



Szegedi Tudományegyetem  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



# MELANÓMASEJT-ENDOTÉLSEJT KÖLCSÖNHATÁSOK SZEREPE AZ AGYI ÁTTÉTKÉPZŐDÉS FOLYAMATÁBAN

Ph.D. értekezés tézisei

**Fazakas Csilla**

Témavezető: Dr. Krizbai István

Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Biofizikai Intézet

SZEGED  
**2014**

## BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A rosszindulatú daganatok agyi áttétei az életet súlyosan fenyegető kórképek, amelyeknek kezelési lehetőségei igen korlátozottak. A leggyakrabban előforduló agyi metasztatikusok emlő- és tüdőkarcinóma, illetve melanóma eredetűek. Ezek közül a melanóma az egyik legnagyobb százalékban agyi metasztatist adó tumor (az esetek 55-75%-ában).

Mivel a központi idegrendszer nem rendelkezik nyirokkeringéssel, a metasztatikus sejtek csupán a véráram útján, vagyis a vér-agy gáton keresztül juthatnak be az agyi parenchymába. Ennek a folyamatnak egyik alapvető lépése az agyi kapillárisokat bélelő endotéliumon való átjutás. Az agyi endotélisejtek a periciták, az asztrociták és az idegvégződések jelenlétében egy szoros gátat képeznek a vér és az idegszövet között. Ez a vér-agy gát, melynek kiemelkedő szerepe a központi idegrendszer homeosztázisának fenntartása. A „gát” funkció ellátását az agyi endotélisejtek különleges tulajdonságai teszik lehetővé, mint a folytonos szoros kapcsolatok (tight junctions), valamint a különböző transzporterek és enzimek jelenléte. A folytonosan elhelyezkedő szoros kapcsolatok szabályozzák a paracelluláris (sejtek közötti) permeabilitást. Felépítésükben transzmembrán (a Marvel család tagjai, claudinok, junkcionális adhézios molekulák), valamint citoplazmatikus fehérjék (zonula occludens proteinek: ZO-1, ZO-2, illetve cingulin, paracingulin fehérjék) vesznek részt. A szoros kapcsolatok kialakulásában és fenntartásában fontos szerepet játszanak továbbá a tőlük bazolaterálisan elhelyezkedő adherens kapcsolatok, melyeket szintén transzmembrán (cadherin), illetve citoplazmatikus (catenin) fehérjék alkotnak.

Az agyi áttétképzésnek kulcsfontosságú lépése a melanómasejtek vér-agy gáton való átjutása, azonban jelenleg még igen keveset tudunk a melanómasejtek és az agyi endotélisejtek között fellépő kölcsönhatásokról. A melanómasejtek erekből való kilépésében, extravázációjában számos sejtfelszíni és adhézios molekula, proteolitikus enzim és jelátviteli útvonal jut kulcsszerephez. A tumorsejtek kétféle mozgással képesek vándorolni: mezenchimálisan, illetve amöboid módon. A mezenchimális mozgás során a sejtek elnyúlt

alakúak, megnövekedett proteolitikus aktivitással és alacsony Rho-ROCK (Rho-kináz) aktivitással bírnak.

Kutatásaink célja olyan molekuláris mechanizmusok és folyamatok vizsgálata volt, amelyek részt vesznek a melanómasejtek és endotélsejtek közötti kölcsönhatásban. Kísérleteinkben a következő kérdéseket próbáltuk megválaszolni:

1. Hogyan hatnak a melanómasejtek az agyi endotélsejtekre extravazációjuk során?
2. Milyen transzmigrációs útvonalon képesek a melanómasejtek áthatolni az agyi endotéliumon?
3. Mely proteázok segítik elő a melanómasejtek átjutását az agyi endotélsejteken?
4. Milyen szerepet játszik a Rho-ROCK jelátviteli útvonal a melanóma agyi áttétképzésében?

## **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

### ***Sejtenyésztés és kezelések***

Az A2058 humán melanómasejteket 5% magzati marha szérummal (fetal bovine serum, FBS) (Lonza), valamint Glutamax-szal (Invitrogen) kiegészített MEM (Sigma) tápfolyadékban tenyésztettük. A B16/F10 egér melanómasejteket RPMI (Sigma) médiumban tenyésztettük, mely 5% FBS-t (Lonza) és Glutamax-ot tartalmazott. A humán agyi mikrovaszkuláris endotél sejt vonalat (hCMEC/D3, röviden D3) patkányfark kollagénnel bevont tenyésztő csészékben növesztettük EGM-2MV (Lonza) növekedési faktorokkal és szérummal kiegészített EBM-2 (Lonza) tápfolyadékban. A primér patkány agyi endotélsejteket (rat brain endothelial cells, RBEC) 2-3 hetes patkányokból izoláltuk. Az endotélsejteket fibronectinnel és IV-es típusú kollagénnel bevont csészében tenyésztettük DMEM/F12 (Invitrogen) tápfolyadékban, melyet 10% plazmából készített szérummal (First Link) és növekedési faktorokkal egészítettünk ki. A más típusú sejtektől mentes, tiszta endotéltenyésztés elérése érdekében az első két tenyésztési napon a tápfolyadékhoz 4 µg/ml puromycint adtunk. Az izolálás során a laboratóriumi állatokkal a hazai és a nemzetközi előírásoknak megfelelően jártunk el.

Kísérleteinkben a következő finomvegyszereket használtuk: a Pefabloc-ot (Roche) 200  $\mu\text{M}$  koncentrációban, az Y27632-t (Tocris) és a fasudil-t (Santa Cruz) (ROCK-1 és ROCK-2 gátlószereket) 10  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban, a CT04 irreverzibilis Rho GTPáz gátlószert 1  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban alkalmaztuk.

### ***Adhéziós kísérletek***

Az agyi endotélsejteket (patkány RBEC vagy humán D3) 24 lyukú tenyésztőedényben növesztettük a konfluencia eléréséig. A kísérletek kezdetén a melanómasejteket (A2058 vagy B16/F10) fluoreszcens festékekkel (Oregon Green® 488 karboxilsav diacetát szukcinimidil észter, Invitrogen) jelöltük meg. Ezt követően  $5 \cdot 10^4$  melanómasejtet helyeztünk az egyes lyukakban levő endotélsejtrétegekre sérumentes tápfolyadékban, majd a melanómasejteket hagytuk kitapadni különböző időintervallumokig. Ezt követően a ki nem tapadt sejteket lemostuk, és a kitapadtakat etanol-ecetsav (95/5 v/v) keverékével fixáltuk  $-20^\circ\text{C}$ -on öt percig. Az endotélréteghez tapadt melanómasejteket fluoreszcens mikroszkóphoz kapcsolt digitális kamerával lefényképeztük, majd Image Pro Plus szoftver segítségével megszámloltuk.

### ***Immunfluoreszcencia és aktin festés***

Fibronektinnel és IV-es típusú kollagénnel bevont üveg fedőlemezekon konfluenciájuk eléréséig növesztettünk patkány agyi endotélsejteket. A melanómasejteket (A2058 vagy B16/F10) CellTracker™ Blue CMAC (Invitrogen) vagy Oregon Green fluoreszcens festékekkel jelöltük meg, majd az endotélrétegre helyeztük. Öt óra elteltével etanol-ecetsav (95/5) keverékével fixáltuk. Ezt követően a fedőlemezeket 3%-os BSA oldattal blokkoltuk 30 percig, majd az elsődleges és a fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyagokkal inkubáltuk. Végül a fedőlemezeket beágyazó médiumban (Biomeda) rögzítettük a tárgylemezekhez. Aktin festés esetén a fedőlemezekon tenyésztett melanómasejteket 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, majd  $-20^\circ\text{C}$ -on 10 percig permeabilizáltuk acetonnal. A blokkolást követően a sejteket Alexa488-cal jelölt falloidinnel festettük meg. A fedőlemezeket beágyazó médiumban rögzítettük, majd fluoreszcens mikroszkóphoz (Nikon Eclipse TE2000U) kapcsolt digitális kamerával (Spot RT KE) felvételeket készítettük róluk. A melanómasejtek és endotélsejtek közötti

kölcsönhatások vizsgálatához konfokális mikroszkópos analízisnek is alávetettük az immunfluoreszcensen megjelölt mintákat. A minták három dimenziós optikai szeletelését Olympus Fluoview FV1000 konfokális lézer mikroszkóppal végeztük. A kapott digitális képeket az Olympus Fluoview szoftver segítségével elemeztük.

### ***A transzendenteliális elektromos ellenállás (TEER) mérése***

A patkány agyi endotélsejteket fibronektinnel és IV-es típusú kollagénnel bevont szemipermeábilis filetereken ( $4\ \mu\text{m}$  pórus méretű,  $1,12\ \text{cm}^2$ , Costar Corning Transwell Clear) növesztettünk. A konfluencia elérése után a sejtek tápfolyadékát  $550\ \text{nM}$  hidrokortizonnal,  $250\ \mu\text{M}$  CPT-cAMP-vel (Sigma) és  $17,5\ \mu\text{M}$  RO-201724-gyel (Roche) egészítettük ki. A filtereket asztrocita kondicionált médiummal feltöltött CellZScope (nanoAnalytics) mérőkészülékbe helyeztük, s megmértük a transzendenteliális ellenállást. Állandósult TEER értékeknél  $10^5$  melanómasejtet helyeztünk a filterek apikális részébe, s mértük az általuk kiváltott ellenállás változást további 24 óráig.

### ***Atomi erő mikroszkópos mérések***

Kísérleteinkben élő melanómasejt és endotélsejtek között fellépő adhéziós erőt mértünk és jellemeztünk atomi erő mikroszkóppal. A mérésekhez Asylum MFP-3D fejet és Molecular Force Probe típusú atomi erő mikroszkópot használtunk, melynek vezérlő programja Igor Pro (v. 6.22A, Wavemetrics) szoftverben készült. Szilikon-nitrid tű nélküli konzolokat használtunk (MikroMasch), melyek rugóállandóját meghatározva  $30\ \text{pN/nm}$  átlagértéket kaptunk. A fluoreszcensen jelölt melanómasejteket biotinilált-BSA/streptavidin/biotinilált-Concanavalin-A rétegekkel bevont konzolokhoz rögzítettük. Az így rögzített melanómasejtet a tenyésztő csészében levő konfluens D3 endotélréteghez közelítettük, míg a nyomóerő elérte a  $2\ \text{nN}$ -t. A kísérleteket Leibovitz médiumban végeztük, amit 25 perc elteltével a mérés során friss médiumra vagy  $10\ \mu\text{M}$ -os koncentrációjú Y27632 ROCK gátlószert tartalmazó tápoldatra cseréltünk. Ezt követően kb. 45 másodpercenként további 90 percig mértük a sejtek közötti adhéziós erőt.

### ***Transzmigrációs kísérletek***

A transzendenteliális migráció vizsgálatához a patkány agyi endotélsejteket fibronektin/kollagén keverékével bevont filterekre (8 µm pórus méret, 1,13 cm<sup>2</sup>, Millipore) helyeztük. Az endotélréteg barrier tulajdonságait a TEER mérésével ellenőriztük. Ezt követően 10<sup>5</sup> Oregon Green-nel fluoreszcensen megjelölt melanómasejtet helyeztünk az apikális részbe. Az alsó kompartmentumot 100 µg/ml I-es típusú kollagént tartalmazó szérummentes médiummal töltöttük fel. Öt óra elteltével a sejteket megmostuk, majd etanol/ecetsav keverékével fixáltuk. A felső részben levő sejteket óvatosan letöröltük, majd fluoreszcens mikroszkóp segítségével megszámoltuk a filter aljára átvándorolt melanómasejteket.

### ***Western-blot***

Szérummentes tápfolyadékban melanómasejteket helyeztünk a konfluens endotélsejtretegekre (D3 vagy RBEC), majd a sejteket 24 órán keresztül együtt tenyésztettük. Ezután a sejteket PBS-sel mostuk, és RIPA lízispufferben (összetétele: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1% deoxikolát, 0,1% SDS, 1 mM Na-vanadát, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM Pefabloc®) homogenizáltuk. A mintákat 30 perc jégen történő inkubálás után lecentrifugáltuk (10000\*g, 10 perc, 4°C). A kapott fehérjeminták koncentrációját BCA (Pierce) módszerrel határoztuk meg. A mintában levő fehérjéket SDS-poliakrilamid gél elektroforézissel választottuk el, majd PVDF (Millipore), illetve nitrocellulóz (Bio-RAD) membránokra blottoltuk. A nem specifikus kötőhelyek blokkolása után a membránokat elsődleges ellenanyagokkal (anti-claudin-5, illetve anti-occludin) inkubáltuk, majd TBS-T-vel mostuk. Ezt követte a HRP-konjugált másodlagos antitesttel való inkubáció, majd újabb mosás. Az immunreakciót Immobilon ECL detektáló segítségével röntgenfilmen tettük láthatóvá.

### ***Zselatin zimográfia***

A D3 endotélsejteket 12 lyukú tenyésztőedényekben a konfluencia eléréséig növesztettük, majd 2\*10<sup>5</sup> A2058 melanómasejtet helyeztünk rájuk szérummentes tápfolyadékban, öt órára. Ezt követően a médiumokat begyűjtöttük, lecentrifugáltuk (10000\*g, 10 perc, 4°C), és merkaptóetanol mentes Laemmli pufferrel előkészítettük zimográfiai vizsgálathoz. A sejteket PBS-sel mostuk, 1,5%-os Tx-114 lízis pufferben homogenizáltuk, majd lecentrifugáltuk, és a membránfrakciót

szintén merkaptotanol mentes Laemmli pufferrel készítettük elő. 1,5 mg/ml zselatint tartalmazó SDS-poliakrilamid gélen a fehérjéket elektroforetikusan szétválasztottuk. A géleket 2,5% Triton-X-100 pufferrel, majd desztillált vízzel mostuk. A géleket ezt követően 37°C-on két napig inkubáltuk a következő összetételű pufferben: 50 mM Tris pH=7,4, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> és 0,2 M NaCl; illetve 50 mM Tris pH=7,4, 0,2 M NaCl és 5 mM EDTA. A zselatinázok aktivitását Coomassie BBR250 festéssel mutattuk ki. A festés után az átlátszó zselatinolitikus sávok láthatóvá váltak.

### ***RNS interferencián alapuló géncsendesítés***

A Stealth<sup>TM</sup> siRNS duplaszálú oligoribonukleotidokat (1. táblázat) az Invitrogen BLOCK-iT<sup>TM</sup> RNAi tervező programmal terveztük, és az Invitrogen-től vásároltuk meg. Az A2058 melanómasejteket növekedési fázisban, 50%-os konfluencia elérésekor transzfektáltuk a táblázatban feltüntetett szekvenciákkal. A géncsendesítés hatékonyságát ismételt transzfekcióval növeltük. A melanómasejteket a második transzfekciót követő napon használtuk fel a kísérleteinkben. A géncsendesítés sikerességét minden alkalommal valós idejű polimeráz láncreakcióval ellenőriztük.

**1. táblázat. A géncsendesítéshez használt szekvenciák.**

Név		Szekvencia (5' -3')
ROCK I	sense	UAGAGUGUCGAAGAUGCCAUGUUA
	antisense	UUAACAUGGCAUCUUCGACACUCUA
ROCK II	sense	CCGUUGCCAUUAUAAGUGUCAUAAA
	antisense	UUUAUGACACUAAUAUGGCAACGG
Szepráz	sense	AAGAAGUGUGUUACUUGCCAUCUAA
	antisense	UUAGAUGGCAAGUAACACACUUCUU
Kontroll	sense	GACGUAGAGAGAGUUCGACAUACA
	antisense	UGUAUGUCGGAACUCUCUCUACGUC

## EREDMÉNYEK

### ***A melanómasejtek és az agyi endotélsejtek közötti kölcsönhatások: kitapadás (adhézió) és átvándorlás (transzmigráció)***

Kísérleteink során megfigyeltük, hogy mind a humán A2058, mind az egér B16/F10 melanómasejtek kitapadtak az agyi endotélsejtek rétegéhez (RBEC és D3 sejtekhez). A melanómasejtek adhéziója az endotéliumhoz már 15 perc után megfigyelhető volt, majd jelentősen növekedett 30 perc elteltével. A két melanómasejt típus közül a B16/F10 adhéziója időben és számban is meghaladta a humán melanómasejtekét.

A metasztázis képzés során a kitapadást követő lépés a tumorsejtek transzmigrációja az endotélsejtek rétegén. Konfokális mikroszkóppal készült felvételeken láthatóak voltak az endotélréteg bazolaterális oldalán a melanómasejtek nyúlványai. Ezért megvizsgáltuk, hogyan befolyásolják a melanómasejtek az agyi endotélium barrier tulajdonságait.

### ***A melanómasejtek hatása az agyi endotélsejtek jukcióira***

A barrier funkció vizsgálatához az endotélréteg transzendentális elektromos ellenállásának (TEER) változását követtük. Megfigyeltük, hogy mind a humán (A2058), mind az egér (B16/F10) melanómasejtek endotélrétegre helyezve 24 óra elteltével jelentősen csökkentették a TEER-t. Az endotélréteg rezisztenciájának csökkenése a jukciók sérülésére utalt, ugyanakkor felvettette annak lehetőségét, hogy a melanómasejtek elsősorban paracellulárisan jutnak át az agyi endotéliumon. A paracelluláris vándorlás következtében sérülhetnek az endotélsejtek közötti jukciók, ezért a továbbiakban megvizsgáltuk a jukcionális fehérjék lokalizációjában és expressziójában melanómasejtek hatására bekövetkező változásokat.

Immunfluoreszcens technikákkal kimutattuk, hogy a melanómasejtek kitapadásának helyén az endotélsejtek jukcionális fehérjéinek (claudin-5, occludin, ZO-1) festése szakadozottá vált. Ugyanakkor western-blot alkalmazásával megfigyeltük, hogy melanómasejtek jelenlétében, illetve az általuk termelt különböző



faktorok hatására elbomlanak a szoros kapcsolatokat alkotó junkcionális fehérjék.

### ***A melanómasejtek által termelt proteolitikus enzimek hatása a transzmigrációra***

A melanómasejtek transzmigrációjuk során számos proteolitikus enzimet termelnek, amelyek elősegítik vándorlásukat és ezáltal az áttétképzést. Kimutattuk, hogy endotélsejtek jelenlétében a melanómasejtek proteolitikus aktivitása jelentősen megnőtt. Különböző proteáz gátlószereket (EDTA mátrixmetalloproteáz, E64 ciszteinproteáz, Pefabloc szerinproteáz inhibitor) alkalmazva megpróbáltuk kimutatni, hogy melyek a melanómasejtek által termelt főbb proteázok. A melanómasejtek által termelt proteázok aktivitását az alkalmazott gátlószerek közül csupán a Pefabloc csökkentette, így arra a következtetésre jutottunk, hogy a melanómasejtek agyi endotélsejtek hatására elsősorban zselatinolitikus szerin proteázokat termelnek, és szabadítanak fel. Transzmigrációs kísérleteinkben Pefabloc segítségével sikerült a melanómasejtek átvándorlását is csökkentenünk. A melanómasejtek által termelt számos szerinproteáz közül géncsendesítés alkalmazásával sikerült kimutatnunk a szepráz. A szepráz-csendesített melanómasejtek transzmigrációja jelentősen csökkent a kontroll sejtekéhez képest. Mivel a daganatos sejtek esetében a jelentős proteolitikus aktivitás, valamint alacsony Rho-ROCK aktivitás az ún. mezenchimális mozgásformára jellemző, a továbbiakban ezen mozgástípus szerepét vizsgáltuk meg a melanómasejtek vér-agy gáton való átjutásában.

### ***A ROCK gátlás hatása a melanómasejtek és az agyi endotélsejtek közötti kölcsönhatásra***

*A melanómasejtekben a ROCK gátlás mezenchimális mozgástípust vált ki*

ROCK gátlószert jelenlétében a melanómasejtek alakja elnyúlt, ún. mezenchimális alakot vett fel, számos aktinban gazdag lamellipodiummal és filopodiummal, ugyanakkor növekedett a proteolitikus aktivitás is.

A melanómasejtek agyi áttétképzésében játszott szerepének tisztázása végett megvizsgáltuk a ROCK gátlásának hatását a melanómasejtek adhéziójára. A2058 melanómasejteket ROCK inhibitor

jelenlétében (Y27632 vagy fasudil) vagy hiányában (kezeletlen, kontroll) hagyunk kitapadni humán agyi endotélsejtekhez 90 percig. Megfigyeltük, hogy a ROCK gátlása jelentősen megnövelte a kitapadt melanómasejtek számát mindkét gátlószer esetében. A kezeletlen sejtekhez képest ROCK gátlására megnőtt az elnyúlt és kerek sejtek számának aránya is. Hasonlóan megnövekedett adhéziót mutattunk ki ROCK I-II csendesített melanómasejtekkel végzett kísérleteinkben.

*A ROCK gátlás növeli a melanómasejtek és endotélsejtek közötti adhéziós erőt*

A továbbiakban kíváncsiak voltunk arra, hogy a ROCK gátlás hatására megnövekedett melanómasejt adhézió milyen összefüggésben áll a melanómasejt-endotélsejt között fellépő adhéziós erő mértékével. Erőspektroszkópia alkalmazásával megmértük a melanómasejt és a tenyésztő csészén levő endotélréteg között kialakult adhéziós erőt. Kezeletlen sejtek esetében a mért adhéziós erő 200 pN volt, amit a ROCK gátlószer jelenléte mintegy 2,5-szer megnövelt.

*A ROCK gátlás elősegíti a tumorsejtek transzendoteliális migrációját*

Mivel a ROCK gátlása megnövelte a kitapadást, kíváncsiak voltunk arra is, hogy milyen hatást figyelhetünk meg a transzmigráció során. Kimutattuk, hogy mindkét melanómasejt esetében a ROCK gátlószerek jelenléte igen jelentősen megnövelte az átvándorolt sejtek számát. A Rho-ROCK jelátviteli útvonal melanómasejtek transzmigrációjában játszott szerepének tisztázása érdekében CT04 gátlószerezrel szelektíven és irreverzibilisen gátoltuk a RhoGTPáz-t, s ezáltal a ROCK-ot endotél- vagy melanómasejtekben. Kimutattuk, hogy a Rho-ROCK útvonal gátlása a melanómasejtekben jelentősen elősegítette a migrációt, míg az endoteliális Rho-ROCK gátlás nem befolyásolta azt.

*A ROCK gátlószer növeli az agyi parenchimális áttétek számát*

B16/F10 sejteket injektáltunk C57/BL6 egerek fő nyaki ütőerébe (arteria carotis communis), majd egy részük ROCK gátlószert (Y27632) is kapott 500 µg/kg koncentrációban. Kezeletlen állatokban főként az agykamrákban és leptomeningeálisan figyeltünk meg áttéteket, ugyanakkor a ROCK gátlószer jelentősen növelte az agyi parenchimális daganatok számát.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A melanóma rendelkezik a daganatok közül a legnagyobb központi idegrendszeri affinitással. Az agyszövetbe való eljutáshoz az áttétképző sejteknek át kell törniük az agyi kapillárisokat bélelő endotélsejteken, amelyek a vér-agy gát legfontosabb alkotóelemei. Ez a folyamat az agyi áttétek képződésének egyik kulcsfontosságú lépése. Keveset tudunk azonban a melanómasejtek és az agyi endotélsejtek közötti kölcsönhatásról.

Kutatásaink célja az volt, hogy olyan molekuláris mechanizmusokat és folyamatokat tárjunk fel, amelyek részt vesznek a melanómasejtek és az agyi endotélsejtek közötti kölcsönhatásban.

Munkánk során vizsgáltuk a melanómasejtek hatására a vér-agy gát endotélsejtjeinek szoros kapcsolataiban bekövetkező változásokat, valamint az átvándolás útvonalát. Továbbá tanulmányoztuk a tumorsejtek migrációjában fontos szerepet játszó Rho-ROCK útvonal és a melanómasejtek által termelt proteolitikus enzimek jelentőségét az agyi endotélsejtek és a melanómasejtek kölcsönhatásában. A melanómasejtek transzendoteliális migrációját egy *in vitro* modellrendszer segítségével tanulmányoztuk.

Megfigyeltük, hogy a melanómasejtek jelenlétében csökkent az endotélsejtek transzendoteliális rezisztenciája, ami a barrier tulajdonságok károsodására utalt. Ugyanakkor, az interendoteliális junkciók kialakításáért, ezáltal a vér-agy gát integritásának fenntartásáért felelős fehérjék, mint az occludin és a claudin-5 immunfluoreszcens membránfestése szakadozottá vált. Hosszabb együtt-tenyésztés ezen junkcionális fehérjék lebomlását idézte elő az endotélsejtekben. Ezen eredmények arra utaltak, hogy a melanómasejtek képesek paracellulárisan, az endotélsejtek között áthatolni a vér-agy gáton. Zimográfias vizsgálatokkal kimutattuk, hogy az endotéliummal kapcsolatba kerülő melanómasejtek proteolitikus aktivitása megnőtt.

Géncsendesítés alkalmazásával bebizonyosodott, hogy a transzmigrációban az egyik jelentős szereppel bíró proteáz a szepráz.

A tumorsejtek kétféle mozgástípussal képesek vándorolni: a mezenchimális típussal, amelyben a Rac és az extracelluláris proteolízis játszik szerepet, illetve az amőboid típussal, amely a Rho-ROCK útvonal aktiválásával és az aktin citoskeleton kontraktilitás növelésével jár. Megvizsgáltuk, hogy milyen szerepe van ezen útvonalaknak a melanómasejtek vér-agy gáton való átjutásában. A Rho-kinázok gátlása a melanómasejtek mezenchimális mozgását idézte elő; ugyanakkor megnövelte mind a kitapadt, mind az átvándorolt sejtek számát. Atomi erő mikroszkóp alkalmazásával megmértük a melanómasejt-endotélsejt között kialakuló adhéziós erőt, mely szintén megnövekedett a ROCK gátlószer hatására. Ugyanakkor a ROCK gátlása növelte az agyi parenchimális áttétek számát is *in vivo*. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a melanómasejtek elsősorban mezenchimális típusú mozgással haladnak át az agyi endotélsejtek rétegén.

Eredményeink arra utalnak, hogy a junkcionális fehérjéknek, a Rho/Rac szignalizációs útvonalaknak és a melanómasejtek által termelt szerin proteázoknak jelentős szerepe van a melanómasejtek vér-agy gáton való átjutásában, ezáltal az agyi melanóma áttétek kialakulásában.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban témavezetőmnek, Dr. Krizbai Istvánnak szeretném megköszönni, az útmutatást és bátorítást, melyet munkám során tőle kaptam. Hálás köszönettel tartozom Dr. Wilhelm Imolának a kísérletek során nyújtott szakmai segítségéért, önzetlen támogatásáért.

Köszönetemet fejezem ki a Molekuláris Neurobiológiai Egység vezetőjének, Dr. Siklós Lászlónak és a csoport összes tagjának. Külön köszönet illeti Ngo Thi Khue Dung-ot a sejttenyésztéshez nyújtott segítségéért és Dr. Váró Györgyöt és Végh A. Gergelyt az atomi erő mikroszkópos eredményekért.

Hálás köszönet illeti munkatársaimat Dr. Nagyőszai Pétert, Dr. Farkas Attilát, Haskó Jánost, Molnár Juditot és Nyúl-Tóth Ádámot a kiváló csapatmunkáért, hasznos beszélgetéseinkért és a vidám percekért.

Köszönöm barátaimnak és családomnak a bátorítást és szeretetet, és hogy számíthatok rájuk.

Kitüntetett hálával tartozom férjemnek, Végh Gergőnek, akinek segítségére és bátorítására mindvégig támaszkodhattam.

Köszönet a Richter Gedeon Centenárium Alapítványnak és a Jedlik Ányos Doktorjelölti Ösztöndíj programnak az anyagi támogatásért.

## PUBLIKÁCIÓK

### *Az értekezés alapjául szolgáló közlemények*

I. **Fazakas, C. \***, Wilhelm, I. \*, Nagyoszi, P., Farkas, A.E., Hasko, J., Molnar, J., Bauer, H., Bauer, H.C., Ayaydin, F., Dung, N.T., Siklos, L., and Krizbai, I.A. (2011). Transmigration of melanoma cells through the blood-brain barrier: role of endothelial tight junctions and melanoma-released serine proteases. *PLoS One* 6, e20758. (\*=megosztott első szerzős közlemény) (IF2011: 4.092)

II. Wilhelm, I.\*, **Fazakas, C.\***, Molnar, J., Hasko, J., Vegh, A.G., Cervenak, L., Nagyoszi, P., Nyul-Toth, A., Farkas, A.E., Bauer, H., Guillemin, G.J., Bauer, H.C., Varo, G., and Krizbai, I.A. (2014). Role of Rho/ROCK signaling in the interaction of melanoma cells with the blood-brain barrier. *Pigment Cell. Melanoma Res.* 27, 113-123. (\*=megosztott első szerzős közlemény) (IF2012: 5.839)

III. Wilhelm, I., **Fazakas, C.**, and Krizbai, I.A. (2011). In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)* 71, 113-128. (IF2011: 2.110)

### *Egyéb közlemények*

1. Wilhelm, I., Molnar, J., **Fazakas, C.**, Hasko, J., and Krizbai, I.A. (2013). Role of the blood-brain barrier in the formation of brain metastases. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 1383-1411. (IF2012: 2.464)

2. Balint, Z., Zabini, D., Konya, V., Nagaraj, C., Vegh, A.G., Varo, G., Wilhelm, I., **Fazakas, C.**, Krizbai, I.A., Heinemann, A., Olschewski, H., and Olschewski, A. (2013). Double-stranded RNA attenuates the barrier function of human pulmonary artery endothelial cells. *PLoS One* 8, e63776. (IF2012: 3.730)

3. Sziraki, I., Erdo, F., Trampus, P., Sike, M., Molnar, P.M., Rajnai, Z., Molnar, J., Wilhelm, I., **Fazakas, C.**, Kis, E., Krizbai, I., and Krajcsi, P. (2013). The use of microdialysis techniques in mice to study P-gp function at the blood-brain barrier. *J. Biomol. Screen.* 18, 430-440. (IF2012: 2.207)

4. Vegh, A.G., **Fazakas, C.**, Nagy, K., Wilhelm, I., Molnar, J., Krizbai, I.A., Szegletes, Z., and Varo, G. (2012). Adhesion and stress

relaxation forces between melanoma and cerebral endothelial cells. *Eur. Biophys. J.* 41, 139-145. (IF2012: 2.274)

5. Mallareddy, J.R., Toth, G., **Fazakas, C.**, Molnar, J., Nagyoszi, P., Lipkowski, A.W., Krizbai, I.A., and Wilhelm, I. (2012). Transport characteristics of endomorphin-2 analogues in brain capillary endothelial cells. *Chem. Biol. Drug Des.* 79, 507-513. (IF2012: 2.469)

6. Hornok, V., Bujdosó, T., Toldi, J., Nagy, K., Demeter, I., **Fazakas, C.**, Krizbai, I., Vecsei, L., and Dekany, I. (2012). Preparation and properties of nanoscale containers for biomedical application in drug delivery: preliminary studies with kynurenic acid. *J. Neural Transm.* 119, 115-121. (IF2012: 2.730)

7. Vegh, A.G., **Fazakas, C.**, Nagy, K., Wilhelm, I., Krizbai, I.A., Nagyoszi, P., Szegletes, Z., and Varo, G. (2011). Spatial and temporal dependence of the cerebral endothelial cells elasticity. *J. Mol. Recognit.* 24, 422-428. (IF2011: 3.310)

8. Sziraki, I., Erdo, F., Beery, E., Molnar, P.M., **Fazakas, C.**, Wilhelm, I., Makai, I., Kis, E., Heredi-Szabo, K., Abonyi, T., Krizbai, I., Toth, G.K., and Krajcsi, P. (2011). Quinidine as an ABCB1 probe for testing drug interactions at the blood-brain barrier: an in vitro in vivo correlation study. *J. Biomol. Screen.* 16, 886-894. (IF2011: 2.049)

9. Nagyoszi, P., Wilhelm, I., Farkas, A.E., **Fazakas, C.**, Dung, N.T., Hasko, J., and Krizbai, I.A. (2010). Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem. Int.* 57, 556-564. (IF2010: 3.601)

10. Wilhelm, I., Nagyoszi, P., Farkas, A.E., Couraud, P.O., Romero, I.A., Weksler, B., **Fazakas, C.**, Dung, N.T., Bottka, S., Bauer, H., Bauer, H.C., and Krizbai, I.A. (2008). Hyperosmotic stress induces Axl activation and cleavage in cerebral endothelial cells. *J. Neurochem.* 107, 116-126. (IF2008: 4.500)