



Szegedi Tudományegyetem  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

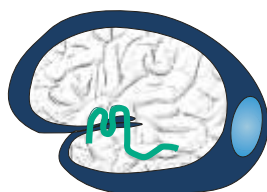


# AZ EMLŐKARCINÓMA ÉS A MELANÓMASEJTEK ÁTVÁNDORLÁSA A VÉR-AGY GÁTON KERESZTÜL: HASONLÓSÁGOK ÉS KÜLÖNBSÉGEK

Ph.D. értekezés tézisei

**Molnár Judit**

Témavezetők: Dr. Krizbai István  
Dr. Wilhelm Imola



Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Biofizikai Intézet

SZEGED  
2016

## BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A rosszindulatú daganatok gyakori komplikációja az áttétek (metasztázisok) kialakulása, elsősorban előrehaladott betegség, illetve késői diagnózis esetén. Az agyi áttétek kialakulása különösen rossz prognózissal bír, mivel kezelési lehetőségeik igen korlátozottak, és az agyi metastázis diagnózisa után az átlag túlélési idő mindösszesen 4-6 hónap. A leggyakoribb agyi áttétek tüdőkarcinóma, emlőkarcinóma, illetve melanóma eredetűek. Az esetek 15-20%-ában az emlőkarcinóma, míg 5-20%-ában a melanóma felelős a központi idegrendszeri metastázisért. A legnagyobb affinitással az agyszövet iránt a melanóma rendelkezik, a boncolási adatok alapján ezen betegek 70-90%-ában alakul ki agyi áttét. Mivel a központi idegrendszeri parenchima nem rendelkezik nyirokerekekkel, a metastatikus sejtek a vérkeringés útján, vagyis a vér-agy gáton keresztül juthatnak be az agyba.

A vér-agy gát, melynek alapját az agyi kapillárisok endotélsejtjei alkotják, fontos szereppel bír a központi idegrendszer homeosztázisának fenntartásában. Az agyi endotélsejtek szoros együttműködésben a gliasejtekkel, a pericitákkal és az idegvégződésekkel egy neurovaszkuláris egységet alkotnak, amelynek nélkülözhetetlen szerepe van a szoros barrier kialakulásában a vér és az idegszövet között. A gát funkció fenntartását az agyi endotélsejtek speciális tulajdonságai teszik lehetővé. Ide tartoznak a folytonos szoros kapcsolatok (tight junctions) a sejtek között, a vezikulák kis száma, a különböző transzporterek és enzimek jelenléte. A sejtek apikális oldalán található szoros kapcsolatok transzmembrán és intracelluláris fehérjékből épülnek fel. Az integráns membrán fehérjék az occludin, a claudinok (elsősorban a claudin-5), a junkcionális adhéziós és egyéb molekulák, míg a fő citoplazmatikus fehérjék közé tartoznak a zonula occludens proteinek: a ZO-1 és a ZO-2. Ezen sejtkapcsoló struktúrák szigorúan szabályozzák a paracelluláris (sejtek közötti) permeabilitást.

A metastatikus tumorsejtek mégis képesek átjutni ezen a szoros barrieren, azonban ezen folyamat mechanizmusai kevésbé ismertek. Korábbi kísérleteinkben igazoltuk, hogy a melanómasejtek által termelt szerin proteázoknak, illetve az agyi endotélsejtek endoteliális-mezenchimális tranzíciójának lehet szerepe a barrier megnyitásában agyi metastázisképződés során.

Kutatásaink során célul tűztük ki, hogy tovább vizsgáljuk azokat a folyamatokat, amelyek szerepet játszanak a tumorsejtek vér-agy gáton való átjutásában. Kétféle tumorsejt típus vizsgálatára fókuszáltunk: az emlőkarcinóma és a melanómasejtek transzmigrációjára, melyek nagy

százalékban felelősek az agyi metasztázisok kialakulásáért. Összehasonlítottuk ezen tumorsejt típusok kitapadását és átjutását az agyi endotélsejtek rétegén. A tumorsejt-endotélsejt interakciókat statikus és dinamikus körülmények között is tanulmányoztuk. Megvizsgáltuk ugyanakkor ezen tumorsejtek hatását a konfluens endotélsejt réteg szoros sejtkapcsolataira.

Célunk volt továbbá a tumorsejtek vér-agy gáton való transzmigrációjában szerepet játszó szignalizációs útvonalak vizsgálata is. Korábbi eredményeink alapján a Rho/ROCK útvonal gátlása, és a mezenchimális fenotípus indukálása elősegítette a melanómasejtek vér-agy gáton való átvándorlását. A mezenchimális mozgástípus mellett a tumorsejtek amőboid alakot is felvehetnek, amit a Rac jelátviteli útvonal gátlásával tudunk indukálni. Megvizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolja a tumorsejtek transzendoteliális migrációját az amőboid fenotípus indukálása. A Rho és Rac útvonalakon kívül a PI3K jelátvitel szerepét is tanulmányoztuk, hiszen ez az útvonal igen gyakran aktiválódik különböző tumorsejtekben.

Kísérleteinknek öt specifikus célja volt:

1. összehasonlítani az emlőkarcinóma és a melanómasejtek adhézióját és transzmigrációját az endotélsejt rétegen statikus és dinamikus körülmények között,
2. összehasonlítani az emlőkarcinóma és a melanómasejtek hatását az endotélsejtréteg szoros kapcsolataira,
3. megérteni a Rac jelátvitel és az amőboid-mezenchimális mozgástípusok szerepét a tumorsejtek vér-agy gáton való átjutásában,
4. megvizsgálni a PI3K gátlás hatását a tumorsejtek endotélsejtrétegen való transzmigrációjára,
5. megfigyelni a Rac és a PI3K gátlószerek hatását az endotél barrier integritására.

Ezen mechanizmusok tisztázása hozzájárulhat új célpontok azonosításához, amelyek az agyi metasztázisok terápiájában, illetve megelőzésében lehetnek fontosak.

# ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

## *Sejtenyésztés és kezelések*

Az MDA-MB-231 és az MCF-7 humán emlőkarcinóma sejteket DMEM (Sigma) médiumban tenyésztettük, mely 5% magzati marha szérumot (fetal bovine serum, FBS) (Lonza) tartalmazott. Az A2058 humán melanómasejteket 5% FBS-t (Sigma) tartalmazó EMEM (Sigma) tápfolyadékban tenyésztettük. Az A375 humán melanómasejteket 10% FBS-sel (Lonza) kiegészített DMEM médiumban (Sigma) tenyésztettük. A 4T1 sejteket 5% FBS-t tartalmazó RPMI tápfolyadékban tenyésztettük. A humán agyi mikrovaszkuláris endotélsejteket (hCMEC/D3, röviden D3) patkányfarkok 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 endotéltenyészet 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 gátlószereket használtuk: a ROCK inhibitorokat (Y27632 és fasudil, Santa Cruz) 10 µM végkoncentrációban; az EHT1864-et (Tocris), mely a Rac fehérje inhibitora, 20 µM koncentrációban. Az LY294002-t (Cell Signaling Technology) – mely a PI3K reverzibilis és szelektív gátlószere – 25 µM koncentrációban alkalmaztuk.

## *Adhéziós kísérletek*

Az agyi endotélsejteket (humán D3) 24 lyukú tenyésztőedényben növesztettük a konfluencia eléréséig. A kísérletek kezdetén a tumorsejteket (MDA-MB-231, MCF-7, A2058 vagy A375) fluoreszcens festékkel (Oregon Green 488 karboxilsav diacetát szukcinimidil észter, Life Technologies) jelöltük meg. Ezt követően  $5 \cdot 10^4$  tumorsejtet helyeztünk az egyes lyukakban levő endotélsejt rétegekre szérum mentes tápfolyadékban, majd a tumorsejteket hagytuk kitapadni 90 percig. Ezt követően a ki nem tapadt sejteket lemostuk, és a tenyészeteket etanol-ecetsav (95/5 v/v) keverékével fixáltuk -20°C-on öt

percig. Az endotélréteghez tapadt tumorsejteket fluoreszcens mikroszkóphoz kapcsolt digitális kamerával lefényképeztük, majd Image Pro Plus szoftver segítségével megszámloltuk.

### ***Statikus transzmigrációs kísérletek time-lapse videók készítésével***

A humán agyi endotélsejteket (D3) 12 lyukú tenyésztőedényben konfluenciáig tenyésztettük.  $2 \cdot 10^4$  tumorsejtet helyeztünk az egyes lyukakban levő endotélsejt rétegekre szérum mentes Leibovitz's L-15 (Sigma) tápfolyadékban. A sejtekről 6 órán keresztül felvételeket készítettünk egy Andor NEO sCMOS kamera segítségével, mely egy Nikon Eclipse Ti-E invert mikroszkóphoz volt csatlakoztatva. A 37°C-ot egy tárgyasztal körüli inkubátor biztosította. A fázis-kontraszt felvételekből time-lapse videókat készítettünk. Nyomon követtük az egyes tumor sejtek mozgását, és megszámloltuk a transzmigrált sejteket.

### ***Dinamikus transzmigrációs kísérletek mikrofluidika alkalmazásával***

Ahhoz hogy megvizsgáljuk a tumorsejtek átjutását alacsony áramlási nyírófeszültség alatt, létrehoztunk egy biokompatibilis kapilláris hálózatot. A mikrofluidikai hálózat polidimetilsziloxánból (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning) készült fotolitográfias eljárással. Az eszközökhöz öntőformákat készítettünk: 100  $\mu\text{m}$  vastagságú SU8-2050 (MicroChem) epoxi alapú negatív fotoreziszt réteget vittünk fel szilícium lemezekre, majd a csipek tervrajzát tartalmazó króm maszkon keresztül (JD Photo-Tools) UV fényel világítottuk meg ezen réteget (500W Hg lámpa, i-vonal, Newport). Az öntőformákat vákuumkamrában szilanizáltuk (Gelest) egy éjszakán át, hogy megakadályozzuk a PDMS csipek illetve az SU8 öntőformák permanens egymáshoz tapadását. Ezután folyékony PDMS-sel öntöttük ki az öntőformákat, majd az eszközöket addig inkubáltuk 40°C-on, amíg a PDMS teljesen polimerizálódott. Az elkészült mikrofluidikai csipeket leválasztottuk az öntőformákról, a bemeneti illetve kimeneti nyílásokat kilyukasztottuk, végül az eszközöket PDMS-sel bevont mikroszkóp tárgylemezhez rögzítettük oxigén plazmával történő kezelés segítségével.

Az agyi endotélsejtek (D3) beinjektálása előtt a mikrocsatornák belső felszínét patkányfarok kollagénnel vontuk be.  $10^6$  D3 sejtet injektáltunk be

100 µl Leibovitz's L-15 médiumban, ami 2,5% FBS-t (Sigma), növekedési faktor keveréket (Lonza), hidrokortizont és gentamicin-amfotericin-B-t tartalmazott. A sejteket statikus körülmények között hagytuk 24-36 órán át, hogy elérjék a konfluenciát, ezalatt minden 8. órában lecseréltük a tápfolyadékot. Az endotélsejtek kitapadásáról és szaporodásáról 30 percenként készítettünk fázis-kontraszt felvételeket. A konfluens sejtrétegen elindítottunk egy folyamatos tápfolyadék áramlást 300 µl/h-val, ami a vérkeringést imitálta. 24 óra elteltével (a transzmigrációs kísérletek során)  $3 \cdot 10^5$  tumorsejtet (A2058 vagy MDA-MB-231) gyűjtöttünk össze 100 µl médiumban, és fecskendő segítségével beinjektáltuk az endotéllel benőtt mikrocsatornákba. Az injektálás után 100 µl/h-val áramoltattuk a tápfolyadékot 6 órán keresztül, és 5 percenként fázis-kontraszt felvételeket készítettünk. A mikrocsatornákban áramló folyadék  $\sim 0.3-2$  dyn/cm<sup>2</sup> nyírófeszültséget jelentett, ami egy alacsony áramlási stressznek felel meg. A time-lapse videók kiértékelésekor megszámláltuk az áramlással eltűnő sejteket, illetve a kitapadt sejtek átjutását.

### ***Immunfluoreszcens vizsgálatok***

Fibronektinnel és IV-es típusú kollagénnel bevont szemipermeábilis filtereken (4 µm pórus méretű, 1,12 cm<sup>2</sup>, Costar Corning Transwell Clear) patkány agyi endotélsejteket növesztettünk konfluenciájuk eléréséig. A tumorsejteket (MDA-MB-231, A2058, illetve 4T1) CellTracker™ Red (Life Technologies) fluoreszcens festékekkel jelöltük meg, majd az endotél rétegre helyeztük. A mintákat 5 óra elteltével etanol-ecetsav (95/5) keverékével fixáltuk. Ezt követően a filtereket 3%-os BSA oldattal blokkoltuk 30 percig, majd az elsődleges ellenanyaggal (anti-claudin-5, Life Technologies), később a fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyaggal (Alexa488-konjugált, Jackson ImmunoResearch) inkubáltuk. A sejtmagokat Hoechst 33342 (Sigma) festékkel jelöltük. Végül a filtereket beágyazó médiumban (FluoroMount-G, SouthernBiotech) rögzítettük a tárgylemezekhez, majd fluoreszcens mikroszkóphoz (Nikon Eclipse TE2000U) kapcsolt digitális kamerával (Spot RT KE) felvételeket készítettük róluk.

### ***A sejtek viabilitásának mérése***

A tumor- és az endotélsejtek életképességének méréséhez és kvantifikálásához EZ4U nem radioaktív sejtproliferációs és citotoxicitás esszét

(Biomedica) alkalmaztunk. A D3, az MDA-MB-231 és az MCF-7 sejteket 96 lyukú tenyésztőedénybe tettük. Következő nap a sejteket 5 órán keresztül kezeltük 20  $\mu$ M EHT1864-vel vagy 25  $\mu$ M LY294002-vel szérumban és fenolvörösmentes DMEM-ben (Life Technologies). Az EZ4U szubsztráttal történő 45 perces inkubálás után az abszorbanciát BMG FLUOstar OPTIMA mikroplate olvasóban mértük meg 450 nm-en.

### ***Vándorlási teszt***

A tumorsejteket (MDA-MB-231, MCF-7 vagy A2058) 24 lyukú tenyésztőedényben növesztettük. Egy pipetta hegyével megsértettük a sejtréteget, majd lemostuk PBS-sel és Rac vagy PI3K gátlószerekkel kezeltük szérumban Leibovitz's L-15 médiumban. 24 órán keresztül 30 percenként fáziskontraszt felvételeket készítettünk a sejtekről egy Andor NEO sCMOS kamerával, amely egy Nikon Eclipse Ti-E invert mikroszkóphoz volt csatlakoztatva, 37°C-ot tartó inkubátorban. A kvantifikálásához a migráló sejtek számát átlagoltuk, amelyeket öt karcolt területről számoltunk.

### ***Valós idejű impedancia mérés***

Az EHT1864 és az LY294002 gátlószerek időbeli hatását a D3 sejtek elektromos impedanciájának mérésével is megfigyeltük az xCELLigence rendszer segítségével, követve a gyártó utasításait (Acea Biosciences).  $10^4$  sejtet tettünk ki lyukanként 100  $\mu$ l médiumban egy E-Plate-be, és a sejteket hagytuk kitapadni az elektródás felszínhez. Az impedanciát 15 percenként mértük. A plató elérése után a sejteket 10 órán keresztül kezeltük 20  $\mu$ M EHT1864-vel vagy 25  $\mu$ M LY294002-vel. A sejt impedancia (ami függ a sejtek számától, az adhézió százaléktól, a kinyúlt sejtek számától és a junkciók szorosságától) sejt indexben volt kifejezve (tetszőleges egység), amit a berendezés szoftvere automatikusan kiszámolt.

### ***Western-blot vizsgálatok***

Konfluens endotélsejt rétegeket (D3) 5 órán keresztül 20  $\mu$ M EHT1864-gyel vagy 25  $\mu$ M LY294002-vel kezeltünk. Ezután a sejteket PBS-sel mostuk, és RIPA lízispufferben homogenizáltuk, melynek összetétele: 20 mM Tris,

150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1% deoxikolát, 0,1% SDS, 1 mM Navanadát, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM Pefabloc®. A mintákat egy 30 percig 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 gélelektroforézissel választottuk el, majd nitrocellulóz (Bio-Rad) membránra blottoltuk. A nem specifikus kötőhelyek blokkolása után a membránokat elsődleges ellenanyaggal (anti-claudin-5) inkubáltuk, majd TBS-T-vel mostuk. Ezt követte a HRP-konjugált másodlagos antitesttel való inkubáció, majd újabb mosás. Az immunreakciót Clarity ECL Western-Blot Substrate kittel (Bio-Rad) tettük láthatóvá a Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System segítségével.

## **EREDMÉNYEK**

### ***Az emlőkarcinóma és a melanómasejtek adhéziójának és transzmigrációjának összehasonlítása***

Az első lépés az agyi metasztázis képzés folyamatában a tumorsejtek kitapadása az agyi endotélsejtekhez. Az emlőkarcinóma és a melanómasejtek adhézióját és transzmigrációját statikus és dinamikus rendszerekben is összehasonlítottuk. Mindkét modellben azt tapasztaltuk, hogy a melanómasejtek nagyobb arányban voltak képesek kitapadni az agyi endotélsejtek rétegéhez, mint az emlőkarcinóma sejtek. Ezzel párhuzamosan a melanómasejtek nagyobb számban és rövidebb idő alatt jutottak át a kitapadást követően, mint az emlőkarcinóma sejtek. A különbség szignifikáns volt a két tumorsejt típus között, statikusan és áramlás alatt is. Az hogy a melanómasejtek nagyobb hatékonysággal jutottak át, részben magyarázhatja azt, hogy nagyobb az affinitásuk a központi idegrendszerhez.

### ***A tumorsejtek hatása az interendoteliális junkciókra***

Immunfestéssel megvizsgáltuk, hogyan befolyásolják a tumorsejtek az agyi endotélium barrier tulajdonságait. Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a melanómasejtek jobban károsították a paracelluláris barriert, mint az emlőkarcinóma sejtek. A melanómasejtek hatására a claudin-5 festés részlegesen eltűnt az agyi endotélsejtek membránjából. Eredményeink azt sugallják, hogy az emlőkarcinóma sejtek kevésbé képesek átjutni a paracelluláris útvonalon, mint a



melanómasejtek. Irodalmi adatok és saját eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy az emlőkarcinóma sejtek részben a transzcelluláris átvándorlási útvonalat használhatják.

### ***A Rac és a PI3K gátlók hatása a tumorsejtek kitapadására és transzmigrációjára az agyi endotélsejtek rétegén***

Kutatásaink során korábban kimutattuk, hogy a melanómasejtekben a ROCK gátlás mezenchimális mozgástípust vált ki, és jelentősen megnöveli az endotélhez kitapadt, valamint az átvándorolt sejtek számát. Célunk volt megérteni, hogy melyik mozgástípusnak (az amőboidnak vagy a mezenchimálisnak) van elsődleges fontossága az emlőkarcinóma sejtek vér-agy gáton való átvándorlásában. Kísérleteink során megfigyeltük, hogy míg a ROCK (Y27632) gátlószer nem befolyásolta az emlőkarcinóma sejtek kitapadását és átjutását, addig a Rac inhibítor (EHT1864) – amely az amőboid fenotípust indukálja – gátolta az emlőkarcinóma adhézióját és transzmigrációját. A Rac inhibítor képes volt a melanómasejtek kitapadását és átjutását is csökkenteni. Eredményeink szerint a PI3K gátlószer (LY294002) is szignifikánsan csökkentette az emlőkarcinóma és a melanómasejtek adhézióját és transzmigrációját. A melanómasejtek esetén a korai átjutású sejtek száma csökkent jelentősen a gátlók hatására. Kísérleteinket mind statikus, mind pedig dinamikus körülmények között is elvégeztük, és azonos eredményeket kaptunk. Mind a Rac, mind pedig a PI3K inhibítor hatására morfológiai változást is megfigyeltünk a tumorsejteken: csökkent a kinyúlt, lapos sejtek száma, és nőtt az amőboid fenotípusú emlőkarcinóma és melanómasejtek száma. A P-Rex1 aktiválása révén a PI3K képes a Rac útvonal szabályozására emlőkarcinóma sejtekben, így nem meglepő, hogy úgy a Rac, mint a PI3K gátlók az amőboid fenotípust indukálták, és csökkentették az agyi endotél rétegen átjutó tumorsejtek számát.

EZ4U esszé segítségével azt is kimutattuk, hogy a Rac és PI3K gátlókra nincs toxikus hatása a tumorsejtekre, illetve az endotélsejtekre (D3) sem. Ezzel kizártuk, hogy az inhibítorok esetleges toxikus hatása okozta volna a tumorsejtek csökkent adhézióját és transzmigrációját a kontroll körülményekhez képest. A vándorlási teszt eredménye szerint a Rac és PI3K inhibítoroknak nem volt hatása a tumorsejtek migrációs képességére sem.

### ***A Rac és PI3K gátlók hatása az agyi endotélium junkcionális integritására***

Kísérleteink során megfigyeltük, hogy az EHT1864 Rac gátlószer tartós csökkenést indukált a D3 sejtek impedanciájában. Az LY294002 PI3K gátlószer azonban nem váltott ki hasonló hatást. Mivel azt valószínűsítettük, hogy a junkciók károsodása miatt csökkent az impedancia a Rac inhibitor hatására, ezért megvizsgáltuk a claudin-5 junkcionális fehérje változását western-blottal. Az EHT1864 hatására szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a claudin-5 fehérje mennyiségében, míg az LY294002 nem változtatott ezen fehérje mennyiségén az endotélsejtekben. Ez igazolta feltételezésünket, hogy az EHT1864 okozta impedancia csökkenést a szoros kapcsolatok felbomlása okozta. Ennek alapján az EHT1864 Rac gátlószer ronthatja a vér-agy gát barrier tulajdonságait.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Az agyi metasztázisok kialakulásáért legnagyobb százalékban a tüdő-, és emlőkarcinóma, illetve a melanóma felelős. A központi idegrendszeri áttéteknek igen korlátozottak a terápiás lehetőségei, és kialakulásuk mechanizmusai is kevésbé ismertek. Az agyszövetbe való bejutáshoz az áttétképző tumorsejteknek át kell jutniuk az agyi kapillárisok falát felépítő endotélsejteken, amelyek a vér-agy gát legfontosabb alkotóelemei. Keveset tudunk azonban a tumorsejtek és az agyi endotélsejtek közötti kölcsönhatásokról.

Annak érdekében, hogy megértsük az emlőkarcinóma és a melanómasejtek metasztázis képzésének mechanizmusait, egy statikus és egy dinamikus in vitro modellt alkalmaztunk a tumorsejtek és endotélsejtek közötti interakciók vizsgálatához.

Munkánk során megfigyeltük, hogy a melanómasejtek nagyobb arányban képesek kitapadni és átjutni az endotélsejtek rétegén, mint az emlőkarcinóma sejtek. Továbbá a melanómasejtek hajlamosak gyorsabban befejezni a transzmigráció folyamatát, mint az invazív emlőkarcinóma sejtek.

Ugyanakkor a melanómasejtek jóval hatékonyabbnak bizonyultak az endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok felbontásban, mint az emlőkarcinóma sejtek.

A szignalizációs útvonalak vizsgálata során feltártuk, hogy a Rac fehérje gátlása csökkenti az emlőkarcinóma és melanómasejtek adhézióját és transzmigrációját is, míg a ROCK gátlása nem befolyásolta az emlőkarcinóma sejtek kölcsönhatását az endotélsejtekkel. A PI3K inhibitor gátolta mindkét tumorsejttípus kitapadását és átjutását az endotélsejtek rétegén.

Figyelembe véve, hogy a Rac illetve PI3K inhibitorok potenciális terápiás szerek, ezért megvizsgáltuk a cerebrális endotélsejtek barrier integritására tett hatásukat. Kimutattuk, hogy az EHT1864 Rac gátlószer jelentősen csökkenti az endotélsejt réteg impedanciáját és a claudin-5 junkcionális fehérje mennyiségét, míg az LY294002 PI3K gátlószer nem befolyásolja a vér-agy gát integritását. Mindezek alapján a PI3K útvonal egy potenciális terápiás célpont, az agyi metasztázisok kialakulásának megakadályozására emlőkarcinómás és melanómás betegeknél.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban témavezetőimnek, Dr. Krizbai Istvánnak és Dr. Wilhelm Imolának szeretném megköszönni az útmutatást és a szakmai segítséget, melyet munkám során tőlük kaptam.

Hálás köszönet illeti munkatársaimat Dr. Fazakas Csillát, Dr. Nagyősz Péttert, Dr. Farkas Attilát, Haskó Jánost és Nyúl-Tóth Ádámot a kiváló csapatmunkáért, hasznos beszélgetéseinkért és a vidám percekért.

Köszönetemet fejezem ki a Molekuláris Neurobiológiai Egység és a Biofizikai Intézet minden tagjának.

Hálás köszönetemet fejezem ki az összes társszerzőnek, aki lelkes munkájával segítette a kísérleteket és a kéziratok elkészülését, különösen Dr. Sipos Orsolyának, Dr. Nagy Krisztinának, Dr. Galajda Péternek, Dr. Végh Gergőnek és Dr. Váró Györgynek.

Köszönöm barátaimnak és családomnak a bátorítást és támogatást, különösen édesanyámnak és Gábornak köszönöm a szeretetet, türelmet és támogatást.

## PUBLIKÁCIÓK

### *Az értekezés alapjául szolgáló publikációk*

I. **Molnar, J.**, Fazakas, C., Hasko, J., Sipos, O., Nagy, K., Nyul-Toth, A., Farkas, A. E., Vegh, A. G., Varo, G., Galajda, P., Krizbai, I. A., Wilhelm, I. (2015). Transmigration characteristics of breast cancer and melanoma cells through the brain endothelium: role of Rac and PI3K. *Cell Adhesion and Migration* [E-pub ahead of print] (IF2014: 4.505)

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 and Melanoma Research* 27 (1):113-23. (IF2014: 4.619)

III. 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. *International Journal of Molecular Sciences* 14 (1):1383-411. (IF2013: 2.339)

### *Egyéb közlemények*

1. Fazakas, C., Wilhelm, I., Nagyoszi, P., Farkas, A. E., Hasko, J., **Molnar, J.**, Bauer, H. C., Ayaydin, F., Dung, N. T. K., Siklós, L., 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 (6):e20758. (IF2011: 4.092)

2. Sziraki, I., Erdo, F., Trampus, P., Sike, M., Molnar, P. M., Rajnai, Z., **Molnar, J.**, Wilhelm, I., Fazakas, C., Kis, E., Krizbai, I. A., Krajcsi, P. (2012). The use of microdialysis techniques in mice to study P-gp function at the blood-brain barrier. *Journal of Biomolecular Screening* 18 (4):430-40. (IF2012: 1.144)

3. Mallareddy, J. R., Toth, G., Fazakas, C., **Molnar, J.**, Nagyoszi, P., Lipkowski, A. W., Krizbai, I. A., Wilhelm, I. (2012). Transport characteristics of endomorphin-2 analogues in brain capillary endothelial cells. *Chemical Biology and Drug Design* 79 (4):507-13. (IF2012: 2.469)

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

melanoma and cerebral endothelial cells. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 41 (2):139-45. (IF2012: 2.274)

5. Hasko, J., Fazakas, C., **Molnar, J.**, Nyul-Toth, A., Herman, H., Hermenean, A., Wilhelm, I., Persidsky, Y., Krizbai, I. A. (2014). CB2 Receptor activation inhibits melanoma cell transmigration through the blood-brain barrier. *International Journal of Molecular Sciences* 15 (5):8063-74. (IF2014: 2.862)

6. Hajdu, Z., Hasko, J., Krizbai, I. A., Wilhelm, I., Jedlinszki, N., Fazakas, C., **Molnar, J.**, Forgo, P., Hohmann, J., Csupor, D. (2014). Evaluation of lignans from *heliopsis helianthoides* var. *scabra* for their potential antimetastatic effects in the brain. *Journal of Natural Products* 77 (12):2641-50. (IF2014: 3.798)

7. Krizbai, I. A., Gasparics, A., Nagyoszi, P., Fazakas, C., **Molnar, J.**, Wilhelm, I., Bencs, R., Rosivall, L., Sebe, A. (2015). Endothelial-mesenchymal transition of brain endothelial cells: possible role during metastatic extravasation. *Plos One* 10 (3):e0123845. (IF2014: 3.234)

8. Nagyoszi, P., Nyul-Toth, A., Fazakas, C., Wilhelm, I., Kozma, M., **Molnar, J.**, Hasko, J., Krizbai, I. A. (2015). Regulation of NOD-like receptors and inflammasome activation in cerebral endothelial cells. *Journal of Neurochemistry* 135 (3):551-64. (IF2014: 4.281)

## TÁRSSZERZŐI NYILATKOZAT

Alulírott Dr. Krizbai István hozzájárulok, hogy Molnár Judit felhasználja a:

*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 and Melanoma Research 27 (1):113-2,*

*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. International Journal of Molecular Sciences 14 (1):1383-41*

közleményeinkben foglalt eredmények egy részét a Szegedi Tudományegyetem Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola keretében a Ph.D. fokozat eléréseért benyújtott dolgozatában. Kijelentem, hogy ezeket az eredményeket nem használtuk fel tudományos fokozat megszerzésekor, s ezt a jövőben sem tesszük. A jelölt által felhasználható kísérletes munka a következő: a melanómasejtek agyi endotélsejtekhez való kitapadása csökken Rac inhibitor (EHT1864) jelenlétében, és a Rac inhibitor képes a ROCK gátlószeres kitapadás növelő hatását kivédeni.

Szeged, 2016. 03. 01.

Dr. Krizbai István  
tud. tanácsadó  
MTA SZBK Biofizikai Intézet