
- [27] K. Schackart and K. Kaarj, “ImageJ Fluorescence Image Composition,” *protocols.io*, 2019. <https://www.protocols.io/view/imagej-fluorescence-image-composition-kxygxm5x4l8j/v1> (accessed Nov. 01, 2022).
- [28] “WESTERN BLOTTING-A BEGINNER’S GUIDE.” www.abcam.com/technical (accessed

Sep. 14, 2022).

- [29] A. M. Ferreira, C. J. Mcneil, K. M. Stallaert, K. A. Rogers, and M. Sandig, “Interleukin-1 β Reduces Transcellular Monocyte Diapedesis and Compromises Endothelial Adherens Junction Integrity,” *Microcirculation*, vol. 12, no. 7, pp. 563–579, Oct. 2005, doi: 10.1080/10739680500253493.
- [30] A. Hollósi *et al.*, “BRAF increases endothelial cell stiffness through reorganization of the actin cytoskeleton,” *FASEB J.*, vol. 36, no. 9, p. e22478, Sep. 2022, doi: 10.1096/FJ.202200344R.
- [31] O. Wiggan, A. E. Shaw, J. G. DeLuca, and J. R. Bamburg, “ADF/Cofilin Regulates Actomyosin Assembly through Competitive Inhibition of Myosin II Binding to F-Actin,” *Dev. Cell*, vol. 22, no. 3, pp. 530–543, Mar. 2012, doi: 10.1016/j.devcel.2011.12.026.
- [32] É. Gráczter, K. Pásztty, C. Lehoczky, and A. Varga, “BRAF modulates cell-cell adhesion through PECAM-dependent mechanotransduction,” 2022.
- [33] A. Hollósi, K. Pásztty, M. Kellermayer, G. Charras, and A. Varga, “Braf modulates stretch-induced intercellular gap formation through localized actin reorganization,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 16, Aug. 2021, doi: 10.3390/IJMS22168989/S1.
- [34] K. Zmajkovicova, V. Jesenberger, F. Catalanotti, C. Baumgartner, G. Reyes, and M. Baccarini, “MEK1 is required for PTEN membrane recruitment, AKT regulation, and the maintenance of peripheral tolerance,” *Mol. Cell*, vol. 50, no. 1, pp. 43–55, Apr. 2013, doi: 10.1016/J.MOLCEL.2013.01.037.
- [35] M. J. Allingham, J. D. van Buul, and K. Burrridge, “ICAM-1-Mediated, Src- and Pyk2-Dependent Vascular Endothelial Cadherin Tyrosine Phosphorylation Is Required for Leukocyte Transendothelial Migration,” *J. Immunol.*, vol. 179, no. 6, pp. 4053–4064, Sep. 2007, doi: 10.4049/JIMMUNOL.179.6.4053.
- [36] N. Wettschureck, B. Strilic, and S. Offermanns, “Passing the vascular barrier: Endothelial signaling processes controlling extravasation,” *Physiol. Rev.*, vol. 99, no. 3, pp. 1467–1525, 2019, doi: 10.1152/physrev.00037.2018.
- [37] Y. L. Dorland and S. Huveneers, “Cell–cell junctional mechanotransduction in endothelial remodeling,” *Cell. Mol. Life Sci.* 2016 742, vol. 74, no. 2, pp. 279–292, Aug. 2016, doi: 10.1007/S00018-016-2325-8.