



Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar



ÉLŐ AGYI ENDOTÉLSEJTEK NANO-BIOMECHANIKAI VIZSGÁLATA

PhD értekezés tézisei

Végh Attila Gergely

Témavezető: Dr. Váró György

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet

Szeged

2012

BEVEZETÉS

A biomechanika fontos szerepet játszik az élő sejtek működésének megértésében. Sejtnövekedés, osztódás, sejtadhézió, migráció csak néhány példa azon folyamatok közül, amelyektől függ, ugyanakkor befolyásol is a sejt mechanikai tulajdonsága.

Élő sejtek morfológiai és mechanikai tulajdonságainak vizsgálatára atomerő mikroszkópot alkalmaztunk. Az atomerő mikroszkóp működési elvét, a nyolcvanas években dolgozta ki Binnig és munkatársai. A műszer egy hegyes tűvel letapogatja a kívánt objektum felszínét, térbeli topográfiát alkotva róla. A módszer nagy előnye, hogy a környező közegtől függetlenül működik, így folyadékban éppolyan hatékonysággal alkalmazható, mint levegőn vagy vákuumban. Ennek és a készülék nagy leképezési tartományának köszönhetően, ami a néhány tíz mikrontól a pár nanométeres méretig terjed, különböző biológiai objektumok leképezését is lehetővé teszi, sejtektől a makromolekuláig.

Mivel a biológiai minták az esetek többségében folyadék környezetben találhatóak fiziológiai körülmények között, ezért tanulmányozásukra a módszer nagy sikerrel alkalmazható. Így a saját növekedési környezetükben lehet vizsgálni őket, követni lehet a különböző kémiai anyagok hatására bekövetkező morfológiai változásokat. Emellett a sejtek mechanikai tulajdonságainak a vizsgálata is lehetséges, az úgynevezett lokális erőmérések segítségével, amely során a sejt rugalmasságát, és sejtmembránjának különböző kémiai anyagokkal kialakuló adhézióját is mérni lehet, mindezt anélkül, hogy a mérés maradandó károsodást okozna a sejtekben.

A központi idegrendszer homeosztázisának fenntartásában az agyi endotélsejtek által képzett vér-agy gát kitüntetett szerepet játszik. Működésének részletes megértése és leírása elengedhetetlen a hozzá kapcsolódó klinikai célú kutatások kivitelezéséhez. Ennek az egyik igen hatásos módja, az agyi endotélsejtek biomechanikai paramétereinek tanulmányozása, melyek fontos szerepet játszanak az anyagcsere során.

Egy másik érdekes kérdés a sejt-sejt kapcsolatok direkt vizsgálata. A bőr festéktermelő sejtjeiből (melanocitákból) kiinduló melanóma a többi bőrrákkal ellentétben viszonylag gyakran képez áttéteket a test távoli részeibe. Ezek az esetek 40-60% -ban agyi áttétek, melyhez a ráksejteknek keresztül kell jutniuk a vér-agy gátat képező endotélsejtrétegen. A sejtek közti adhézió fontos szerepet játszik az átjutásban, amit kémiai anyagok segítségével modulálni lehet. Ehhez elengedhetetlen a jelenség mechanizmusának ismerete, amihez fontos információkat szolgáltat a laboratóriumunkban végzett atomerő mikroszkópos direkt sejt-sejt adhéziómérés. Ezen paraméterek ismerete nagymértékben hozzájárulhat esetleges sejt adhézió gátlását célzó gyógyszerek kifejlesztéséhez.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk célja élő agyi endotélsejtek morfológiai és mechanikai tulajdonságainak vizsgálata, melyhez. egyedülálló, konfluens és fixált sejtenyészeteket hasonlítottunk össze topográfia és elasztikus paramétereik alapján. Továbbá közvetlen sejt-sejt közötti mechanikai kölcsönhatás tanulmányozása.

A dolgozat a következő témákat foglalja magába:

1. Különböző fázisban levő élő agyi endotélsejtkultúrák morfológiai és rugalmassági feltérképezése. Ezzel egy időben a fixálás következményeként fellépő morfológiai és rugalmassági eltérések kimutatása.

2. Egyedi melanómasejtnek konfluens endotélsejtréteghez való tapadásának vizsgálata és elemzése. A sejtek között fellépő adhéziós erő mértékének a nyomóerő és a tapadással töltött idő függvényében való tanulmányozása. Továbbá a sejtek nyomóerő hatására fellépő relaxációjának vizsgálata.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Mintakészítés

A hCMEC/D3 humán agyi endotélsejteket patkányfarok kollagénnel bevont csészéken tenyésztettük EBM-2 médiumban EGM-2 Bullet Kit-el kiegészítve, 2,5%-os FBS (Fetal Bovine Serum) jelenlétében. A sejteket 100%-os páratartalmat biztosító inkubátorban növesztettük, 5% CO₂ tartalmú atmoszférában, 37°C fokon. B16F10 melanómasejteket Glutamax-al kiegészített RPMI médiumban tenyésztettük, 5% FBS jelenlétében.

Ezen tápoldatokat a méréseket megelőzően Leibovitz médiumra cseréltünk, CO₂ atmoszféra kiváltása miatt. A sejtek fixálásához 4%-os paraformaldehid oldatot használtunk, melyet 30 perc kezelés után PBS-el lemostunk.

AFM, tűk és mérési módszerek

A mérésekhez egy Asylum MFP-3D fejet és Molecular Force Probe típusú atomerő mikroszkópot (AFM) használtunk, melynek vezérlő programja IGOR Pro (6.22A Wavemetrics) szoftverben készült.

A topográfiai és rugalmasság mérésekhez arannyal bevont szilícium nitridből készült, Bio-Lever (BL-RC150 VB-C1) típusú tűket használtunk. A sejtekről készült képek 256 x 256 képpontot tartalmaznak, melyet 60 µm/s –os szkennelési sebességgel vettünk fel Alternate Contact (AC vagy tapping) módban. Az erőmérések 2 µm/s, míg a 32 x 32 ponton felvett rugalmasság térkép 6 µm/s –os z irányú sebességgel és 2 kHz –es mintavételezési frekvenciával készült. A minta rugalmassági modulusát az erőgörbék közelítő ágának kontakt és maximális elhajlási pontok közé eső szakaszából számoltuk.

A sejt-sejt kölcsönhatásmérésekhez a hátlapjukon alumíniummal bevont tű nélküli konzolokat (MikroMash CSC12) használtunk. Az egyedülálló melanómasejteket BiotBSA-Streptavidin-BiotConA bevonat segítségével rögzítettük a konzolhoz. Az alkalmazott nyomásértékek 0,5 nN és 5 nN között, míg a benyomódás utáni várakozási idő 0 tól 30 másodpercig változott.

A sejtek között fellépő teljes adhéziót az erőgörbék távolodó ágának minimuma és utolsó pontja közötti különbségként definiáltuk. A fellépő szakadásokat egy öt pontos mozgóátlag a görbe mintavételezési zaját meghaladó érték fölé emelkedéseként rögzítettük. A várakozási idő alatt fellépő teljes relaxációs erőt a maximum pont és az időintervallum végén mért benyomódás különbsége adta. A görbék ezen szakaszát két exponenciális lecsengés összegével illesztettük. Ebből a lecsengés élettidejét és amplitúdóját határoztuk meg.

EREDMÉNYEK

Agyi endotélsejtek morfológiai és rugalmassági vizsgálata

Élő agyi endotélsejtek morfológiai vizsgálatához nagy felbontású atomerő mikroszkópos képeket készítettünk. Három különböző fázisú sejt kultúrát vizsgáltunk: egyedülálló (szub-konfluens), teljesen konfluens és paraformaldehiddel fixált konfluens tenyészeteket.

Mind az egyedülálló mind a teljesen konfluens sejtekről készült képeken fluorescens festés nélkül kimutatható a sejtek hosszában végigfutó vázrendszere. A citoskeletális filamentumok jelenléte jól megfigyelhető, valamint a sejtek szoros kapcsolódási pontjai is kirajzolódnak. Emellett az aktin szálakkal dúsan átszőtt lamellipodium képződés is követhető, amely a sejtek helyváltoztatásában játszik fontos szerepet. A sejt és a lamellipodiumok méretei nagy pontossággal meghatározhatók.

Az élő sejtekkel ellentétben, a fixált tenyészet sejtjein drasztikus változásokat észleltünk. Egyfelől a sejtfelületen apró kitüremkedések jelentek meg ami megnehezíti a sejt kapcsolatok egyértelmű lokalizálását, másfelől a citoskeletális rendszer sem mutatott az élő sejtek esetében tapasztalt struktúrát.

Ugyanezen három fázisú tenyészet rugalmassági paramétereit vizsgálva, feltérképeztük a rugalmasság térbeli eloszlását illetve egy meghatározott pont rugalmasságának időbeli változását. Élő sejttenyészet esetében, a magi régióban

mért 1-3 kPa rugalmassági állandó a magtól távolodva 10 kPa fölé emelkedik. Konfluens sejtek esetében nem ritkák a periférián mért 20-40 kPa értékek.

A fixált sejtek nem oszthatók rugalmasság szerinti régiókra, mivel rugalmassági állandójuk pozíciótól függetlenül néhány tíz kPa értéket mutat. Sőt, az egymástól 2 mikrométer távolságra eső mérési pontok sem koherensek. A nagyfokú inhomogenitás a paraformaldehid keresztkötő hatásának a következménye.

A térbeli inhomogenitásokra kevésbé érzékeny magi régió rugalmasságát hosszabb időskálán (órák) követve, külső anyagok hozzáadása nélkül, jelentős ingadozást tapasztaltunk. Az esetek többségében ez 2 és 8 kPa közötti, perces nagyságrendű oszcillációt jelentett mind az egyedülálló, mind a konfluens sejtek esetében. Irodalmi adatok alapján ez a pulzálás a citoskeletális rendszer dinamikus átrendeződésével hozható kapcsolatba, bár pontos okai még nem tisztázottak.

Melanómasejt –endotélsejtréteg kölcsönhatás közvetlen mérése

Az áttétképző melanómasejt vérér falán való átjutáshoz szükséges egyik kritikus mozzanatot vizsgáltuk, nevezetesen a melanómasejt konfluens agyi endotélsejtréteghez való tapadását. Ehhez, B16F10 melanómasejtet az atomerő mikroszkóp rugólapkájához rögzítettük, majd az endotél réteghez közelítve a közöttük kialakuló adhéziót mértük. Kontrollként üres Petri csészét illetve fixált endotélsejt kultúrát használtunk.

A kapcsolódásban eltöltött növekvő időintervallum hatására az adhéziós erő nagysága telítődést mutatott. Ez a jelenség növekvő nyomóerő esetén is megfigyelhető. A sejtek között fellépő adhézió felbomlása apró szakadási események sorozatára bontható. A néhány nanonewton nagyságú adhéziós erőt elemi molekuláris szakadásokra bontottuk. Ezen elemi szakadások értékének eloszlása, élő sejtek esetén, 20 pN-nál maximumot mutatott. Fixált sejt kultúrával megismételve a kísérletsorozatot, ez nem volt kimutatható.

Ezzel párhuzamosan, melanómasejtnak endotélsejt réteghez való nyomása során fellépő relaxációját vizsgáltuk. A maximális benyomódás és a várakozási periódus végén mért nyomóerő különbségéből meghatároztuk a kialakuló teljes

relaxáció mértékét. Összehasonlítva az élő endotélsejten kapott értékeket a Petri csészén, illetve a fixált sejtréteg esetében kapott értékekkel, jelentős eltérés nem volt kimutatható. A relaxáció két exponenciális lecsengés összegére bontható, függetlenül attól, hogy a konzolra rögzített melanómasejt milyen felülethez való tapadását vizsgáltuk (üres Petri csésze, élő endotél réteg, fixált endotél tenyészet). Ez utalhat a túlhöz rögzített sejt dominanciájára ebben a jelenségben. A relaxáció lecsengésének élettidejét és amplitúdóját meghatároztuk.

Az általunk alkalmazott kísérleti módszerek és a vizsgált paraméterek feltérképezése és pontos ismerete nagyban hozzájárulhat a vér-agy gát biomechanikai kutatásának szélesítéséhez, valamint daganatok áttétképzését gátló szerek kifejlesztéséhez és teszteléséhez.

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során a vér-agy gátat alkotó endotélsejtek különböző mechanikai paramétereit, valamint melanómasejtnek konfluens endotélsejtréteghez való tapadását, illetve nyomásra adott relaxációját vizsgáltuk.

Rugalmasságukat feltérképezve kimutattuk, hogy magi régió rugalmasabb, a szoros kapcsolatokkal átszótt perifériához viszonyítva. A magi régió rugalmasságát hosszabb időskálán (órák) követve, külső anyagok hozzáadása nélkül, jelentős ingadozás tapasztalható. Az esetek többségében ez 2 és 8 kPa közötti, perces nagyságrendű oszcillációt jelentett. Kontrollként, paraformaldehiddel fixált sejteken, nem észleltünk időbeli változást, mindemellett egy nagyságrenddel nőtt a sejtek keménysége. Citoszkeletális szerkezetének rendezettsége megbomlott, sejtfelszíne durvább lett. Ezen paraméterek feltérképezésével betekintést nyerhetünk a vér-agy gát alapját képező élő agyi endotélsejtek biomechanikájába, mely fontos szerepet játszik például az angiogenezis folyamatában.

Melanómasejt – endotélsejt között kialakuló adhéziós erő mértékét meghatároztuk, a kiváltó nyomás és várakozási idő függvényében. A sejtek között kialakult néhány nanonewton nagyságú adhéziós erőt elemi szakadások összegére bontottuk, melynek legtöbbször előforduló értéke 20 pN. Az egyedülálló elemi szakadások elemzéséből következtetni lehet a két sejt között kialakuló molekuláris kapcsolatok számára és nagyságára. A két sejtből álló rendszer mechanikai ingerre adott teljes relaxációjának mértékét meghatároztuk. Rámutattunk a relaxáció biexponenciális jellegére az egyes alkotó amplitúdók és élettidők megadásával. A sejt-sejt adhézió és mechanikai stressz relaxáció elemzése értékes információkat szolgáltathat sejtkitapadással kapcsolatos betegségek, valamint daganatok áttétképző folyamatainak kutatásához.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Váró Györgynek szeretném megköszönni, hogy bevezetett a biofizika világába. Sok bátorítást, segítséget és tanácsot kaptam tőle, amelyért hálás köszönettel tartozom.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Ormos Pálnak a Biofizikai Intézet igazgatójának valamint az intézet minden dolgozójának az ösztönző légkör megteremtéséért.

Hálás köszönetem Dr. Bálint Zoltánnak, Dr. Szegletes Zsoltnak és Nagy Krisztinának a szakmai útmutatásért, hasznos tanácsaikért beszélgetéseink során. Köszönettel tartozom Dr. Wilhelm Imolának és Dr. Krizbai Istvánnak a sejt kultúrákért és a sejtbiológiai ismereteim kibővítését szolgáló beszélgetésekért, valamint az Agyi Endotél Kutatócsoport tagjainak a segítségükért.

Külön köszönetet érdemel az Asylum Research Company németországi képviselője dolgozóinak állandó technikai segítsége.

Kitüntetett hálával tartozom feleségemnek, Fazakas Csillának, akinek a segítsége és ösztönzése elengedhetetlen volt munkám során valamint ezen dolgozat létrejöttéhez. Köszönöm szüleimnek, tanárainak, kollégáimnak és minden barátomnak a szociális és szakmai támogatást, segítséget és bátorítást.

PUBLIKÁCIÓK

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:

- I. **Végh, A. G.**; Fazakas, C.; Nagy, K.; Wilhelm, I.; Molnár, J.; Krizbai, I. A.; Szegletes, Z.; Váró, G. Adhesion and Stress Relaxation Forces between Melanoma and Cerebral Endothelial Cells. *Eur. Biophys. J.* **2012**, *41*, 139-145.
IF: **2,286** Hivatkozások száma: **0** Ebből független: **0**

- II. **Végh, A. G.**; Fazakas, C.; Nagy, K.; Wilhelm, I.; Krizbai, I. A.; Nagyőszzi, P.; Szegletes, Z.; Váró, G. Spatial and Temporal Dependence of the Cerebral Endothelial Cells Elasticity. *J. Mol. Recognit.* **2011**, *24*, 422-428.
IF: **2,387** Hivatkozások száma: **0** Ebből független: **0**

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ SZOROSAN NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK:

III. **Végh, A. G.**; Nagy, K.; Bálint, Z.; Kerényi, A.; Rákhely, G.; Váró, G.; Szegletes, Z. Effect of Antimicrobial Peptide-Amide: Indolicidin on Biological Membranes. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 2011, 670589.

IF: **1,225** Hivatkozások száma: **0** Ebből független: **0**

IV. Miclea, P. S.; Péter, M.; **Végh, G.**; Cinege, G.; Kiss, E.; Váró, G.; Horváth, I.; Dusha, I. Atypical Transcriptional Regulation and Role of a New Toxin-Antitoxin-Like Module and its Effect on the Lipid Composition of *Bradyrhizobium Japonicum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2010**, 23, 638-650.

IF: **4,010** Hivatkozások száma: **1** Ebből független: **0**

V. Bálint, Z.; Nagy, K.; Laczkó, I.; Bottka, S.; **Végh, G. A.**; Szegletes, Z.; Váró, G. Adsorption and Self-Assembly of Oligodeoxynucleotides Onto a Mica Surface. *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, 111, 17032-17037.

IF: **3,333** Hivatkozások száma: **5** Ebből független: **4**

VI. Bálint, Z.; **Végh, A. G.**; Popescu, A.; Dima, M.; Ganea, C.; Váró, G. Direct Observation of Protein Motion during the Photochemical Reaction Cycle of Bacteriorhodopsin. *Langmuir* **2007**, 23, 7225-7228.

IF: **4,009** Hivatkozások száma: **5** Ebből független: **5**

VII. Wilhelm, I.; Farkas, E. A.; Nagyőrszi, P.; Váró, G.; **Végh, A. G.**; Couraud, P.; Bálint, Z.; Weksler, B.; Krizbai, I. A.; Romero, A. I. Regulation of Cerebral Endothelial Cell Morphology by Extracellular Calcium. *Physics in Medicine and Biology* **2007**, 52, 6261-6274.

IF: **2,528** Hivatkozások száma: **9** Ebből független: **3**

VIII. Vollmer, J.; **Végh, A. G.**; Lange, C.; Eckhardt, B. Vortex Formation by Active Agents as a Model for *Daphnia* Swarming. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin Soft Matter Phys.* **2006**, 73, 061924.

IF: **2,438** Hivatkozások száma: **8** Ebből független: **8**