

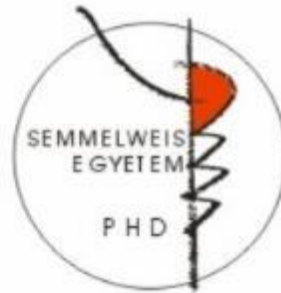
BRAF szerepe az endotél sejtek mechanikájában

Doktori értekezés

Hollósi Anna

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Matkovicsné Dr. Varga Andrea, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Alexa Anita, Ph.D., tudományos munkatárs
Dr. Sipéki Szabolcs, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Losonczy György, DSc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Kulka Janina, DSc., egyetemi tanár

Dr. Géczi Lajos, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest
2023

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	7
1.1.	Az endotél sejtek heterogenitása, az endotél permeabilitással való kapcsolata ..	7
1.2.	Az endotél sejt kapcsoló struktúrák	8
1.3.	Az endotél sejt-sejt kapcsolatok szabályozásában részt vevő adhéziós molekulák	9
1.4.	A kis GTPázok szerepe az endotél sejt-sejt adhézióban.....	11
1.5.	Az endotélium szerepe fiziológiás és patológias folyamatokban	12
1.5.1.	Az endotélium szerepe a gyulladós folyamatokban.....	13
1.5.2.	Az endotél sejtek szerepe a leukocita transzmigrációban	14
1.5.3.	Az endotél sejtréteg permeabilitása és a leukocita transzmigráció folyamata	17
1.5.4.	Az endotél sejtek szerepe a metasztázisban	18
1.6.	Az endotél sejtréteget érő külső erők.....	21
1.6.1.	Az endotél sejt-sejt kapcsolatok szabályozása mechanikai erők hatására ...	22
1.6.2.	VE-cadherin alapú sejt-sejt kapcsolatok hatása az aktin citoskeleton átrendeződésére	23
1.6.3.	VE-cadherin-függő mechanotranszdukció: az α -catenin konformációjának változása	25
1.6.4.	Mechanikai erő hatása - az aktin citoskeleton Rho fehérjék általi szabályozása	26
1.7.	Az aktin citoskeleton szabályozó jelátviteli útvonalak	29
1.7.1.	Rho fehérje szerepe az aktin citoskeleton szabályozásában.....	29
1.7.2.	ROCK fehérje szerepe az aktin citoskeleton szabályozásában	30
1.7.3.	RAF1 szerepe az aktin citoskeleton szabályozásában.....	32
1.7.4.	BRAF fehérje szerepe az aktin citoskeleton szabályozásában	35
2.	Célkitűzések	38
3.	Anyagok és módszerek.....	39
3.1.	A kísérletek során használt primer sejtek és sejt vonalak.....	39
3.2.	Sejtek tenyésztési körülményei, sejtek preparálása és tenyésztése.....	39
3.2.1.	A HUVEC sejtek tenyésztési körülményei	39
3.2.2.	HUVEC sejtek preparálása.....	40
3.2.3.	HUVEC sejtek tenyésztése.....	40
3.2.4.	HEK293T sejt vonal tenyésztési körülményei	41
3.2.5.	A375 melanóma sejt vonal tenyésztési körülményei	41

3.3.	Géncsendesítés siRNS és shRNS technika segítségével.....	41
3.3.1.	siRNS transzfekció HUVEC sejtekben	41
3.3.2.	shRNS transzdukció HUVEC sejteken	42
3.3.3.	HUVEC sejtek transzdukciója Lifeact-mCherry plazmival.....	43
3.4.	Az endotél sejtek kezelése trombinnal és inhibitorokkal.....	44
3.4.1.	Az endotél sejtek kezelése trombinnal	44
3.4.2.	Az endotél sejtek kezelése inhibitorokkal (Y27632, U0126)	44
3.5.	Transzmigrációs esszé	44
3.6.	Western blot analízis.....	45
3.7.	Az endotél sejtek immunofluoreszcenciás jelölése	48
3.8.	Permeabilitás mérés	49
3.9.	Az endotél sejtek megnyújtása a cytotstretcher eszköz segítségével.....	49
3.10.	Élő és fixált sejteken készült konfokális felvételek	50
3.11.	Kinepict szoftver	51
3.12.	AFM/Epifluoreszcens mikroszkóp.....	52
3.13.	Fluoreszcencia intenzitás kvantifikálása	52
3.14.	A sejt-sejt kapcsolatok hosszának és a rések méretének kvantifikálása	53
4.	Eredmények.....	54
4.1.	BRAF szabályozza az endotél sejt-sejt kapcsolatok erősségét.....	54
4.1.1.	BRAF fehérje szabályozza az endotél sejtréteg permeabilitását és a melanoma sejtek transzmigrációját.....	54
4.1.2.	BRAF hatása az ERK, az MLC és a cofilin foszforilációjára trombin stimuláció hatására	56
4.1.3.	BRAF hatása az aktin lokalizációjára	58
4.1.4.	BRAF hatása a pMLC lokalizációjára	59
4.1.5.	ROCK hatása a pMLC lokalizációjára.....	61
4.1.6.	MEK/ERK jelátviteli útvonal szerepe az aktin citoskeleton szabályozásában	63
4.1.7.	BRAF hatása a cofilin lokalizációjára.....	65
4.1.8.	ROCK gátlásának hatása a cofilin perifériás lokalizációjára BRAF-csendesített sejtekben	67
4.1.9.	MEK/ERK jelátviteli útvonal gátlásának hatása cofilin perifériás lokalizációjára	69
4.1.10.	BRAF hatása az endotél sejtek mechanikai tulajdonságaira	71

4.2.	A sejt-sejt kapcsolatok mechanikai perturbációja az endotél sejtréteg nyújtásával - citoszkeletális változások BRAF általi szabályozása	75
4.2.1.	BRAF hatása az MLC és a cofilin foszforilációjának kinetikájára nyújtás hatására.....	76
4.2.2.	ROCK izoformák szerepe a mechanikai nyújtás során.....	78
4.2.3.	Mechanikai erő hatására történő F-aktin átrendeződés élő sejteken	80
4.2.4.	A foszforilált MLC lokalizációjának változása mechanikai erő hatására	83
4.2.5.	A foszforilált cofilin lokalizációjának változása mechanikai erő hatására ..	86
4.2.6.	Az endotél sejt-sejt kapcsolatoknál képződő intercelluláris rések	87
4.3.	Következtetések	88
5.	Az eredmények megvitatása.....	90
5.1.	BRAF szerepe az endotél permeabilitás szabályozásában és az endotél sejtek mechanikai tulajdonságainak meghatározásában	90
5.1.1.	BRAF szerepe az aktin citoszkeleton átrendeződésében, hatása az endotél sejt-sejt kapcsolatokra	90
5.1.2.	BRAF szerepe az aktin citoszkeleton szabályozó fehérjék lokalizációjában és foszforilációjában	90
5.1.3.	BRAF szerepe az endotél sejtek mechanikai tulajdonságainak meghatározásában	91
5.2.	BRAF szerepe az endotél sejtek mechanikai perturbációjára adott sejtválasz szabályozásában.....	94
5.2.1.	A BRAF fehérje szerepe az aktin citoszkeleton átrendeződésére a sejtek megnyújtása során	94
5.2.2.	A BRAF szerepe a sejtek közötti rések képződésében mechanikai perturbáció hatására, az aktin citoszkeleton szabályozása	95
6.	Összefoglalás.....	97
7.	Summary	98
8.	Saját publikációs jegyzék	99
8.1.	Az értekezésen alapuló közlemények	99
8.2.	Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények	99
9.	Irodalomjegyzék.....	100
10.	Köszönetnyilvánítás	116

Rövidítések jegyzéke

ADF	aktin depolimerizáló faktor (actin depolymerization factor)
AFM	atomerő-mikroszkóp (atomic force microscopy)
bFGF	bázikus fibroblaszt növekedési faktor (basic fibroblast growth factor)
CAB	kortikális aktin köteg (circumferential actin bundles)
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát (cyclic adenosine monophosphate)
Cdc42	kis GTPáz, a Rho család tagja, sejtosztódási ciklus 42 (cell division cycle 42)
CRD	ciszteinben gazdag domén (cysteine-rich domain)
DMSO	dimetil-szulfoxid (dimethyl sulfoxide)
E-cadherin	epiteliális cadherin (epithelial-cadherin)
ECM	extracelluláris mátrix (extracellular matrix)
EGF	epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
FAK	fokális adhézión kináz (focal adhesion kinase)
F-aktin	filamentális aktin (filamentous actin)
FBS	fötális szarvasmarha szérum (fetal bovine serum)
FI	fluoreszcencia intenzitás (fluorescence intensity)
GAP	GTPáz aktiváló fehérje (GTPase-activating protein)
GDI	guanin nukleotid disszociációs inhibitor (guanine nucleotide dissociation inhibitor)
GDP	guanozin-difoszfát (guanosine diphosphate)
GEF	guanin-nukleotid kicserélő faktor (guanine nucleotide exchange factor)
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)
GPCR	G-fehérje kapcsolt receptor (G protein-coupled receptor)
GTP	guanozin trifoszfát (guanosine triphosphate)
HBSS	Hank féle só tartalmazó puffer (Hanks' balanced salt solution)
HUVEC	humán köldökzsínór véna endotél sejt (human umbilical vein endothelial cell)
ICAM	intercelluláris adhézión molekula (intercellular adhesion molecule)
IF	immunofluoreszcencia (immunofluorescence)
IL-1 β	interleukin 1 béta (interleukin-1 beta)
JAM	junkcionális adhézión molekula (junctional adhesion molecule)

LARG	leukémia-asszociált RhoGEF (leukemia-associated RhoGEF)
MAPK	mitogén aktivált fehérje kináz (mitogen-activated protein kinase)
MCP-1	monocita kemoattraktáns protein-1 (monocyte chemoattractant protein-1)
MIP-1 alfa	makrofág gyulladáscsökkentő fehérje 1 alfa (macrophage inflammatory proteins)
MLC	miozin könnyű lánc (myosin light chain)
MLCK	miozin könnyű lánc kináz (myosin light chain kinase)
NaCl	nátrium-klorid (sodium chloride)
NaPPi	nátrium pirofoszfát (tetrasodium pyrophosphate)
N-cadherin	neurális cadherin (neural cadherin)
NF- κ B	nukleáris faktor κ B (nuclear factor κ B)
P-cadherin	placenta-eredetű cadherin (placental cadherin)
p-cofilin	foszforilált cofilin (phosphorylated cofilin)
PECAM-1	vérlemezke endotél sejt adhéziós molekula (platelet endothelial cell adhesion molecule 1)
PEI	polietilén-imin (Polyethylenimine)
pERK	foszforilált ERK (phosphorylated ERK)
PI3K	foszfatidilinozitol 3-kináz (phosphoinositide 3-kinases)
pMLC	foszforilált MLC (phosphorylated MLC)
PVDF	polivinilidén-difluorid membrán (polyvinylidene fluoride)
Rac	Rho GTPáz család fehérje (Ras-related C3 botulinum toxin substrate)
Rac1	Rho GTPáz család fehérje 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)
RAF	onkogén, amelyet a fibroszarkómában azonosítottak (rapidly accelerated fibrosarcoma)
Rap1	Ras GTPáz család fehérje (Ras-related protein 1)
Ras	kis G-fehérje, patkány szarkóma vírus (rat sarcoma virus)
Rho	Ras homológ G-fehérje (Ras homologous G protein)
RhoA	Ras homológ G-fehérje A (Ras homologous G protein A)
ROCK	Rho kináz (Rho kinase)
RSF	radiális stressz-szálak (radial stress fibers)
RT	szobahőmérséklet (room temperature)
TBS	sót tartalmazó trisz puffer (tris-buffered saline)
TBS-T	1% Tween-20 TBS oldatban (1% Tween-20 in TBS)

TEM	transzendenteliális migráció (transendothelial migration)
TGF β	transzformáló növekedési faktor béta (transforming growth factor beta)
TNF	tumor nekrozis faktor (tumor necrosis factor)
TRP	tranzients receptor potenciál (transient receptor potential)
VCAM	vaszkuláris sejt adhéziós fehérje (vascular cell adhesion protein)
VE-cadherin	vaszkuláris endoteliális cadherin (vascular endothelial cadherin)
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
VEGFR2	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2)
WB	western blot
ZO	zonula occludens, tight junction fehérje

1. Bevezetés

Az utóbbi években egyre több kutatás irányul az endotél sejt-sejt kapcsolatok szabályozásának megértésére, mivel számos sejtelettani folyamatot befolyásol. Korábbi kutatási eredmények rávilágítottak arra, hogy a RAF fehérjecsalád tagjai a sejtproliferáción kívül az aktin citoskeleton átrendeződését is szabályozzák, így befolyásolva az endotél sejtréteg permeabilitását (1). Az endotél sejtréteg folyamatosan ki van téve különböző biokémiai és mechanikai ingereknek, amelyekre a sejtek jelátviteli folyamataik aktiválásával vagy gátlásával reagálnak. Például a tumorsejtek permeabilitást növelő ágenseket képesek termelni annak érdekében, hogy az endotél réteg fellazulásával könnyebben át tudjanak jutni azon és mechanikai erőt fejtenek ki az endotél sejtrétegre az érfalból történő kilépéskor, az extravazáció folyamatában (2-4).

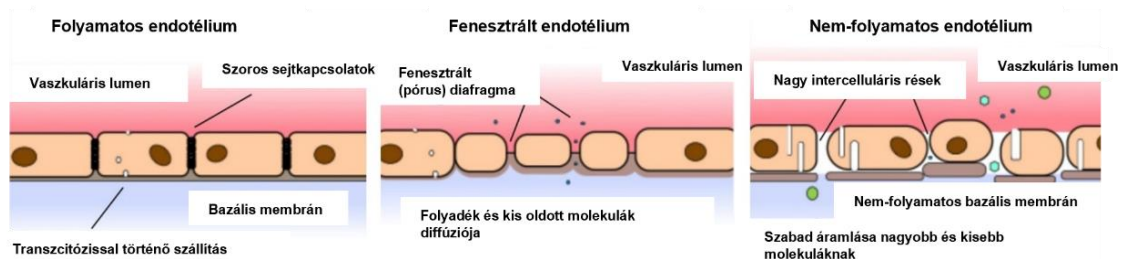
PhD munkám során a BRAF szerepét vizsgáltam az endotél sejt-sejt kapcsolatok szabályozásában, az aktin citoskeleton átrendeződésének és szabályozó folyamatainak tanulmányozásával.

1.1. Az endotél sejtek heterogenitása, az endotél permeabilitással való kapcsolata

Az erek belső falát alkotó endotél sejtekre jellemző, hogy erősen lapult laphámszerű sejtek, csupán a sejtmagok domborodnak be az ér lumenébe. Az endotél sejtek befolyásolják az érfal tónusát, biztosítják a vérben oldott tápanyagok felvételét a szövetek számára, antikoaguláns felszín képeznek és számos vasoaktív hormont aktiválnak, illetve inaktiválnak (5).

Az endotél sejteket nagymértékű heterogenitás jellemzi morfológiájuk, egymáshoz való illeszkedésük alapján, amely nemcsak a makrokörnyezetükre (pl. artériák, vénák), hanem a mikrokörnyezetükre (pl. vese kapilláris ereinek sejtjei) is igaz (6-8). A szervezetben található endotélium többnyire összefüggő réteget alkot, azonban a sejtek közötti kapcsolat erőssége nagyon eltérő lehet (1. ábra). Például az agyban található endotéliumra a szoros sejtkapcsolatok jellemzők, ún. „folyamatos endotélium”, ahol csak a víz és kis oldott molekulák képesek a sejtek közötti réseken átjutni, a nagyobb molekulák transzporterek segítségével jutnak el a vérből az agy sejtjeihez. Az agyban található endotéliumnál valamelyest áteresztőbb endotélium található például a tüdőben, a bőrben és a szívben. Ennél áteresztőbb (ún. fenestrált) endotélium jellemző az endokrin mirigyekre, a gasztrointesztinális mukózára, és a vese glomerulusokra. A folyadék és a

kis molekulák diffúzióval is ki tudnak jutni az érből a környező szövetekbe. A májban és a csontvelőben pedig ún. „nem folyamatos” endotéliumot találunk, amely szabad áramlást enged a molekulák méretétől függően az érfal egyik oldaláról a másikra. A bazális membrán nem folyamatos, ami elősegíti, hogy akár sejtek is akadálytalanul kilépjenek az erekből. A szervezetünk nagyobb részében (például a bőr-, szív-, tüdő-, és az agy artériáiban, vénáiban és kapillárisaiban) az endotél réteg permeabilitása szigorúan szabályozott, amelyben fontos szerepet játszanak a sejteket összekapcsoló adhéziós molekulák a sejtek közötti kapcsolatok erősségének szabályozása révén (6).



1. ábra. Az endotél sejtek heterogenitása. Különböző típusú endotél sejtrétegek csoportosítása permeabilitásuk mértéke szerint Hennings és mtsai alapján (6).

1.2. Az endotél sejtkapcsoló struktúrák

A sejtkapcsoló struktúrák feladatai közé tartozik a sejtréteg fizikai összetartása, a sejtek közötti kommunikáció fenntartása, valamint a környezetükhöz való rögzítése (9). Az endotél sejtkapcsolatokban szerepet játszó molekulákat csoportosíthatjuk az alapján, hogy két szomszédos endotél sejt közötti kapcsolat összetartásában, vagy az endotél sejt és az extracelluláris mátrix (ECM) közötti kapcsolat kialakításában vesznek részt. Az előbbi kapcsolatokra jellemző, hogy stabil összeköttetést biztosít két sejt között, mégis szabályozott módon fel tud lazulni. Az endotél sejtek adhéziós molekulái más típusú sejtekhez is kapcsolódhatnak (pl. leukociták), amely esetekben kevésbé szoros kapcsolat alakulhat ki, például az immunrendszer működésében (érfalon való gördülés, pl. szelektinek) és az embrionális fejlődésben (sejtek migrációja, illetve a neuruláció során) (10, 11). A sejtadhéziós molekulák csoportosíthatók aszerint is, hogy két endotél sejt között milyen szoros sejtkapcsolat alakul ki. Ez alapján megkülönböztethetünk adhéziós kapcsolatokat (adherens junction, zonula adherens), szoros sejtkapcsolatokat („tight junction”, zonula occludens), és kommunikációs (rés) kapcsolatokat (gap junction) (9, 12).

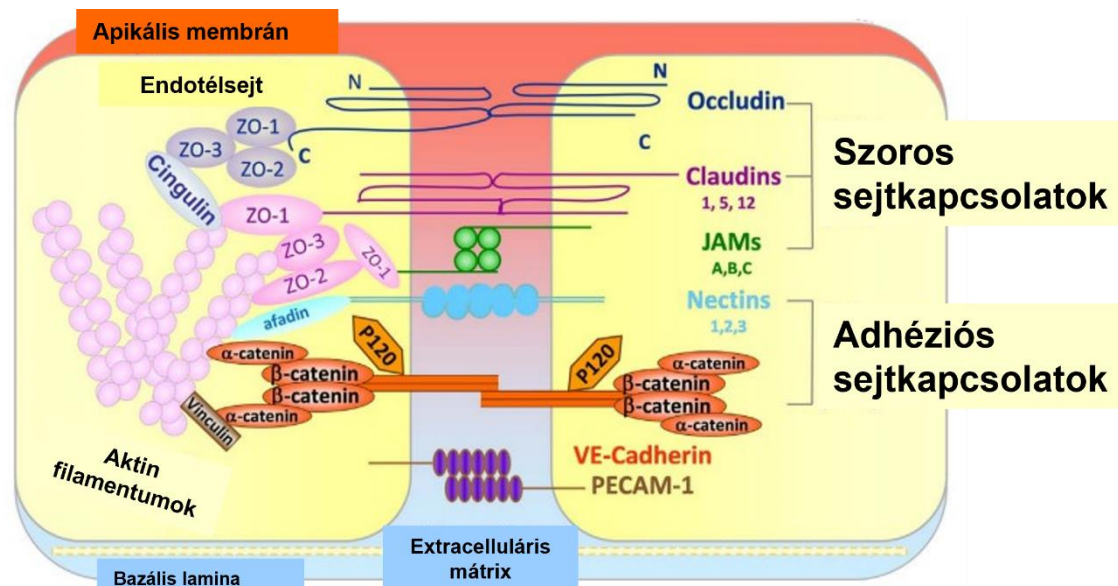
1.3. Az endotél sejt-sejt kapcsolatok szabályozásában részt vevő adhéziós molekulák

A sejt-sejt adhézióknak fontos szerepe van az egészséges szövetek kialakulásában és fenntartásában. A sejtkapcsolatokban jelen lévő adhéziós molekulák a sejtmembránt egyszeresen vagy többszörösen átérő transzmembrán glikoproteinek. Az extracelluláris résznél vagy azonos típusú molekulákhoz kötődnek, azaz homofil tulajdonságúak vagy más típusú molekulákhoz kötődnek, azaz heterofil kapcsolatot létesítenek (9). A sejt-sejt kapcsolatok szabályozásában az adhéziós molekula intracelluláris része a sejtmembrán belső felszínéhez közel elhelyezkedő citoszkeletonhoz tud kapcsolódni intracelluláris molekulák közreműködésével, így az aktin citoszkeleton a sejten kívülről érkező mechanikai vagy biokémiai jel hatására képes átrendeződni. A sejtadhéziós molekulák strukturális felépítésük alapján lehetnek: integrinek, cadherineknél, szelektinek és immunglobulin doménnel rendelkező adhéziós molekulák (9).

A főbb sejt felszíni molekulákat csoportosíthatjuk Ca^{2+} -függő és Ca^{2+} -független adhéziós molekulaként. A Ca^{2+} -függő adhéziós molekulák csoportjába tartoznak például a cadherineknél és a szelektinek. A Ca^{2+} -független adhéziós molekulák csoportjába az integrinek és az immunglobulin-szerű adhéziós molekula szupercsalád (celluláris adhéziós molekulák, CAM család, tagjai: pl. intercelluláris adhéziós molekula, ICAM; vérlemezke endotél sejt adhéziós molekula, PECAM; junkcionális adhéziós molekulák, JAM-ok), amelyek a sejt-sejt (nemcsak endotél-endotél, hanem leukocita-endotél vagy rákos sejt-endotél) kapcsolatokban játszanak szerepet (12, 13).

Az endotél sejt-sejt kapcsolatokban a cadherin fehérjék kiemelkedő szerepet játszanak az adhéziós kapcsolatok (adherens junction) kialakításában. Több izoformájuk is ismert attól függően, hogy milyen szövetben találhatóak. Például az E-cadherin (epiteliális cadherin), az epitéliumban található, az N-cadherin (neurális cadherin) az idegsejtben, izomszövetekben, a szemlencsében, valamint a harántcsíkolt izomszövetben, P-cadherin (placenta-eredetű cadherin) a placentában (14). A VE-cadherin (vaszkuláris endoteliális cadherin) kizárólag az endotél sejtekben expresszálódik, de jelen van itt az N-cadherin és a P-cadherin is (15). A cadherineknél Ca^{2+} -kötő doménnel rendelkező fehérjék, amelyek homofil kötést alakítanak ki a szomszédos sejtek cadherin molekuláinak extracelluláris régióival és az intracelluláris részüknel cateninek horgonyozzák ki őket az aktin citoszkeletonhoz és ezen a jelátviteli útvonalon történik a

sejt-sejt kapcsolatok szabályozása (14). A VE-cadherin a PECAM-1 molekulával biztosítja az endotél sejtek közötti kapcsolat integritását, bár ez utóbbi nem az adherens kapcsolat (adherens junction) fehérjéi közé tartozik (2. ábra) (16).



2. ábra. Az endotél sejt-sejt kapcsolatokban található főbb transzmembránfehérjék. Három különböző claudin, JAM és nectin gén fejeződik ki az endotél sejtekben. Az intracelluláris fehérjék a transzmembrán fehérjéket az aktin citoszkeletonhoz kötik (9).

Az endotél sejtadhézióban a szoros sejt-kapcsolatok (tight junction) speciális struktúrát alkotnak, a sejt apikális felszínén találhatóak. Legfőbb szerepük az agyi endotéliumban van, ahol a legszorosabbak a sejt-sejt kapcsolatok. A szoros sejt-kapcsolatokat alkotó transzmembrán fehérjék (occludin és claudin) homofil módon kapcsolódnak egymáshoz. Ezek a transzmembrán fehérjék a sejt körül övszerűen helyezkednek el, amelyek intracelluláris része a zonula-occludens fehérjékhez (ZO-1, ZO-2, ZO-3) kötődik. A ZO fehérjék az occludin és claudin fehérjéket a sejt vázhoz (aktin, spektrin) horgonyozzák ki (11, 12). Az adherens molekulák között létrejövő szoros sejt-kapcsolatok funkcióit tekintve sokrétűek: fenntartják a sejtek mechanikai kapcsolatát, valamint diffúziós határteget képeznek és így szabályozzák az ionok és a poláris oldott anyagok diffúzióját, gátolják a nagy makromolekulák átjutását a sejtrétegen, megakadályozzák a vízdékony anyagok bejutását és a membránkomponensek laterális diffúzióját (főként claudin típus transzmembrán fehérjékre jellemző), meghatározzák a sejtek polarizációját (az apikális és bazális membrán elválasztásával) (9, 17). A claudin fehérjéknek fontos szerepük van az endotél sejtréteg integritásának fenntartásában, különösen a claudin-5 kritikus szerepet játszik az endotél sejtek permeabilitás

szabályozásában *in vivo* és *in vitro* (18, 19). A JAM-1, JAM-2, JAM-3 fehérjéknek fontos szerepe van mind az endotél sejtréteg permeabilitás-szabályozásában, mind a leukociták transzendoteliális migrációjában (TEM) (20).

A réskapcsolatok (gap junction) a sejtek laterális felszínéhez közelebb helyezkednek el, egy hidrofil csatornát képezve, amely 1,5-2 nm átmérőjű és kb. 20 nm hosszú. Mindkét sejt felől egy-egy konnexon (félcsatorna) alkotja és egy konnexon mindig 6 konnexin fehérjéből épül fel. Több mint 20 konnexin ismert, azonban egy konnexonon belül csak azonos típusúak találhatók. Tulajdonságait tekintve maximum 1-1,6 kD molekulásúlyú anyag mehet át (pl. cukrok, aminosavak, ionok). Jellemzően pH-érzékeny (ha csökken a pH, akkor zár), Ca^{2+} -koncentrációra is érzékeny (ha megnő, akkor zár) (21).

1.4. A kis GTPázok szerepe az endotél sejt-sejt adhézióban

A kis GTPázok számos tagja hozzájárul az endotél sejt-sejt adhézió szabályozásához, ezáltal befolyásolva az endotél sejtréteg permeabilitását. A kis GTPázok családjába tartoznak a Ras GTPáz család fehérjéi (Rap1, Rap2) és számos Ras homológ G-fehérje családba tartozó GTPáz (Rho, Rac, Cdc42) (22). A legtöbb kis GTPáz inaktív, guanozin-difoszfáthoz (GDP-hez) kötött vagy aktív, guanozin trifoszfáthoz (GTP-hez) kötött konformációban található meg a sejtben. A guanin-nukleotid kicserélő faktorok (GEF-ek) katalizálják a GDP GTP-re való cseréjét, ezáltal aktiválják a fehérjéket, míg a GTPáz-aktiváló fehérjék (GAP), serkentve a GTP hidrolízist, inaktíválják a fehérjéket. A kis GTPázok és effektoraik közötti kölcsönhatás gyakran megköveteli a membránhoz való lokalizációjukat, szabályozva az endotél sejt-sejt adhéziót, és az endotélium permeabilitását (22).

A Rho fehérje az endotél sejt-sejt kapcsolatok szabályozásában az aktomiozin kontraktilitást növeli, ezáltal a radiális stressz-szálak (RSF) kialakulását eredményezi, amelyek a sejt-sejt adhézió gyengülését és az intercelluláris résképződést segítik elő. Ezzel ellentétben a plazmamembránnal párhuzamosan futó kortikális aktin köteg (CAB) jellemző a stabil sejtkapcsolatokra, amely kialakulásában és stabilizálásában a Rap1 kis G-fehérje fontos szerepet játszik. Az endotél sejtek barrier funkciójának szabályozása a sejteket összekapcsoló adhéziós molekulák aktin citoskeletonhoz való kapcsolódásának dinamikus szabályozásán keresztül valósul meg (23, 24). E dinamika szabályozásában a kis GTPázok (Rho, Rap) aktiváló fehérjéinek, a GEF-eknek jelentős szerepe van. A Rap1-

et például a cAMP aktiválja (a Rap GEF, Epac aktiválásán keresztül), amely egyidejűleg a PKA aktiválását is okozza, így a Rap1 és a PKA együttesen felelősek a megnövekedett endoteliális barrier funkcióért. A Rap1 aktiválása mindenekelőtt a Rho gátlását eredményezi és ezáltal az RSF csökkenését, valamint a Cdc42 aktiválását, amely az aktin mennyiségét növeli a sejt-kapcsolatokban. A CAB szerkezetének átrendeződését stimulálják permeabilitást növelő ágensek (pl. trombin) és ezek csökkentik a cAMP-szintet, elősegítve a CAB gyengülését (25). Így a permeabilitás indukciója a Rap1 és a Rho útvonalak finomhangolását igényli, mindkét fehérje befolyásolja az endotél sejt-sejt kapcsolatok dinamikájának szabályozását. Ezzel egyidejűleg a Rho aktivitás hatására alakul ki az RSF szerkezete és ezt a Rho GEF relokalizáció segíti elő. Valóban, a Rap1 által kiváltott megerősödött sejtadhéziót az aktin citoskeleton változásai kísérik: az RSF mennyisége csökken, míg a filamentális aktin (F-aktin) megnövekedett mennyisége kolokalizálódik a VE-cadherinrel (az ún. junkcionális aktin) (25).

1.5. Az endotélium szerepe fiziológias és patológias folyamatokban

Az endotél sejt-sejt kapcsolatok szabályozása kiemelkedő fontosságú az érrendszer működés szempontjából mind fiziológias, mind patológias körülmények között (5, 6). Az endotélium egyfajta gátként funkcionál a véráram és a szövetek között, miközben lehetővé teszi bizonyos molekulák korlátozott cseréjét. Ez a funkció létfontosságú az oxigén és a tápanyagok belső szervekbe történő eljuttatásában, valamint azoknak az anyagoknak a belső szervekből történő elszállításában, amire már nincs szükség (6). Az érfal sejtjei folyamatosan ki vannak téve a véráramlás okozta mechanikai hatásoknak (shear stress), a vér pulzáló hatásának (cyclic stretch) és különböző hormonok, biokémiai ágensek által kiváltott ingerekre is reagálnak. Így szerepet játszanak a véralvadási kaszkádban, gyulladásos folyamatokban, vérnyomás fenntartásában, vérnyomás változás által okozott körülményekre is képesek adaptálódni a simaizomtónus szabályozásával (relaxáció és kontrakció), angiogenezisben és tumor metasztázisban is szerepet játszanak (26, 27).

Az endotél sejteknek az új erek képződésében (neoangiogenezis) is kritikus fontosságú szerepe van az embrionális fejlődés során, valamint a szövetek helyreállításában és a sebgyógyulás folyamatában. Azonban a kontrollálatlan, túlzott angiogenezis hozzájárulhat gyulladásos betegségek kialakulásához, mint például reumatoid arthritisz (RA), pikkelysömör, atópiás dermatitisz és gyulladásos bélbetegségek

(IBD), valamint a daganatképződés. Ezzel szemben a szöveti fibrózis a krónikus gyulladás következményeként alakul ki, ami az érrendszer elvesztésével járhat (28).

1.5.1. Az endotélium szerepe a gyulladásos folyamatokban

A szervezetünk egyik fontos védekező mechanizmusa a gyulladás. Az endotél sejtek érzékenyen reagálnak gyulladásos citokinekre, ilyenek például az interleukin-1 β (IL-1 β) és a tumor nekrozis faktor alfa (TNF α) (29, 30). A gyulladásos folyamatokban az erek permeabilitása megnő, számos adhéziós molekula expressziója megemelkedik, így lehetővé teszik a leukociták fertőzés helyére történő vándorlását, amivel segítik az immunválasz kialakulását (17, 31, 32, 33).

Az immunrendszer nem megfelelő működésével összefüggő betegségekben jellemzően diszfunkcionált az endotélium vagy túlzott aktivációt mutat. Ezért fontos megvizsgálni, hogy az érrendszer passzív válaszadó vagy fontos effektor szerepet játszik-e a gyulladásos és fibrózisos betegségekben (30). A diszfunkcionális endotélium jellemzője, hogy a homeosztázisból a proinflammatorikus, azaz a gyulladásra jellemző folyamatok játszódnak le, csökken a vazodilatáció, valamint nő a sejtek proliferációja. A szervezet szöveti sérülésre adott normális válasza, amelyet leginkább a bőrön tanulmányoztak, az immunsejtek gyors beáramlásával, a hámsejtek proliferációjával és migrációjával, a fibroblasztok és az endotél sejtek populációjának növekedésével, a granulációs szövet kialakulásával, majd az extracelluláris mátrix lerakódásával, és a végső fázisban a mátrix átalakulásával és hegeképződéssel jár (34). Ebben a folyamatban a megfelelő javításhoz elengedhetetlen az új erek képződése, amely magában foglalja mind a meglévő erekből új kapillárisok kiindulását, mind a csontvelői endotél progenitor sejtek mobilizálását. A jól kontrollált sebgyógyulásban a gyulladás gyorsan megszűnik, és a szövetek helyreállításához hozzájáruló, de már nem szükséges sejtek apoptózison mennek keresztül. Számos kóros állapotot, például a gyulladásos és a fibrotikus betegségeket gyakran hasonlítják az örökös sebgyógyuláshoz, ahol az előbbit a nem gyógyuló korai gyulladásos fázis, az utóbbit pedig a túlzottan erős reparatív fázis jellemzi. Az olyan krónikus gyulladásos betegségek, mint az RA, a pikkelysömör, az IBD és számos más betegség, jellemzően túlzott angiogenezissel járnak együtt (35-37).

A gyulladásos körülmények során a makromolekulák és immunsejtek átjutása az endotél sejtrétegen történhet transzcellulárisan, amikor az endotél sejteken mennek keresztül vagy paracellulárisan, két endotél sejt között a sejt-sejt kapcsolatok

megbontásával (34, 38). A paracelluláris transzmigráció folyamata szigorúan szabályozott molekuláris mechanizmusok révén valósul meg, az érfalak stabilitásának, integritásának és barrier tulajdonságainak fenntartásával, illetve visszaállításával az immunsejtek átjutása után. Sérülésre vagy fertőzésre adott válaszként az endotél sejtréteg kontrollált megnyitása/lazítása kritikus szerepet játszik a hatékony gyulladással kapcsolatos válasz támogatásában. Az ilyen biológiai funkciókban betöltött alapvető szerepük miatt óriási érdeklődés övezi az endotél sejtréteget összekötő molekulák jelátviteli szabályozását mind fiziológiás, mind patológiai körülmények között (38, 39). Emellett egyre inkább tudatosul, és egyre több bizonyíték van arra, hogy gyulladással megváltozik az endotél sejtrétegen található molekulák sejtfelszíni expressziója, azonban ez még nem teljesen tisztázott az ehhez kapcsolódó mechanizmusok és biológiai vonatkozások szempontjából (39).

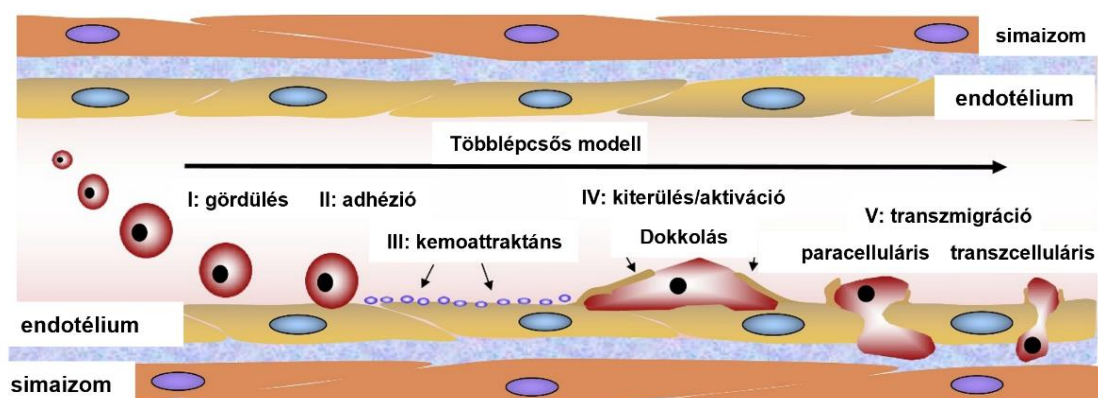
1.5.2. Az endotél sejtek szerepe a leukocita transzmigrációban

A hatékony immunválasz egyik elengedhetetlen feltétele, hogy a védekezésben szerepet játszó fehérvérsejtek a megfelelő helyen legyenek a megfelelő időben. Az immunsejtek differenciálódásának és aktivációjának egyik lépése a leukociták immunszervekbe és egyéb perifériás szövetekbe történő migrációjától függ, amely során a sejtek elhagyva az ér pályát a másodlagos nyirokszervekbe, vagy a gyulladás (sérülés) területén a szövetközi térbe kerülnek (31, 39, 40). A leukociták transzendoteliális migrációjuk során kilépnek a véráramból és belépnek a nyirokszervekbe és a fertőzött szövetekbe, ez létfontosságú élettani folyamat része mind az adaptív, mind a veleszületett immunválasznak (41).

A transzendoteliális migráció mechanizmusának a háttérben szigorúan szabályozott jelátviteli útvonalak húzódnak, mert kritikus fontosságú, hogy a leukocita transzmigráció ne forduljon elő túlzottan vagy nem a megfelelő helyen, mert a túlzott mértékű gyulladás, érlemezéshez vagy szklerózis multiplex kialakulásához is vezethet. A leukocita transzmigráció legfontosabb molekuláris szereplői a szelektinek, a kemokinek és az integrinek, valamint a CAM molekulák (1. táblázat, 3. ábra), amelyek az érfalon történő átjutást segítik elő. A leukocita transzendoteliális migráció folyamata több lépésből áll és mindegyik lépés a következő lépést segíti elő (3. ábra) (39-41).

1. táblázat. Leukocita adhéziós receptorok és a kölcsönható endotél adhéziós molekulák a transzendoteliális migráció különböző lépéseinél (42).

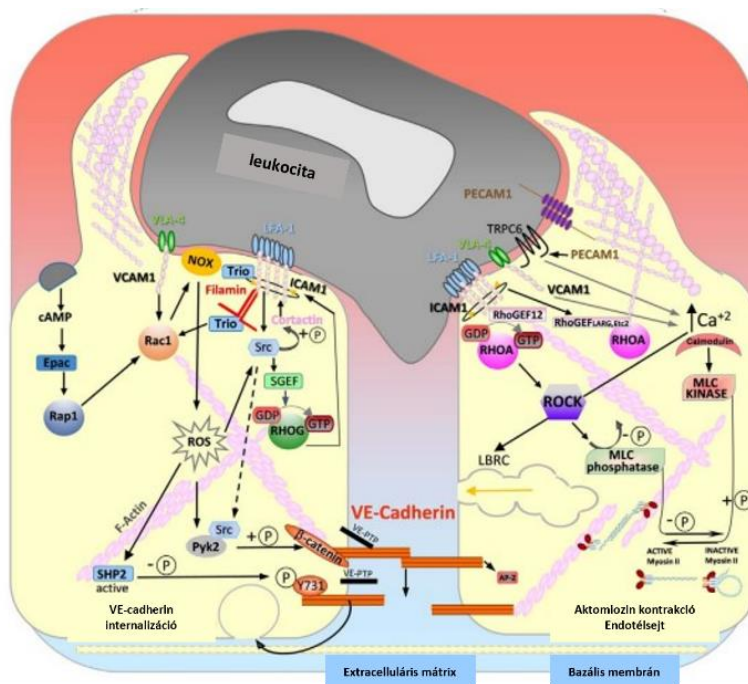
Leukocita adhéziós receptor	Endotél adhéziós molekula	Funkció (a lépés, amelyben szerepet játszik)
PSLG-1	P-szelektin	gördülés, adhézió
L-szelektin	P-szelektin	adhézió
L-szelektin	E-szelektin	gördülés
$\alpha_4\beta_7$ integrin (nem-aktivált)	MadCAM-1	gördülés
$\alpha_4\beta_7$ integrin (aktivált)	VCAM-1/MadCAM-1	erős adhézió (kiterülés)
$\alpha_4\beta_1$ integrin (nem-aktivált)	VCAM-1	gördülés
$\alpha_4\beta_1$ integrin (aktivált)	VCAM-1	erős adhézió (kiterülés)
LFA-1/Mac-1	ICAM-1	erős adhézió (kiterülés), transzmigráció
PECAM-1	PECAM-1	transzmigráció



3. ábra. A leukocita transzendoteliális migráció folyamatának lépései. A leukociták migrációja az endotél sejtrétegen keresztül többlépcsős folyamat során valósul meg. **I.:** gördülés, **II.:** adhézió, **III.:** kemokinek megjelenése, **IV.:** kiterülés és aktiváció és **V.:** transzmigráció vagy diapedézis. Az egyes lépések egymást segítik elő és a végén a leukocita paracelluláris vagy transzcelluláris migrációval jut át az endotél sejtrétegen (43).

Első lépésként a fehérvérsejt rövid ideig és lazán kötődik az endotél sejtréteghez, ezáltal lassul a mozgása, úgynevezett „rolling”, azaz gördülő mozgást végez. Az endotél sejtek felszínén lévő szelektinek játszanak fontos szerepet ebben a folyamatban (32). Az aktivált szelektin a leukocita felszínén lévő speciális szerkezetű oligoszacharid láncot ismer fel és átmeneti, laza kölcsönhatás alakít ki. Ez az előfeltétele a következő lépésnek, ahol a proinflammatorikus citokinek (pl. $\text{TNF}\alpha$) hatására az endotél sejtek apikális felszínén kemokinek jelennek meg. Ilyen kemokinek például IL-8, vagy az MCP-1, MIP-1 α és a RANTES (32, 39, 40). Ez a folyamat két szempontból is fontos. Egyrészt a sejtek

között szorosabb kapcsolat kialakulását segítik elő az integrin molekulák (pl. lymphocyte function-associated antigen 1, LFA-1, $\alpha_L\beta_2$ integrin) aktív konformációjának indukálásával, szoros kapcsolat jön létre a leukocita integrin $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4), $\alpha_4\beta_2$ (LFA-2, CD11a/ CD18) és $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1, CD11b/CD18) és az endotél felszínén expresszálódó ICAM-1 és ICAM-2, valamint VCAM-1 adhéziós molekulákkal (4. ábra) (31, 40, 44). Ebben a folyamatban a leukocita képes megtalálni és felismerni a legalkalmasabb helyet, ahol át tud menni az endotél sejtrétegen. Másrészt a kemokin receptorok aktiválódásának hatására klasztereződik például az ICAM fehérje az endotél sejtek apikális felszínén. Ez a klasztereződés elindítja az endotél sejtek aktin citoszkeletonjának átrendeződését is (45). A leukocita transzmigráció történhet paracelluláris mechanizmus révén, ebben az esetben az endotélium elvékonyodó, fenesztrált citoplazma részeit is felhasználhatja. A leukociták átjutásának egyik lényeges lépése a diapedézis, amely során a leukocita és az endotél sejt között molekuláris szintű kapcsolat alakul ki, ebben a folyamatban kitüntetett szerepe van a JAM-1, PECAM, CD99 és VE-cadherin adhéziós molekuláknak (4. ábra) (40).



4. ábra. A leukocita átjutása, paracelluláris transzmigráció folyamata. A leukociták endotél sejtekhez való kapcsolódása és az endotél sejtrétegen történő transzmigrációja többlépcsős folyamat, amelyben számos adhéziós molekula vesz részt. A transzendoteliális migráció során az ICAM-1, VCAM-1 endotél adhéziós molekulák és a PECAM-1 interakcióba lépnek a leukocitákkal, és olyan jeleket továbbítanak az endotél sejt felé, amelyek elősegítik a transzmigrációs folyamatot. A bal oldali sejt olyan jelátviteli útvonalakat mutat, amelyekben a RhoG, Rac1 és Rap1 GTPázok vesznek részt; a jobb oldali sejt a RhoA-t érintő jelátvitelt mutatja (39).

1.5.3. Az endotél sejtréteg permeabilitása és a leukocita transzmigráció folyamata

Még nyitott kérdés, hogy a transzmigráló leukociták az érből történő kilépésekor hogyan ismerik fel azt a helyet, ahol át kell jutniuk az endotél rétegen. Az utóbbi időben ezeket a helyeket ún. transzmigrációs „hotspot”-nak nevezték el (26). Többféle tényező állhat a „hotspot” felismerés hátterében. Az immunsejtek átjutását a kemokinek optimális koncentrációja (kemotaxis), az adhéziós molekulák sűrűsége (haptotaxis) vagy akár az endotél sejtek keménysége (ami összefüggésben áll az extracelluláris mátrix merevségével - durotaxis) is meghatározhatja. Mindezek mellett a szövetbe vagy szervbe történő vándorlás egyik másik meghatározója lehet az is, hogy a legkisebb ellenállással menjen végbe a transzmigráció folyamata (tenertaxis) (46). Ezenkívül a nyíróerők nagysága, iránya, valamint az ér típusa (artéria vagy véna) is fontos szabályozó szerepet játszik a megfelelő kilépési helyek meghatározásában. Érdekes megfigyelés, hogy a fizikai környezet, azaz az extracelluláris mátrix merevségének van egy optimális tartománya, például a leukociták lassabban vándorolnak puhább (4 kPa) és merevebb (13 kPa) poliakrilamid gélben, míg az optimális kúszás sebességét 7 kPa nyomáson érik el. Az is rendkívül érdekes megfigyelés, hogy a fibronectin sűrűsége is befolyásolta a vándorlás sebességét (46).

A leukocita TEM és az érrendszer integritásának szabályozása egyaránt függ az F-aktin citoszkeleton dinamikus átrendeződésétől. A leukociták endotélhez kapcsolódó részén kialakul egy F-aktin tartalmú nyúlvány, az ún. lamellipodia szerkezet, amely képes „letapogatni” az endotél sejtfelszint. A lamellipodiák egy elágazó, polarizált aktin filamentum hálózatot tartalmaznak, amelyekben az aktin plusz végei a plazma felé irányulnak. Az aktin monomerek növekedése egy elágazó hálózatot alakít ki és azok képesek ezáltal mechanikai erőt kifejteni a plazmamembránra, amely a lamellipodiumok előrefelé történő nyúlását hajtja. Legújabb kutatások alapján az endotél sejtek is képesek ilyen nyúlványok, filopodiumok kialakítására, amelyek „hotspot”-ként szolgálnak a leukociták endotél rétegen történő átjutásakor (47).

Érdekes módon a RhoA fehérjének eltérő szerepe van a permeabilitás és a leukocita TEM szabályozásában. Míg a permeabilitás szabályozásánál az RSF kialakulásának indukálásával a résképződést segíti elő, addig a leukocita TEM folyamata során a transzmigráló leukocita körül kialakuló F-aktin gyűrű segítségével hozzájárul a

távozó leukocita után az endotél pórusok bezárásához, ezáltal az endotél sejtréteg barrier funkciójának megőrzéséhez. A RhoA tranziensen és lokálisan aktiválódik a leukocita diapedézis során, és a kialakult F-aktinban gazdag gyűrű megjelenése korrelál a foszforilált miozin könnyű lánc (MLC) jelenlétével és mennyiségi növekedésével, ami arra utal, hogy ezek a kontraktilis F-aktin-gyűrűk rugalmas pántként szolgálnak a szivárgás korlátozására (48). Az még nem tisztázott, hogy a RhoA milyen jelátviteli útvonalon képes aktiválódni a leukocita TEM helyén. Feltételezések szerint az endotél felszínén expresszálandó jelátviteli receptorok felelősek ezért, amik végül helyi RhoA aktiválódást eredményeznek (26, 46). Ilyen receptor az ICAM-1 és a PECAM-1 fehérje, mindkettő jelen van a neutrofil transzmigráció során a pórusképződés helyén, akár paracellulárisan, akár transzcelluláris migrációról van szó. Érdekes módon mechanikai hatásra mindkét fehérje RhoA aktivitást indukál (46).

1.5.4. Az endotél sejtek szerepe a metasztázisban

A daganatos megbetegedések esetében a halálozások fő oka nagyrészt nem a primer daganat, hanem az áttétképződés, amely a betegek halálozásának mintegy 90%-áért tehető felelőssé (49). Kísérleti állatmodellekben az elsődleges daganatból kikerülő tumorsejteknek csak kevesebb, mint 0,01%-a képes áttétet képezni, így az onkogénnel vezérelt állati tumormodellekben nem mindig alakulnak ki. A tumorsejtek perifériás keringésbe jutásának sebessége befolyásolhatja az áttétképződés hatékonyságát. Sőt, a betegek véráramában is lehetnek rákos sejtek, de a véráramban jelen lévő rákos sejtek nem feltétlenül képeznek áttétet (39).

A metasztázis során a tumorsejtek behatolnak a környező szövetekbe, egyedi sejtként, vagy csoportosan. A tumorsejtek vándorlása kétféle módon is történhet: mezenchimális típusú és amőboid típusú vándorlás (39, 50). A vándorlás módja a környezeti tényezőktől függ. Az áttétképződés folyamata során a tumor sejt bejut a véráramba, ezt a folyamatot nevezzük az intravazációnak. A véráramba kerülve, ha túlélnek a nyíróerő hatását és meg tudják kerülni az immunrendszert, akkor az endotél sejtrétegen keresztül kilépnek a véráramból és a szöveti részt elérve megtörténik az extravazáció folyamata. Először egy ún. mikrometasztázis alakul ki, és amennyiben az új környezetben képesek osztódni a rákos sejtek, akkor alakul ki a klinikailag kimutatható makrometasztázis (39). Valószínűleg az áttétképződés helye nemcsak attól függ, hogy a rákos sejtek hol képesek megtapadni, illetve átjutni az endotéliumon, hanem a megfelelő

túlélési és növekedési környezet is elengedhetetlen a célszövetben. Alapvetően az intravazáció és extravazáció folyamata eltérő, mert az endotéliumot ellentétes oldalról közelítik meg (5, 39, 51).

A rákos sejtek intravazáció folyamatát számos tényező befolyásolja, többek között a tumor mikrokörnyezetében lévő egyéb sejtek, proteázok, jelátviteli molekulák, valamint a tumor és a kapcsolódó érrendszer környezeti körülményei. Az intravazáció folyamata során a tumorsejtnek be kell jutnia a szöveteken keresztül az érbe. A tumorsejtek angiogenezist indukálnak, új ereket hoznak létre és gyengén kapcsolódnak egymáshoz. Így egy sejt vagy sejtcsoport leszakadva a primer tumorról a kialakult új erekbe viszonylag könnyen be tud lépni (2, 52). Alapvetően az intravazáció egy fiziológiás folyamat, amely az immunrendszer normális működéséhez is szükséges. Erre példa szöveti sérülés esetén az immunsejtek eljutása a sérülés helyére. Egy másik természetes folyamat, amikor a csontvelőből a fejlődő immunsejtek intravazációval jutnak be a véráramba. Fontos megjegyezni, hogy míg a leukociták átjutása során az erek szerkezete és integritása nem sérül és az endotél rétegen való átjutás során a vér szivárgása is limitált, addig a tumorsejtek átjutásának tanulmányozása során felmerült egy olyan mechanizmus, amely során a rákos sejtek indukálják az endotél sejtek nekroptózist (2, 13).

Számos kutatás foglalkozik a daganatos intravazáció tanulmányozásával és megértésével, azonban a különböző daganatok eltérő tulajdonságúak, így a különböző tumorok valószínűleg különböző mechanizmusokat használnak az intravazációkor. Az új markerek vagy kezelések sikeres kifejlesztése tehát tumor specifikus kell legyen (13). A kutatási eredmények alapján valószínű, hogy az intravazáció és az extravazáció folyamatában az endotél sejt-sejt kapcsolatok gyengülése háttérben hasonló molekuláris mechanizmusok húzódnak, bár a sejt-sejt kapcsolat fehérjéinek szignálizációs útvonalai nagyrészt különböznek egymástól. Például vannak olyan proteázok, amelyek a primer tumor körüli szövetekben jelen vannak és részt vesznek az intravazációban, de eddig még nem vizsgálták őket az extravazáció folyamatában (2, 53). A tumorsejtek extravazációja általában kis kapillárisokban történik, amelyek átmérője hasonló a tumorsejtek átmérőjéhez. Ez arra utal, hogy fizikai oka van annak, hogy a tumorsejtek a véráramban utazva épp itt lassulnak le, állnak meg. A tumorsejtek adhéziójában elsősorban az integrinek vesznek részt, amelyek kölcsönható partnerei expresszálódnak az endotélium

felszínén. A rákos sejtek ezután átvándorolnak az endoteliális gáton, majd ezt követően behatolnak a bazális membránba, amely körülveszi az ereket. A sejtek ezután nyugalmi állapotba kerülnek, vagy proliferálódnak, vagy sejthalál következik be ebben az új mikrokörnyezetben (2).

A tumorsejtek transzmigrációja az endotéliumon keresztül nagyon hasonló a leukocita transzmigráció folyamatához, azonban a molekuláris szereplők különbözőek (9). A paracelluláris transzmigráció során a tumorsejtek az endotél sejt-sejt kapcsolatokat megnyitásával, a sejtek között átréselődve jutnak át az érfalon. A transzcelluláris migráció során pedig közvetlenül az endotél sejten mennek keresztül. *In vitro* kísérletben a tumorsejtek paracelluláris transzmigrációval jutottak át, habár van bizonyíték arra is, hogy ez transzcelluláris úton is megtörténhet (13, 39). Az még nem tisztázott, hogy *in vivo* kísérletekben melyik útvonalon történik a TEM és milyen tényezők befolyásolják ezt. Feltételezések vannak, hogy a tumorsejt típusa ezt képes meghatározni. Azonban a paracelluláris migráció során a rákos sejtek a leukocitáknál lassabban képesek az érfalon átjutni, mert az endotél sejt-sejt kapcsolatok közé ékelődnek és emiatt az endotél sejt-sejt kapcsolatok hosszantartó megnyílását indukálják, amely ezek után csak lassan képes visszazáródni vagy nem is tud (13, 53). Ennek az lehet az oka, hogy a tumorsejt irreverzibilisen megbontja az endotél sejt-sejt kapcsolatokat. Kutatási eredmények arra mutatnak rá, hogy a tumorsejteken lévő $\alpha v \beta_3$ integrin specifikusan részt vesz a transzmigráció folyamatában, és kölcsönható partnere lehet a CAM családba tartozó adhéziós molekuláknak (pl. L1-CAM, PECAM) (54, 55). A rákos sejtek képesek olyan faktorok termelésére, amelyek időlegesen gyengíthetik az endotél sejt-sejt kapcsolatokat (pl. trombin, SPARC), ezzel elősegítve az érrendszerből történő kilépésüket (2, 51). Az extravazáció folyamatának hátterében húzódozó molekuláris mechanizmusok megismerése és azonosítása új terápiás lehetőségeket nyithat meg az áttétképződés csökkentésére. Az intravazáció folyamata mögött húzódozó molekuláris mechanizmusok már egy jól körülírt, kutatott terület, azonban az extravazáció folyamatáról még keveset tudunk, a különböző receptorok szerepéről, ezeken keresztül milyen jelátviteli útvonalak segítségével lazul fel az endotél sejt-sejt kapcsolat és a vérben keringő sejtek, mint például a leukociták és vérlemezkék hogyan járulnak hozzá ezekhez a folyamatokhoz (53).

1.6. Az endotél sejtréteget érő külső erők

Az epitél és az endotél sejt-sejt kapcsolatok létfontosságúak a szöveti homeosztázis fenntartásában. Az embrionális fejlődés és a szövetfenntartás során a sejtek folyamatosan mechanikai erőknek vannak kitéve. Az érfal összehúzódásához és az immunsejtekhez való kapcsolódás folyamata során az érrendszert alkotó endotél sejtek mechanikai nyúlásnak vannak kitéve, alkalmazkodniuk kell a véráramlás pulzáló jellege miatt keletkező hemodinamikai erőkhöz, miközben fenntartják érpermeabilitást szabályozó funkciójukat is (23, 56). A jelátviteli útvonalak aktivációja változhat attól függően, hogy a sejt fiziológiás vagy patológiás (nagyobb) mértékű megnyúlást szenved. A fiziológiás működéssel járó megnyúlás fontos az érrendszeri homeosztázisban, mivel részt vesz a sejtek szerkezetének, az érrendszeri angiogenezis, a proliferáció és az érrendszeri tónus szabályozásában. A magas vérnyomással járó megemelkedett nyomás azonban túlzott mechanikai terhelésnek teszi ki a sejteket, ami a reaktív oxigéngyökök, a gyulladás és/vagy az apoptózis kialakulásán keresztül patológiás következményekhez vezethet. Ha az endotél sejtréteg nem képes alkalmazkodni az erők nagyságának vagy irányának változásaihoz, az közvetlen következményekkel jár az érpermeabilitásra, ezért az érbetegségek, például az akut ödéma, a krónikus gyulladás, a magas vérnyomás és az érlemezsedés fontos okának tekintik (23).

A sejteket érő mechanikai hatások érkehetnek kívülről, ilyen lehet a véráramlás, az érfal alatti simaizom-összehúzódás, érkezhets az extracelluláris mátrix, illetve a szomszédos sejtek felől vagy akár a sejt belsejéből is, az aktomiozin kontrakciójából (57). Az endotél sejtek a külső mechanikai hatást sejtfelszíni fehérjékkel érzékelik, majd ezen keresztül jelátviteli fehérjék egész sora aktiválódhat a sejtben, hogy a sejt alkalmazkodni tudjon a megváltozott körülményekhez, ezt a folyamatot hívjuk mechanotranszdukciónak. Az érrendszerben fellépő mechanotranszdukciós útvonalak feltérképezése és megértése potenciális terápiás célpontot lehet vagy új megközelítési lehetőségeket eredményezhet az endotél réteg stabilitásának helyreállítására különböző betegségekben, pl. érlemezsedés vagy tumor metasztázis (8, 58). Jelenleg az endotél sejtek kutatása nagyrészt olyan molekuláris események azonosítására összpontosít, amelyek magyarázatot adhatnak arra, hogy az endotél sejtréteg hogyan érzékeli a mechanikai hatásokat és hogyan reagál és adaptálódik hozzá. A sejtek plazmamembránján találhatóak a mechanoszenzitív fehérjék, amelyek a fellépő erők

hatására megváltoztatják konformációjukat, így lehetővé válik a fehérjék foszforilációja (pl. az erő hatására az eltemetett foszforilációs hely hozzáférhetővé válik), vagy az enzimaktivitás allosztérikus szabályozása, illetve kölcsönható fehérjék kötőhelyének kialakulása. A sejtmembrán erőt érzékelő fehérjéi általában multiprotein komplexek közreműködésével kapcsolódnak a sejtek aktin citoskeletonjához. Az erőt érzékelő fehérjék lehetnek integrinek, cadherineek, mechanoszenzitív ioncsatornák, G-fehérje kapcsolt receptorok és receptor-tirozin kinázok (33, 59, 60).

Ezen jelátviteli útvonalak és az ebben szerepet játszó fehérjék azonosítása, valamint a jelátviteli útvonal szabályozásának jellemzése kulcsszerepet játszhat pl. az endotél sejtek kóros mechanikai megnyúlásával, vagy az endotél réteg barrier funkciójának sérülésével összefüggő betegségek terápiás lehetőségeinek feltérképezésében.

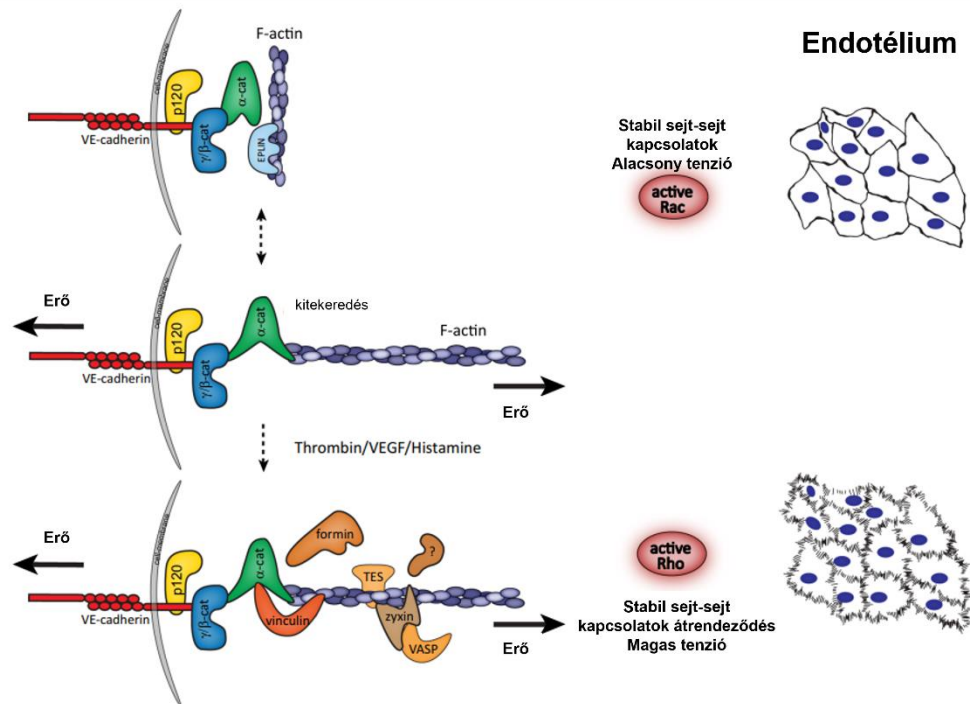
1.6.1. Az endotél sejt-sejt kapcsolatok szabályozása mechanikai erők hatására

Az endotél sejtréteget egy multiprotein sejt-sejt adhéziós struktúra jellemzi, amely a VE-cadherin transzmembrán receptorból, intracellulárisan kapcsolódó cateninekből és más szabályozó fehérjékből áll (2. ábra) (15). Az endotél sejt-sejt kapcsolatok stabilitását a VE-cadherin mellett a nektinek, claudinok, occludinok, JAM-ok és PECAM-1 fehérje biztosítja. A véráramlás, mint mechanikai hatás vizsgálata előtérbe került az érelmeszesedés kapcsán és a legfrissebb kutatások már ún. omics technika segítségével számos gén expressziós szintjének változását igazolták nemcsak gén, hanem fehérje szinten is (61). Mindezek alapján megfigyelték, hogy a gyorsabb véráramlás gátolja az endotél sejtek proliferációját és a gyulladás során bekapcsolt jelátviteli útvonalak aktiválódását az endotéliumban, stabilizálva ezzel az endotél sejt-sejt kapcsolatokat. Ezzel szemben a lassabb véráramlás aktiválja a gyulladásban szerepet játszó jelátviteli útvonalakat, pl. az NF-kB és JNK (23). Kevés információ áll rendelkezésre azonban arról, hogy az endotél sejtek a mechanikai erő változásának hatására milyen jelátviteli folyamatok során képesek az aktin citoskeleton átrendeződésével adaptálódni a megváltozott külső hatásokhoz.

1.6.2. VE-cadherin alapú sejt-sejt kapcsolatok hatása az aktin citoskeleton átrendeződésére

Az endotél sejt-sejt kapcsolatokban az egyik szabályozó fehérje a VE-cadherin, amely homofil kölcsönhatást alakít ki a szomszédos sejt VE-cadherin fehérjéjével. Az extracelluláris domének között jön létre a kapcsolat, a fehérje citoplazmatikus része pedig egy fehérjekomplexen keresztül képes az aktin citoskeletonhoz kapcsolódni. Így az aktin kontraktilitása szerepet játszik a sejt-sejt kapcsolatok szabályozásában. A sejt felszínén elhelyezkedő (adhéziós) fehérjék képesek érzékelni a mechanikai és különböző biokémiai ingereket, amelyek hatására az aktin átrendeződik. Az aktin kontrakciója „visszahat” a VE-cadherin alapú sejt-sejt kapcsolatokra, hogy szabályozza azok össze- és szétszerelését (62-65). A VE-cadherin mechanotranszdukcióban betöltött szerepe kezdetben folyadékáramlási kísérletből vált nyilvánvalóvá, amelyekben a VE-cadherinról a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor 2-vel (VEGFR2-vel) és a PECAM-1 fehérjével együtt kiderült, hogy szükséges az endotél sejtek aktin citoskeletonjának a folyadékáramlás irányába történő rendeződéséhez (66). Az áramlás hatására a sejtekben aktiválódik a Rho, és a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K), amely végső soron a sejt extracelluláris mátrix-hoz történő adhézióját erősíti meg (66-69).

Az endotél sejtekben a sejt-sejt adhéziók kialakulását és stabilizálódását a plazmamembrán közelében elhelyezkedő aktin szerkezet segíti elő (70-72). A stabil sejt-sejt kapcsolatokban a VE-cadherin lineárisan (folytonosan) helyezkedik el a sejtek között, és a vele párhuzamosan futó aktin kötegek „támasztják alá” (5. ábra) (72, 73). A stabil sejt-sejt kapcsolatok átrendeződéséhez aktomiozin kontrakció szükséges, amelyek a sejt-kapcsolatokra visszahatva szabályozzák annak szerkezetét és a VE-cadherin jelenlétét (29, 74). A citoskeletonális átrendeződés során az aktin a sejt-kapcsolatokra merőleges aktin kötegekbe rendeződik, amelyet fokális adhéziós kapcsolatoknak (FAJ) neveztek el (74).



5. ábra. Az aktin citoskeleton átrendeződése mechanikai erő hatására. Nyugalmi állapotú sejtben a VE-cadherin sejt-sejt kapcsolatok folytonosan, lineárisan szerveződnek. Ezt az állapotot az aktív Rac támogatja, amely hatására csökken a VE-cadherinre eső tenzió. Ez maga után vonja a plazmamembránnal párhuzamosan futó kortikális aktin kötegek (CAB) kialakulását. Ebben az állapotban a stabil sejt-sejt kapcsolatok a barrier funkció megerősödésével korrelálnak. Külső erő hatására (illetve a Rho aktiválásával) a VE-cadherin érzékeli a külső erőt és az aktin citoskeleton, valamint a kapcsolódó fehérjék átrendeződésével reagál. Ekkor alakulnak ki a radiális stressz-rostok (RSF), amelyek az aktomiozin kontrakciójával visszahatnak a VE-cadherin sejt-kapcsolatokra. Ez utóbbi sejt-kapcsolati elrendezés a fokális adhéziós kapcsolat (adherens junction) (FAJ) (23).

Ezt az átrendeződést szabályozza a Rho-, illetve Rac (Rap) GTPázok lokális aktivitása is. Míg a Rho GTPáz aktiválása növeli az aktomiozin által közvetített húzóerőt, és a FAJ-k kialakulását, addig a Rac lokális aktivációja a sejt-sejt kapcsolatok stabilizálódását (lineáris csomópontok) segíti elő (75, 76). A VE-cadherin alapú sejt-sejt csomópontokra ható megnövekedett citoskeletális húzó erők hatására a sejt-sejt adhézió megerősödik, ami összhangban van a VE-cadherin homofil kapcsolat „catch bond” tulajdonságával, azaz azzal a tulajdonsággal, hogy relatíve kis erőknél a VE-cadherin kapcsolatok megerősödnek, az erő további növelésével pedig akár fel is bomolhatnak (64).

Az endotél sejtréteg barrier funkciójának dinamikus változását az aktin citoskeleton dinamikája teszi lehetővé. Ily módon az endotél sejtek képesek reagálni a szomszédos sejtek aktin citoskeletonja által kifejtett húzóerőkre (71, 77, 78). *In vivo* kísérletekben még nem tisztázott, hogy ez a mechanizmus valóban releváns-e, bár a közelmúltban transzgenikus modellekben már vizualizálták az endotél sejt-sejt

kapcsolatok és az aktin citoszkeleton átrendeződését az angiogenezis és az anasztomózis folyamata során (79, 80).

Az F-aktin és a VE-cadherin komplex közötti kölcsönhatás időbeli szabályozása döntő fontosságúnak bizonyul az agonista által kiváltott érpermeabilitás és a leukocita extravazáció szempontjából eregekben (81). Ezen túlmenően az endoteliális csomópontok eltérő szerveződése felismerhetők az emberi eregekben, ami arra utal, hogy a tenyésztett sejtrétegben megfigyelt erőfüggő citoskeletális átrendeződések nagy valószínűséggel jól jellemzik az érrendszer sejteiben történő átrendeződéseket (82).

Tehát a VE-cadherin a mechanikai jeleket képes átalakítani és továbbítani a sejt belseje felé, ún. mechanotranszduktor a sejt-sejt kapcsolatok átmeneti átrendeződése során. Ezzel szemben a véráramlás érzékelése során úgy tűnik, hogy a VE-cadherin inkább a VEGFR jelátvitel adaptoraként működik és az integrinek átrendeződését aktiválja. A VE-cadherin citoplazmatikus farkának Src függő foszforilációja az Y658 és Y685 pontokon azonban erősen függ az áramlás sebességétől (83). Mivel a vér áramlási sebessége az artériákban és a vénákban eltérő, ez megmagyarázhatja, hogy ezeknek a specifikus aminosavaknak a foszforilációja miért történik preferenciálisan a vénákban és nem az artériákban (83, 84). Eddig nem világos, hogy a VE-cadherin foszforilációja szerepet játszik-e az áramlás indukálta mechanotranszdukcióban. A Rap1 kis GTPáz, amely részt vesz az endotél sejt-sejt kapcsolatok stabilizálásában és az endotélium barrier funkciójának fenntartásában, a PECAM-1/VE-cadherin/VEGFR komplex véráramlás érzékelésben betöltött funkciójához is szükséges (85).

1.6.3. VE-cadherin-függő mechanotranszdukció: az α -catenin konformációjának változása

Az adherens csomópontokban a VE-cadherin/ β -catenin/ α -catenin fehérjekomplex közvetíti a sejteket ért külső hatásokat az aktin citoszkeleton felé (2. ábra). Korábban kimutatták, hogy az α -catenin oldatban nem kötődik egyszerre β -cateninhez és aktinhoz (86, 87). Ez összefüggésben van azzal a megfigyeléssel, hogy mechanikai erő hatására az α -catenin dinamikus és allosztérikus átalakulása figyelhető meg. Az α -catenin kulcsfontosságú mechanoszenzor, amely erőfüggő módon lép kölcsönhatásba a fehérjékkel, köztük az aktinnal (88-90). A monomer α -catenin erősen kötődik a VE-cadherin/ β -catenin komplexhez, de gyengén az F-aktinhoz, és az α -catenin affinitása az F-aktinhoz még tovább csökken a VE-cadherin/ β -cateninhez való kötődéskor (91).

Buckley és munkatársai a catenin és az aktin rostok közötti kölcsönhatás élettartalmát vizsgálták és felfedezték, hogy a rekonstruált VE-cadherin/catenin komplexre kifejtett feszítőerő nagymértékben növeli az α -catenin kötődését az F-aktinhoz, erős, hosszú élettartamú kötések kialakításával (91). FRET kísérlettel is alátámasztották az α -catenin külső erő hatására bekövetkező konformáció-változását a sejt-sejt kapcsolatokban (92). A mechanikai erő hatására bekövetkező konformáció-változás hatására az α -catenin egy eltemetett fehérje részlete kerül felszínre, amely egy másik fehérje, a vinculin kötődését teszi lehetővé, így stabilizálva az α -catenin megváltozott konformációs állapotát (93). Kim és munkatársainak FRET-alapú vizsgálatai azt mutatják, hogy az α -catenin konformációjának megváltozása megelőzi a vinculin toborzását, azaz a vinculin nem szükséges az erő által indukált α -catenin konformációjának változásához (92).

Ezzel összhangban, a vinculin hiányzik a Rac indukált lineáris adhéziós sejt-kapcsolatokból, viszont a megnövekedett húzóerő hatására átalakuló sejt-kapcsolatokban (FAJ-k) jelen van (64, 74). Azt, hogy a vinculin toborzása valóban a VE-cadherin fehérjén keresztüli erőhatásnak köszönhető, egy olyan speciális kísérlettel is bizonyították, amely során mágneses gyöngyöket VE-cadherinnel vontak be és mechanikai erő hatására vizsgálták a vinculin jelenlétét és az F-aktin felhalmozódását (67). Azt is megmutatták, hogy a mechanikai erő hatására a PECAM-1 nem váltja ki a vinculin toborzását és F-aktin felhalmozódást. Tehát a külső erő indukált vinculin sejt-kapcsolati jelenléte specifikusan a VE-cadherin fehérjéhez köthető. A vinculin endoteliális csomópontokhoz való toborzásának fiziológiai hatása még nem teljesen ismert. Azt tudjuk, hogy az endotél permeabilitást elősegítő adhéziós molekulák, és a vinculin toborzásának abban lehet szerepe, hogy a sejtek egymástól ne távolodjanak el túlzottan (pl. trombin kezelés hatására), így szabályozva a sejtek között kialakult rések nagyságát, és ezzel a permeabilitást (74). Ez arra utal, hogy a VE-cadherin-függő mechanotranszdukció valószínűleg szerepet játszik az érszivárgás korlátozásában és a gyulladáshoz vezető válaszok kialakításában.

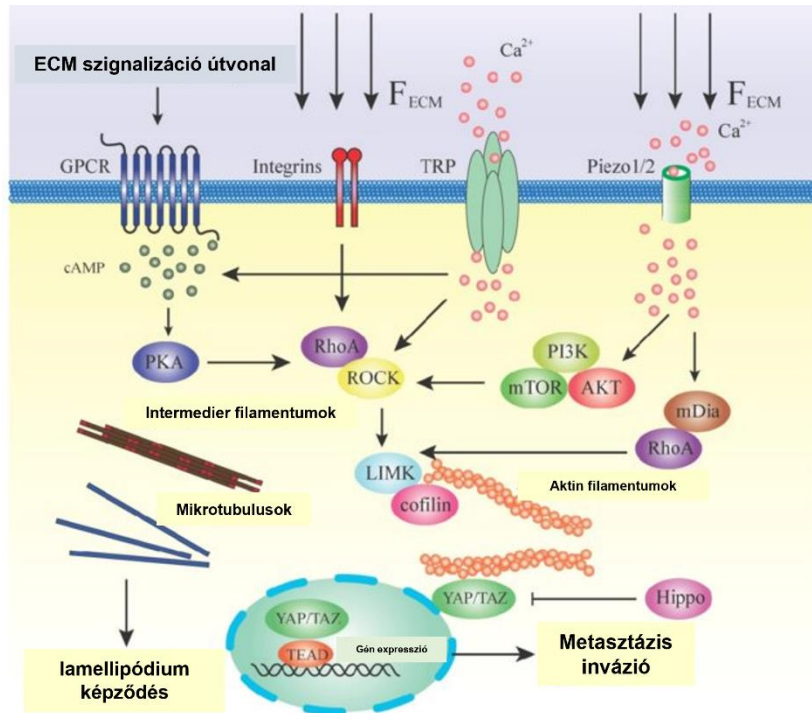
1.6.4. Mechanikai erő hatása - az aktin citoszkeleton Rho fehérjék általi szabályozása

A Rho fehérjecsaládba tartozó kis molekulású G fehérjék számos sejtélettani folyamat szabályozásában elengedhetetlen szerepet töltenek be. Ebbe a családba 22 fehérje tartozik és a legismertebb és legtöbbet kutatott tagjai a Cdc42, Rac1 és a RhoA.

Mindhárom fehérje részt vesz a sejtek citoskeletális struktúrájának szabályozásában és kialakításában, valamint dinamikus átrendeződésében. A Rho kis G-fehérje az effektor Rho asszociált kináz (ROCK) fehérjén keresztül biztosítja a citoskeleton átrendeződését a külső erőhatásokkal szemben, ami valószínűleg az endotél sejtek integritását védi a gyulladással kapcsolatos folyamatokra történő válaszadásban (48, 64, 94). Emellett a Rho-ROCK szignalizáció fontos szerepet tölt be a PECAM-1 és VE-cadherin adhéziós fehérjékhez kapcsolódó mechanotranszdukció folyamatában (67, 68, 95). A Rho GTPázok az aktomiozin citoskeleton szabályozását végzik, és központi szerepet töltenek be az endotél sejtek mechanikai hatásra történő biológiai sejtválasz kialakításában (94, 96, 97).

Az endotél sejtek permeabilitását növelő ágensek, mint például a trombin és a hisztamin, a Rho aktiválásán keresztül indukálják a stressz-szálak képződését, amely lehetővé teszi az endotél sejt-sejt kapcsolatok fellazulását (64, 74, 98). A Rho fehérjék szabályozó szerepe a GTP-kötő és a GTP-hidrolizáló egyensúlyon alapul, molekuláris kapcsolóként működnek. A GTP-kötő formában effektor partnereikhez kötődnek, majd a GTP hidrolízist követően megszűnik a kapcsolat az effektoraikkal és inaktív GDP-kötött állapotba kerülnek, amely a jelátvitel befejeződését jelenti. Mechanikai hatásra a Rho aktiválódik, azaz GDP-kötött állapotból GTP-kötött állapotba kerül. Például integrinek vagy az ICAM adhéziós molekula mechanikai aktivációja során a Rho aktiválásáért felelős GEF-ek aktiválódnak, például a LARG és a GEF-H1 (99, 100). Nem ismert azonban, hogy mely guanin-nukleotid kicserélő faktorok (GEF-ek) vesznek részt az endoteliális adhéziós csomópontok mechanotranszdukciójában. Nem olyan régen kezdték el vizsgálni a GEF-ek funkcióját ciklikus nyújtás hatására (101). Azonosítottak 11 GEF-et a sejtválaszban, közülük a Solo-ról bizonyították, hogy a VE-cadherinnek szerepe van az aktiválásában.

Érdekes módon a citoskeletális válasz fokozza az extracelluláris erők továbbítását a sejtmag felé (6. ábra) (68, 102, 103). Egy másik, nemrégiben felfedezett mechanojelátviteli útvonal, amely biokémiai úton kapcsolja össze az extracelluláris mechanikai ingereket a nukleáris válaszokkal, a Yes asszociált fehérje (YAP) és a PDZ-kötő motívummal rendelkező transzkripciós koaktivátor (TAZ) fehérjék aktivitását foglalja magában.



6. ábra. Az extracelluláris erők hatásának továbbítása a sejtmag felé. Mechanotranszdukció és a citoskeletonot szabályozó útvonalak a metasztázis során. Ez az ábra összefoglalja azokat a mechanizmusokat, amelyek révén a merev ECM vagy az extracelluláris jelátvitel mechanotranszduktorokon keresztül megváltoztatja a sejtek állapotát. A RhoA/ROCK a központi pozícióban helyezkedik el a jelátviteli útvonalban. Külső erők hatására megváltozik a TRP-csatorna és a Piezo 1/2 konformációja, amely a Ca²⁺ beáramlását eredményezi az extracelluláris téréből. A megnövekedett intracelluláris Ca²⁺ koncentráció több jelátviteli útvonal is aktiválódik, amely ROCK aktiválásával foszforilálja a LIMK-t, amely foszforilálja és inaktiválja a cofilint. A cofilin elősegíti az aktin filamentumok depolimerizációját, ezért a ROCK aktiválása végső soron aktin-stabilizáló hatással bír. A LIMK kináz (LIMK) közvetlenül is fokozza az aktomiozin kontrakciót is. Az aktin kontraktilitás növekedése a Hippo-útvonal gátlásával elsősorban a YAP/TAZ sejtmagba jutását. A YAP/TAZ felhalmozódik a sejtmagban és a DNS-kötő transzkripciós faktorokkal együtt szabályozza számos gén átírását. A külső erő hatására az aktin citoskeletonon kívül az intermedier filamentumok és mikrotubulusok átrendeződhetnek, amely a sejtek lamellipodiumok képződését segítheti elő (104).

A konzervált Hippo-útvonal részeként ezek a fehérjék felelősek a sejt-sejt kontaktus és a sejtproliferáció gátlásáért a szöveti méret szabályozása érdekében (105). A Hippo-útvonalon keresztüli aktiválódástól függetlenül a YAP/TAZ aktiválódását a citoskeletonális kontraktilitás és a Rho GTPáz aktivitása szabályozza (106). Ezeknek a transzkripciós szabályozóknak az aktivitására számos mechanikai inger hatással van, beleértve az extracelluláris mátrix merevségét, a sejtgeometriát, a sejt-sejt kontaktust és a sejtek megnyújtása is (107).

A YAP/TAZ fehérjék aktiválódása során megváltozik a sejten belüli lokalizációjuk. A rugalmas extracelluláris mátrixhoz tapadó endotél sejtek citoplazmatikus YAP/TAZ lokalizációt mutatnak, míg köztes vagy nagy merevségű környezetben a fehérjék a sejtmagban helyezkednek el (106). A molekuláris

mechanizmus, amelyek révén a YAP/TAZ érzékeli a mechanikai ingereket és hogy ezek hogyan kapcsolódnak a sejt-sejt kapcsolatok átalakításához még nem teljesen tisztázott. Ismert azonban, hogy a YAP működése és sejt-sejt csomóponthoz való toborzása szorosan függ a VE-cadherin alapú adhéziótól, és a permeabilitást növelő ágensről, mint például a trombin (108).

1.7. Az aktin citoskeletont szabályozó jelátviteli útvonalak

1.7.1. Rho fehérje szerepe az aktin citoskeleton szabályozásában

Az endotél sejt-sejt kapcsolatok dinamikájának szabályozásában a Rap1 (Rap1a és Rap1b) és a Rho GTPáz család tagjai is kritikus szerepet töltenek be. Ebbe a családba tartozik például a Cdc42, a Rac és a RhoA (109). A Rho GTPázok modulálják az aktin citoskeleton szerveződését és dinamikáját szignalizációs útvonalakon keresztül, amelyek a sejtek összehúzóását és a sejtek közötti rések megnyitását szabályozzák, illetve a rések visszazáródását, így befolyásolva a permeabilitást (110-112).

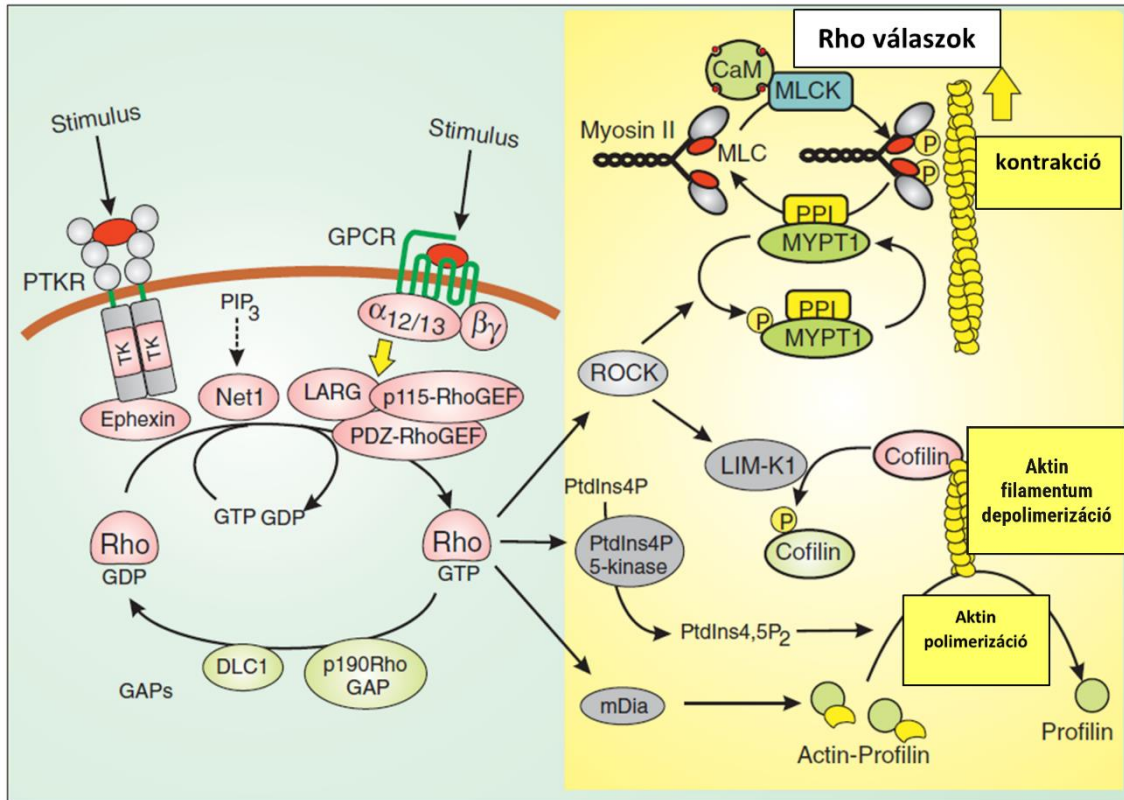
A Rac és a Cdc42 fehérjék a filopódiumok és a lamellipódiumok térbeli szabályozását irányítják, így hozzájárulva a rések bezáródásához (110). Ezzel szemben az volt az általánosan elfogadott nézet, hogy a RhoA fehérje az F-aktin szálak képződését és kontrakcióját szabályozza, így a sejt-sejt kapcsolatok nyitására járul hozzá, ami által az endotél sejtréteg permeábilis lesz és gyengül a barrier funkciója (76). A legújabb megfigyelések alapján azonban kiderült, hogy a RhoA fehérjének szerepe van mind a pozitív mind a negatív szabályozásban, azaz a sejt-sejt kapcsolatok nyitására és zárására is. A RhoA aktivitását befolyásolják különböző vazoaktív anyagok, mint a VEGF, az endotoxin és a trombin, amelyek az endotél sejtréteg permeabilitását növelő biokémiai ágensek (113). A ROCK fehérje foszforilálja a miozin könnyű láncot (MLC) az F-aktin filamentumokon, ami pedig stressz-szálak kialakulásához vezet. A stressz-szálak képződése pedig elősegíti az endotél sejt-sejt kapcsolatok nyitását.

A Rho GTPáz aktivációja térben és időben szabályozott. A nem stimulált endotél sejtrétegnél a sejtek periferiáján aktív a RhoA (110). Trombin stimuláció hatására gyorsan növekszik a RhoA aktivitás a sejtek szélén az ún. protrúziókban, azaz ujjszerű membrán nyúlványokban. Ezután egy időben hosszabban fenntartott RhoA aktivitás figyelhető meg az F-aktin mentén a sejtek citoplazmájában, ami stressz-szálak kialakulásával és a sejt kontrakciójával jár együtt. A RhoA perifériás aktivitásának növekedése egybeesett a

sejtek közötti rések záródásával. Ezek az adatok a RhoA teljesen új szerepére utalnak az endotél sejtréteg integritásának fenntartásában, amelyhez a ROCK aktivitása is szükséges. Ezzel összhangban bizonyították, hogy a leukocita transzmigráció során a ROCKII izoforma szükséges a leukocita endotél rétegen történő áthaladása után az endotél rétegben keletkezett rés bezárásához (48).

1.7.2. ROCK fehérje szerepe az aktin citoskeleton szabályozásában

A Rho asszociált kinázok, azaz a ROCK fehérjék a szerin/treonin kinázok AGC családjába tartoznak és létfontosságú szerepet játszanak az aktin citoskeleton kontrakciójának szabályozásában (114). A felfedezésük óta a ROCK fehérjéket széles körben tanulmányozták, feltárva sokrétű funkciójukat olyan folyamatokban, mint a sejtkontrakció, migráció, apoptózis és proliferáció. Emlősökben két ROCK homológot különböztetünk meg: a ROCK1 (más néven ROCKI, ROK β , Rho-kináz β , vagy p160ROCK) és ROCK2 (más néven ROCKII, ROK α , vagy Rho kináz α) (115). A két izoforma szekvenciálisan 90%-os homológiát mutat a kináz domént tekintve, azonban csak 64%-os homológiát a teljes szekvencia összehasonlítása esetén (26). A ROCK fehérjék a RhoA, RhoB és RhoC kis GTPázok effektorai. A ROCK szabályozza az aktin polimerizációt a LIMK-on keresztül, valamint a miozin könnyű lánc (MLC) foszforilációjával szabályozza az aktin összehúzódását (7. ábra). A sejtekben megfigyelt stressz-szálak egyrészt a sejt-sejt kapcsolatok gyengítéséhez járulhatnak hozzá, azonban a sejt belsejében megfigyelt rövidebb aktin szálak a bazális membránhoz kapcsolódva a sejt-ECM kapcsolat szabályozásában vesznek részt (98, 115). ROCK izoforma-specifikus knockout (KO) egerek embrionális fibroblasztjainak vizsgálata rámutatott, hogy míg a ROCKI az MLC foszforilációjáért és a sejt kontrakciójáért felelős, addig a ROCKII szerepe az aktin stabilizálásában van, ami a cofilin inaktiválásán keresztül valósul meg (116).



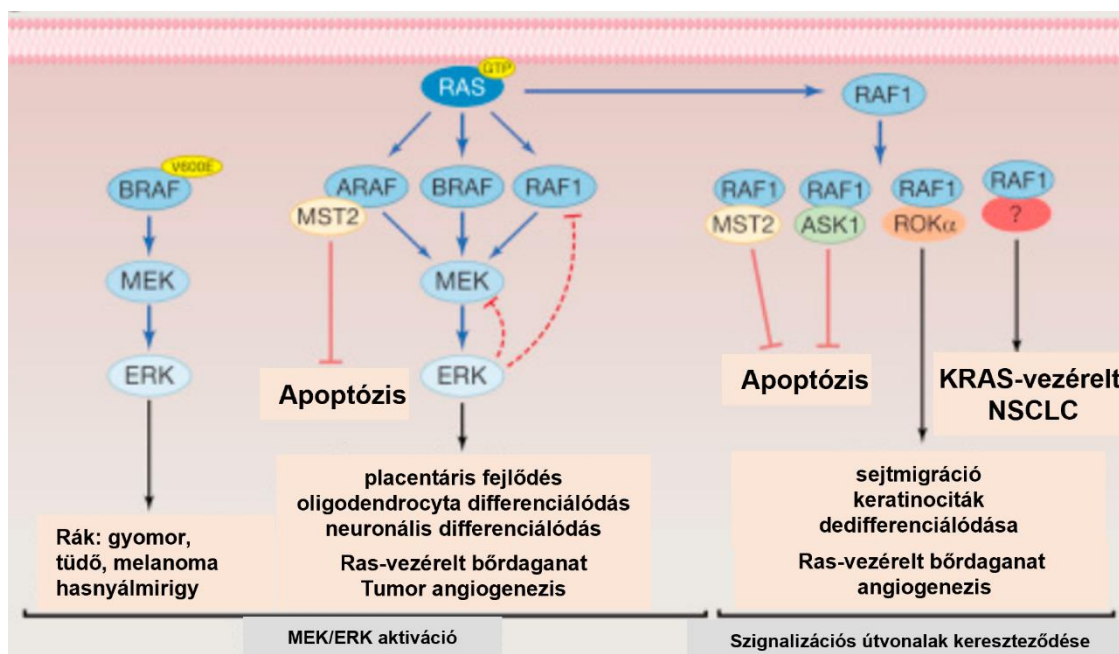
7. ábra. RhoGTP szerepe az aktin citoskeleton szabályozásában. A Rho GDP kötött állapotból GTP kötött állapotba kerül és a ROCK fehérjét aktiválja. A ROCK fehérje aktiválja az MLC-t, amely a kontrakció folyamatát szabályozza és a ROCK fehérjén keresztül szabályozódik az aktin összeszerelődés, ahol a ROCK a LIMK aktiválásával gátolja az aktin depolimerizáció folyamatát (117).

A tumor metasztázis során a sejtmigráció és az invázió két kritikus fontosságú folyamat, amely az elsődleges tumor távoli szervekbe történő áttérjedéséhez vezet. A sejtek mozgásához citoskeletonális átrendeződésre van szükség, amit az aktin polimerizáció és depolimerizáció összehangolt folyamata tesz lehetővé (114, 118). Számos jelátviteli útvonal vesz részt ebben a folyamatban, és a Rho/ROCK útvonal az egyik legismertebb ezek közül. Az aktív Rho kötődik a ROCK-hoz, ezáltal a miozin szabályozó könnyűlánc (MLC) aktiválódik, ami az aktin kontrakcióját növeli (119, 120). Ezen túlmenően a ROCK képes foszforilálni a LIMK-t, amely a cofilin foszforilációjával, azt inaktíválva gátolja az aktin depolimerizációt (121). A FAK, amely a sejtek mozgékonyágához szükséges, finoman szabályozza a fokális adhéziohhoz kapcsolódó aktin citoskeleton dinamikáját (120). Azt találták, hogy emlődaganatok esetében a két ROCK izoforma eltérő szabályozó szereppel rendelkezik (115). A ROCKI az MLC-t foszforilálja, ezzel elősegíti a sejtmozgás során a húzóerő generálást, míg a ROCKII a cofilint foszforilálja és ezáltal szabályozza a citoskeletonális átrendeződést. A RhoA/ROCKI/foszforilált MLC és a RhoA/ROCKII/foszforilált cofilin jelátviteli

útvonalak a FAK aktiválásán keresztül a sejtek extracelluláris mátrixhoz való kötődését szabályozza, a sejtek mozgékonyágát segíti elő (115).

1.7.3. RAF1 szerepe az aktin citoszkeleton szabályozásában

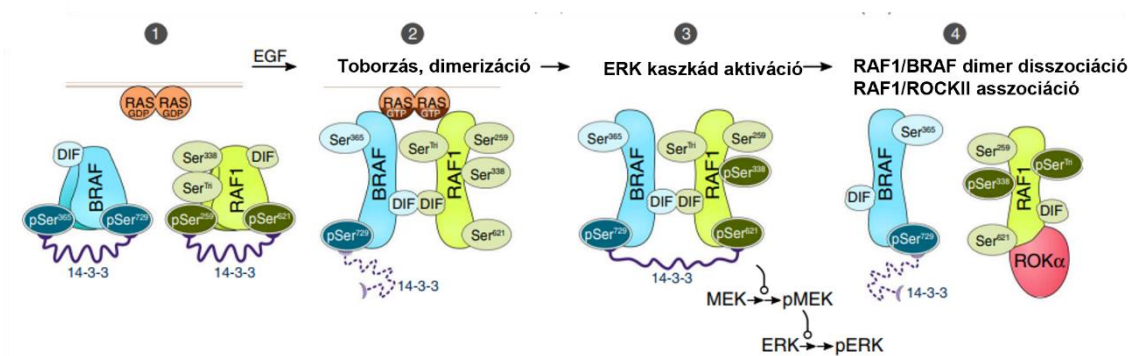
Az egyik legjelentősebb sejtbiológiai felfedezés volt a fehérje foszforilációs kaszkádok megismerése és az ebben szerepet játszó RAS fehérje aktivációja, amely kináz kaszkádot indít el, melynek egyes fehérjéi foszforilálják a kaszkád következő elemét. Az egyik legismertebb és sokat kutatott jelátviteli útvonal, a Ras/Raf/MEK/ERK szignalizációs útvonal a sejtproliferáció szabályozásához köthető (122). A RAF fehérjék a RAS fehérje által aktiválódnak. A RAF fehérjék családjába tartozik az ARAF, BRAF és a RAF1 vagy más néven CRAF. Emlősökben jelen lévő RAF fehérjék mindhárom izoformája kináz aktivitással bír és a MEK fehérjét aktiválja (123, 124). A MEK fő aktivátora az izoformák közül azonban a BRAF, a másik két izoforma az ARAF és a RAF1 más élettani folyamatokban is szabályozó szereppel bír (8. ábra) (122). A RAF1 fehérjének szerepe van a migráció elősegítésében és az apoptózis folyamatának elkerülésében. Az apoptózis szabályozása során a RAF1 kölcsönhatást alakít ki az ASK-1 és MST2 proapoptotikus kinázokkal, míg a sejtmigráció szabályozása esetén a ROCKII-vel való kölcsönhatása játszik szerepet. A RAF1 sejtmigrációban betöltött szerepét egér embrionális fibroblaszt sejteken és keratinocitákon tanulmányozták. RAF1 hiányában a sejtek morfológiája megváltozik, összehúzó alakot vesz fel, amelyet a periférián megjelenő CAB és rendezetlen vimentin jellemez a sejtek citoszkeletonjában (125). Ez a fenotípus a ROCKII hiperaktivációjával magyarázható.



8. ábra. A Ras/RAF/MEK/ERK útvonallal, illetve a RAF1 izoforma egyéb funkciói. A RAF-paralógok funkciói a fejlődésben és a tumorigenezisben. A piros vonalak a gátlást jelölik, a szaggatott piros vonalak negatív visszacsatolást jelölnek. A vonal vastagsága arányos a kölcsönhatások erősségével és jelentőségével. Az NSCLC, nem kis sejtés tüdőrák (122).

A RAF1 Ras általi aktivációja, azaz a Ras/RAF/MEK/ERK útvonallal aktiválódása elengedhetetlen a ROCKII-vel való kölcsönhatásához, amelyet az alábbi modell ír le (9. ábra). Nyugalmi állapotban lévő egersejtekben a RAF1 komplexet képez a 14-3-3 fehérjével a Ser259 és a Ser621 foszforilációs helyeken. Növekedési faktor stimuláció hatására a Ras GTP kötött formába kerül, majd a RAF1-hez kötődve elősegíti a RAF1 Ser259 oldalláncának defoszforilációját (126). Ezt követően a RAF1 a membránhoz megy, ahol az aktív RAS-hoz való kötődés heterodimer képződést indukál a RAF1 és a RAF család egy másik tagja, például a BRAF között (127). A RAF1 és a BRAF közötti allosztérikus kölcsönhatás a RAF1 Ser621 oldalláncának autofoszforilációjához vezet, ezután a megtörténik a MEK, majd az ERK foszforilációja. A BRAF-ról disszociált RAF1 (az ERK általi negatív visszacsatolás indukálja, 8. ábra), defoszforilálódik a Ser621 oldalláncon, és ezáltal képes kötődni a ROCKII-höz (ROK α).

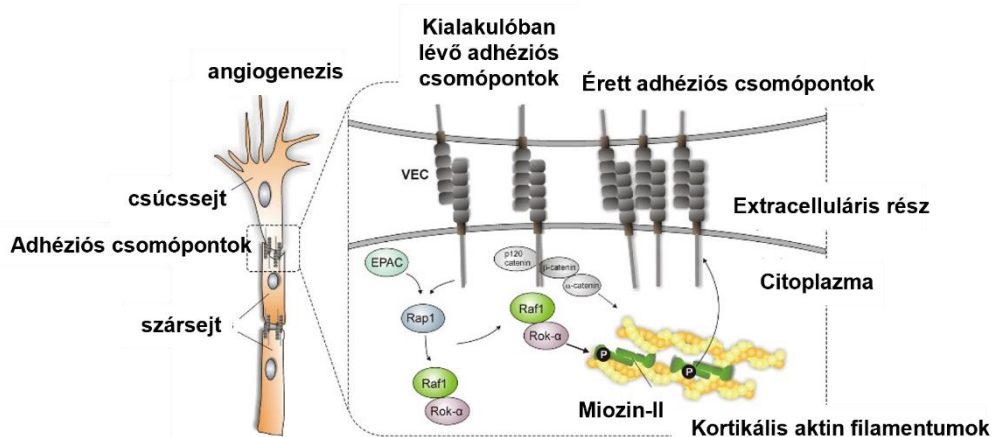
Ezzel szemben a RAF1 (Ser259 oldalláncon foszforilált) inaktív formája kötődik az MST2 fehérjéhez és gátolja annak apoptotikus hatását, amely egyértelművé teszi, hogy a ROCKII és az MST2 nem versenyez egymással a RAF1 kérésért (128).



9. ábra. Sematikus összefoglaló ábra a RAF1-ROCKII kölcsönhatás modellje a RAF1 aktivációja során. A foszforilációs helyek láthatóak, illetve a BRAF és a RAF1 foszforilálatlan állapotban világoskék (BRAF) vagy zöld (RAF1) színnel, foszforilált állapotban pedig sötétebb színnel vannak jelölve (127).

A RAF1 fehérje az epidermális tumorok kialakulásához és fenntartásához is elengedhetetlen, itt a ROCKII-vel való kölcsönhatása végső soron a sejtek differenciációjára van hatással. A már kialakult tumorok esetén a RAF1 gén kiütése a tumorok visszafejlődéséhez vezetett (129). Endotél sejtekben a RAF1 jelenléte szükséges a tumor angiogenesishez, RAF1 nélkül ugyanis az új kapillárisok képződése gátolt (10. ábra) (130). Tehát a RAF1 jelenléte és a ROCKII-vel való kölcsönhatása támogatja a tumorigenezist.

Endotél sejtekben a RAF1-ROCKII komplex a VE-cadherin-tartalmú sejt-kapcsolatokhoz lokalizálódik, amelyhez a Rap1 jelenléte is szükséges. A megfelelő mennyiségű ROCKII jelenléte pedig az MLC foszforilációjával szabályozza az újonnan kialakuló sejt-sejt kapcsolatok erősségét két endotél sejt között (10. ábra) (127).



10. ábra. RAF1 szabályozza a VE-cadherin sejt-sejt kapcsolat erősségét a ROCKII-vel való kölcsönhatásán keresztül. A RAF1 szükséges az *in vivo* angiogenesishez, mert a RAF1 befolyásolja az adhéziós csomópontok dinamikáját és az endotél sejtek összetartását. Az MLC csomóponti aktivitását a RAF1/ROCKII komplex szabályozza. A RAF1/ROCKII komplex az EPAC/Rap1 jelátvitel révén toborzódik az adhéziós csomópontokba (130).

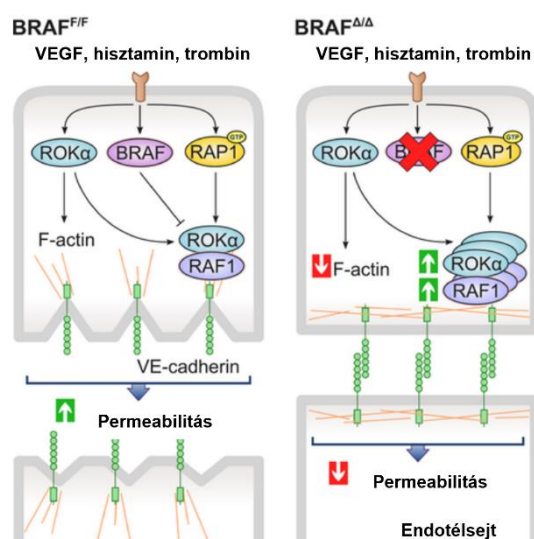
1.7.4. BRAF fehérje szerepe az aktin citoskeleton szabályozásában

A BRAF fehérjéről már régóta ismert, hogy a sejtproliferációban szabályozó szerepet játszik a RAS/RAF/MEK/ERK szignalizációs útvonalon keresztül. Ennek számos példáját látjuk többféle tumor kialakulása során, ahol az útvonal fehérjei közül leginkább a RAS és a BRAF aktivációjával a külső (extracelluláris) jeltől függetlenül az útvonal állandóan bekapcsolt állapotban van (131). Azonban a BRAF-ról kiderült, hogy nemcsak a sejtproliferáció folyamatában tölt be kritikus szerepet, hanem az aktin citoskeleton szabályozásában is, amely összefüggésbe hozható az endotél sejt-sejt kapcsolatok permeabilitásának szabályozásával (131). Permeabilitást növelő anyagok (pl. VEGF, hisztamin, trombin) hatására a BRAF fehérje komplexet képez a RAF1 fehérjével, így a BRAF/RAF1 heterodimer képződés miatt kevesebb RAF1 érhető el, amely komplexet tud képezni a ROCKII fehérjével, így a BRAF/RAF1 komplex mennyisége szabályozza a ROCKII mennyiségét a VE-cadherin sejt-sejt csomópontokban (11. ábra). Ezzel szemben BRAF hiányában több RAF1 válik elérhetővé a ROCKII számára, amely végső soron nagyobb mennyiségű ROCKII jelenlétét eredményezi a sejt-kapcsolatoknál és ez a permeabilitást növelő szerek által indukált permeabilitás növekedés gátlását eredményezi (1).

Érdekes módon a BRAF fehérjével való heterodimer képzést követően képes a RAF1 fehérje megfelelő, ROCKII-t kötő foszforilált formáját előállítani. A BRAF tehát fontos szerepet tölt be a RAF1/ROCK kölcsönhatás szabályozásában, azonban a BRAF hiányában is megtörténik a RAF1 és a ROCK közötti interakció, feltehetőleg a RAF1 más fehérjével való kölcsönhatása után, például saját magával, illetve ARAF vagy KSR fehérjékkel történő homo-/heterodimer képződés során is kialakulhat a ROCKII-t kötő megfelelően foszforilált forma (11. ábra) (1).

Molekuláris szinten a BRAF-knockout egér endotél sejtekben VEGF kezelés hatására az RSF csökkent és a CAB emelkedett, amely korrelált a csökkent F-aktin mennyiséggel. A BRAF-hiányos egér endotél sejtek morfológiája hasonló volt a 007-es EPAC-aktivátorral kezelt vad típusú sejtek morfológiájához, amely csökkenti az endotél sejtréteg áteresztőképességét a VE-cadherin tartalmú adhézios sejt-sejt csomópontokban RAP1-függő szignalizáción keresztül (72, 132, 133). A vad típusú sejtréteg 007-es aktivátorral történő kezelése, illetve a BRAF-hiányos egér endotél sejtek hasonló módon viselkedtek egy specifikus esszében, amelyet az endotél réteg permeabilitásának

jellemzésére használnak, ami azt jelenti, hogy a kontroll sejtek 007-es aktivátorral történő kezelése és a BRAF fehérje hiánya hasonló hatással van az adhézions sejt-sejt kapcsolatokra. Érdekes módon a kontroll sejtekben a MEK gátlásának nem volt hatása ebben a specifikus esszében, és ez arra utal, hogy a BRAF hiánya nem a MEK/ERK útvonalhoz köthető a permeabilitás szabályozásában (127).



11. ábra. BRAF knockout egerek endotél sejtrétegének permeabilitás-csökkenése háttérben a VE-cadherin sejt-kapcsolatokban megnövekedett RAF1/ROCKII komplexképződés áll. BRAF szabályozza az endotél sejtréteg permeabilitását. A vad típusú sejtekben a permeabilitást növelő ágensek hatására a RhoA, RAF1, BRAF és Rap1 aktiválódnak. A RhoA-GTP aktiválja a ROCKII/LIMK/cofilin útvonalat, indukálva az F-aktin átrendeződését, az RSF kialakulását és intercelluláris rés képződését, ami összességében a sejtek átteresztőképességének növekedését eredményezi. Az aktív Rap1 növeli a dimerizációt a RAF1 és a BRAF között és ez szükséges a RAF1/ROCKII dimerek relokációjához a VE-cadherint tartalmazó adhézions csomópontba. BRAF hiányában a sejtekben nagyobb mennyiségű RAF1/ROCKII komplex lokalizálódik a VE-cadherin-tartalmú sejt-kapcsolatokhoz. A LIMK és a cofilin foszforilációja csökken, ami csökkent F-aktin mennyiséggel társul és a CAB kialakulásának irányába tolja el az egyensúlyt, ami végső soron az erek permeabilitás csökkenéséhez vezet (134).

Molekuláris szinten a VEGF-fel történő aktiválás a Rho-GTP mennyiségét nem csökkenti, azonban a ROCK LIMK-on keresztül történő cofilin foszforilációja csökken. Érdekes módon a cofilin foszforilációjának csökkenését BRAF KO fibroblasztokban is megfigyelték, azonban ennek oka a ROCK mennyiségi csökkenése volt (135). Az endotél sejtek esetén azonban nem változott a ROCK mennyisége, így a cofilin csökkenését a ROCK RAF1-általi gátlásával magyarázták (1).

A tumor metasztázis képzés vizsgálata során egér farok vénába injektáltak B16F10 melanóma sejteket és a tüdőben képződött metasztatizáló sejt-koloníák mennyiségét összehasonlították vad típusú és BRAF KO egerekben. (A B16F10 melanómasejteket széles körben használják tüdő érrendszerbe történő extravazáció

folyamatának vizsgálatára, mint modellrendszer). Azt tapasztalták, hogy a BRAF KO egerekben kevesebb melanóma sejt volt képes metasztatizálni a tüdőbe, mint a kontroll egerekben. Azt is megfigyelték, hogy permeabilitást növelő ágensek hatása (VEGF, hisztamin, trombin) elősegítette a B16F10 melanóma sejtek migrációját kontroll sejtekben, azonban BRAF-KO endotél sejtek esetében kevesebb melanóma sejt volt képes átjutni a sejtrétegen *in vitro* (1, 136).

A BRAF-hiányos sejtekben és ereken a permeabilitást növelő szerek hatékonysága csökken, ami az adhézios sejt-sejt kapcsolatok stabilizálódására utal, amelyért a RAF1/ROCKII szignalizáció felelős. Ezt a következtetést alátámasztja az a tény, hogy csak a RAF1-hez kötődni képes BRAF-fehérjék (dimerizáció kompetens mutánsok) képesek visszaállítani a permeabilitásra vonatkozó fenotípust az endotél sejtrétegben, valamint, hogy a BRAF és a RAF1 gének együttes kiütésének hatására az endotél sejtek fenotípusa a vad típusú sejtekéhez hasonló lesz. Tehát a BRAF, a RAF1 és a ROCK a permeabilitás ingerekből származó jeleket fogadja és integrálja, és ez molekuláris szinten a BRAF/RAF1 és a RAF1/ROCKII heterodimerek egyensúlyától függ, amely végső soron az endotél sejtek barrier funkciójának finomhangolásáért felelős (1).

PhD munkám során a fenti megfigyelések miatt fektettem nagy hangsúlyt az endotél sejt-sejt kapcsolatok szabályozásának megértésére humán endotél sejtekben és a permeabilitás változás háttérében húzódó molekuláris mechanizmusok feltérképezésére. Mivel a BRAF fehérje jelenlétének, illetve hiányának hatása az aktin citoskeletont szabályozó ROCK fehérje lokalizációjának és aktivitásának szabályozásával befolyásolja mind a permeabilitást, mind a metasztázis képzést egér endotél sejtekben, ezért a későbbi terápiás lehetőségek feltérképezéséhez a humán endotél sejtekben bekövetkező molekuláris szintű folyamatok azonosítása és szabályozásának megértése igen fontos.

2. Célkitűzések

PhD munkám során célul tűztem ki, hogy megértsem és feltérképezzem a BRAF fehérje szerepét az aktin citoskeleton dinamikájának szabályozásában humán endotél sejtekben. Munkám során megvizsgáltam, hogy az endotél réteg biokémiai (1), illetve mechanikai (2) stimulációjának hatására hogyan változik az aktin citoskeleton szerkezete és ez milyen hatással van az endotél sejt-sejt kapcsolatok dinamikus átrendeződésére, azaz a sejtréteg barrier funkciójára.

(1) Az endotél sejtréteg biokémiai stimulációjának vizsgálata során az alábbi specifikus kérdések megválaszolását tűztem ki célul:

1.1. A BRAF hasonló szereppel bír-e humán endotél sejtek esetén is a sejtréteg permeabilitásának változásában, illetve a melanoma sejtek transzmigrációjában, mint egér sejtekben?

1.2. Hogyan befolyásolja a BRAF a trombin stimulációval indukált aktin citoskeleton átrendeződését, illetve az ebben szerepet játszó fehérjék foszforilációját és lokalizációját?

1.3. A BRAF aktin citoskeleton átrendeződésében betöltött szerepe mennyiben köthető a RAF1-en keresztül történő ROCK, illetve a MEK/ERK útvonalbeli funkciójához?

(2) Az endotél sejtréteg mechanikai stimulációjának vizsgálata során az alábbi specifikus kérdések megválaszolását tűztem ki célul:

2.1. A sejtréteg megnyújtása során hogyan változik az aktin citoskeleton szabályozó fehérjék foszforilációja, milyen (izoforma-specifikus) szerepe van ebben a ROCK fehérjéknek? Hogyan változik a foszforilációs mintázat BRAF hiányában?

2.2. A sejtréteg megnyújtása során hogyan rendeződik át a sejtek aktin citoskeletonja, illetve az aktin citoskeleton szabályozó fehérjék és milyen szerepe van ebben a folyamatban a BRAF-nak?

2.3. A nyújtás hatására a sejtek között kialakuló rések mennyiségében van-e különbség BRAF jelenlétében és hiányában és ez milyen összefüggésben állhat az aktin citoskeleton átrendeződésével?

3. Anyagok és módszerek

3.1. A kísérletek során használt primer sejtek és sejtvonalak

Kísérleteink során humán köldökzsinór véna endotél sejtekkel (Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVEC) dolgoztunk. A HUVEC sejtek egy részét a Caltag Medsystem (UK) cégtől rendeltük, ezekre a sejtekre jellemző, hogy több köldökzsinór vénából izolált endotél sejtek keverékét tartalmazták. Mi magunk is izoláltunk HUVEC sejteket köldökzsinór vénából, amit a Semmelweis Egyetem II. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról kaptunk kísérleti célra.

A HUVEC sejtek transzfekciója nem elég hatékony az egyes fehérjék immunfluoreszcenciás jelöléséhez, ezért a különböző plazmidokat lentivírusok segítségével juttattuk be a HUVEC sejtekbe, amelyek előállításához HEK293T sejtvonalat használtunk. A humán A375 melanóma sejtvonallal segítségével vizsgáltuk e sejtek endotél rétegen keresztül történő transzmigrációjának hatékonyságát *in vitro* transzmigrációs esszéiben.

3.2. Sejtek tenyésztési körülményei, sejtek preparálása és tenyésztése

3.2.1. A HUVEC sejtek tenyésztési körülményei

A HUVEC sejtek tenyésztése során komplett MCDB médiumot használtunk, amely 5% FBS-t, 1% Penicillin-Streptomycin-t, 1% Chemically Defined Lipid Concentrate-t, 1% HEPES-t, 1% GlutaMAX-ot, 0,3% Insulin-Transferrin-Seleniumot, 1 ng/mL fibroblaszt növekedési faktort, 2 ng/mL EGF-t, 7,5 U/ml heparint, 5 µg/mL C-vitamint és 250 nM hidrokortizont tartalmazott. A HUVEC sejtek esetében fontos volt, hogy alacsony passzázs-számmal dolgozzunk (4-5), mert a sejtek magasabb passzázs-számnál elvesztik az endotél sejtekre jellemző tulajdonságaikat.

Az endotél sejtek esetében a passzálás egyik lépésénél, illetve konfokális mikroszkópos méréseknél K2 médiumot használtunk, amely HBSS-t, 5% FBS-t, 1% HEPES-t és 1% Penicillin-Streptomycin-t tartalmazott.

A HUVEC sejtek kezelése során egy speciális alacsony szérumtartalmú médiumot, AIMV-t használtunk, amely 1% FBS-t, 1 ng/ml bFGF-t, 2 ng/ml EGF-t és 7,5 U/ml heparint tartalmazott. A kezelések előtti este lecseréltük a médiumot 1:1 arányban a komplett MCDB-vel, erre azért volt szükség, hogy a sejtek adaptálódni tudjanak az

alacsony szérumszertartalmú AIMV médiumhoz és a hirtelen FBS megvonás ne okozzon sejthalált. Másnap 1 órán át AIMV-ben tartottuk a sejteket és ezt követően kezdtük meg a sejtek kezelését.

3.2.2. HUVEC sejtek preparálása

A HUVEC sejtek preparálása során a köldökzsinórt az izolálás megkezdéséig 4°C-on fiziológias sóoldatban tároltuk. Első lépésként a köldökzsinórt fiziológias sóoldatban megmostuk, majd pedig 70%-os etanolban fertőtlenítettük és ezt követően ismét fiziológias sóoldatban öblítettük át. A következő lépésként a leghosszabb lefogásmentes részt kiválasztottuk, aminek minimum 10 cm hosszúnak kellett lennie és enyhe húzás mellett a két végéből 2-2 cm levágtunk, majd mindkét végébe kanült helyeztünk. A köldökzsinórt a két végében lévő kanül segítségével átmostuk steril PBS-el (Gibco/Invitrogen), majd ezt követően kollagenáz oldatot (1 mg/ml, Gibco/Invitrogen, és a kollagenázt PBS-ben oldottuk be) folytattunk a köldökzsinórba és 20 percig 37°C-on inkubáltuk. Az inkubációs időt követően K2 médiummal mostuk ki a kollagenáz oldatot, amely már tartalmazta az érfalból leoldott endotél sejteket. A kinyert oldatot a köldökzsinórból egy falkon csőbe gyűjtöttük össze és lecentrifugáltuk 1200 rpm-en 6 percig. A centrifugálást követően a felülúszót eltávolítottuk, a pelletben található sejteket megszámlálva MCDB médiumban T25-ös sejtenyésző flaskában (Corning) vettük fel, aminek a felületét előtte 15 percig 0,5%-os zselatinnal (Sigma) 37°C-on termosztátban inkubáltuk, hogy a sejtek letapadását elősegítsük. A zselatin leszívását követően a sejteket flaskába szélesztettük, sejt kultúrában tartottuk és növesztettük, folyamatosan ellenőrizve morfológiájukat és állapotukat mikroszkópban.

3.2.3. HUVEC sejtek tenyésztése

A HUVEC sejtek passzálása során először eltávolítottuk a komplett MCDB médiumot, majd T25-ös sejtenyésző flaska esetén kétszer 2 ml PBS-el átmostuk a flaskában a sejteket. Ezt követően 1 ml tripszin (Gibco/Invitrogen) hozzáadásával megszüntettük a sejtek közötti, illetve a sejt és a hordozó közötti kapcsolatot, amelynek során a sejtek elengedték a flaska alját. A sejtekhez adott tripszint 1-2 percig inkubáltuk a termosztátban. Ezt követően a tripszinhez képest ötszörös térfogatú K2 médiummal állítottuk le a reakciót, 15 ml-es falkon csőbe összegyűjtöttük a sejteket és 1200 rpm-en

6 percig centrifugáltuk, majd MCDB médiumban felszuszpendálva, a megfelelő sejtszám beállítását követően növesztettük tovább T25-ös flaskában.

3.2.4. HEK293T sejtvonal tenyésztési körülményei

A HEK293T sejtvonalat komplett DMEM-ben tenyésztettük, a DMEM összetevői: 10% FBS, 10 mM L-glutamin, 1% Penicillin-Streptomycin. A HEK293T sejtvonal tenyésztésekor a komplett médium eltávolítását követően a T25-ös flaskában tenyésztett sejteket kétszer 2 ml PBS-el mostuk, majd a HUVEC sejtekhez hasonlóan tripszinezttük és komplett DMEM-ben vettük fel, ezt követően a megfelelő sejtszámban vittük tovább.

3.2.5. A375 melanóma sejtvonal tenyésztési körülményei

Az A375 sejtvonalat komplett DMEM-ben tenyésztettük, amely 10% FBS-t, 10 mM L-glutamint, 1% Penicillin-Streptomycin-t tartalmazott. Primer sejteket és a sejtvonalakat 37°C-on 5 % CO₂ mellett termosztátban növesztettük.

3.3. Géncsendesítés siRNS és shRNS technika segítségével

A BRAF, ROCKI és ROCKII fehérjék génjét csendesítettük az endotél sejtekben siRNS transzfekció segítségével, illetve a BRAF esetén shRNS technikát is alkalmaztunk, hogy feltérképezzük az aktin citoszkeleton szabályozásában betöltött szerepüket.

3.3.1. siRNS transzfekció HUVEC sejtekben

Az siRNS transzfekciót T25-ös sejtenyésztő flaskában vagy 6-well plate-en végeztük el, attól függően, hogy mennyi sejtre volt szükségünk a kísérlethez.

2. táblázat. A géncsendesítéshez használt reagensek. A táblázat az siRNS transzfekciós keverékek összetételét mutatja különböző sejtenyésztő edényre vonatkozó mennyiségekkel. A transzfekciós keveréket a sejtenyésztő flaskában lévő OPTI-MEM-hez adtam 20 perc inkubációt követően. A 6-well plate esetén 800 µl OPTI-MEM-be kevertem bele, míg a T25 flaskában 2 ml OPTI-MEM-be.

	Reagensek	6-well plate	T25 flaska
Transzfekció összetevői	OPTI-MEM	200 µl	500 µl
	RNAiMAX	6 µl	12 µl
	siRNA (20 µM)	1,25 µl	3,1 µl

Az siRNS transzfekció során az siRNS-t és a transzfekciós reagenst (RNAiMAX) először külön-külön Eppendorf csőben összekevertem OPTI-MEM médiummal (a mennyiségeket a 2. táblázat tartalmazza), majd az siRNS-t tartalmazó

OPTI-MEM teljes mennyiségét hozzáadtam a RNAiMAX-ot tartalmazó OPTI-MEM médiumhoz, összekevertem és 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltam steril fülke alatt. Az inkubációs idő közben a T25-ös sejtenyészítő flaskát 2-szer mostam 2 ml PBS-el majd pedig 2 ml OPTI-MEM médiumot tettem a sejtekre. Az inkubációs idő elteltével óvatosan a sejtekre csepegtettem az siRNS-transzfekeciós reagens keveréket (pl. 500 µl /T25). Minden kísérletben volt egy kontroll siRNS és a kísérletben csendesíteni kívánt fehérje siRNS-e, vagy azok kombinációja (siBRAF, siROCKI, siROCKII, siROCKI + siROCKII). Ezt követően 4 órán keresztül inkubáltam a sejteket a transzfekeciós keverékkel, majd kétszer mostam 2 ml PBS-el és 1 ml tripszin segítségével tripszineztem a sejteket. Ezt követően 5 ml K2 médiummal leállítottam a reakciót, lecentrifugáltam a sejteket (1200 rpm-en, 6 percig szobahőmérsékleten) és MCDB médiumban felvettem a kísérletnek megfelelő sejtkoncentrációban és térfogatban.

3.3.2. shRNS transzdukció HUVEC sejteken

Az endotél sejtek nagyon nehezen transzfekektálhatóak még lipofektamin alapú transzfekeciós reagenssel is, ezért az shRNS-t tartalmazó plazmidokat vírusinfekcióval juttattam be a sejtekbe. Az shRNS technika előnye az siRNS technikával szemben, hogy egy olyan plazmidot transzfekektálunk, amely az shRNS mellett egy EGFP-t kódoló szakaszt is tartalmaz. Így azokat a sejteket, amelyekben az shRNS expresszálódik, az EGFP expresszió alapján azonosítani tudjuk. Ezzel a technikával hosszabb távú hatást tudunk elérni, azaz az RNS csendesítés hosszabb ideig fenntartható, azonban a hátránya, hogy a transzfekeció hatékonysága limitálja az shRNS expresszióját. A vírusinfekció lépései mindig ugyanazon a napon zajlottak, hogy a sejtek mindig ugyanolyan körülmények között legyenek és ugyanolyan állapotban. A lentivírus előállításához három, a vírus különböző komponenseit expresszáló plazmidot, és az shRNS-ünket tartalmazó plazmidot ko-transzfekecióval juttattam be a HEK293T sejtekbe. A lentivírus komponenseit expresszáló plazmidok: pMDLg/pRRE (a vírus *gag* és *pol* fehérjéit kódoló gének mellett tartalmazza az RRE fehérjét kódoló gént), pRSV-Rev (Rev fehérjét kódoló gént tartalmazza, amely az RRE-hez kötődve szabályozza a *gag* és *pol* fehérjék expresszióját), CMV-VSV-G (burokfehérjét kódoló gént tartalmazó plazmid).

A transzfekeciót megelőző napon $2,8 \cdot 10^6$ HEK293T sejtet tettem ki T25-ös flaskába. Másnap egy kationos polimer transzfekeciós reagenssel, a polietilén imin (PEI) segítségével transzfekektáltam a sejteket. 200 µl szérumentes DMEM-ben összekevertem

4 µg plazmid konstruktot, 1,5 µg VSV-G, 0,75 µg Rev és 0,75 µg RRE vírus plazmidot 1:2 arányban egy eppendorf csőben (7 µg plazmidhoz 14 µl PEI-t használtam) és a keveréket 15 percig inkubáltam szobahőmérsékleten a steril fülke alatt. Az inkubációs idő alatt a HEK293T sejtekről óvatosan eltávolítottam a komplett DMEM médiumot, mostam egyszer 2 ml PBS-el, majd pedig 2 ml üres (szérummentes) DMEM médiumot adtam hozzá és a 15 percet követően a plazmid-PEI keveréket cseppenként a sejtekhez adtam. Majd 3-4 óra elteltével lecseréltem a médiumot komplett MCDB-re. Egy napot álltak a HEK293T sejtek MCDB médiumban, közben a konfokális mikroszkóp segítségével ellenőriztem az infekció hatékonyságát. Majd 48 órát követően 0,45 µm-es steril szűrőn átszűrtem a sejtek felülúszóját és betöményítettem a HEK293T sejtek médiumában jelen lévő vírust a Lenti-X™ Concentrator segítségével. A vírustöményítés során először 1:3 arányban összekevertem a lentivírus koncentrátumot a sejtekről leszűrt vírus felülúszóval, majd 1 órát jégen a hidegszobában (4°C-on) inkubáltam és ezt követően 45 percig 4°C-on, 1500xg sebességgel lecentrifugáltam. A pellet tartalmazta a betöményített vírust, amit MCDB médiumban szuszpendáltam fel, hogy egy hatékonyabb vírus infekciót tudjak elérni. A centrifugálás alatt előkészítettem a HUVEC sejteket a megfelelő sejtszámban MCDB médiumban, illetve előkészítettem kísérlettől függően a sejtenyészítő flaskát vagy 6-well plate-t. A HUVEC sejteket általában 1:1 térfogatarányban kevertük össze a betöményített vírussal, hozzáadtunk a keverékhez 3 µl 10 mg/ml-es polybrene-t (T25-ös flaska használata esetén, 200 000 HUVEC sejtszámmal dolgoztunk) és 24 órán át inkubáltam a sejteket a vírussal. Amikor két vírussal egyszerre infektáltam, akkor az arányokat úgy állítottam be, hogy mindkét vírus elég hatékony legyen. Másnap a HUVEC sejtekről eltávolítottam a médiumot, majd T25-ös flaska esetén kétszer 2 ml PBS-el mostam a sejteket, ezután 2 perc tripszinezést követően K2 médiummal állítottam le a reakciót és számoltam meg a sejteket és vettem fel a kísérletnek megfelelő koncentrációban, MCDB médiumban. Az shRNS technikával a BRAF fehérje génjét csendesítettem, illetve a sejteket shKontroll plazmiddal is kezeltem, hogy kizárjam a transzfekciós reagens, illetve a transzfekció hatásából adódó különbségeket.

3.3.3. HUVEC sejtek transzdukciója Lifeact-mCherry plazmiddal

Az shRNS technika segítségével Lifeact-mCherry plazmidot juttattam be a HUVEC sejtekbe az shBRAF és az shKontroll plazmidokkal együtt és technikailag

ugyanúgy készítettem el a transzdukció folyamatát, valamint a mennyiségek is megegyezők az előző fejezetben leírtakhoz. A Lifeact egy rövid aktin-kötő peptid, amely F-aktin struktúrát teszi láthatóvá számunkra élő és fixált eukarióta sejtekben fluoreszcens mikroszkópia segítségével. Az általunk vizsgálni kívánt aktin citoskeleton átrendeződését teszi lehetővé számunkra BRAF fehérje jelenlétében és hiányában.

3.4. Az endotél sejtek kezelése trombinnal és inhibitorokkal

3.4.1. Az endotél sejtek kezelése trombinnal

Az endotél sejtek siRNS/shRNS kezelését trombin kezeléssel kombinálva is elvégeztem kísérleteimben. A HUVEC sejteket az siRNS/shRNS kísérletek során 48 órát inkubáltam és ehhez igazítottam a sejtek kezelését trombinnal. A 48 óra eltelte után a trombin kezelést megelőző este lecseréltem a sejtek médiumát 50-50%-os komplett MCDB és AIMV keverékre, majd másnap reggel a kezeléseik előtt a sejteket 1 órán át AIMV médiumban tartottam és ezután inkubáltam a sejteket 1 U/ml trombinnal 0, 2, 5, illetve 15 percig.

3.4.2. Az endotél sejtek kezelése inhibitorokkal (Y27632, U0126)

Az endotél sejteket kétféle inhibitorral is kezeltem, egy ROCK inhibitorral (Y27632) és egy MEK inhibitorral (U0126). A HUVEC sejtek inhibitorral történő kezelésének idejét igazítottam az siRNS transzfekció hatékonyság maximumához, ami 48 óra volt és ezzel egyidejűleg a trombin kezeléseikhez is. Mindkét inhibitor 10 μ M-os koncentrációban alkalmaztam 1 órán át. A trombin kezeléseik előtti 1 órás AIMV kezelés során az AIMV médiumhoz adtam az inhibitor, illetve a DMSO-t (dimetil-szulfoxid, amiben az inhibitorok törzsoldata készült). A trombin stimulációt ezt követően indítottam el.

3.5. Transzmigrációs esszé

$6 \cdot 10^4$ HUVEC sejtet tettünk ki zselatinnal bevont speciális 96 lyukú plate-re, amelynek az alján 8 μ m átmérőjű pórusok találhatóak (Cat# 89089-938, VWR). Majd 48 órán keresztül tenyésztettük a sejteket a plate-n és egy éjszakán át 50-50%-os MCDB-AIMV médiummal kezeltük elő a sejteket, hogy adaptálódjanak a másnap következő 1 órás AIMV médiumban történő éheztetéshez. A kamra alsó részében lévő médium a HUVEC sejtek növekedési médiuma volt (MCDB). A kamra felső részében Oregon

Green festékkel (Cat# C34555, ThermoFisher Scientific) festett A375 melanoma sejteket tettünk ($1 \cdot 10^5$) és 4 órán át inkubáltuk trombinnal (3 U/ml) vagy anélkül. Az endotél sejtrétegen átjutott, transzmigrált sejteket a kamra alsó részéből sejtdiszociációs puffer (5 mM EDTA PBS-ben) segítségével leszedtük, és a fluoreszcencia intenzitását CLARIOstar eszközzel mértük (BMG LABTECH, gerjesztés: 483 nm, emisszió: 530 nm). A sejtréteg integritását narancssárga CellMask festéssel (Cat# C10045) határoztuk meg.

3.6. Western blot analízis

Kísérleteink során a különböző fehérjék foszforilációjának időbeli változásait, illetve a géncsendesítések hatékonyságát western blot analízis segítségével ellenőriztem. Az endotél sejtek líziséhez használt puffer összetételét a 3. táblázat mutatja.

3. táblázat. A western blot analízishez készített lízis puffer. A lízis puffer elkészítéséhez használt törzsoldatok és a pufferben lévő összetevők koncentrációja. A lízis puffert az összemérés alatt és után is jégen tartottam.

Törzsoldatok	Összetevők koncentrációja
5M NaCl	150mM NaCl
0,2M NaPPi	10 mM NaPPi
1M HEPES	25mM HEPES
0,5M EGTA	1mM EGTA
0,5M NaF	10mM NaF
100 mM Na ₃ VO ₄	5 mM Na ₃ VO ₄
100 mM PMSF	1 mM PMSF
PIC (proteáz inhibitor koktél, EDTA nélkül, Sigma) (25x hígítás)	PIC (1x)
100 % glycerol	10 % glycerol
10% NP-40	1% NP-40

A sejtek lízise előtt a sejteket kétszer PBS-el mostam, majd lízis puffert-t (6 well plate esetén 1 ml PBS, 200 µl Puffer A) mértem rá és 1-2 percig inkubáltam a sejteket a pufferrel. Az inkubációs idő elteltével összegyűjtöttem a sejtlyizátumokat eppendorf csövekbe és lecentrifugáltam 5000xg sebességgel, 5 percig 4°C-on. Ezután a felülúszókat átmerem új eppendorf csövekbe és folyékony N₂-ben lefagyasztottam, a western blot analízisig -80°C-on tároltam a lizátumokat.

A mintákban a fehérjéket 12%-os SDS-PAGE gél elektroforézis segítségével választottam szét, majd ezt követően PVDF membránra blottoltam. A blottolást követően a fehérjék molekulatömege alapján szétvágtam a membránt és ezután 5%-os sovány tejport tartalmazó TBS-Tween (25 mM Tris, 0,16 M NaCl, 0,1% Tween 20) oldatban blokkoltam 1 órán keresztül. A blokkolást követően háromszor mostam TBS-Tween pufferrel és az elsődleges ellenanyagban inkubáltam egy éjszakán át. Másnap az elsődleges ellenanyagot visszamentve a falkon csőbe háromszor 5 percig TBS-Tween-nel mostam a membránokat, majd az elsődleges ellenanyaghoz tartozó HRP-konjugált anti-nyúl vagy anti-egér másodlagos ellenanyaggal inkubáltam (1:4000-hez arányban) 1 órán át. Az inkubálást követően háromszor 10 percig TBS-Tween-ben mostam a membránokat és ECL Western blotting Substrate alkalmazásával, Amersham Hyperfilm ECL (GE healthcare) film segítségével detektáltam a kemilumineszcens reakció során jelentkező fénykibocsátást. A 4. táblázatban felsorolt elsődleges és másodlagos ellenanyagok segítségével immunfestettem a membránt a gyártó által megadott protokoll alapján. Ezt követően a Western blotot denzitometriás analízis segítségével értékeltem ki, az ImageJ program segítségével, az adatokat Prism4 v4.01 (GraphPad Software) szoftverrel dolgoztam fel. A western blot analízis során az ImageJ programban elvégzett denzitometriás analízisből kapott értékeket meghatároztuk a fehérje foszforilált formájára, illetve a teljes fehérjére, majd a foszforilált fehérjék mennyiségét normalizáltuk a teljes fehérje mennyiségre. Legalább 3 párhuzamos mérés esetén nem úgy történt a normalizálás, hogy minden egyes adatsor esetén a kiindulási adatpontot vettük 1-nek, hanem a három adatsort normalizáltuk először egymáshoz (mivel minden egyes körülmény esetén ugyanúgy van kísérleti hiba), és ezután a kiindulási adatpontok átlagát vettük 1-nek.

4. táblázat. A fehérje expresszió és foszforiláció detektálása. Western blot analízishez használt elsődleges és másodlagos ellenanyagok és hozzá tartozó hígítási arányok.

Elsődleges ellenanyag	Forrás	Hígítások	Másodlagos ellenanyag
BRAF	Cat# 14814S Cell Signaling	1:1000	Cat#705-035-003 Jackson ImmunoResearch

ROCKI	Cat# 611136 BD Bioscience	1:500	Cat#705-035-003 Jackson ImmunoResearch
ROCKII	Cat# 610623 BD Bioscience	1:500	Cat# 115-035-003 Jackson ImmunoResearch
ROCK	Cat# 04-841 Merck (Millipore)	1:500	Cat#705-035-003 Jackson ImmunoResearch
aktin	Cat# sc-1616 Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Cat#705-035-003 Jackson ImmunoResearch
GAPDH	Cat# 97166S Cell Signaling	1:2000	Cat# 115-035-003 Jackson ImmunoResearch
ERK	Cat# 9102 Cell Signaling	1:1000	Cat#705-035-003 Jackson ImmunoResearch
pERK	Cat# 9101 Cell Signaling	1:1000	Cat#705-035-003 Jackson ImmunoResearch
cofilin	Cat# 5175S Cell Signaling	1:1000	Cat#705-035-003 Jackson ImmunoResearch
p-cofilin	Cat# 3313S Cell Signaling	1:1000	Cat#705-035-003 Jackson ImmunoResearch
MLC	Cat# 85005S Cell Signaling	1:1000	Cat#705-035-003 Jackson ImmunoResearch
pMLC	Cat# 3674S Cell Signaling	1:1000	Cat#705-035-003 Jackson ImmunoResearch
RhoA	Cat#2117S Cell Signaling	1:1000	Cat#705-035-003 Jackson ImmunoResearch

3.7. Az endotél sejtek immunfluoreszcenciás jelölése

Az immunfluoreszcens festések során a sejtek kezelését és/vagy meghúzását a sejtek fixálásával állítottam le, 4%-os paraformaldehid oldat (Image-iT™ Fixative Solutions) alkalmazásával, 15 percig 37°C-on. A fixálást követően a mintákat háromszor mostam PBS-el, majd a mosást követően permeabilizáltam (0,25% Triton X-100 TBS-Tween oldatban) 10 percig szobahőmérsékleten. A permeabilizálást követően HBSS oldattal mostam a sejteket és ezután 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltam a blokkoló oldattal (1%-os BSA TBS-Tween oldatban). Ezt követően elsődleges ellenanyaggal (VE-Cadherin – 1:400, pMLC – 1:200; MLC-1:200, PECAM-1-1:2000, p-Cofilin-1:100, Cofilin-1:200) inkubáltam a mintákat 4°C-on egy éjszakán át. Másnap reggel a mintákat az elsődleges ellenanyag eltávolítását követően háromszor mostam TBS-Tween oldatban és ezt követően 1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltam a másodlagos ellenanyaggal. Az elsődleges és másodlagos ellenanyagok mindegyikét a blokkoló oldattal hígítottam a protokollnak megfelelő hígítási arányban, amely a másodlagos ellenanyagok (Chicken anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 és Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 546) esetén 1:2000 volt. Ezt követően háromszor mostam a mintákat TBS-Tween oldatban, majd pedig egyszer PBS-ben és ezután 2 percig szobahőmérsékleten inkubáltam hoechst festékekkel (PBS-ben beoldva, 1:1000 arányban), valamint Alexa647-jelölt falloidinnel (blokkoló oldatban, 1:1000-hez arányban). Ezt követően a mintákat kétszer mostam PBS-el és utána mounting Dabco (1 ml 1%-os BSA, 1 ml glicerin és 20 µl Dabco) oldatot mértem a sejtekre, ezzel csökkentve a festék fotooxidációját (fakulását). Immunfluoreszcens festést követően konfokális mikroszkóp segítségével felvételeket készítettem a fixált endotél sejtrétegről. A gerjesztés és az emisszió specifikus hullámhossz tartományait az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat. A konfokális mikroszkópos felvételek készítése során használt lézerek és a hozzájuk tartozó emissziós spektrumok tartományai.

Fluorofór molekula	Hoechst	Alexa Fluor 488	Alexa Fluor 546	Alexa Fluor 647
Gerjesztés (nm)	405	488	561	640
Emisszió (nm)	415-470	505-551	575-620	650-730

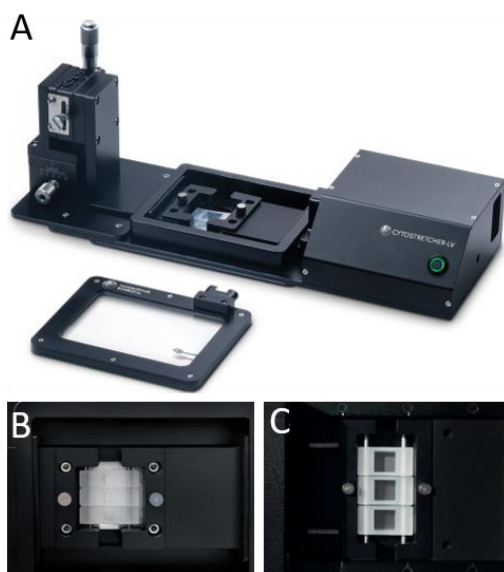
3.8. Permeabilitás mérés

A permeabilitás vizsgálatokat egy módosított XPerT technika segítségével végeztük el Cervenak László és munkatársaival együttműködésben. Konfluens HUVEC sejtréteget siRNS kezelés után egy 96 lyukú plate lyukaiba osztottuk szét, amit előzetesen 250 µg/ml biotinilált-zselatinnal vontunk be. A sejteket AIMV tápfolyadékban tenyésztettük 2 napig. Trombin kezelést (3 U/ml) követően Alexa488-kapcsolt streptavidint (2 µg/ml, Life Technologies) adtunk minden egyes lyukhoz. 2 perces inkubálás után a sejteket 1%-os paraformaldehid-PBS-szel fixáltuk, és minden egyes lyukról két képet készítettünk egy Olympus IX-81-es készülékkel fluoreszcens mikroszkóp és egy Olympus XM-10 kamera segítségével. A festett terület nagyságát, amely a sejtek közötti üres (sejttel nem lefedett) terület nagyságát jellemzi, minden egyes képnél meghatároztuk a CellP szoftver (Olympus) segítségével végzett kvantitatív képelemzéssel. Így értékeltük ki a 13. ábrán látható eredményeket.

3.9. Az endotél sejtek megnyújtása a cytostretcher eszköz segítségével

Az endotél sejtek megnyújtását egy speciális eszköz, a Cytostretcher LV (Curi Bio, korábbi nevén Nanosurface Biomedical cég, Seattle, USA) segítségével végeztem el. Kísérleteim során a sejthúzáskor kétféle méretű flexibilis sejt kamrát használtam (Curi Bio, korábbi nevén Nanosurface Biomedical, Seattle, USA) attól függően, hogy a sejteket lizáltam a nyújtás után, vagy konfokális mikroszkópos felvételeket készítettem a sejtekről. A western blot analízishez a közepes méretű sejt kamrát használtam (12 mm x 12 mm), erre $4,5 \cdot 10^5$ sejtet tettem ki. A kisméretű kamrát (5 mm x 5 mm), amire $4,35 \cdot 10^4$ sejtet tettem ki, az élő sejtek megnyújtására és a fixált sejtek fluoreszcencia analízisére használtam. A sejtek nyújtását élőben követtem a konfokális mikroszkóp segítségével és a fixált sejteken a fluoreszcencia analízist is szintén így detektáltam. A kamrák előkészítése mérettől függetlenül azonos módon történt. Első lépésként a kamrák alját 0,2 mg/ml polidopamin oldattal (dopamin hidrokloridot 10 mM TRIS, pH 8.5 pufferben oldottam be) kezeltem 2,5 órán keresztül szobahőmérsékleten, amely során a kamra hidrofób felülete hidrofillé vált. Ezt a lépést követően steril desztillált vízzel háromszor átmostam a kamrákat és 0,5%-os zselatinnal kezeltem a kamrák alját, 1 órán keresztül 37°C-on, hogy a sejtek kitapadását segítse a kamra aljához, majd ismét háromszor mostam steril desztillált vízzel és ezt követően tettem ki a sejteket a kamrákra.

A sejtek nyújtásának mértékét a Curi Bio cég által készített kalibrációs görbe segítségével állítottam be. Ellenőrzésképpen a sejtek hosszát a nyújtás irányában nyújtás előtt és a megnyújtást követően is lemértem. A megnyújtások a készüléken eltérőek voltak a kamra méretétől függően, a kisebb kamrán 5 mm felett meg a 30%-os nyújtásnak, nagyobb kamrán pedig 6 mm volt ugyanekkora megnyúlás. A sejtek nyújtásának sebessége 0,5%/másodperc és különböző ideig (0-tól 60 percig különböző időpillanatokig) tartottuk nyújtva a készülék segítségével, amit Curi Bio NaOMI szoftveren keresztül tudunk programozni. Kísérleteink során 15-30%-kal nyújtottam meg a sejteket és ezt követően vagy lizáltam és western blot segítségével analizáltam bizonyos fehérjék foszforilációs állapotát, vagy pedig konfokális mikroszkóp segítségével követtem az aktin citoskeleton szabályozó fehérjék lokalizáció változását. A mintákról STED szuperfelbontású mikroszkóppal (Expertline, Abberior Instruments, Göttingen Germany) készítettem felvételeket, konfokális módban, Abberior szoftver segítségével.



12. ábra. A sejthúzó készülék. A: Cytostretcher készülék és **B:** kisebb méretű kamra (5 mm x 5 mm) és **C:** nagyobb sejthúzó kamra látható (12 mm x 12 mm).

3.10. Élő és fixált sejteken készült konfokális felvételek

Az élő és fixált sejteken történő felvételek során az endotél sejteket a cytotretcher kamrára tettem ki, ahol összefüggő sejtréteget alkottak, ezt mindig ellenőriztem mikroszkóp segítségével. A felvételek levegős 20-szoros nagyítású objektívvel (Nikon Eclipse Ti2, numerikus apertúra: 0.75) készültek, a terület 210 μm x 210 μm volt

(felbontása 1050 x 1050 pixel). Az élő és a fixált sejteket úgy vizsgáltam meg, hogy a cytoskeleton készüléket rögzítettem a konfokális mikroszkópra, amely lehetővé tette, hogy az élő sejteken történő mérés közben az F-aktin és aktin citoskeleton szabályozó fehérjék átrendeződését valós időben tudjam követni. A fixált sejtekről is így készítettem mikroszkópos felvételeket. Az élő sejt mérésakor a megnyújtás előtt 10 percig folyamatosan követtem a sejtek mozgását, mechanikai perturbáció nélkül, hogy a sejtek mozgását feltérképezsem. A meghúzást követően pedig 30-60 percen keresztül követtem a fluoreszcens jelek változásait. A meghúzás előtt és után is a felvételeknél z-stack-et vettem fel, z-irányban összesen 7 μm -es magasság tartományban 1 μm -ként készült képek a sejtselektokról. Egy z-stack felvétele 2 percet vett igénybe. A felvételek végén az ImageJ program segítségével a z-ben felvett képekből a maximális intenzitás alapján összeadtam a különböző stack-ekben rögzített fluoreszcens intenzitásokat és a későbbiek során a 2 percnként rögzített, összegzett képekből videókat tudtam készíteni a Fiji program segítségével.

3.11. Kinepict szoftver

A Kinepict Health Kft. orvostechikai eszközfejlesztéssel foglalkozik (<https://kinepict.com/>), megreformálták a röntgensugarat felhasználó vizsgálatokat, s megalkották a mozgásalapú képfeldolgozást, amelynek a lényege, hogy kisebb röntgenterhelés és kontrasztanyag-használat mellett a korábbinál szebb és részletgazdagabb felvételek készülhessenek (<https://vascupedia.com/product/kinepict-medical-imaging-tool-v5-1/>).

Kísérleteimben az aktin reorganizációs kinetikában mutatkozó különbségek vizuális ábrázolását Kinepict szoftver segítségével a megnyújtás után készült felvételek felhasználásával készítettük el. Kísérletünk során meghatároztuk azt az időt, amikor a nyújtás által kiváltott fluoreszcencia-intenzitás változás minden egyes pixelben elérte az adott pixelben megfigyelt maximális intenzitás változás felét, amit effektív félidőnek nevezünk el. Az algoritmus nem tesz különbséget, hogy növekedés vagy csökkenés következett-e be a fluoreszcencia intenzitásában. Az effektív félidők ezután színekódolt képek formájában jelennek meg, a pixelek színei a pirostól (gyorsabb változások) a kékig (lassabb változások) terjednek (37. ábra). Az algoritmus azonban a sejtek mozgását is felismeri, mint a fluoreszcencia intenzitásának növekedését vagy csökkenését a mozgás közbeni pixeleltolódás miatt.

3.12. AFM/Epifluoreszcens mikroszkóp

A fluoreszcensen jelölt HUVEC sejteken a kísérleteket epifluoreszcens mikroszkóp (Olympus, IX81) és AFM kombinációjával végeztük el. A mintát egy speciális tárgyasztalra helyeztük, amely az AFM része (MFP-3D, Asylum Research, Santa Barbara, CA). A rendszer alsó részén egy mechanikusan mozgatható tárgyasztal található, amely az AFM fej mozgását teszi lehetővé az optikai tengelyhez képest. A felső mozgatható rész egy XY irányú-piezo rész, amely segítségével összehangolható az epifluoreszcens mikroszkóp és az AFM képalkotása, hogy ugyanazt a területet egyszerre tudjuk vizsgálni. Az AFM képalkotás minden esetben kontakt módban történt, MFP-3D AFM készülékkel, MSCT-A rugólapkát (Bruker) használtunk. Az erőmérések megkezdése előtt az AFM szoftvere által irányított termikus kalibrációval határoztuk meg a rugóállandót (70 pN/nm). A képalkotás és az erőspektroszkópiai mérések is szabályozott hőmérsékleten, 37°C-on PBS-ben történtek. Az AFM mérések kezdeti lépéseként az epifluoreszcens mikroszkóp segítségével megkerestük a megfelelő területet. Az shRNS-t kódoló plazmidban volt egy EGFP-t kódoló szakasz, így zölden világítottak azok a sejtek, amelyek felvették az shRNS-t. Az AFM mérésekkor 100 erőgörbét vettünk fel az endotél sejtek perifériás részéről, illetve a sejtmagi részről is, 3 μm x 3 μm területet választva. A rugólapkát 1 $\mu\text{m}/\text{s}$ sebességgel mozgattuk. Az erőgörbékre az alkalmazott piramidális tű miatt a Rico-féle modellt illesztettük (137). Az élő sejtek AFM képalkotását trombin kezelés nélkül is elvégeztük, kísérleti körülmények AIMV médiumban, 37°C-on. Mivel a merevség hőmérsékletfüggő, ezért ugyanazon a hőmérsékleten akartuk összehasonlítani a fixált és élő sejtek merevségét.

3.13. Fluoreszcencia intenzitás kvantifikálása

A konfokális mikroszkóp által kapott felvételek esetén egyes fehérjék (cofilin, p-cofilin) fluoreszcencia-intenzitását (FI) az ImageJ 1.53c programmal számszerűsítettük. A sejt perifériáját 0,8-as skálafaktor segítségével határoztuk meg (mind az x és y irányban is) az ImageJ programban. Ez a skálafaktor két részre osztotta a sejt területét oly módon, hogy a periféria és a központ közötti terület arány 1:2 legyen. A FI értékét meghatároztuk a sejt egész területére (a PECAM membránfestéssel készült kompozit képet használva a sejt körvonalának meghatározásához) és a sejt közepén (a 0,8-as skálafaktort használva). Ezután a centrumban mért FI-t kivontuk az "egész sejt"

FI-jából, hogy megkapjuk a periférián lévő FI-t. A mért (centrum, I_c) vagy számított (periféria, I_p) FI-ek értékeit a megfelelő területre normalizáltuk és az arányt (I_p/I_c) a periféria és a centrum FI-jének (a területre normalizált) arányát minden egyes sejtre kiszámítottuk. Az arány kiszámításához minden körülmény esetében legalább 15 sejtet használtunk. Az adatok minden ábrán biológiai ismétlések átlaga \pm SEM értékeként szerepelnek. A statisztikai elemzéseket a GraphPad Prism 4 (4.01-es verzió) segítségével végeztük. A szignifikanciát a Microsoft Excelben végzett kétmintás t-próbával határoztuk meg. A csoportok közötti különbségeket akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, ha $p < 0.05$.

3.14. A sejt-sejt kapcsolatok hosszának és a rések méretének kvantifikálása

A csomópontok hosszának és a rés méretének meghatározása a következőképpen zajlott. A csomópontok (sejt-sejt kapcsolatok) hosszát a plazmamembrán festése alapján határoztuk meg (DeepRed Cellmask Tokyo Japan), a Fiji program segítségével. A rések méretét (területét) szintén a plazmamembrán festés segítségével analizáltuk. A fényerő beállítása után (jól azonosíthatók legyenek a sejtek közötti rések), a fluoreszcencia intenzitás küszöbértékét úgy állítottuk be, hogy a képet binárisá alakítva a rések feketeként jelenjenek meg a fehér háttéren. Majd a Fiji programban a Particle Analysis plugin segítségével számszerűsítettük és összegeztük azokat a fekete területeket, ahol az EGFP expresszió alapján kontroll-kontroll vagy shBRAF-shBRAF sejt találkozott. Az ilyen sejtkapcsolatok esetén a sejtkapcsolatok hosszát is megmértük. A rések kvantifikálásnál kapott területet elosztottuk a sejtkapcsolatok hosszával minden kép esetén. Csak a $200 \mu\text{m}^2$ méretnél kisebb réseket használtuk fel a számításhoz.

4. Eredmények

4.1. BRAF szabályozza az endotél sejt-sejt kapcsolatok erősségét

PhD témám kiindulási pontjaként szolgált az a korábbi megfigyelés, hogy a BRAF fehérjének fontos szerepe van az egér endotél sejt-sejt kapcsolatok szabályozásában, így befolyásolva az endotél sejtréteg átjárhatóságát, aminek szerepe van például a leukocita transzmigráció folyamatában, de a tumorsejtek metasztázis képzésében is (1).

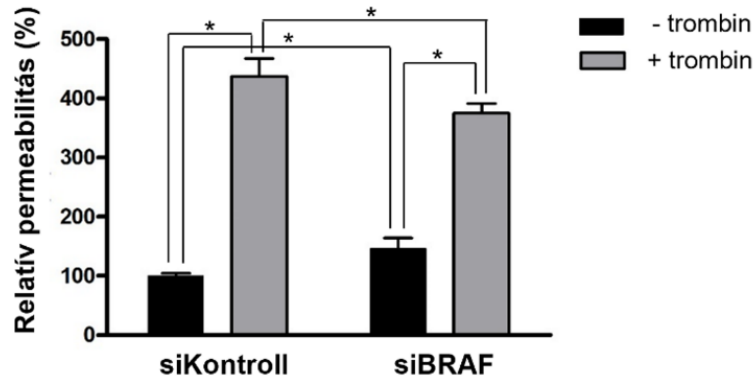
BRAF fehérje hiányában kevesebb melanóma sejt képez metasztázist az egerek tüdejében. Ebből arra következtethetünk, hogy a BRAF fehérje hiányában nagy valószínűséggel szorosabb endotél sejt-sejt kapcsolatok alakulnak ki. Erre utal az is, hogy BRAF hiányában kevésbé indukálható a sejtréteg permeabilitása VEGF, hisztamin vagy trombin hatására (1). A sejt-sejt kapcsolatok erősségét a hozzá kapcsolódó aktin citoskeleton dinamikája határozza meg, ezért PhD munkám során célul tűztem ki a BRAF fehérje aktin citoskeleton szabályozásában betöltött szerepének feltérképezését HUVEC sejteken.

Az endotél sejtréteget érő külső hatások az aktin citoskeleton átrendeződését indukálják. Például a különböző permeabilitást növelő biokémiai ágensek a sejt felszíni receptorokhoz kapcsolódva az aktin citoskeleton átrendeződésével és az aktin kontrakciójával a sejt-sejt kapcsolatok gyengülésén keresztül növelik a sejtek permeabilitását (26).

4.1.1. BRAF fehérje szabályozza az endotél sejtréteg permeabilitását és a melanoma sejtek transzmigrációját

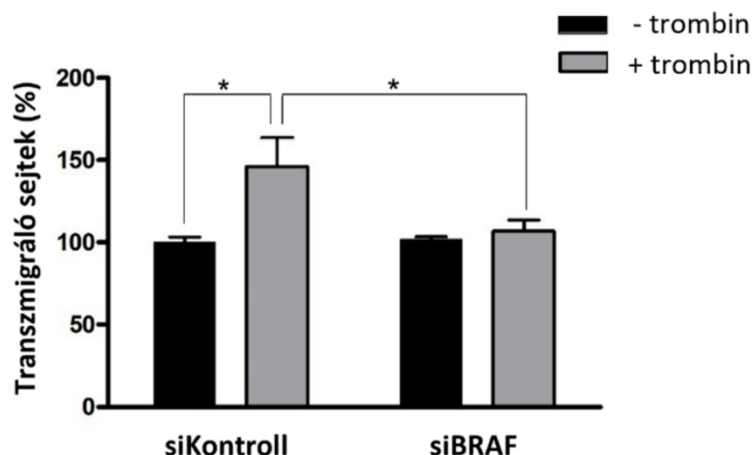
Munkatársaim megmutatták, hogy BRAF hiányában a trombin-indukált permeabilitás csökken. A BRAF fehérje génjét csendesítettük siRNS technikával HUVEC sejtekben és összehasonlítottuk a kontroll endotél sejtréteg és a BRAF siRNS-sel kezelt sejtréteg permeabilitását trombin kezelés hatására. Azt tapasztaltuk, hogy trombin stimuláció nélkül BRAF hiányában a sejtréteg permeabilitása a kontrollhoz képest enyhén megemelkedett. Trombin stimuláció hatására a kontroll sejtréteg

permeabilitása megnőtt, azonban a BRAF hiányában az endotél sejtréteg kevésbé lett permeabilis (13. ábra).



13. ábra. Trombin-indukált permeabilitás HUVEC sejteken. A trombin által kiváltott permeabilitás csökken a BRAF csendesített sejtekben. Relatív permeabilitás számszerűsített adatait mutatja az ábra (minden adatsort a trombin kezelés nélküli kontroll siRNS-kezelt sejtekre normalizáltunk). A kiértékelés során legalább három párhuzamos mérés esetén a normalizálás úgy történt, hogy a három adatsort normalizáltuk egymáshoz és ezután a kiindulása adatpontok átlagát vettük 100%-nak.

Az előző kísérletek alapján látszik, hogy a BRAF fehérjének humán endotél sejtekben is fontos szerepe van a sejt-sejt kapcsolatok szabályozásában, így befolyásolva az endotél sejtréteg átjárhatóságát. A következő kísérletekben azt vizsgáltuk meg, hogy a sejtrétegen keresztül történő transzmigrációban milyen szerepet játszik a BRAF fehérje. Kísérletünk során humán A375 melanóma sejtvonal segítségével vizsgáltuk az endotél sejtrétegen keresztül történő transzmigrációt, a kontroll endotél sejtréteg tulajdonságát összehasonlítottuk a BRAF-csendesített sejtréteggel trombin stimuláció hatására. A kontroll sejtrétegben trombin kezelés hatására több A375 melanóma sejt volt képes átjutni az endotél sejtrétegen, mint abban a sejtrétegben, ahol hiányzott a BRAF fehérje. Azt is tapasztaltuk, hogy BRAF hiányában a trombin stimuláció hatására nem nőtt az endotél sejtrétegen átjutott melanóma sejtek száma (14. ábra). Ezek az eredmények összhangban vannak a korábban már említett egerekben végzett kísérleti eredményekkel (1).

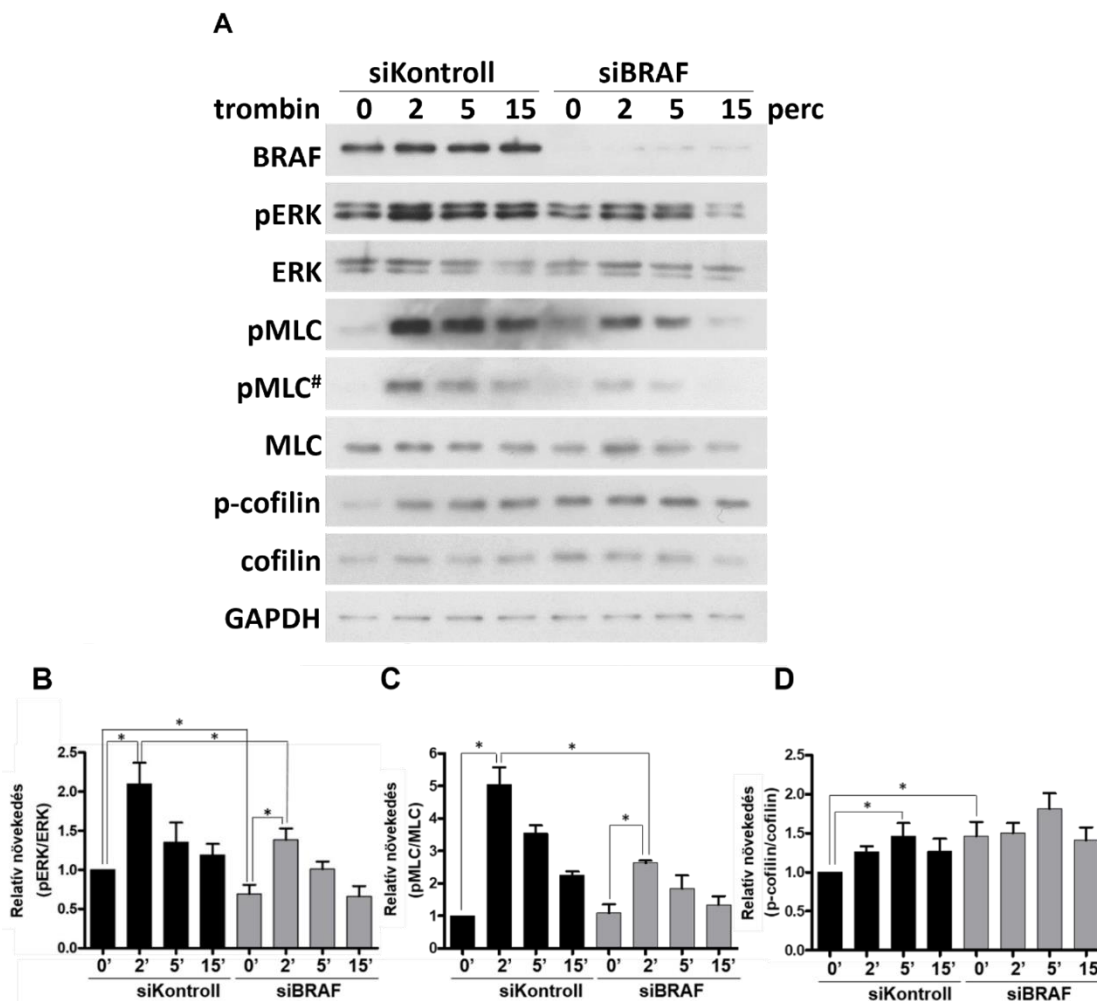


14. ábra. A375 sejtek transzigrációja HUVEC sejtrétegen keresztül. A375 melanóma sejtek trombin-indukált transzigrációs hatékonyságának számszerűsített adatait mutatja be kontroll vagy BRAF siRNS-kezelt HUVEC sejtrétegen keresztül (minden adatsort trombin kezelés nélküli kontroll siRNS-kezelt sejtekre normalizáltunk). A kiértékelés során legalább három párhuzamos mérés esetén a normalizálás úgy történt, hogy a három adatsort normalizáltuk egymáshoz és ezután a kiindulási adatpontok átlagát vettük 100%-nak.

4.1.2. BRAF hatása az ERK, az MLC és a cofilin foszforilációjára trombin stimuláció hatására

Annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy a BRAF fehérje hogyan szabályozza az aktin citoszkeleton dinamikáját western blot technika segítségével összehasonlítottam BRAF jelenlétében és hiányában hogyan változik néhány, az aktin citoszkeletonot szabályozó fehérje foszforilációs mintázata trombin kezelés hatására. Korábban megfigyelték, hogy trombin kezelés hatására az ERK foszforilálódik, amelyet a MEK fehérjén keresztül a BRAF szabályozhat. Kísérleteimben megfigyeltem, hogy az ERK trombin kezelés hatására foszforilálódik (15. ábra), amelynek mértéke BRAF hiányában szignifikánsan csökkent, alátámasztva a BRAF szerepét a trombin-indukált ERK foszforilációban (138).

Az aktin citoszkeleton egyik szabályozója a ROCK fehérje, amely szerepe bizonyított a trombin-indukált permeabilitás növekedésben (138). A ROCK az MLC és a cofilin foszforilációján keresztül szabályozza az aktin kontrakciót és polimerizációt. Azt tapasztaltam, hogy trombin kezelés hatására kontroll sejtekben valóban megemelkedik az MLC foszforilációja és kisebb mértékben, de a cofilin foszforilációja is, összhangban azzal, hogy a trombin kezelésre emelkedik a ROCKII aktivitás. BRAF hiányában az MLC foszforilációja kisebb mértékben emelkedik meg trombin kezelés hatására, a cofilin foszforilációja azonban meglepő módon már trombin kezelés nélkül is szignifikánsan magasabb.



15. ábra. Trombin stimuláció hatása az aktin citoszkeletot szabályozó fehérjék foszforilációs mintázatára. A: kontroll és BRAF siRNS-transzfektált HUVEC sejtréteg lízise után western blot analízis segítségével vizsgáltam különböző időpillanatokban a trombin kezelést követően az ERK, az MLC és a cofilin foszforilációjának változását. A western blot analízis által kapott eredmények számszerűsített adatait az alatta lévő diagramok mutatják. **B:** számszerűsített eredményeket a pERK esetén. **C:** pMLC esetén. **D:** a p-cofilin esetén. A pERK, pMLC és p-cofilin mennyiségét az ERK, MLC és cofilin teljes mennyiségére normalizáltam. A bemutatott eredmények három független kísérletből származnak, és két különböző LOT számú HUVEC sejttel végeztem el. A # szimbólum alacsonyabb expozíciós időt jelez az előhíváskor, a * $p < 0,05$ értéket jelöl. Kétféle expozíciós időre azért volt szükség, mert az erősebb csíkok szaturáció miatt nem használhatók, gyengébb csíkok esetében meg nem látható, ezért a kettőt együttesen értékeltem ki. A kiértékelés során legalább három párhuzamos mérés esetén a normalizálás úgy történt, hogy az adatsorokat normalizáltuk egymáshoz és ezután a kiindulási adatpontok átlagát vettük 1-nek. Minden esetben van hibája az adatsoroknak csak néhány esetben nagyon kicsi, ezért a hibaszázló nem látható.

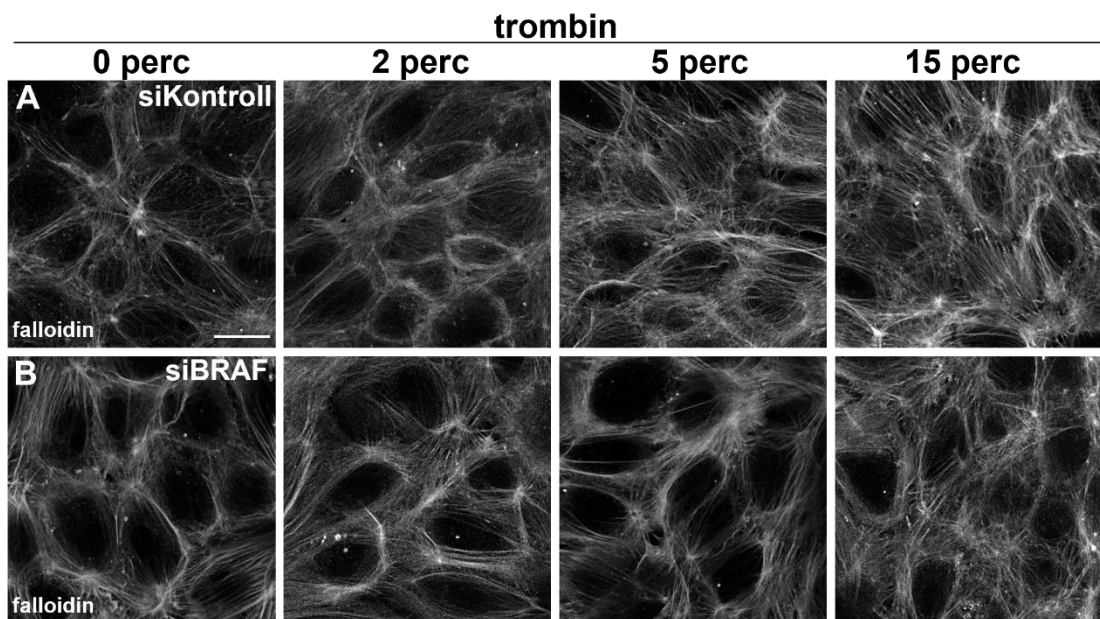
Kísérleteimben BRAF hiányában az MLC foszforilációja csökkent, a cofilin foszforilációja pedig nőtt (15. ábra). Korábban BRAF KO fibroblasztokban a ROCKII mennyiségének és a cofilin foszforilációjának csökkenését figyelték meg, míg egér endotél-specifikus BRAF KO sejtekben a ROCKII mennyisége nem változott, viszont a cofilin foszforilációja szintén csökkent a kontroll sejtekhez viszonyítva. Felmerül a kérdés, hogy különböző molekuláris mechanizmusokon keresztül valósul-e meg ugyanaz

a fiziológias hatás egér és humán sejtekben. A kérdés megválaszolásához ezen fehérjék lokalizációjának analízisét is elvégeztem.

4.1.3. BRAF hatása az aktin lokalizációjára

Megvizsgáltam, hogyan változik meg az aktin citoskeleton, valamint a pMLC és a cofilin, illetve a p-cofilin lokalizációja trombin kezelés hatására kontroll és BRAF-csendesített sejtekben. A HUVEC sejteket különböző ideig (0, 2, 5 és 15 perc) kezeltem trombinnal és ezután az egyes fehérjék lokalizációját immunfluoreszcens jelölések segítségével tettem láthatóvá, majd konfokális mikroszkóppal készítettem felvételeket.

Trombin stimuláció hatására megtörténik az aktin szálak átrendeződése. Megfigyeltem, hogy kontroll sejtekben trombin kezelés hatására 2 perc után perifériás aktin gyűrű alakul ki, majd vékonyabb aktin szálak futnak végig a sejten és a kezelést követő 15 perc után vastagabb stressz-szálak képződnek. BRAF-csendesített HUVEC sejtrétegnél ezzel szemben azt tapasztaltam, hogy a kezdetben vastagabb perifériás aktin gyűrű megmarad a kezelés során és nem alakulnak ki stressz-szálak a későbbi időpontokban sem, így a perifériás aktin gyűrű megmarad a kezelés alatt (16. ábra).



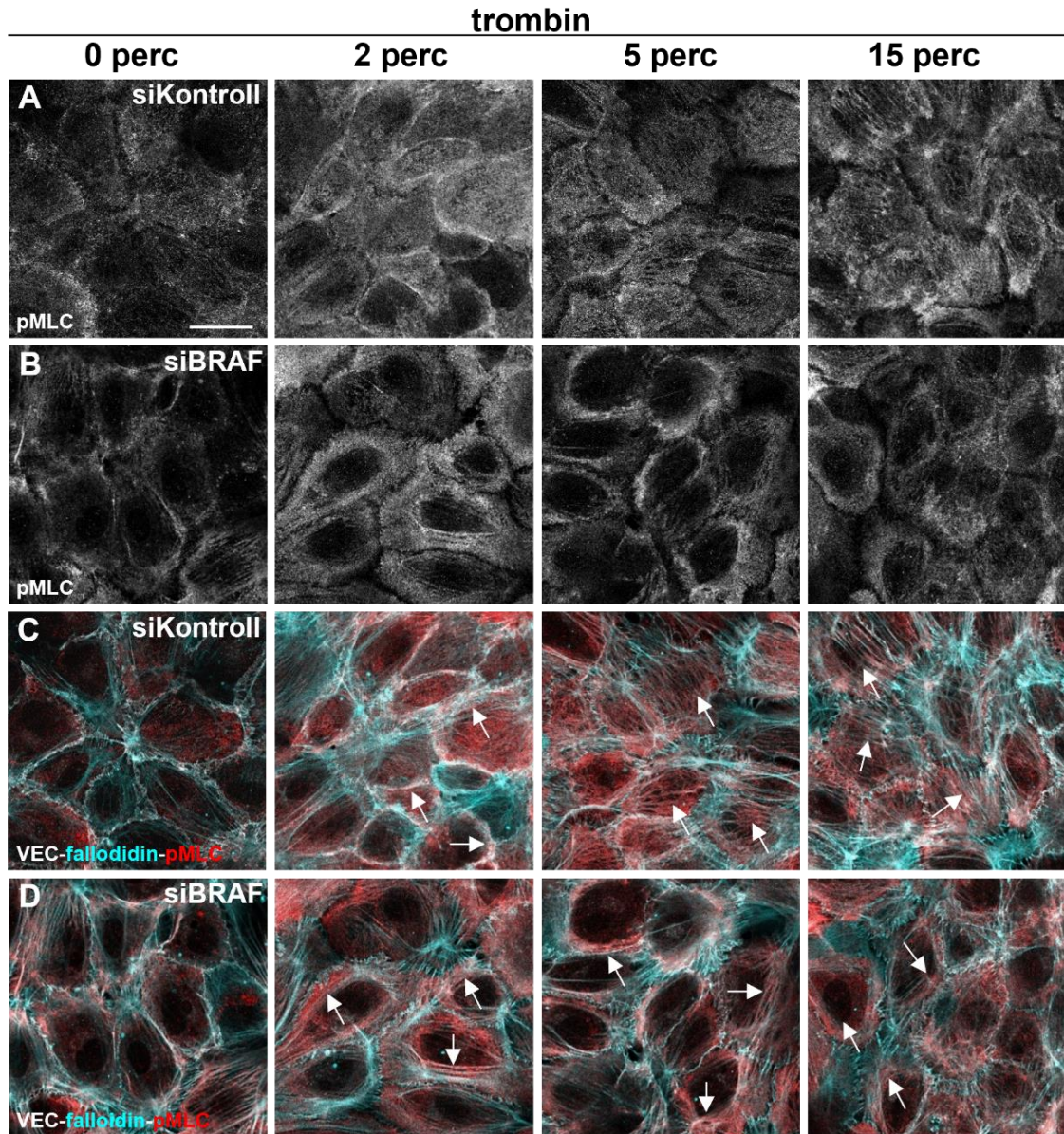
16. ábra. Trombin stimuláció hatására bekövetkező aktin átrendeződés. A BRAF-hiányos sejtek esetében nem képződnek stressz-szálak trombin kezelés hatására. **A:** siKontroll és **B:** siBRAF HUVEC sejtrétegről készített immunfluoreszcens képek láthatók, amelyeket trombinnal kezeltem és fixáltam a kezelést követő időpillanatokban, az ábra felső részén látható jelölés szerint. Minden panelen a falloidin festés látható, ami a filamentális aktint jelöli. Három független kísérletet végeztünk el, amelyek közül egy kísérlet reprezentatív eredményei láthatók az ábrán. A méretarányos vonal 25 μm .

A fenti megfigyelésünk rámutatott arra, hogy a BRAF jelenlétében trombin-kezelés előtt vékonyabb perifériás aktin látható és a kezelések hatására vastagabb aktin figyelhető meg és kialakulnak a stressz-szálak, azonban BRAF-hiányában vastagabb perifériás aktin figyelhető meg a kezelés előtt és trombin-kezelés hatására nem alakulnak ki stressz-szálak (16. ábra). BRAF hiányában és jelenlétében az aktin szálak elrendeződése eltérő, ezért további kísérleteket végeztem annak érdekében, hogy megértsem a BRAF milyen jelátviteli útvonalon keresztül képes szabályozni az aktin citoskeleton átrendeződését.

4.1.4. BRAF hatása a pMLC lokalizációjára

A következőkben megvizsgáltam, hogy az aktin kontrakcióját szabályozó MLC fehérje foszforilált formájának (pMLC) lokalizációja hogyan változik BRAF jelenlétében és hiányában. Kontroll sejtekben korai trombin kezelés hatására (2 perc) megnőtt a foszforilált MLC mennyisége mind a periférián mind pedig a sejt belsejében. A perifériás pMLC a perifériás aktin gyűrű mentén helyezkedett el és a későbbi trombin kezelési időpontoknál a sejt belsejében futó aktin szálak mentén volt látható. A BRAF-csendesített HUVEC sejtréteg trombin kezelésének korai időpontjában, 2 percnél megfigyelhetjük a foszforilált MLC mennyiségének a növekedését a sejt perifériáján, azonban a kezelés későbbi időpillanataiban a sejt belsejében nem jelentkezik a foszforilált MLC mennyiségének növekedése, ellentétben a kontroll sejteknél tapasztalt változással (17. ábra).

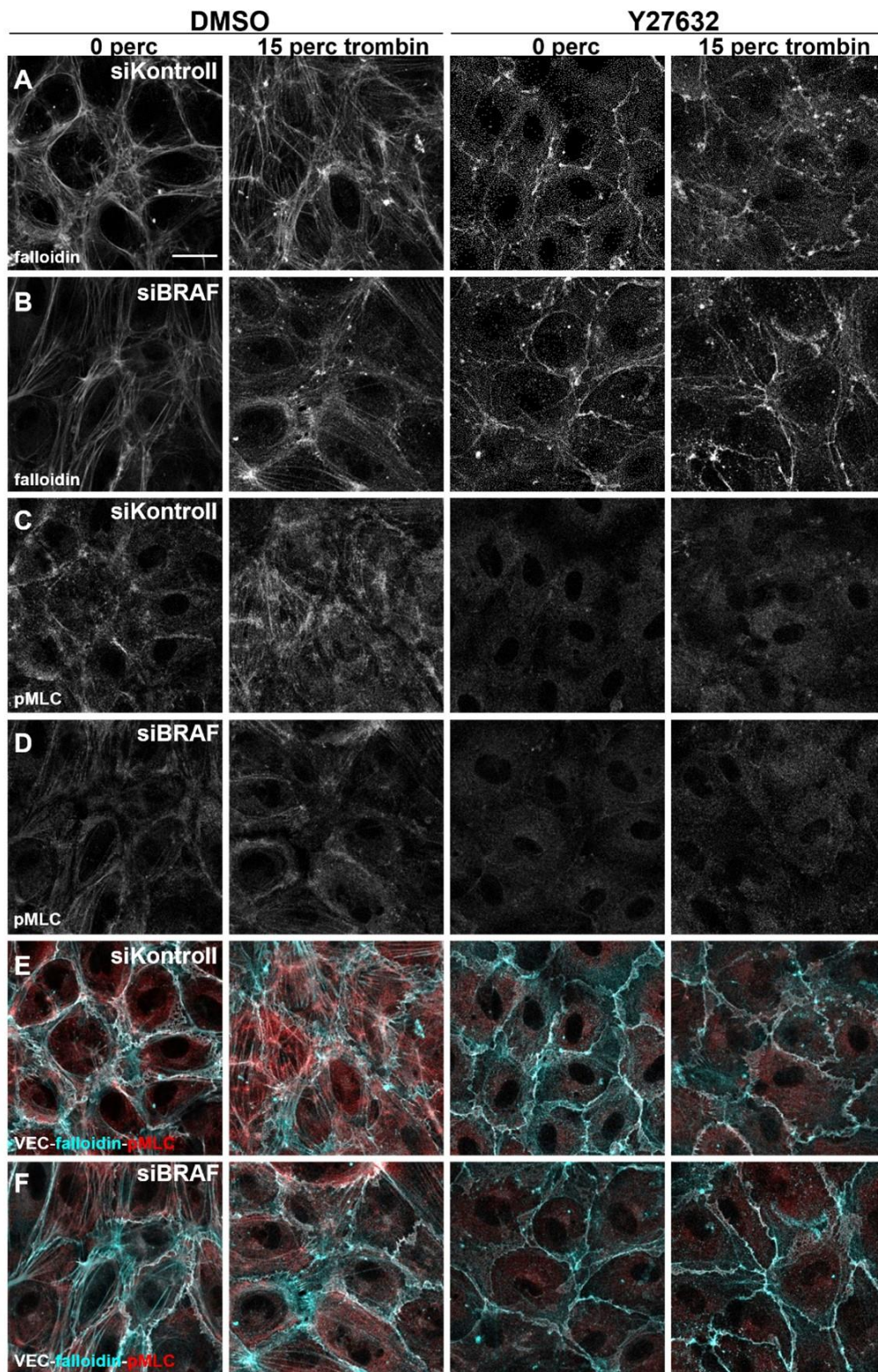
Az immunfestés által kapott eredmények azt mutatják, hogy a trombin stimuláció hatására nem jönnek létre stressz-szálak BRAF-csendesített HUVEC sejtekben. Mivel a foszforilált MLC BRAF-csendesített sejtekben kizárólag a sejt perifériáján figyelhető meg, ez magyarázhatja a western blot analízis során kapott foszforilált MLC mennyiségi csökkenését. Felmerül az a kérdés, hogy a BRAF-csendesített HUVEC sejtrétegben megfigyelt perifériás foszforilált MLC mennyiségének növekedése a ROCK fehérjén keresztül szabályozódik-e.



17. ábra. A trombin kezelést követően különböző időpillanatokban történő változások követése konfokális mikroszkóppal. **A és C:** Trombinnal (a felső sorban jelzett ideig) kezelt siKontroll. **B és D:** siBRAFF HUVEC sejtrétegről készült immunfluoreszcens képek, amelyeket pMLC antitesttel jelöltem. **A C és D** ábrák kompozit képet mutatnak, ahol az aktin (világoskék), a pMLC (piros) és a VE-cadherin (fehér) látható. A pMLC és a falloidin kolokalizációja fehér színben jelenik meg. A VE-cadherin jelöli a sejt-sejt kapcsolatokat és a trombin kezelés hatására keletkező kisebb rések jelenlétét. A fehér nyilak a trombin kezelést követően az aktin szálak mentén elhelyezkedő pMLC lokalizációra mutatnak példát. Három független kísérletből egy kísérlet reprezentatív képei láthatók. A méretarányos vonal 25 μ m.

4.1.5. ROCK hatása a pMLC lokalizációjára

A kérdés megválaszolásához kísérleteimben egy ROCK-specifikus inhibitor (Y27632) használtam, amely a ROCK mindkét izoformáját gátolja, ATP-vel verseng a katalitikus helyhez való kötődésért. Mind a kontroll, mind a BRAF-csendesített endotél sejtréteget kezeltem a ROCK inhibitorral, majd trombinnal indukáltam az aktin átrendeződést és konfokális mikroszkóp segítségével készítettem felvételeket az immunfestést követően. Kontroll sejtekben az irodalmi adatokkal összhangban azt figyeltem meg, hogy a ROCK inhibitor hatására nem tudtak stressz-szálak képződni, a foszforilált MLC mennyisége is csökkent. BRAF hiányában azt figyeltem meg, hogy a kontroll sejtekhez hasonlóan ROCK-specifikus inhibitor hatására a sejt perifériáján vékonyabb aktin szálak alakultak ki, és csökkent a foszforilált MLC mennyisége is, ami arra utalhat, hogy BRAF hiányában a perifériás ROCK aktivitás megnő a kontroll sejtekhez viszonyítva. Az eredményekből látszik, hogy a BRAF szabályozza a ROCK aktivitását, megváltozik a foszforilált MLC mennyisége és lokalizációja is. Ezt szemléltetik a 18. ábrán látható kísérleti eredmények.



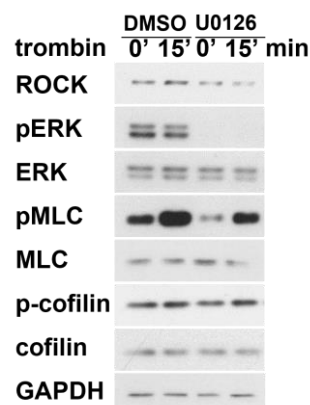
18. ábra. ROCK inhibitor (Y27632) hatása a HUVEC sejtek trombin-indukált aktin, illetve pMLC átrendeződésére. SiKontroll és siBRAf HUVEC sejteket kezeltem DMSO-val, illetve az Y27632 inhibitorral (10 μ M, 1 óra), majd a sejteket trombinnal stimuláltam 15 percig. Az **A** és **B**: az aktin (faloidin), a **C** és **D**: a pMLC lokalizációja látható siKontroll (**A**, **C**, **E**), illetve siBRAf (**B**, **D**, **F**) sejtekben. Az **E** és **F**: az aktin (zöld), a pMLC (piros) és a VE-cadherin (szürke) jelölések kompozit képeit mutatják. Két független kísérlet reprezentatív képei láthatók. A méretarányos vonal 25 μ m.

4.1.6. MEK/ERK jelátviteli útvonal szerepe az aktin citoskeleton szabályozásában

A következőkben arra kerestük a választ, hogy a BRAF a MEK/ERK jelátviteli útvonalon keresztül szabályozhatja-e a ROCK aktivitást a sejt periférián. Az irodalomból már ismert, hogy a BRAF a MEK/ERK jelpályán keresztül szabályozhatja a ROCK aktivitását és a stressz-rostok képződését fibroblasztokban (139). Továbbá, a MEK gátlása megakadályozza a stressz-rostok képződését epitel sejtekben és szarvasmarha aorta endotél sejtekben (139). Annak érdekében, hogy megértsük, hogy HUVEC sejtekben a MEK útvonalon keresztül szabályozódik-e a BRAF aktin citoskeletonra gyakorolt hatása, egy specifikus MEK inhibitorral (U0126) kezeltük a kontroll HUVEC sejtréteget.

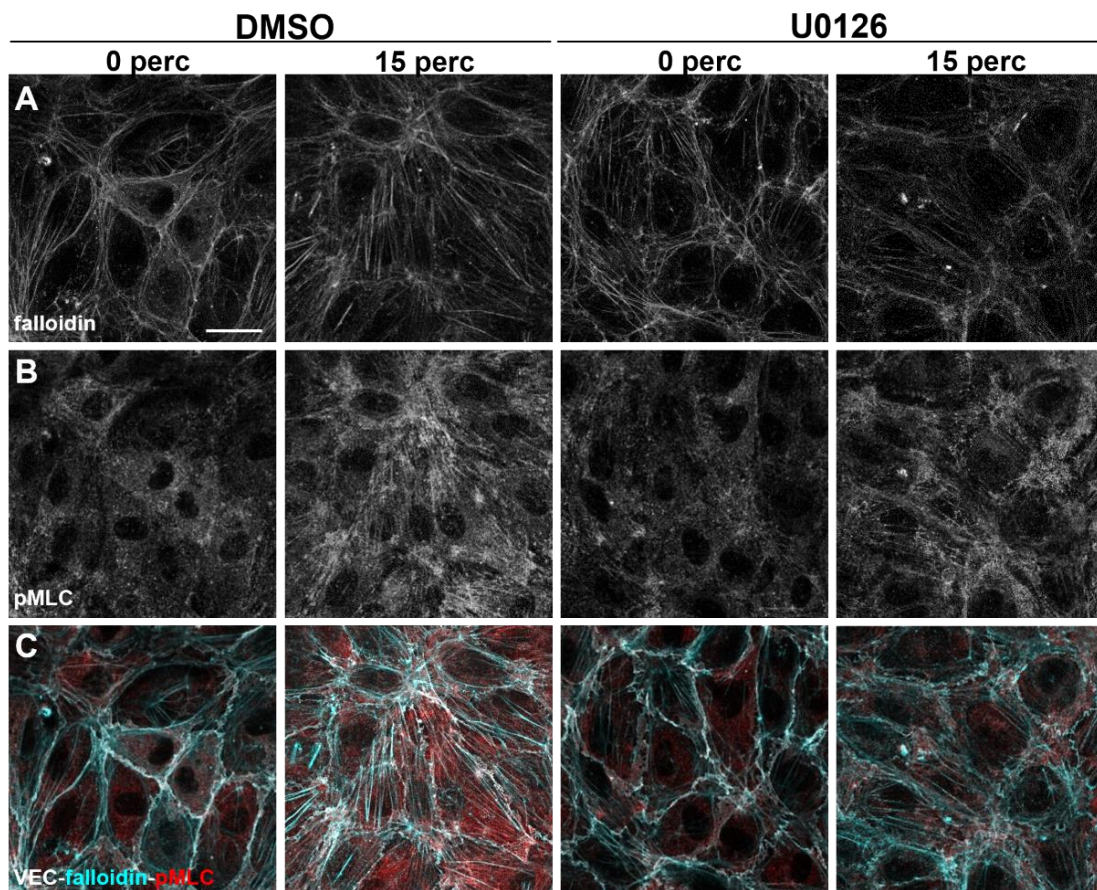
Azt már korábban megfigyeltük, hogy BRAF hiányában trombin kezelés hatására hogyan rendeződik át az aktin citoskeleton a kontroll sejtréteghez képest (17. ábra). A tudományos kérdésünk az volt, hogy a MEK gátlásának hasonló hatása van-e az aktin citoskeleton átrendeződésére, illetve az aktin citoskeleton szabályozó fehérjék foszforilációjára és lokalizációjára, mint amit a BRAF hiányában trombin stimulus hatására megfigyeltünk.

Az U0126 inhibitor gátolja a MEK aktivitását, ezáltal az ERK aktiválását. Ezzel összhangban, kísérleti eredményeim azt mutatják, hogy az U0126 inhibitorral történő kezelés hatására csökken az ERK foszforilációja (19. ábra). Az MLC foszforilációja a trombin kezelés hatására csökkent, hasonlóan a BRAF-hiányában kapott eredményekhez. A cofilin foszforilációja azonban nem változott (19. ábra).



19. ábra. MEK (U0126) inhibitor kezelés hatása HUVEC sejteken trombin stimuláció után, western blot analízis. A HUVEC sejtréteget DMSO-val, illetve U0126 MEK inhibitorral (10 μ M, 1 óra) kezeltem, majd a sejteket trombinnal stimuláltam a jelzett ideig. Az ERK, az MLC és a cofilin foszforilációs állapotának változásait elemeztük. A western blot adatok 2 független kísérlet reprezentatív eredményei.

A 20. ábrán látható eredmények azt mutatják, hogy a MEK inhibitor kezelés megakadályozta a stressz-rostok képződését és a kontroll sejtekhez képest vastagabb perifériás aktin gyűrűt eredményezett, a BRAF csendesítéshez hasonló eredményt mutattak. Az U0126 kezelés a pMLC perifériás lokalizációját is növelte kissé, de összehasonlítva a BRAF-csendesített endotél sejtréteggel jóval kisebb mértékben.

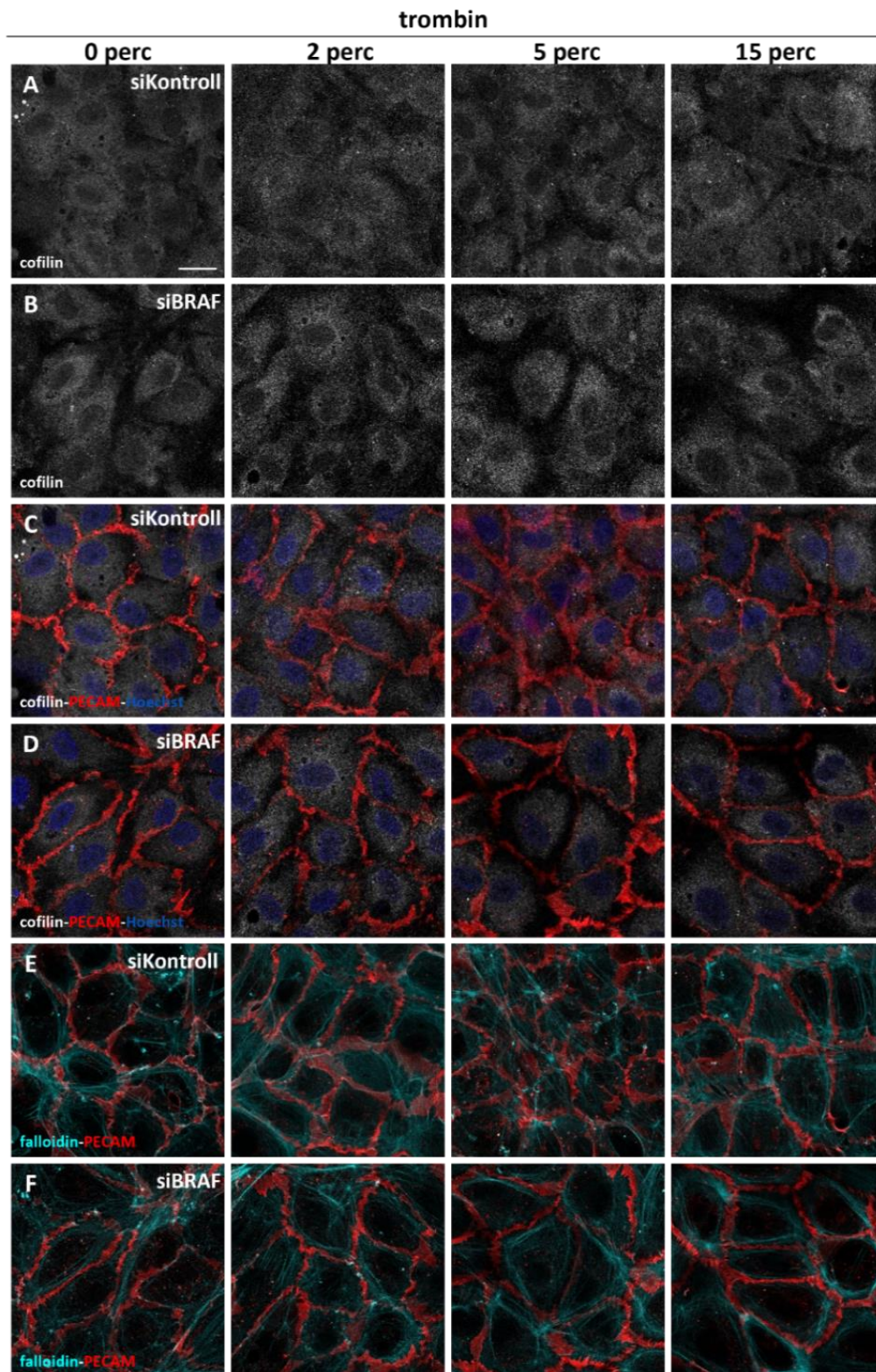


20. ábra. MEK inhibitor (U0126) hatása az aktin és pMLC lokalizációjának változására trombin kezelést követően. A HUVEC sejteket DMSO-val, illetve U0126 inhibitorral (10 μ M, 1 óra) kezeltem. **A:** aktin lokalizációja. **B:** pMLC lokalizációja. **C:** az aktin (kék), a pMLC (piros) és a VE-Cadherin (fehér) festések kompozit képeit mutatja. Két független kísérletből származó reprezentatív képek láthatók. A méretarányos vonal 25 μ m.

Összefoglalva, a trombin stimuláció mind a kontroll, mind a BRAF-csendesített endotél sejtekben növelte a pMLC mennyiségét a sejtek perifériáján a korai időpontokban. A kontroll sejtekben az aktin átrendeződött és stressz-rostok képződtek a későbbi időpontokban, de ez BRAF hiányában nem történt meg. A BRAF-csendesített sejtek perifériáján megfigyelt pMLC-gyűrű ROCK-függő volt és a MEK/ERK-gátlás ugyan növelte a pMLC perifériás lokalizációját, de kisebb mértékben koncentrált a sejtek perifériájára, mint a BRAF-csendesített sejtekben.

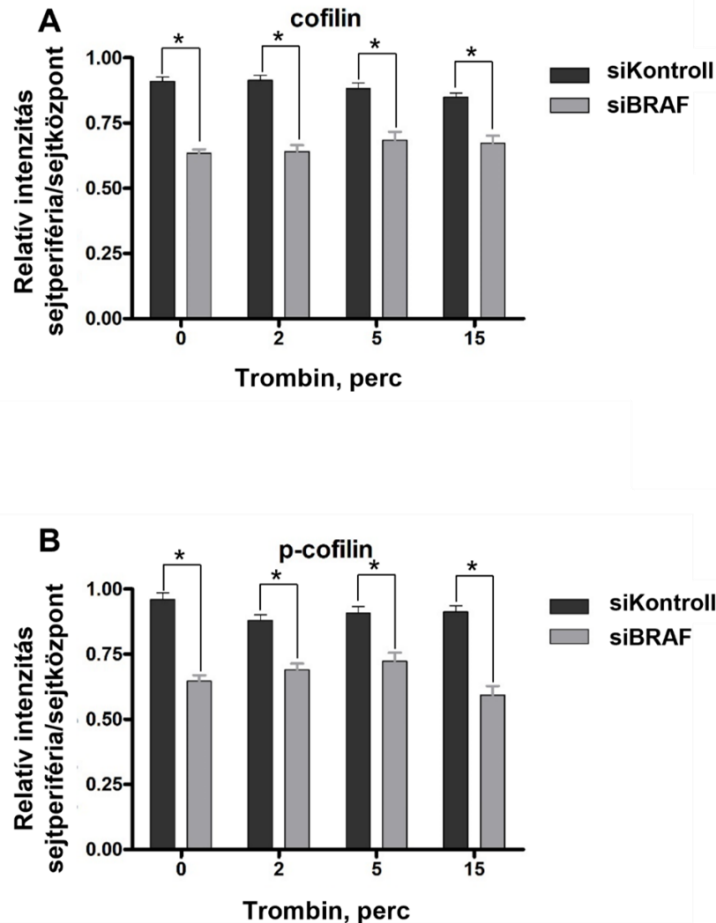
4.1.7. BRAF hatása a cofilin lokalizációjára

A western blot eredmények arra mutattak rá (15. ábra), hogy BRAF-hiányában a bazális p-cofilin mennyisége enyhén megnövekedett a kontroll endotél sejtekhez viszonyítva. Felmerül a kérdés, hogy BRAF hiányában a cofilin fokozott foszforilációja összefügg-e a ROCK megnövekedett perifériás lokalizációjával és aktivitásával. Annak érdekében, hogy megértsük a BRAF hatását a cofilin foszforilációjára a HUVEC sejteket különböző ideig (0, 2, 5 és 15 perc) trombinnal kezeltem és ezután a cofilin lokalizációját immunfluoreszcens jelölés segítségével tettem láthatóvá, majd konfokális mikroszkóppal készítettem felvételeket. Ezek a képek láthatók a 21. ábrán.



21. ábra. A BRAF fehérje génjének csendesítése csökkenti a perifériás cofilin mennyiségét. Immunfluoreszcens képek siKontroll (**A**, **C**, **E**) és siBRAF (**B**, **D**, **F**) HUVEC sejtrétegről, amelyeket trombinnal kezeltem a jelzett ideig. **A** és **B**: sejteket fixáltuk és cofilin antitesttel jelöltük. **C** és **D**: a cofilin festés (szürke) mellett a plazmamembránt (PECAM, piros) és a sejtmagokat (Hoechst, kék) is mutatja. Az **E** és **F**: a plazmamembrán (PECAM, piros) és az aktin (falloidin, kék) festését mutatják. Két független kísérlet reprezentatív képei láthatók. A méretarányos vonal 25 μ m.

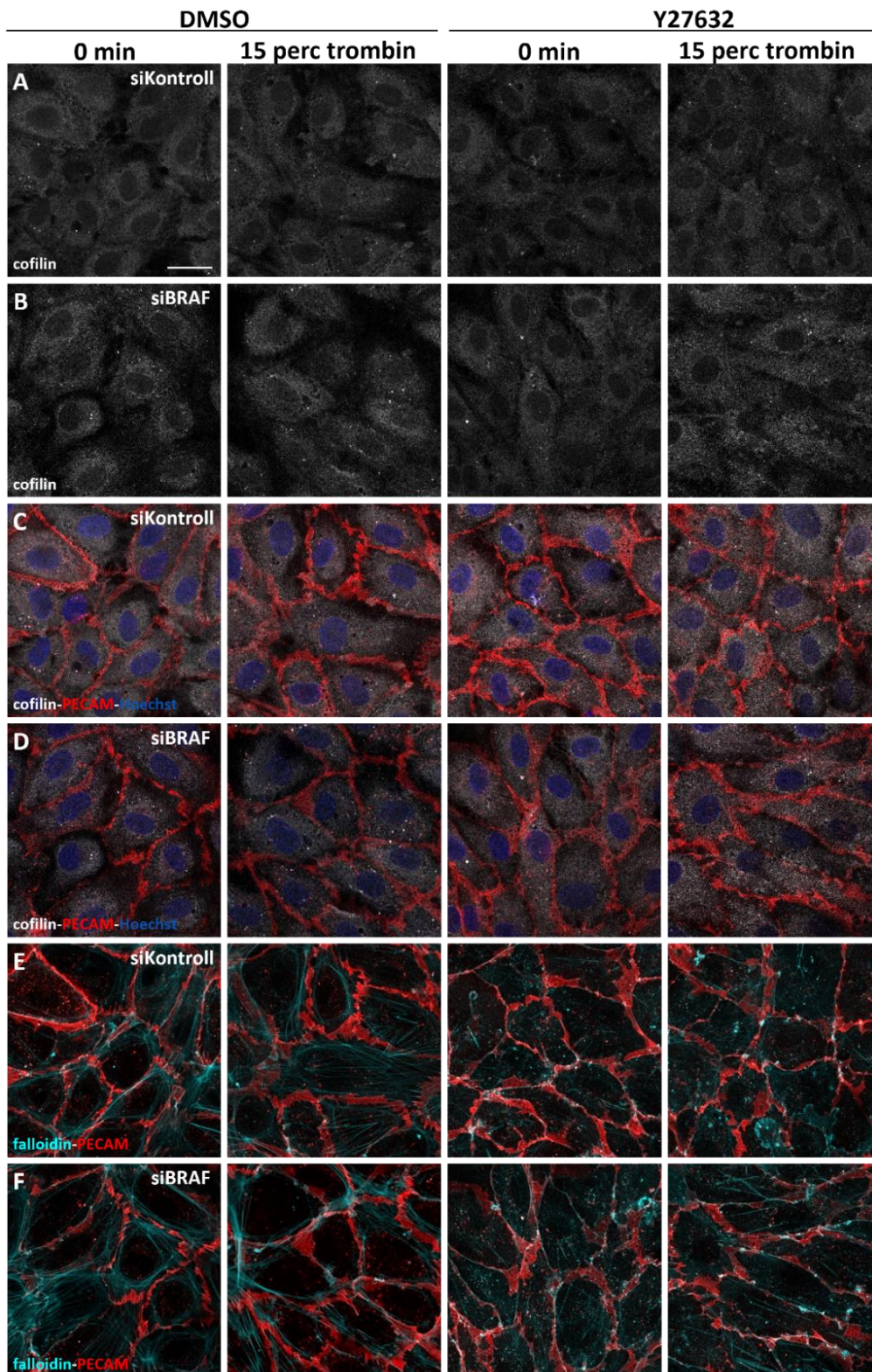
A 21. ábrán látható immunfluoreszcens képek kvantifikálását elvégezve arra a következtetésre jutottunk, hogy BRAF hiányában a trombin stimulustól függetlenül csökken a perifériás cofilin mennyisége. Az immunfluoreszcens képek kvantifikált eredményét a 22. ábra mutatja.



22. ábra Trombin stimuláció mellett a cofilin és p-cofilin változása siKontroll és siBRAf endotél sejtrétegben. A cofilin és p-cofilin fluoreszcencia intenzitás változását értékeltük ki a sejtp periférián és a sejtközpontban.

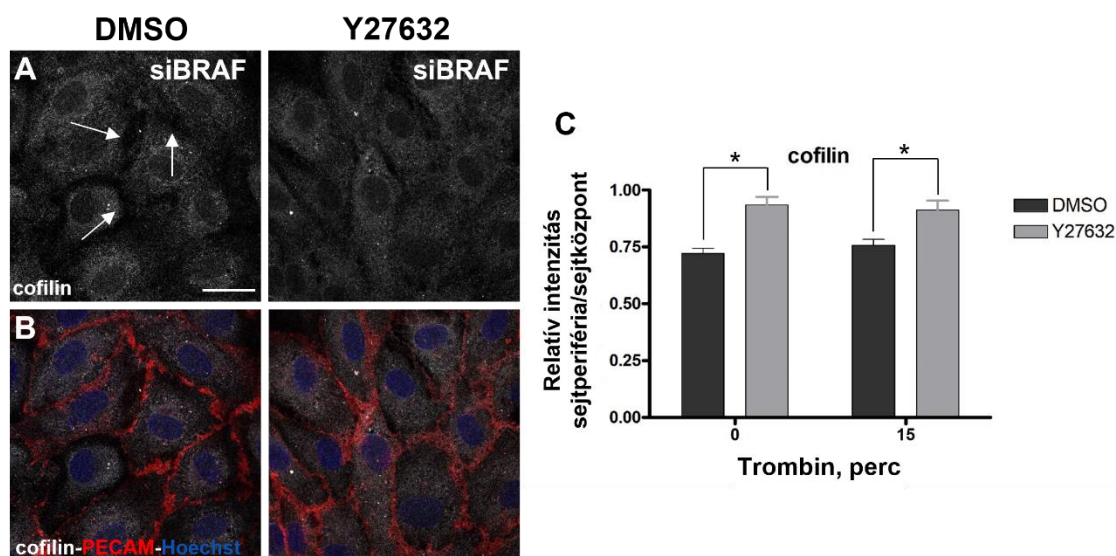
4.1.8. ROCK gátlásának hatása a cofilin perifériás lokalizációjára BRAF-csendesített sejtekben

A következőkben arra kerestük a választ, hogy vajon a ROCK aktivitása húzódik a háttérben annak, hogy a cofilin lokalizációja csökken a BRAF-csendesített sejtek perifériáján. A BRAF-csendesített endotél sejteket ROCK inhibitorral (Y27632) kezeltem. Az eredmények azt mutatják, hogy BRAF hiányában az inhibitorral való kezelés hatására a cofilin mennyisége nőtt a sejtek perifériáján, míg a kontroll sejtekben a cofilin lokalizációja nem változott (23. ábra).



23. ábra. A HUVEC sejtek kezelése ROCK inhibitorral (Y27632). A ROCK-specifikus inhibitor, az Y27632 (10 μ M, 1 óra) hatását vizsgáltuk trombin kezelés hatására siKontroll (A, C, E) és siBRAF (B, D, F) HUVEC sejtrétegben. **A:** kontroll és **B:** BRAF-csendesített sejteket fixáltuk és cofilinre festettük meg. **C** és **D:** plazmamembránt (PECAM, piros) és a sejtmagokat (Hoechst, kék) mutatják. **E** és **F:** plazmamembrán (PECAM, piros) és az aktin (falloidin, cián) festését mutatják. Két független kísérlet reprezentatív képei láthatók. A méretarányos vonal 25 μ m.

A 24. ábra az előtte lévő ábrából kiemelt részlet látható, ami szemlélteti a cofilin fluoreszcencia-intenzitás változásának számszerűsített kiértékelését. Megvizsgáltam a sejtperiférián lévő (Ip) fluoreszcencia intenzitást és a sejtközpontban (Ic) lévő fluoreszcencia intenzitást és ezek változását. A DMSO-val kezelt siBRAF sejtekben az Ip/Ic arány 0,72-0,76 volt, míg Y27632 jelenlétében 0,91-0,94-re nőtt (24. ábra). Nagyon hasonló Ip/Ic arányt kaptunk a kontroll sejtek esetében (Ip/Ic 0,85-0,91 volt, 24. ábra). A cofilin lokalizációja az Y27632 inhibitor kezelés hatására megemelkedik a sejtperiférián trombin kezeléstől függetlenül is, illetve a trombin kezelésre is.

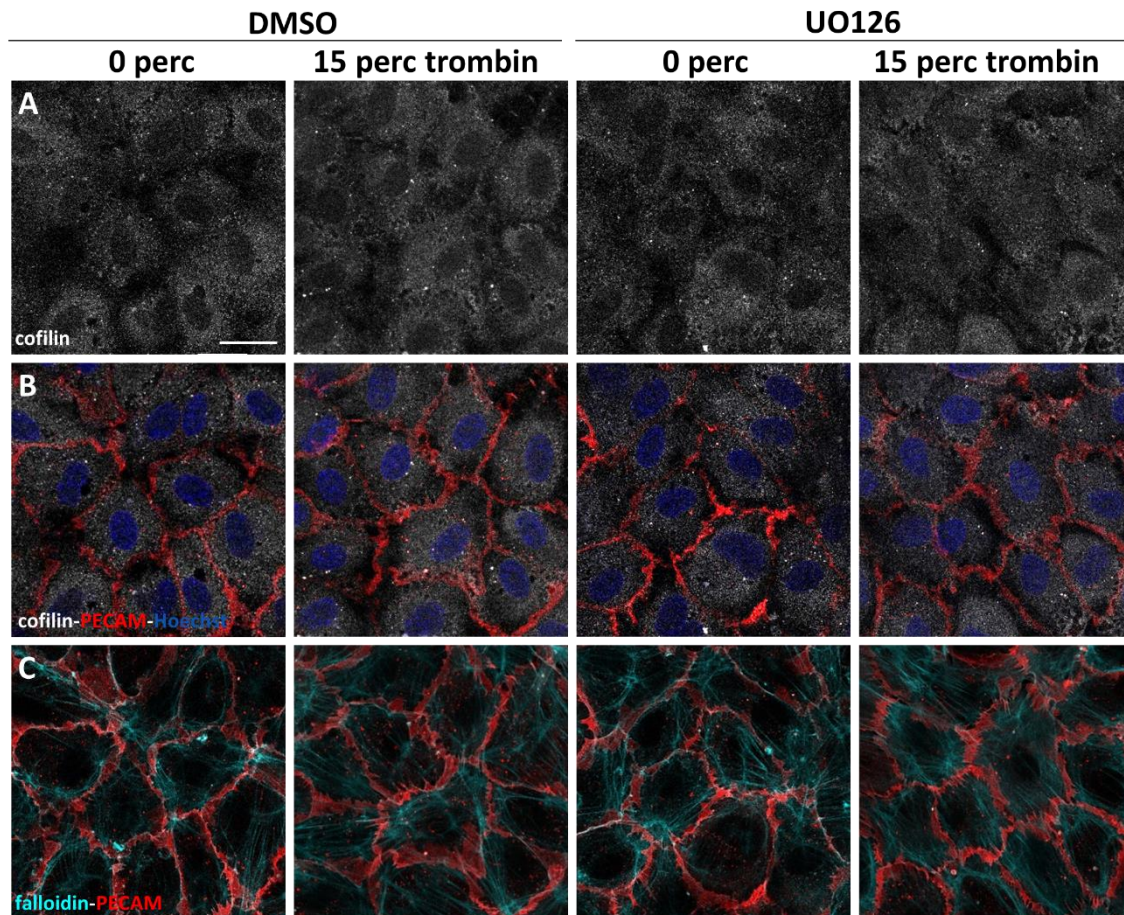


24. ábra. A cofilin mennyisége nő az siBRAF sejtek perifériáján Y27632 kezelés hatására. A ROCK-specifikus inhibitor, az Y27632 (10 μ M, 1 óra) hatását vizsgáltam a cofilin lokalizációjára. **A:** siBRAF sejtekben trombin kezelés nélkül. A fehér nyilak a cofilin csökkent perifériás jelenlétét mutatják a DMSO-kezelt siBRAF sejteken. **B:** cofilin festésen (szürke) kívül a plazmamembránt (PECAM, piros) és a sejtmagokat (Hoechst, kék) is mutatják. Két független kísérletből származó reprezentatív képek láthatók. A méretarányos vonal 25 μ m-t jelöl. **C:** cofilin fluoreszcencia-intenzitásának számszerűsítése a perifériás (Ip) és centrális (Ic) intenzitások arányaként látható az Y27632 kezelések esetében, * $p < 0,05$.

4.1.9. MEK/ERK jelviteli útvonal gátlásának hatása cofilin perifériás lokalizációjára

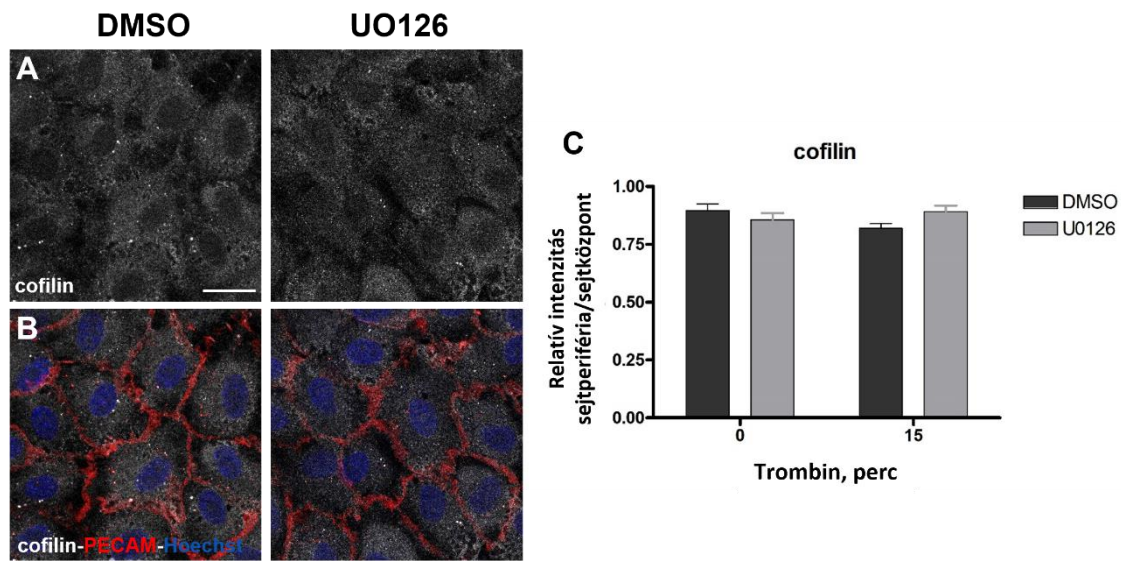
Keratinociták esetében a MEK/ERK útvonal farmakológiai gátlása indukálja a cofilin foszforilációját (140). Felmerül a kérdés, hogy HUVEC sejtekben van-e szerepe a BRAF MEK/ERK útvonalat aktiváló hatásának és a BRAF a MEK/ERK jelviteli útvonalon keresztül képes szabályozni a cofilin lokalizációját. A kérdés megválaszolásához a kontroll HUVEC sejteket MEK inhibitorral kezeltük (U0126), trombinnal stimuláltuk, és a cofilin foszforilációját western blot analízis segítségével

vizsgáltuk meg. Eredményeink azt mutatták, hogy a MEK/ERK inhibitor hatására nem volt számottevő változás a cofilin foszforilációjának mértékében (19. ábra).



25. ábra. A MEK-aktivitás nem játszik szerepet a cofilin lokalizációjában. **A, B, és C:** A MEK-specifikus inhibitor, az U0126 (10 μ M, 1 óra) hatását vizsgáltuk trombin kezelés hatására siKontroll sejtekben. **A:** kontroll sejteket fixáltuk és megfestettük cofilinre. **B:** cofilint (szürke), plazmamembránt (PECAM, piros) és a sejtmagokat (Hoechst, kék) mutatja. **C:** plazmamembrán (PECAM, piros) és az aktin (falloidin, cián) festését mutatja. A méretarányos vonal 25 μ m.

A 25. ábrán látható kísérleti eredmények esetében megvizsgáltuk a cofilin fluoreszcencia intenzitásának változását a sejtp periférián és a sejt középső részén, ennek a kiértékelését mutatja a 26/C. ábrán látható diagram. Az immunfluoreszcencia képek megegyeznek a 25. ábrán látható képekkel, csak a diagram könnyebb megértését segítik elő. A MEK inhibitor hatását mutatja trombin kezelést követően. Az eredményeink rávilágítottak arra, hogy cofilin lokalizációja nem változik, ezért nagy valószínűséggel nem a MEK/ERK jelátviteli útvonalon keresztül képes szabályozni a BRAF a cofilin lokalizációját.



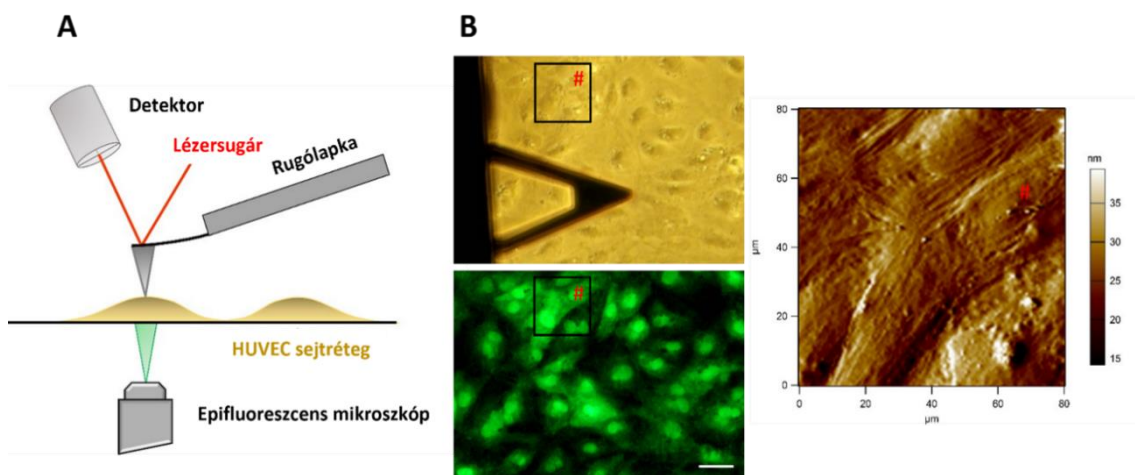
26. ábra. A MEK-specifikus inhibitor, az U0126 cofilin lokalizációjára kifejtett hatása trombin kezelés (15 perc) után kontroll sejtekben. **A:** cofilin festést mutatja, **B:** cofilin festésen (szürke) kívül a plazmamembránt (PECAM, piros) és a sejtmagokat (Hoechst, kék) is mutatják. Két független kísérletből származó reprezentatív képek láthatók. A méretarányos vonal 25 μm -t jelöl. **C:** cofilin fluoreszcencia-intenzitásának számszerűsítése a perifériás (Ip) és centrális (Ic) intenzitások arányaként az U0126 (25. ábra) kezelés esetében. * $p < 0,05$.

4.1.10. BRAF hatása az endotél sejtek mechanikai tulajdonságaira

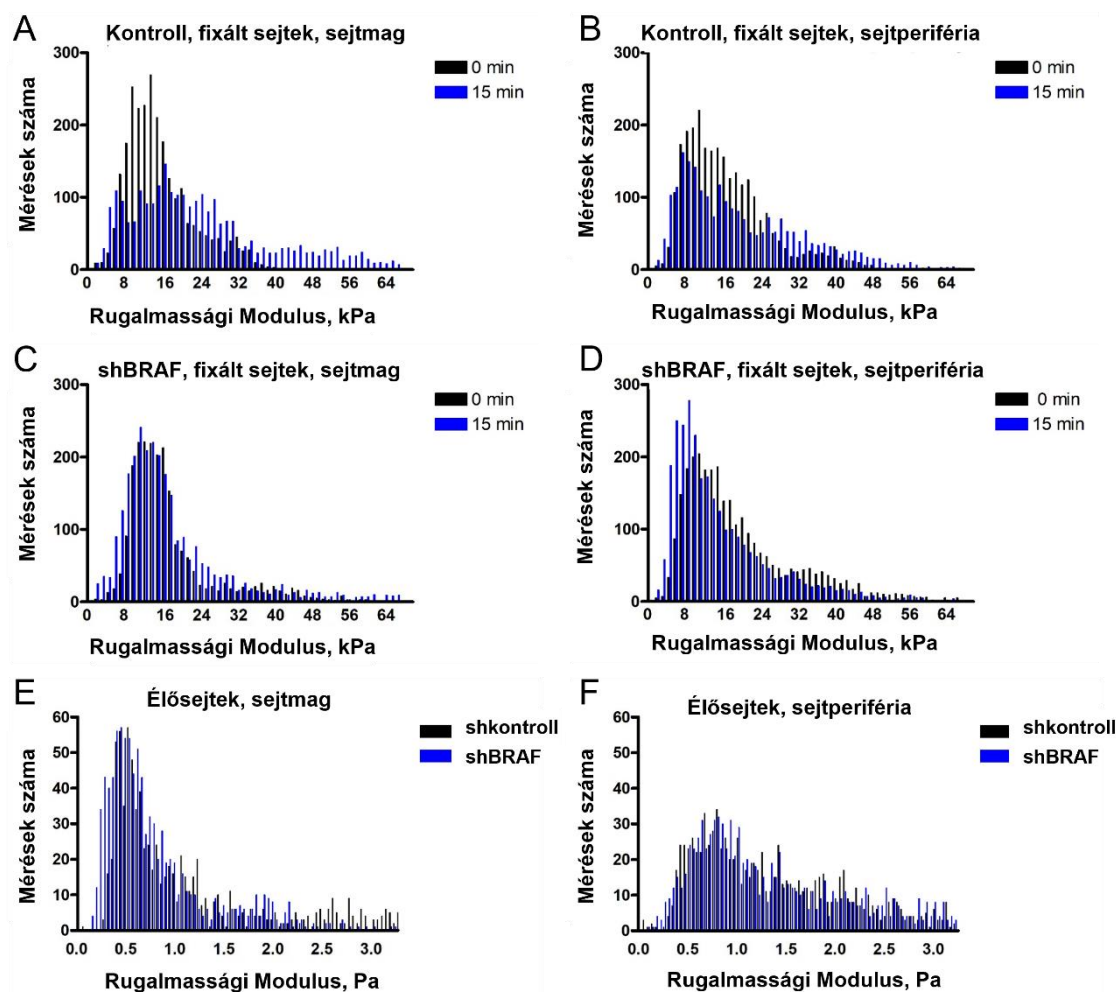
A következőkben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a BRAF fehérje hiányában és jelenlétében a trombin-indukált aktin-átrendeződés során hogyan változik meg a sejtek mechanikai tulajdonsága. A sejtek megváltozott merevségét befolyásolhatják az aktin átrendeződései a trombin stimuláció során, illetve a kialakult stressz-szálak is. Ezeket a változásokat észlelhetjük a sejt perifériáján vagy a sejt közepén, például ez utóbbi helyen történő változás esetleg korrelálhat a stressz-szálak képződésével. A sejtek mechanikai tulajdonságainak vizsgálatára atomierő-mikroszkópos (AFM) méréseket végeztünk. A kísérleti elrendezésünkben az atomierő-mikroszkópot epifluoreszcens mikroszkóppal kombinálva használtuk (27. ábra), hogy a HUVEC sejtrétegben az EGFP expressziójának segítségével azonosítani tudjuk azokat a sejteket, ahol a BRAF-csendesítése megtörtént.

A kontroll és a BRAF csendesített HUVEC sejtrétegeket trombinnal kezeltük és ezt követően különböző időpillanatokban fixáltuk a sejteket, majd vizsgáltuk a sejtek merevségét (rugalmasságát) a periférián és a sejt közepén (a sejt legmagasabb részén). Az erőgörbék illesztéséből kapott Young-modulus (rugalmassági modulus) értékek eloszlásának összehasonlításai szemléltetik, hogy a trombin stimuláció hogyan változtatja

meg ezek eloszlását a kontroll és a BRAF-csendesített sejtek központjában és periferiáján. A kontroll mintákban a trombin általi stimuláció a rugalmassági modulus eloszlásának eltolódását idézte elő a sejt központban magasabb értékek felé (28/A. ábra) és a periferián kissé alacsonyabb értékek felé (28/B. ábra). Ezzel szemben a BRAF-csendesített sejtekben az elasztikus modulus eloszlása nem változott trombin kezelés hatására a sejt központban (28/C. ábra), sőt a sejt periferián kissé alacsonyabb értékek felé tolódott el (28/D. ábra). Élő sejtekben a rugalmassági modulus eloszlása nagyon hasonló volt a kontroll és BRAF-csendesített sejtek esetében trombin kezelés nélkül, mind a sejt központi részét (28/E. ábra), mind a sejt periferiát (28/F. ábra) tekintve.



27. ábra. AFM kísérleti elrendezése, a HUVEC sejtréteg mikroszkópos és AFM képei. **A:** sematikus ábra az AFM epifluoreszcens mikroszkóppal való kombinálásának elrendezését mutatja be, amely célja, hogy megjelenítsük az EGFP-t expresszáló sejteket, így azonosítva azokat a sejteket, amelyek expresszálják a kontroll vagy BRAF shRNS-t. **B:** a fixált endotél sejtréteg fáziskontraszt képe (az AFM rugólapkát mutatva), valamint ugyanennek a sejtrétegnek a fluoreszcencia képe (bal alsó), továbbá a nagy felbontású AFM képe (jobb oldali) látható. A fáziskontraszt képen és a fluoreszcencia képen látható bekeretezett részlet az AFM képnek felel meg, a piros # pedig mindhárom képen ugyanazt a sejtet jelöli a sejtrétegen belül. Méretarányos vonal 50 μm .

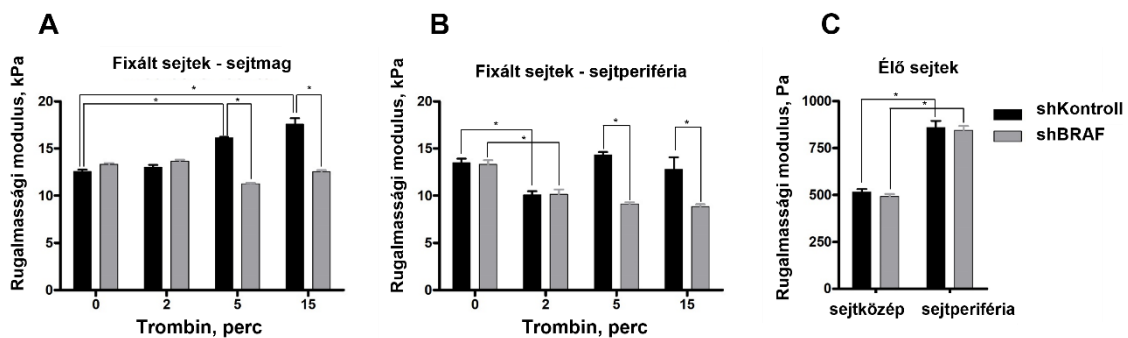


28. ábra. A BRAF növeli az endotél sejtek merevségét trombin kezelés hatására. **A-D:** kezeletlen vagy trombin kezelt fixált endotél sejteket reprezentáló rugalmassági modulus eloszlás. **A:** shKontroll, sejt központ, sejt magi rész. **B:** shKontroll, sejt periféria. **C:** shBRAF sejt központ. **D:** shBRAF, sejt periféria. Az **E** és **F** panelek a nem kezelt élő shKontroll és shBRAF sejtek. **E:** sejt központra számított rugalmassági modulus, sejt magi rész. **F:** sejt perifériára számított rugalmassági modulus összehasonlítását mutatják.

Ezután összehasonlítottuk a fixált sejtek rugalmassági modulusának maximális értékeit (29. ábra), amelyeket az egyes hisztogramokból számítottunk a trombin kezelés különböző időpillanataiban. Nem láttunk szignifikáns különbséget sem kontroll, sem a BRAF-hiányos sejtek esetében trombin kezelés nélkül a sejtek közepén és a periférián mért rugalmassági modulus között (29. ábra). A sejtek középpontjában kevésbé rugalmasak lettek a sejtek és a rugalmassági modulus egyre növekedett 5 és 15 perccel a trombin stimuláció után (29/A. ábra). A kontroll sejteknél a perifériás merevség a korai időpontban (2 perccel a trombin kezelést követően) csökkent, ami a későbbi időpontokban visszatért a trombin kezelés nélküli (kiindulási) állapotba (29/B. ábra), ez korrelálhat a stressz-rostok kialakulásával a sejt központi részén. A BRAF-csendesített

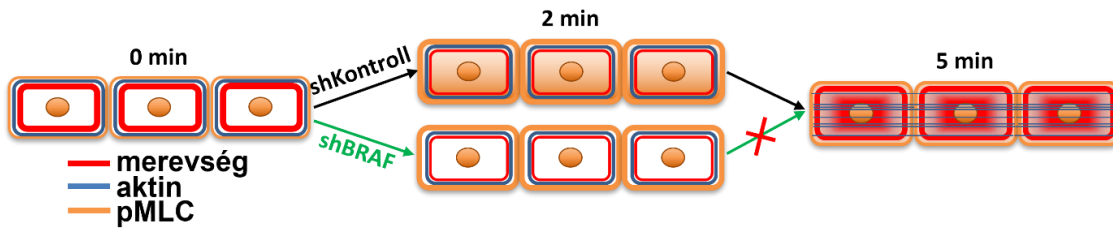
sejtek esetében a trombin stimuláció után 2 perccel a periférián csökkent a rugalmassági modulus, de a kontroll sejtekkel ellentétben ezek nem tértek vissza a normál értékre 5 vagy akár 15 percet követően sem.

A 18. ábra látható stressz-szalak képződésének hiánya összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a BRAF-csendesített sejtek rugalmassági modulusa nem változott jelentősen a sejtek közepén a teljes stimuláció alatt. Érdekes módon a trombinnal nem kezelt élő sejtekben azt találtuk, hogy a sejtek perifériája merevebb, mint a sejtek központi része (29/C. ábra). Ezt a merevségbeli különbséget élő szarvasmarha aorta endotélsejtek, nem kezelt és TNF α -val kezelt HUVEC sejtek esetében is megfigyelték (45). Ugyanakkor nem találtak különbséget a fixált humán tüdőartéria endotél sejtek sejt-központjának és perifériájának merevsége között, hasonlóan az általunk kiértékelt fixált HUVEC sejtek merevségéhez (141). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a fixálás eltérő módon befolyásolja a centrális és perifériás régiók merevségét. Az is ismert, hogy a fixálás növeli a sejtek merevségét és valóban a mi kísérleti eredményeink is alátámasztják ezt. A fixálás 25-szörösére növelte az endotél sejtek merevségét a sejt-központban, és 15-szörösére a sejtek perifériáján. Fontos, hogy a BRAF hiánya nem befolyásolta sem a sejt-központ, sem a sejtperiféria merevségét.



29. ábra. Az shKontroll és shBRAF sejtek rugalmassági modulusának összehasonlítása fixált és élő sejteken. **A:** fixált sejtek központi részének, **B:** fixált sejtek perifériáján számolt rugalmassági modulusok eloszlásának illesztett maximum értékeit mutatja a trombin kezelés különböző időpillanataiban. Legalább 30 sejtet elemeztünk, és minden sejt esetében 100 erőgörbét rögzítettünk. Az ábrázolt eredmények három független kísérletből származnak, és két különböző LOT számú HUVEC sejttel végeztük. **C:** élő shKontroll és shBRAF sejtek rugalmassági modulusainak illesztett maximum értékeit mutatja a sejt-központ és a periféria esetén (trombin kezelés nélkül). Ezek az adatok két független kísérletből származnak (két különböző LOT számú HUVEC sejteket felhasználva). Legalább 20 élő sejtet elemeztünk. * $p < 0,05$.

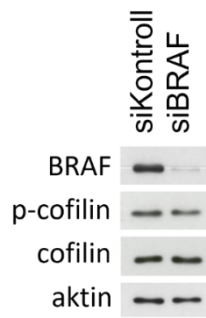
Összefoglalva, a BRAF-csendesített sejtek rugalmassága nagyon hasonló volt a kontroll sejteken mért értékekhez mind a sejtközponban, mind a sejtperiférián trombin kezelés nélkül és 2 perccel a trombin kezelést követően. Azonban 5 perc után a BRAF-hiányos sejtek nem mutattak változást a rugalmassági modulusban sem a sejtközponban, sem a sejtperiférián. A BRAF-hiányos sejtek perifériáján és később a sejtközponban megfigyelt fokozott merevség korrelál a stressz-rostok megjelenésével.



30. ábra. Sematikus ábra a HUVEC sejtekben trombin kezelés hatására bekövetkező változásokról. Az AFM mérések során történő rugalmasságbeli változásokat szemlélteti a piros szín. Az aktin átrendeződését (kék) csak a kontroll sejtek esetén figyelhetjük meg, amelynek előzményeképp a pMLC mennyisége (narancssárga) nemcsak a sejt periferiáján, hanem a sejt belsejében is nő. Míg a pMLC perifériás mennyiségének növekedése korrelál a merevség csökkenésével (2 perc), a stressz-szálak kialakulása a sejt központi részén a merevség növekedésével jár együtt (5 perc). shBRAF sejtek esetén a merevség nem változik a 2 perces kezelést követően és stressz-szálak sem alakulnak ki a sejt központi részén.

4.2. A sejt-sejt kapcsolatok mechanikai perturbációja az endotél sejtréteg nyújtásával - citoskeletális változások BRAF általi szabályozása

Irodalmi adatokból tudjuk, hogy az endotél sejtréteg folyamatosan mechanikai hatásoknak van kitéve, ami fakadhat a véráramlás pulzáló jellegéből, de a leukocita vagy a tumor sejt a transzmigráció folyamata során az endotél sejtrétegre erőt fejtenek ki az átjutás alatt. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az endotél sejt-sejt kapcsolatok mechanikai perturbációjának hatására bekövetkező aktin citoskeleton átrendeződésében a BRAF fehérjének milyen szerepe lehet. Ahhoz, hogy ezt megértsük a korábbi kísérletekhez hasonlóan a BRAF fehérje génjét csendesítettük az endotél sejtekben, RNS interferencia segítségével (siRNS technika, siBRAF). Az endotél sejtréteget mechanikai hatásnak tettük ki, azaz megnyújtottuk a sejt húzó készülék (12. ábra) segítségével, majd összehasonlítottuk kontroll, illetve BRAF-csendesített sejtek válaszát. Az siRNS kezelés hatékonyságát western blot analízis segítségével ellenőriztük, és azt is analizáltuk, hogy az aktin, cofilin és a foszforilált cofilin mennyiségében tapasztalunk-e változást a BRAF hiányában (31. ábra).

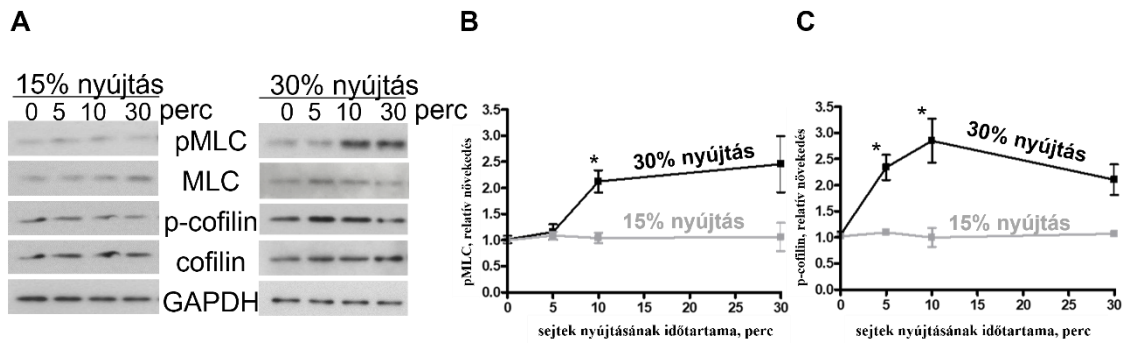


31. ábra. A BRAF fehérje génjének csendesítése. Western blot analízis segítségével ellenőriztem, hogy a BRAF fehérje génjének csendesítése működött-e és változik-e a cofilin foszforilációja a csendesítés hatására.

4.2.1. BRAF hatása az MLC és a cofilin foszforilációjának kinetikájára nyújtás hatására

Kísérleteink során első lépésként azt vizsgáltuk meg, hogy különböző mértékű megnyújtások esetében hogyan változik az aktin citoskeletonot szabályozó fehérjék foszforilációs mintázata. A HUVEC sejteket 15 és 30%-kal nyújtottuk meg egyirányba horizontálisan (32. ábra). A megnyújtást követően különböző időpillanatokban (0, 5, 10 és 30 perc) lizáltuk a sejteket és western blot analízis segítségével detektáltuk az MLC és a cofilin foszforilációjában bekövetkező változásokat. Azt tapasztaltuk, hogy 30%-os megnyújtás hatására szignifikánsan nő az aktin citoskeletonot szabályozó MLC és cofilin fehérje foszforilációja. A 15%-os megnyújtás hatására nem tapasztaltunk szignifikáns változást e fehérjék foszforilációjában (32. ábra).

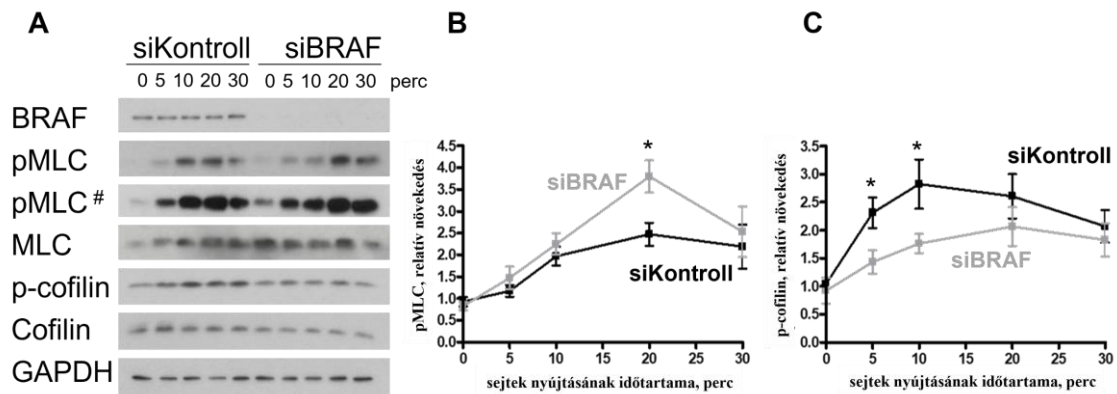
A sejtréteg 30%-os megnyújtása során a foszforilált MLC mennyisége már 10 perc után megemelkedett, míg a cofilin foszforilációja még korábban, a nyújtást követő ötödik percben megnőtt (32. ábra).



32. ábra. HUVEC sejtek különböző mértékű nyújtásának hatása az MLC és a cofilin foszforilációjára. A HUVEC sejtréteget 15%-kal vagy 30%-kal megnyújtottam, a nyújtást követő különböző időpontokban lizáltam a sejteket. **A:** az MLC és a cofilin foszforilációjának western blot analízise látható. A pMLC denzitometriás kiértékelése a **B** ábrán, míg a p-cofilin a **C** ábrán látható. A pMLC és a p-cofilin mennyiségét az MLC, illetve a cofilin mennyiségére normalizáltuk. Az átlag \pm SEM értékeket ábrázoltuk. A feltüntetett eredmények 3-7 független kísérletből származnak, amelyeket 3 független HUVEC LOT felhasználásával végeztünk el; * $p < 0,05$ -öt jelöl.

További kísérleteinkben 30%-os nyújtást alkalmaztunk, hogy össze tudjuk hasonlítani a mechanikai hatásra adott molekuláris sejtválaszt BRAF jelenlétében és hiányában. Mind a kontroll, mind a BRAF-csendesített sejtrétegeket megnyújtva, különböző időpillanatokban (0, 5, 10, 20 és 30 perc) lizáltam a sejteket és vizsgáltam az aktin citoskeleton szabályozó MLC és cofilin foszforilációjának változását. Azt tapasztaltam, hogy az MLC foszforilációja mind a kontroll, mind a BRAF-csendesített sejtrétegekben megemelkedett és 20 percnél figyelhetjük meg a maximumát (33. ábra). Érdekes, hogy a BRAF-csendesített sejtréteg esetében a foszforilált MLC 20 percnél szignifikánsan nagyobb növekedést mutatott a kontroll sejtréteghez viszonyítva. Megfigyeltem azt is, hogy a cofilin foszforilációja szintén megemelkedett a nyújtás hatására, a kontroll sejtekben ez gyorsabban bekövetkezett, mint BRAF hiányában. Összehasonlítva a kontroll és a BRAF-csendesített sejtrétegek nyújtásra adott válaszát azt láthatjuk, hogy ahol a BRAF fehérje hiányzik, ott kisebb mértékű a cofilin inaktivációja, ami a több, aktív cofilin jelenléte miatt egy hosszabb időskálán zajló aktin átrendeződésre utalhat, és ez együtt jár egy nagyobb mértékű MLC foszforilációval (32. ábra).

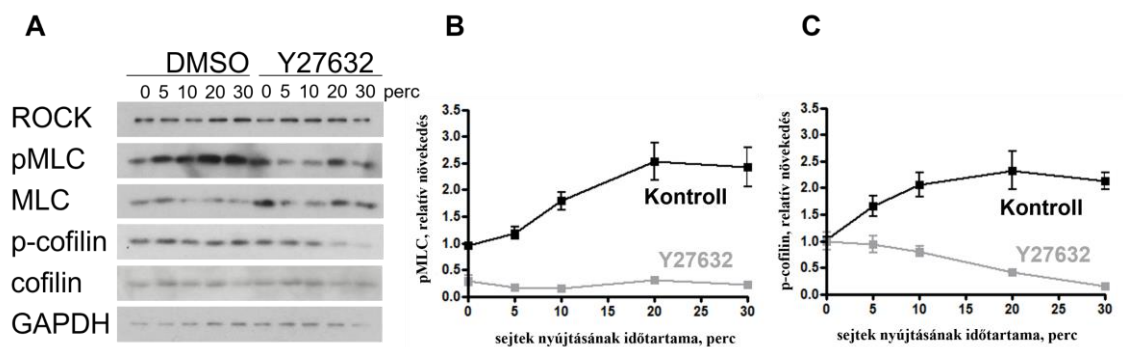
Irodalomból ismert, hogy a LIMK felelős a cofilin foszforilációjáért, és az aktin stressz-szálak képződéséért (142). A BRAF jelenlétében gyorsabban bekövetkező cofilin foszforilációja az aktin szálak korábban bekövetkező stabilizálódására utal, míg BRAF hiányában ez lassabban zajlik, ami nagyobb mértékű aktin átrendeződést és késleltetett aktin-stabilizációt eredményezhet.



33. ábra. MLC és cofilin foszforilációjának kinetikája kontroll (siKontroll) és BRAF-csendesített (siBRAF) HUVEC sejtekben, 30%-os megnyújtást követően. A: 30%-kal megnyújtott kontroll és BRAF siRNS-transzfectált HUVEC sejtréteg western blot analízise, a mintákat a nyújtást követően különböző időpontokban lizáltam. **B:** pMLC, míg a **C:** p-cofilin denzitometriás analízise látható. A pMLC és a p-cofilin mennyiségét a teljes MLC, illetve a cofilin mennyiségére normalizáltuk. Az átlag \pm SEM értékeket ábrázoltuk. A feltüntetett eredmények 3-7 független kísérletről származnak, amelyeket 3 független HUVEC LOT felhasználásával végeztünk; # hosszabb expozíciós időt jelent; * $p < 0,05$ -öt jelöl.

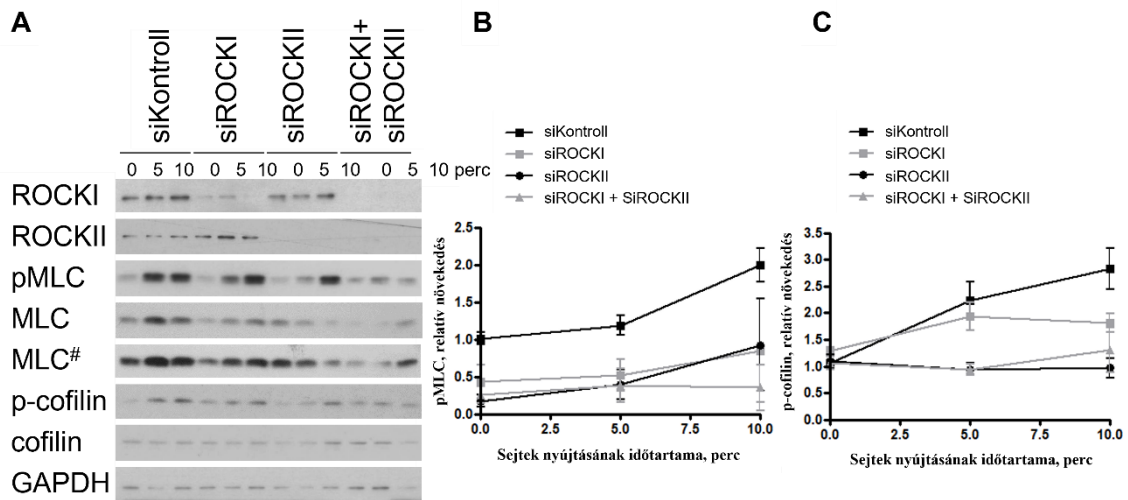
4.2.2. ROCK izoformák szerepe a mechanikai nyújtás során

A BRAF a RAF1 fehérjén keresztül szabályozhatja a ROCKII izoforma lokalizációját, illetve aktivitását, ezért célul tűztem ki annak a kérdésnek a megválaszolását, hogy vajon az MLC és a cofilin a mechanikai nyújtás hatására a ROCK fehérjéken keresztül foszforilálódik-e. Felmerült az a kérdés is, hogy bármely fehérje foszforilációja kapcsolható-e valamelyik ROCK izoformához. A kérdések megválaszolásához először egy Rho-kináz inhibitor (Y27632) alkalmaztam, amely nem izoforma specifikus, hanem mind a ROCKI-t és a ROCKII-t gátolja a működésében. A korábbi kísérletekhez hasonlóan az endotél sejtréteget megnyújtottam, majd különböző időpillanatokban (0, 5, 10, 20 és 30 perc) a sejteket lizáltam és western blot analízis segítségével detektáltam az aktin citoskeleton szabályozó MLC és cofilin foszforilációs mintázatát azzal a különbséggel, hogy ezt megelőzte egy 1 órás Y27632 kezelés. A kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a ROCK funkciójának gátlása mind az MLC, mind a cofilin foszforilációját csökkentette (34. ábra).



34. ábra. ROCK inhibitor (Y27632) hatása az aktin citoskeletont szabályozó fehérjék foszforilációjára a HUVEC sejtréteg nyújtásakor. **A:** Y27632 inhibitorral kezelt sejtek western blot analízise. Az MLC és a cofilin foszforilációját vizsgáltam a 30%-kal megnyújtott és a nyújtást követően különböző időpontokban lizált HUVEC sejtekben. **B:** pMLC mennyiségének kvantitatív analízise, míg a **C:** p-cofilin, melyeket normalizáltam a teljes MLC és a cofilin mennyiségére. Az átlag \pm SEM értékek ábrázoltam. Az adatok 2 független kísérletből származnak.

Tehát, a mechanikai stimulusra adott biológiai sejtválaszban a ROCK fehérjének fontos szerepe van, azonban az még nyitott kérdés, hogy melyik ROCK izoforma és milyen mértékben járul hozzá a citoskeletális válaszhhoz. Ahhoz, hogy ezt a kérdést megválaszoljuk a ROCKI és a ROCKII izoforma specifikus siRNS-eket alkalmaztam. Az siRNS kezelés után megnyújtottam a sejteket és az előző kísérletekhez hasonlóan különböző időpillanatokban lizáltam, majd western blot segítségével analizáltam a fehérjék foszforilációs mintázatát (35. ábra). A kísérleti eredményekből látszik, hogy amikor külön-külön csökkentettük a ROCKI és ROCKII izoformák mennyiségét, az MLC foszforilációja is csökkent, de a nyújtás hatására bekövetkező emelkedő MLC foszforiláció tendenciája megmaradt. Ahol mindkét izoforma expresszióját csökkentettük, ott a nyújtás hatására megszűnt teljesen a sejtválasz, elmaradt az MLC és a cofilin foszforilációja is. A cofilin foszforilációjában azonban a két ROCK izoforma eltérő szereppel bír, ugyanis ahol a ROCKI izoforma expresszióját csökkentettük, a meghúzás hatására a cofilin foszforilációja emelkedett, bár kisebb mértékben a kontroll sejtekhez képest. Ezzel szemben, ahol a ROCKII izoforma génjét csendesítettük, ott alig figyelhető meg a cofilin foszforilációjának emelkedése a meghúzás hatására. Az eredmények arra utalnak, hogy a ROCKII izoforma hozzájárulása a HUVEC sejtek nyújtás által kiváltott cofilin foszforilációjához nagyobb mértékű, mint a ROCKI izoformának (35. ábra).



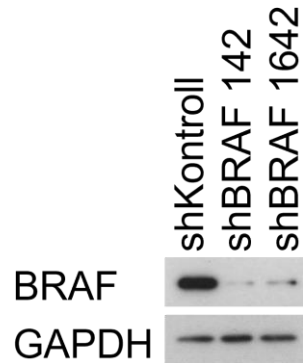
35. ábra A ROCKII nagyobb mértékben járul hozzá a cofilin foszforilációjához, mint a ROCKI az endotél sejtréteg nyújtásakor. **A:** ROCK1 és ROCK2 siRNS-sel, valamint a kettő kombinációjával kezelt HUVEC sejtek nyújtásakor bekövetkező citoszkeletális változások western blot analízise. A 30%-kal megnyújtott sejteket a nyújtást követő különböző időpontokban lizáltam. **B:** pMLC mennyiségének kvantitatív analízise, míg **C:** p-cofilin, melyeket normalizáltam az MLC és a cofilin mennyiségére. Az átlag \pm SEM értékek ábrázoltam. A bemutatott eredmények 3 független kísérletből származnak; a # hosszabb expozíciót jelent.

4.2.3. Mechanikai erő hatására történő F-aktin átrendeződés élő sejteken

Az endotél sejtréteg megnyújtásakor megvizsgáltam a nyújtás hatására adott aktin citoszkeletont szabályozó fehérjék foszforilációjának kinetikáját, amely arra utal, hogy BRAF hiányában valószínűleg nagyobb mértékű az aktin átrendeződése és a kialakult szálak később stabilizálódnak. Ahhoz, hogy bizonyítsuk, hogy az aktin valóban eltérő időskálán rendeződik át, egy technikailag sokkal bonyolultabb kísérleti megközelítést alkalmaztam. Ebben a kísérletsorozatban azt vizsgáltam meg, hogy BRAF jelenlétében és hiányában a nyújtás hatására valós időben hogyan rendeződnek át az aktin stresszszálak, azaz a BRAF fehérje milyen szerepet játszik az F-aktin átrendeződésében és stabilitásában.

A HUVEC sejtréteg nyújtását valós időben követtük nyomon konfokális mikroszkóp segítségével. Annak érdekében, hogy az F-aktin változását követni tudjuk, vírus infekcióval LifeAct-mCherry (fluoreszcensen jelölt) aktin-kötő peptidet vittünk be a sejtekbe, valamint kontroll, illetve BRAF shRNS-eket, utóbbi segítségével a BRAF fehérje génjének expresszióját csendesítettük a sejtekben. Kísérletünkben egyedi sejteket hasonlítottunk össze kontroll és BRAF-csendesített sejtrétegekben, amelyek egy intakt sejtréteg részét képezik (nem minden sejt ad fluoreszcenciás jelet, ennek az a magyarázata, hogy a vírusinfekció sem ad 100%-os hatékonyságot). Az shKontroll és

shBRAF plazmidok esetén ugyanazon promóterrel expresszálódik az shRNS és az EGFP rész, ezért minden olyan sejt, ahol az shRNS expresszálódik, zölden világít. A BRAF shRNS-ek hatékonyságát, azaz, hogy valóban csökkentik-e a BRAF expresszióját western blot analízissel is ellenőriztem (36. ábra). Kísérleteim során egy plazmamembrán festék segítségével ellenőriztem (DeepRed CellMask), hogy a HUVEC sejtek egy összefüggő sejtréteget alkotnak.

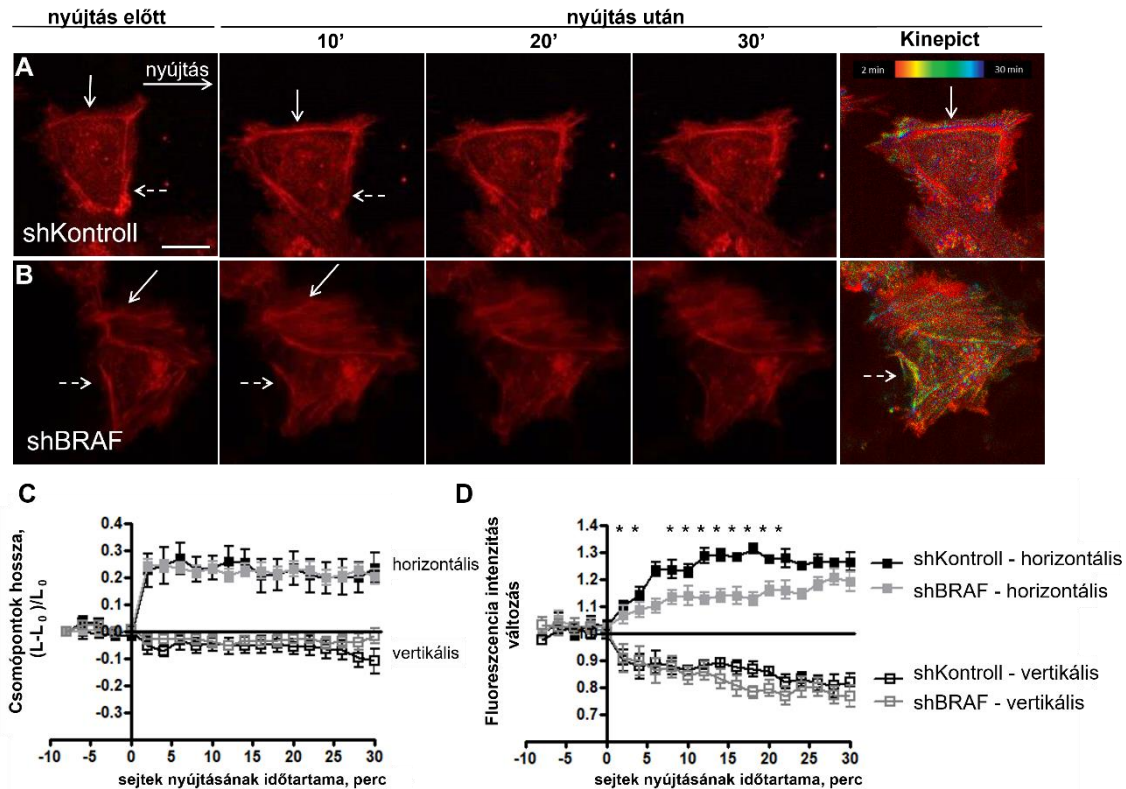


36. ábra Az endotél sejtrétegen a BRAF fehérje génjét csendesítettem. Western blot analízis segítségével ellenőriztem, hogy valóban csökkent a BRAF expressziója.

Először arra a kérdésre kerestem a választ, hogy a nyújtás hogyan befolyásolja a nyújtás irányával párhuzamos (azaz a horizontális), illetve arra merőleges (azaz a vertikális) sejtkapcsolatok hosszát (37/C. ábra). Ennek a számszerűsítéséhez meghatároztuk a különböző időpillanatokban készített felvételeken az épp aktuális hosszát (L), ebből kivontuk a kiindulási, nyújtás előtti hosszát (Lo) és ezt normalizáltuk a nyújtás előtt mért hosszra (Lo). Az eredmények az mutatják, hogy a nyújtásra merőleges, azaz a függőleges sejtkapcsolatok méretét nem változtatta meg a nyújtás, de a nyújtással párhuzamos, vízszintes sejtkapcsolatok hossza 20-30%-kal nőtt, a nyújtás mértékével összhangban. A következőkben analizáltuk a nyújtás irányával megegyező (horizontális) stressz-szálak és a nyújtás irányára merőleges (vertikális) stressz-szálak időbeli átalakulását, hogy a western blot kísérletek eredményei alapján felállított hipotézisünket igazolni vagy cáfolni tudjuk.

A LifeAct-mCherry fluoreszcenciás intenzitásának kvantifikálása (37/D. ábra) arra enged következtetni, hogy a nyújtást követő néhány percen belül az aktin filamentumok mennyisége megnő a nyújtással párhuzamos (vízszintes irányba eső) sejtkapcsolatokban és a nyújtásra merőleges (függőleges) sejtkapcsolatokban pedig hasonló mértékben, de csökkent. Az átlagos fluoreszcencia intenzitás mértéke

számszerűsítve 20-30%-os növekedést mutatott BRAF jelenlétében és hiányában is a nyújtás irányával megegyező irányban. A nyújtás irányára merőleges filamentumok fluoreszcencia intenzitása 20-30%-kal csökkent. Érdekes módon a kontroll sejtekben a nyújtás hatására gyorsabban átrendeződött az aktin citoskeleton és a nyújtás hatására kialakult stressz-szálak 10 perccel a nyújtás után már stabilizálódtak. BRAF hiányában a kontroll sejtekhez viszonyítva az aktin átrendeződése lassabban történik meg, 30 perccel a nyújtást követően közelíti meg a kontroll sejtekben tapasztalható maximális aktin fluoreszcencia intenzitás kvantitatív értékét. Ezek az eredmények alátámasztják a western blot eredmények alapján felállított hipotézist, miszerint a cofilin foszforilációjának lassabb kinetikája BRAF hiányában az aktin lassabb stabilizálódásához vezet, csak 30 perc után éri el azt a szintet, amely a kontroll sejtekben már hamarabb észlelhető, 10 percet követően (37. ábra).

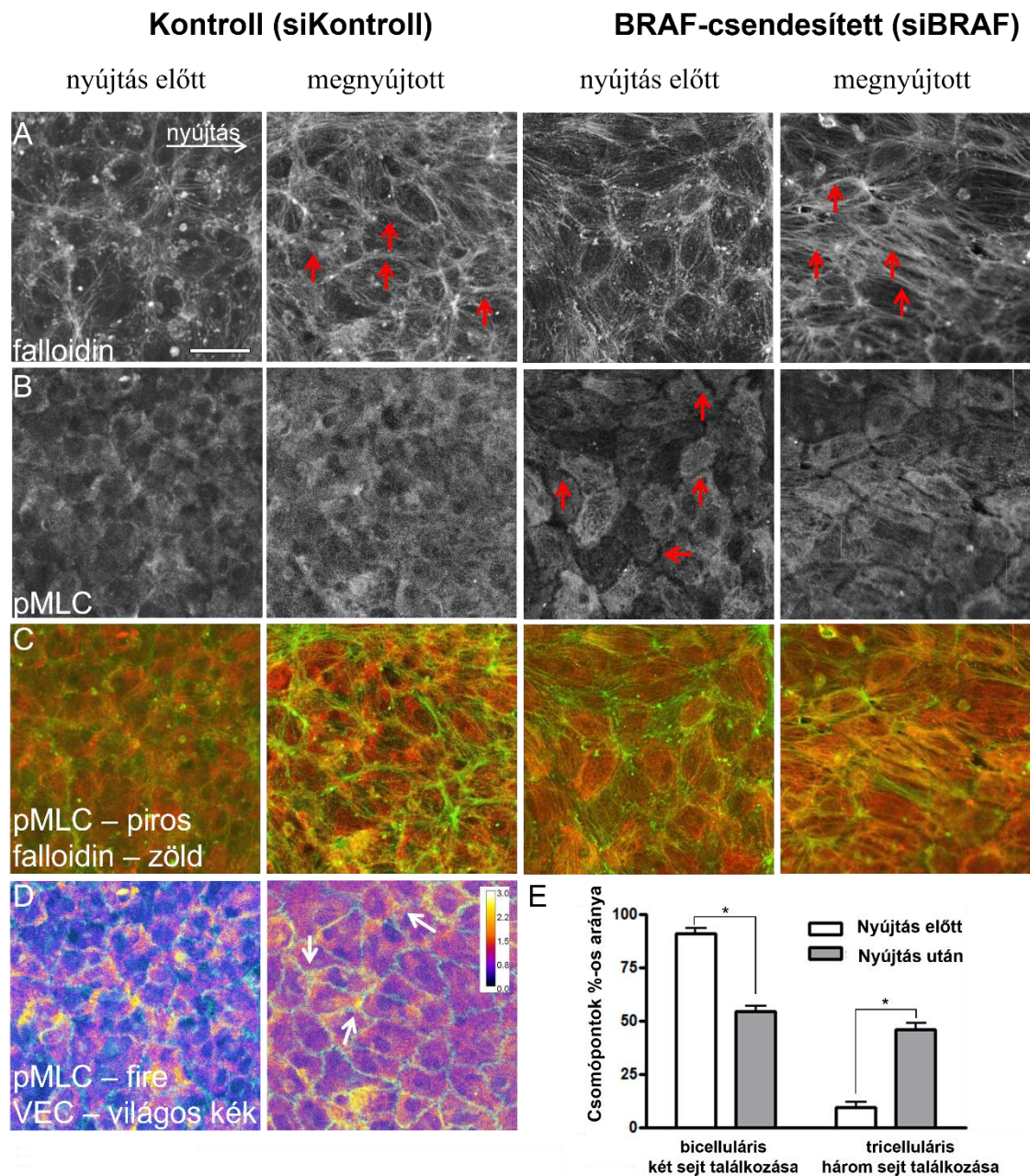


37. ábra. A BRAF jelenléte felgyorsítja az újonnan képződött aktin stressz-rostok stabilizálódását a nyújtás után a megnyújtott (horizontális) csomópontokban. A, B: Példa a LifeAct-mCherry expressziójával vizualizált aktin lokalizáció változásaira 30%-os nyújtás hatására. **A:** shKontroll és **B:** shBRAF sejtekben. A képek a nyújtás előtt és után a jelzett időpontokban készültek. A méretarányos vonal 25 μm . A folytonos vonallal jelzett nyílak a fluoreszcencia intenzitásának növekedését jelzik a vízszintes csomópontokban, míg a szaggatott nyílak a fluoreszcencia intenzitásának csökkenését a függőleges csomópontokban. Az utolsó panel a Kinepict szoftver által az aktin fluoreszcencia-intenzitásokból a nyújtás időbeli lefolyása alatt kiszámított effektív félidőt mutatja, amely a nyújtás azon időpontját jelzi, amikor az aktin fluoreszcencia-intenzitás elérte a teljes fluoreszcencia-intenzitásváltozás felét. A színek az utolsó paneleken látható. **C:** vízszintes (kitöltött négyzetek) és függőleges (üres négyzetek) csomópontok nyújtásának mértékét a $(L-L_0)/L_0$ képlet segítségével számoltuk ki, ahol L_0 a csomópont nyújtás előtt mért hossza, L pedig a megadott időpontban a nyújtás után mért hosszát jelöli. Az shKontroll sejtek adatait fekete színnel, míg az shBRAF sejtek adatait szürke színnel ábrázoltuk. **D:** az aktin fluoreszcencia intenzitás változásának kvantitatív meghatározása a megadott időpontokban a nyújtás után az shKontroll- (fekete) és shBRAF-transzfektált (szürke) sejtek horizontális (kitöltött négyzetek) és vertikális (üres négyzetek) sejtkecsolatokban.

4.2.4. A foszforilált MLC lokalizációjának változása mechanikai erő hatására

Az MLC foszforilációs mintázatában a western blot eredmények alapján (33. ábra) különbséget tapasztaltunk a kontroll és a BRAF-csendesített minták esetében, ezért a következőkben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a pMLC lokálisan hogyan befolyásolja az aktin szálak kialakulását és a kontrakciót. A kontroll és BRAF-csendesített sejtrétegeket meghúzás előtt, majd a meghúzást követő 15 perc után egyből fixáltam, majd az F-aktin és a pMLC lokalizációját immunfestéssel vizsgáltam. A nyújtás

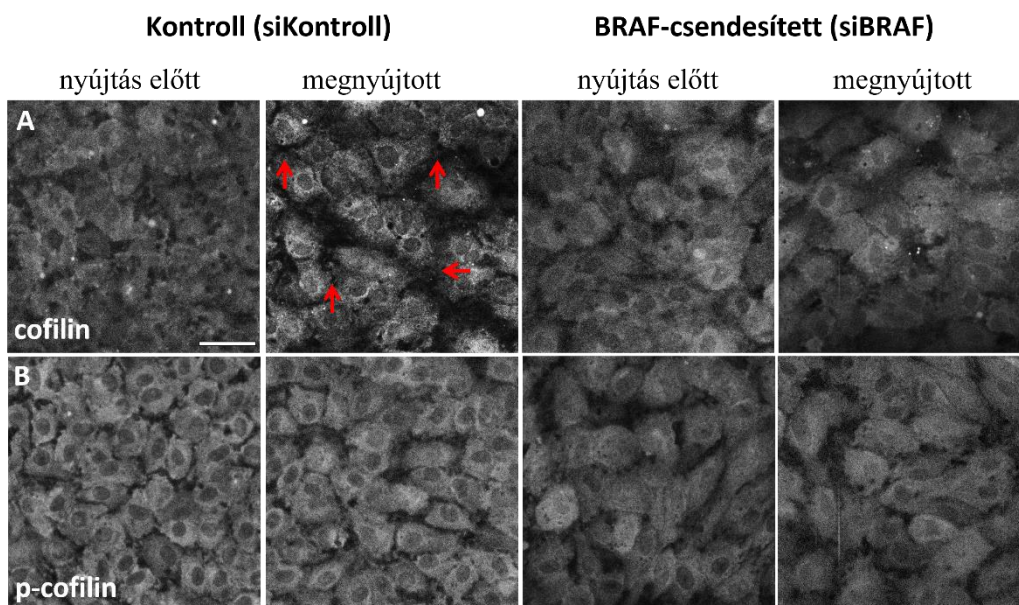
előtti állapotban azt tapasztaltam, hogy a kontrollhoz képest a BRAF-hiányos sejtrétegben több aktin található a sejtek periferiáján (38/A. ábra). Ezek az eredmények korrelálnak a már említett KO egérmodellekben tapasztalt endotél sejtek immunfestési mintázatával. A nyújtás hatására a kontroll sejtekben vékonyabb aktin szálak jelentek meg a nyújtás irányával párhuzamosan a sejtek belsejében és vastagabbak aktin szálakat figyeltünk meg a nyújtás irányával párhuzamos sejt-sejt kapcsolatokban. A BRAF-csendesített mintáknál nemcsak a nyújtással párhuzamos (horizontális) sejt-sejt kapcsolatokban, hanem a sejten belül is vastagabb aktin szálak képződtek. Érdekes megfigyelés, hogy a nem nyújtott kontroll és BRAF-csendesített minták esetében a pMLC festődés eltérő mintázatot mutat (38/B. ábra). A kontroll sejtekben a pMLC eloszlása homogén, míg a BRAF-hiányos sejtekben nagyon halvány festődést mutat a sejt periferia közelében (azaz a sejt-sejt kapcsolatoknál, piros nyilak jelzik), a sejt más részein strukturáltnak tűnik. Nyújtás hatására a BRAF-csendesített sejtekben a pMLC strukturáltabbá válik, és nemcsak a horizontális csomópontokban, hanem a sejtek belsejében is kolokalizálódik az aktin szálakkal (38. ábra). Sejtszinten az aktin szálak pMLC-vel való lokalizációja fokozott kontraktilitásra utalhat, és valóban molekuláris szinten megnövekedett MLC foszforilációt kaptunk BRAF-deficiens sejtekben nyújtás hatására (33. ábra). Nyújtás hatására a pMLC festődés kifejezettebbé válik azoknál a kontroll sejt-sejt kapcsolatoknál, ahol kettőnél több sejt találkozik, azaz a tricelluláris csomópontokban (38. ábra).



38. ábra. Az aktin citoskeleton átrendeződése nyújtás hatására, a BRAF szerepe. **A:** aktin (falloidin), **B:** pMLC festése látható a kontroll, illetve BRAF-csendesített sejtrétegnek nyújtást megelőzően, illetve 15 perccel a nyújtást követően. **C:** pMLC (piros) és aktin (zöld) kompozit képe. A piros nyilak vastagabb aktin szálakra (**A**) mutatnak a megnyújtott kontroll és siBRAF sejtekben, valamint halvány pMLC festődést az siBRAF sejtek periferiáján (**B**). A méretarányos vonal 50 μm . A **D** ábrán bemutatott kép látható másképp színezve (az ImageJ-ben „fire”), hogy jobban szemléltesse a fokozott pMLC festődés különbségeit a sejten belül (itt a VE-cadherin festődés világoskék színnel látható). A pMLC mennyiségét egy színskála mutatja, sárga szín jelöli azokat a területeket, ahol a pMLC nagyobb mennyiségben található, míg a kék szín kevesebb pMLC jelenlétére utal. A színskála a kép jobb felső sarkában található. A fehér nyilak a nyújtott sejtréteg képén három sejt találkozásánál (tricelluláris) látható erősebb pMLC festődést jelölik. Az **E** ábrán azoknak a két vagy három sejt találkozásánál kialakult csomópontoknak a száma van ábrázolva, a csomópontok %-os aránya, ahol a pMLC erősebb festődést mutatott. Az átlag \pm SEM-t ábrázoltuk, az adatok 90-100 csomópontra vonatkoznak. Az eredmények 2 független kísérletből származnak; * $p < 0,05$.

4.2.5. A foszforilált cofilin lokalizációjának változása mechanikai erő hatására

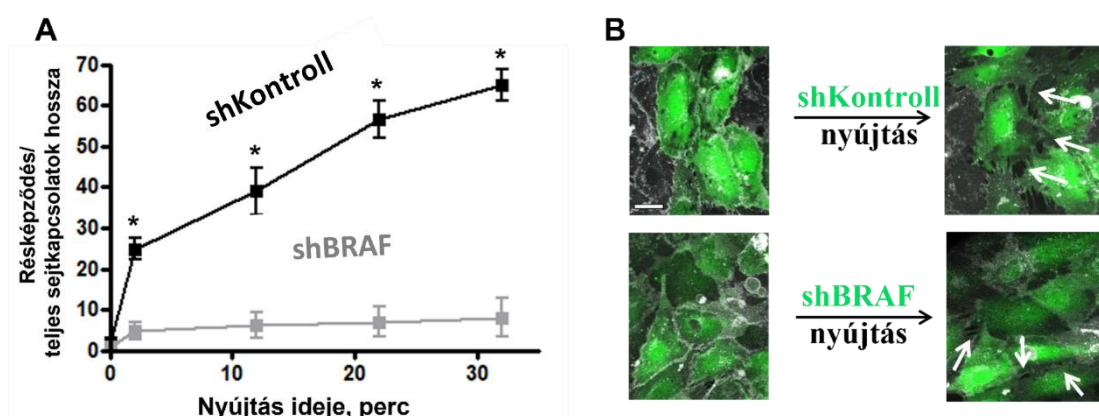
A pMLC lokalizációjának megfigyelése után a következőkben a cofilin, illetve a p-cofilin lokalizációját is vizsgáltam nyújtás hatására (39. ábra). Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a cofilin lokálisan hogyan járul hozzá az aktin stabilizáció eltérő kinetikájához. A kérdés megválaszolásához a nem nyújtott és a nyújtott sejtréteget immunfestettük cofilin-re, és p-cofilin-re. Az irodalmi adatokkal összhangban a nem nyújtott kontroll sejtekben a cofilin festődés homogén volt (142). Nyújtás hatására a cofilin lokalizációja perinukleárisabb lett, és a fluoreszcens jel jelentősen csökkent a sejt-sejt kapcsolatoknál. A p-cofilin festődés egyenletes volt a sejteken belül, és nem változott nyújtás hatására. Ez arra utal, hogy a megnyújtott sejtekben kevesebb aktív cofilin van jelen a sejt-kapcsolatoknál. Ez összhangban van azzal az elmélettel, hogy a nyújtás hatására a nem foszforilált, aktív cofilin disszociál az aktinról, ami az aktin szálak stabilizálódásához vezet. A BRAF csendesített sejtekben mind a cofilin, mind a p-cofilin egyenletes eloszlást mutattak, és egyik sem változott a nyújtás hatására. Ez korrelál azzal a hipotézissel, hogy BRAF hiányában az aktin reorganizáció a sejt egészén belül történik, és nem korlátozódik a sejt-kapcsolatokra (39. ábra).



39. ábra. BRAF hatása a cofilin és p-cofilin lokalizációjára a HUVEC sejtréteg nyújtása során. A: Kontroll, illetve BRAF-csendesített sejtréteg cofilin festését mutatja. **B:** p-cofilin festése látható nyújtás megelőzően, illetve 15 perccel a nyújtást követően. A nyújtás előtti és a megnyújtott felvételek két különböző mintán készültek. A piros nyilak a kontroll mintában a cofilin nyújtás hatására bekövetkező elmozdulását mutatják a sejtek periferiájáról (a sejt-sejt kapcsolatokból). A méretarányos vonal 50 μm .

4.2.6. Az endotél sejt-sejt kapcsolatoknál képződő intercelluláris rések

Elemeztük a sejtek közötti résképződést nyújtás hatására, amely a sejt-sejt kapcsolatok erősségéről ad információt (40. ábra). A résképződés a kontroll sejtrétegben körülbelül 15-szörösére nőtt közvetlenül a nyújtás után, és az idő múlásával tovább nőtt. Érdekes módon a BRAF-csendesített sejtréteg már a nyújtás előtt is valamivel kevesebb rést mutatott (körülbelül a kontroll felét). Ez a megfigyelés a BRAF-hiányos sejtek fokozott perifériás aktin gyűrű képződésével magyarázható (38. ábra). Érdekes módon a rések területe közvetlenül a nyújtás után körülbelül ötszörösére nőtt, és az idő múlásával BRAF hiányában nem növekedett tovább jelentősen. Feltehetően a BRAF hiányos sejtek megnövekedett kontraktilitása miatt a sejtek képesek hatékonyabban alkalmazkodni a nyújtáshoz, és ezért képesek megerősíteni a sejt-sejt kapcsolatokat és minimalizálni a résképződést.



40. ábra. BRAF hiányában az endotél sejtek között a nyújtás hatására képződött rések mennyisége időben nem változik. A: shKontroll (fekete) és shBRAF (szürke) sejtrétegben a sejtek közötti rések méretének változását mutatja a nyújtás előtt, illetve időben követve a sejtréteg nyújtása után. Az ábrázolt eredmények 4-5 független kísérletből származnak, * $p < 0,05$ -öt jelöl. **B:** shKontroll és shBRAF RNS-t expresszáló sejtréteg példáját mutatja a nyújtás előtt és 30 perccel a nyújtás után. A plazmamembrán fehérrel, az shRNS-t expresszáló sejtek zölddel láthatók. A fehér nyilak a nyújtás hatására megjelenő réseket jelölik. A méretarányos vonal 25 μm .



41. ábra. Összefoglaló ábra az endotél sejtek nyújtásakor bekövetkező molekuláris és sejtszintű válaszoknak BRAF jelenlétében és hiányában. Molekuláris szinten mind a cofilin, mind az MLC foszforilálódik nyújtás hatására. A cofilin a foszforiláció révén inaktívulódik, ezért az aktin depolimerizációja gátolt. A foszforilált MLC az aktin összehúzóását segíti elő. BRAF csendesítés esetén nagyobb mértékű aktin kontrakció figyelhető meg (a cofilin foszforilációja/inaktívulása késleltetett). Sejtszinten a kontroll sejtekben vastagabb aktin szálakat (zöld, felső ábrásor) figyelhetünk meg a horizontális (megnyújtott) csomópontokban, amelyekben csökken a cofilin (zöld, alsó ábrásor) mennyisége. Ez úgy értelmezhető, hogy az aktinrostok stabilizálódnak a megnyújtott csomópontokban. BRAF csendesítés esetén a vastagabb aktinrostok az egész sejtben megtalálhatók, és nem korlátozódnak csak a megnyúlt csomópontokra (ahonnan a cofilin nem záródik ki). A méretarányos vonal 50 μm .

4.3. Következtetések

Az endotél sejtréteg trombinral történő biokémiai stimulációja során (1) megállapítottuk:

1.1. BRAF hiányában a humán endotél sejtek trombin-indukált permeabilitása csökken, továbbá az A375 melanoma sejtek transzmigrációja is, összhangban az egér modellben megfigyelt jelenségekkel.

1.2. BRAF hiányában trombin stimuláció hatására nem alakulnak ki stressz-szálak, hanem megmarad a perifériás aktin gyűrű. Ezzel összhangban az MLC foszforilációja csökken a kontroll sejtekhez viszonyítva, a pMLC lokalizációja pedig nem nő a sejt belsejében stimuláció hatására. A cofilin

foszforilációja magasabb BRAF-hiányában, mennyisége pedig csökken a sejt perifériáján.

1.3. A BRAF aktin citoskeleton átrendeződésében betöltött szerepe a ROCK-on keresztüli szabályozáshoz köthető, mivel a ROCK inhibitor képes visszaállítani a cofilin perifériás lokalizációját siBRAF sejtekben, míg kontroll sejtekben a MEK/ERK útvonal gátlásával nem változik a cofilin perifériás lokalizációja.

Az endotél sejtréteg mechanikai stimulációja során (2) megállapítottuk:

2.1. A sejtréteg megnyújtása során mind az aktin citoskeletont szabályozó MLC, mind a cofilin foszforilálódik, de a cofilin foszforilációja időben korábban éri el a maximumát. BRAF hiányában az MLC foszforilációja nagyobb mértékű, a cofilin foszforilációjának mértéke nem változik, azonban lassabban következik be. Kontroll sejtekben az MLC foszforilációjához mindkét ROCK izoforma hozzájárul, azonban a cofilin foszforilációjában a ROCKII-nek nagyobb szerepe van.

2.2. A sejtréteg megnyújtása során a sejtek aktin citoskeletonja a megnyúlt sejt-sejt kapcsolatokba rendeződik, ahol a cofilin mennyisége csökken. BRAF hiányában egy nagyobb mértékű aktin átrendeződés történik, amely nemcsak a sejt perifériájára korlátozódik. Ezzel összhangban a cofilin elmozdulása sem figyelhető meg.

2.3. BRAF hiányában kevesebb rész alakul ki a sejtek között és nyújtás hatására a sejtek között kialakuló rések területe jóval kevésbé nő a kontroll sejtekhez viszonyítva. A BRAF hiányában megfigyelt nagyobb mértékű aktin átrendeződés és kontrakció hatására a sejt-sejt kapcsolatok stabilitása nő.

5. Az eredmények megvitatása

5.1. BRAF szerepe az endotél permeabilitás szabályozásában és az endotél sejtek mechanikai tulajdonságainak meghatározásában

5.1.1. BRAF szerepe az aktin citoskeleton átrendeződésében, hatása az endotél sejt-sejt kapcsolatokra

Az aktin citoskeleton dinamikus változásával szabályozódnak az endotél sejt-sejt kapcsolatok, így befolyásolva az endotél sejtréteg permeabilitását. Az endotél sejt-sejt kapcsolatok erősségét, akár a rákos sejtek, akár a leukociták a gyulladás során érzékelhetik, ezáltal megtalálják az extravazációhoz szükséges optimális helyet, ahol a legkönnyebben tudnak átjutni a sejtrétegen (143). A tumor sejtek képesek kibocsátani permeabilitást növelő anyagokat, például trombint, amelyek az endotél barrier funkcióját gyengítik. Ezt az aktin citoskeleton átrendeződése segíti elő, amely a tumor sejt extravazáció folyamatához járulhat hozzá (3). A trombin által indukált aktin citoskeleton változások fontosnak bizonyultak a BRAF V600E mutációt tartalmazó melanoma sejtek transzmigrációs kísérleteiben, mivel a V600E mutáció jelenléte fokozott trombin termelést mutatott és a trombin termelés mértéke korrelált a sejtek extravazációs hatékonyságával (3). PhD munkám alapját képezte az a megfigyelés, hogy egér endotél sejtekben BRAF hiányában kevésbé lesz átjárható az endotél sejtréteg trombin kezelés hatására is és kevesebb melanoma sejt képes átjutni *in vitro* transzmigrációs kísérletekben (1). Kísérleteinkben megmutattuk, hogy ez a fenotípus humán endotél sejtekben is megfigyelhető. BRAF hiányában a sejtekben vastagabb perifériás aktin gyűrű figyelhető meg a kontroll sejtekhez viszonyítva. Trombin kezelés hatására a kontroll sejtekben kialakult stressz-szálak hozzájárulnak a sejt-sejt kapcsolatok átrendeződéséhez, azonban BRAF fehérje hiányában nem alakulnak ki stressz-szálak.

5.1.2. BRAF szerepe az aktin citoskeleton szabályozó fehérjék lokalizációjában és foszforilációjában

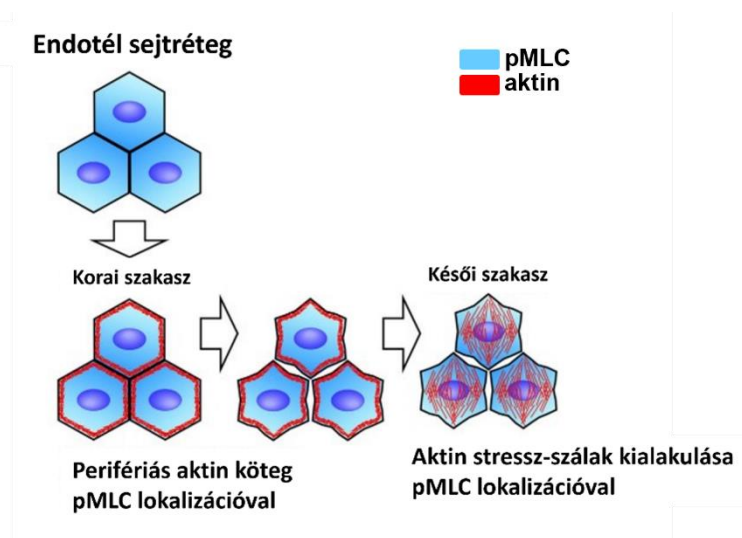
Kontroll sejtekben a trombin kezelés hatására kialakuló, a sejten átívelő aktin szálak mentén lokalizálódik a pMLC, amely a sejt kontraktilitás növekedését jelzi. Ezzel szemben a BRAF hiányában perifériás aktin gyűrű alakul ki, ahol a pMLC jelenléte is megfigyelhető. A perifériás pMLC megnövekedett mennyisége a BRAF-hiányos sejtekben hozzájárulhat a vastagabb perifériás aktin gyűrű stabilizálásához. Ez a

perifériás gyűrű a ROCK gátlásával megszűnik. Kontroll sejtekben a MEK aktivitásának gátlásával hasonló perifériás gyűrű jelenik meg, de a pMLC lokalizációja nem koncentrálódik a sejtek perifériájára olyan mértékben, mint az siBRAF sejtekben. Az aktin depolimerizációs faktor, a cofilin mennyisége csökken a BRAF-csendesített sejtek perifériáján a kontroll sejtekhez képest. ROCK inhibitorral való kezelés hatására a BRAF-csendesített sejtek perifériáján megnő a cofilin mennyisége, de a kontroll sejtek MEK inhibitorral való kezelésének hatására nem történik változás. E jelenség mögött potenciálisan több molekuláris mechanizmus állhat. Az egyik lehetséges mechanizmus alapját képezi az a megfigyelés, amely során a cofilin fehérje génjének csendesítése HeLa sejtekben pMLC gyűrű kialakulását eredményezte a sejtek perifériáján, ahol molekuláris szinten felvetették a miozin-cofilin kompetíció szerepét (144). A BRAF hiányának hatására az endotél sejtek perifériáján a ROCK aktivitása megnövelheti a pMLC lokális mennyiségét és ha a miozin és a cofilin verseng az F-aktin kötődésért, a sejtek perifériáján megemelkedett pMLC fokozhatja a cofilin perifériás aktinról való disszociációját. Egy másik lehetséges mechanizmus az lehet, hogy a ROCK foszforilálja a cofilint a sejtek perifériáján, elősegítve az aktinról történő disszociációját. Ezt az elméletet alátámasztja, hogy BRAF hiányában valóban megemelkedett p-cofilin alapszintet találtunk, ami a LIMK és a cofilin felé irányuló fokozott ROCK-aktivitást tükrözi. A BRAF hiányos sejtekben vastagabb (stabilabb) aktin gyűrű alakul ki, ami a cofilin aktin-depolimerizáló aktivitás csökkenésével és a megemelkedett pMLC stabilizáló hatásával magyarázható a sejt periférián (145, 146). A BRAF a ROCK lokalizációjának változásával akár szabályozhatja az aktin polimerizációjáért felelős egyéb fehérjék, például az Arp2/3 vagy az mDia aktivitását is a sejtperiférián. Ez azért is elképzelhető, mivel megfigyelték, hogy az mDia a filamentum turnover fokozásán keresztül a cofilin depletálásával stabilizálja az Arp2/3-polimerizált, elágazó aktin hálózatot (71, 147).

5.1.3. BRAF szerepe az endotél sejtek mechanikai tulajdonságainak meghatározásában

Az immunfluoreszcens képekből az F-aktin lokalizációjának változását nyomon tudtuk követni BRAF fehérje jelenlétében és hiányában. A sejtek mechanikai vizsgálata (AFM) során korrelációt kerestünk az aktin citoskeleton átrendeződése és a sejtek mechanikai tulajdonságainak változása között analizálva a rugalmassági modulust a sejtek közepén, illetve a perifériás részen. A kezeletlen sejtekben a BRAF hiányának

hatására kialakuló vastagabb perifériás aktin gyűrű nem változtatta meg a perifériára jellemző rugalmassági modulus értékét, azaz a sejt „keménységét”. Ez a megfigyelés mind az élő, mind a fixált sejtekre érvényes. A trombin hatását csak fixált sejteken tudtuk vizsgálni a trombin gyors hatásának időtartama alatt ugyanis nem rögzíthető elegendő erőgörbe a statisztikai analízishez. Érdekes módon a korai trombin-kezelés a BRAF fehérje jelenlététől függetlenül csökkenti a perifériás keménységet. Ez korrelál a pMLC megnövekedett mennyiségével a perifériás aktinon, mind BRAF jelenlétében, mind a BRAF hiányában. A pMLC perifériás növekedése előfeltétele lehet a stresszrostok kialakulásának a kontroll sejtekben, ahogy azt Hirano és mtsai. találták (42. ábra).



42. ábra. Az endotél sejtrétegben az aktin citoskeleton átrendeződésének modellje trombin kezelés hatására. A szekvenciális események sematikus bemutatása, amelyek az endotél sejt-sejt kapcsolatok fellazulása során következnek be. Az ábrán pirossal az aktin szálak elhelyezkedése, kékkel a pMLC lokalizációjának változása látható (148).

Az a megfigyelésünk, hogy BRAF hiányában is megfigyelhető a perifériás pMLC mennyiségének növekedése arra utal, hogy a keménység csökkenése és a pMLC lokalizációjának növekedése szükséges, de nem elegendő a stressz-rostok kialakulásához (17. ábra). Későbbi időpontokban a kontroll sejtekben a keménység mind a sejtek központi részén, mind a sejtek perifériáján megnő, és ez korrelál a pMLC mennyiségi növekedésével. BRAF hiányában viszont ez a lépés hiányzik. A kontroll sejtek perifériás keménységének növekedése a sejtek perifériáján az aktin átrendeződését tükrözheti, amely a sejtek központi részén a stressz-rostok kialakulásához szükséges. Meglepő módon a pMLC mennyiségének növekedése a sejtperiférián található F-aktinon mind a kontroll, mind a BRAF hiányos sejtek esetében a keménység csökkenését eredményezi,

míg a pMLC lokalizációja a központi aktin rostokon a keménység növekedésével korrelál. Ennek a látszólagos ellentmondásnak az egyik magyarázata az lehet, hogy a sejtp periférián a pMLC növekedése szükséges az aktin átrendeződéséhez, de ez csak később figyelhető meg és csak a BRAF-hiányos sejtekben történik meg (ez összhangban van a perifériás keménység 2-5 perces trombin stimuláció után megfigyelt növekedésével). A BRAF fehérje hiányában a sejt közepén nem emelkedik a sejtek rugalmassági modulusa trombin stimuláció hatására, ami azzal magyarázható, hogy BRAF hiányában nem képződnek stressz-rostok. A perifériás cofilin hiánya és a perifériás pMLC egyidejű növekedése nem elegendő a sejtp periféria merevségének megváltoztatásához. A perifériás cofilin inkább a perifériás aktin trombin kezelés hatására történő átrendeződéséhez lehet szükséges, ami szabályozhatja a pMLC lokalizációját a perifériás aktin hálón. Azt gondoljuk, hogy a cofilin és a miozin F-aktinhoz való kötődése közötti egyensúly szabályozza az aktin reorganizáció dinamikáját, amely végső soron a stressz-rostok kialakulását eredményezi vagy akadályozza meg és ezt a ROCK aktivitása befolyásolja. Így adataink alátámasztják a sejtp periférián a dinamikus aktin átrendeződés képességének fontosságát, amely elengedhetetlen a sejtek közötti rések kialakulásához. Irodalmi adatok alapján a citoskeletális erők eloszlása nem homogén a sejtben belül, a sejt-sejt kapcsolatok közelében nagyobb, míg a sejt közepe felé kisebb erők mérhetők (149). Azt is megfigyelték, hogy az erő instabilitása, nem pedig az erők nagysága korrelált a sejtek közötti rések kialakulásával. A VE-cadherin tartalmú kapcsolódási pontok jelentős szerepet játszanak a szomszédos sejtek közötti tenzió kiegyensúlyozásában, mivel a citoskeletális erők közel fele a sejt-sejt kapcsolódási pontokra hat (150). Ezért valóban elképzelhető, hogy a sejtp periférián az aktin dinamikájának finom szabályozása határozza meg az endotél barrier nyitásának/zárásának mértékét. A kortikális aktin hozzájárul a filopódia-szerű nyúlványok kialakulásához a sejtek közötti résben, ami szerepet játszik a rés záródásában. A leukociták transzmigrációja során a pórus körüli megnövekedett RhoA aktivitás valóban korlátozza a vér szivárgását az erekből és az alapján modellünkben a BRAF-hiányos sejtekben megnövekedett ROCK-aktivitás valóban az endotél barrier funkció növekedését eredményezheti (48). Mivel a BRAF a RAF1-en keresztül szabályozza a ROCK lokalizációját, a BRAF és a RAF1 közötti heterodimer képződést megzavaró, nemrégiben leírt BRAF-gátlók, mint például a PLX8394, előidézheti a BRAF hiányos

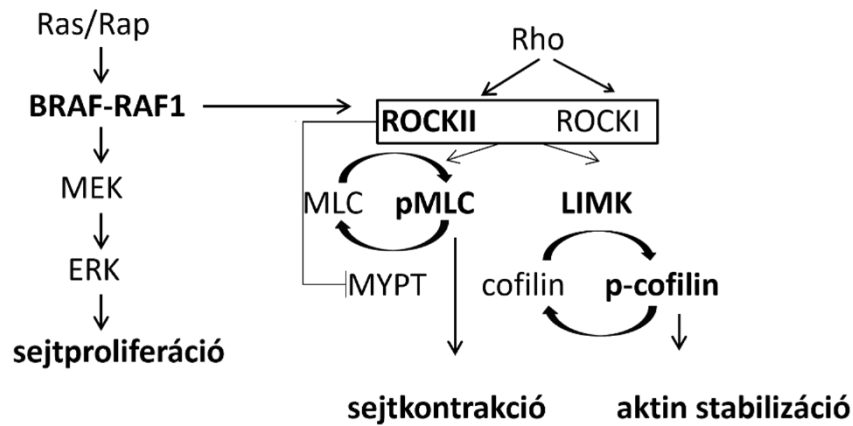
állapotot. Az ilyen inhibitorok alkalmazása végső soron erősítheti az endotél sejtek barrier funkcióját, és egy potenciális lehetőség lehet az áttétképződés hatékonyságának csökkentésére (151).

5.2. BRAF szerepe az endotél sejtek mechanikai perturbációjára adott sejtválasz szabályozásában

5.2.1. A BRAF fehérje szerepe az aktin citoskeleton átrendeződésére a sejtek megnyújtása során

Az endotél sejtek intercelluláris adhéziójának dinamikus jellege kritikus a barrier integritása szempontjából, meghatározza a gyulladás mértékét, és ezáltal befolyásolja a tumorsejtek metasztázis képzésének hatékonyságát (152). A sejt-sejt adhézió stabilitását az endotél sejtek aktomiozin kontrakciója által generált belső és a külső erők közötti egyensúly határozza meg, ilyen külső erő lehet a véráramlás okozta nyíróerő, a vérnyomás változása, az érfal összehúzódása és az immun- vagy rákos sejtek által kifejtett erők (23, 57, 153, 154). A véráramlás pulzáló jellege miatt az endotél sejtek állandóan ciklikus mechanikai terhelésnek vannak kitéve (121). Az aktin filamentumok az alkalmazott ciklikus nyújtás irányára merőlegesen szerveződnek, lehetővé téve a sejtek számára, hogy az intracelluláris tenzió minimális változása mellett is megőrizték szerkezetüket (56). Ezt az átrendeződést fokozott MLC-foszforiláció kíséri (155). A ciklikus nyújtás által kiváltott MLC foszforiláció teljesen megszüntethető a ROCK inhibitor Y27632 alkalmazásával, tehát az endotél sejtek ciklikus nyújtás hatására az aktin citoskeletonjukat a ROCK által közvetített MLC foszforilációval szervezik át. Kísérleteinkben a kontroll endotél sejtrétegben is megfigyeltük a foszforilált MLC mennyiségének növekedését egyirányú (nem ciklikus) nyújtás hatására. Az endotél sejtek az alkalmazott külső erőre nemcsak fokozódó kontrakcióval reagálnak, hanem a cofilin foszforilációjára ható ROCK-kinázokon keresztül szabályozzák aktin átrendeződését. A ROCKII nagyobb mértékben járul hozzá a nyújtás által kiváltott cofilin-foszforilációhoz, mint a ROCKI, ami újabb példát szolgáltat a ROCK izoformák eltérő szabályozó szerepére (115, 156). Az aktív cofilin mennyisége határozza meg az aktin depolimerizáció sebességét és felelős az alacsony feszülés alatt kialakult eredeti aktin hálózat átrendezéséért (157, 158). BRAF jelenlétében a sejtek a külső erőre úgy reagálnak, hogy az aktin filamentumaikat a nyújtással párhuzamos (megnyúlt) sejt-sejt

kapcsolati csomópontokhoz lokalizálják, amelyet korábban epitel sejtekben is megfigyeltek (138, 157). A cofilin mennyisége csökken ezekben a sejt-sejt kapcsolatokban, ami korrelál az F-aktin lokális stabilizálódásával (41. ábra).



43. ábra. Összefoglaló ábra. Az endotél sejtrégen meghúzás hatására a biológiai sejtválasz milyen jelátviteli útvonalon keresztül szabályozódhat és milyen mechanizmusok állhatnak a háttérben.

5.2.2. A BRAF szerepe a sejtek közötti rések képződésében mechanikai perturbáció hatására, az aktin citoskeleton szabályozása

A kísérleteinkben alkalmazott külső erő hatására megnő a sejtek közötti rések mennyisége, ami főként azokban a sejt-sejt kapcsolati csomópontokban fordul elő, ahol kettőnél több sejt találkozik. Ez nem meglepő, mivel például három sejt találkozásának csomópontjában, az úgynevezett tricelluláris csomópontokban nagymértékű a feszülés (159). Az ilyen típusú sejt-sejt kapcsolódási pontok (csúcsok) voltak azok a struktúrák, ahonnan a sejtek kontraktilitásának calyculin A kezeléssel történő indukciója után az epitel sejtréteg elszakadása elindult (160). A sejtek közötti rések spontán kialakulásának előfordulása az endoteliális sejtrétegben az ilyen típusú sejt-sejt kapcsolatokban a legnagyobb valószínűségű és ezeken a helyeken a rákos sejtek előszeretettel mennek át a sejtrétegen, az extravazáció folyamata során (161).

BRAF hiányában a sejtek a mechanikai perturbációra a kontraktilitás növekedésével és a cofilin foszforilációjának lassításával a nagyobb mértékű aktin átrendeződéssel végső soron intenzívebb stressz-rost képződést érnek el (41. ábra). Érdekes módon az aktív cofilin mennyisége nem csökken a sejt-sejt csomópontokból nyújtás hatására, ami összefügghet azzal, hogy az aktin átrendeződése és a stressz-rost képződés nem korlátozódik a sejt csomópontokra. BRAF hiányában a külső erő által

kiváltott résképződés mértéke csökkent, amely magyarázható azzal, hogy a BRAF-csendesített sejtek a fokozott stressz-rost képződés segítségével megerősíthetik a sejt-sejt csomópontokat. Az intenzívebb aktin átrendeződés hatására elképzelhető, hogy a sejtek gyorsabban képesek alkalmazkodni a kívülről érkező erőhatásra és ezáltal BRAF hiányában a sejtek közötti kapcsolatok stabilabbak lesznek.

Az endotélium barrier funkciója a patogénekkal szembeni megfelelő immunválaszhoz szükséges és az endotél sejt-sejt kapcsolatok közötti rések nyitásával és zárásával szabályozódik (7). A krónikus gyulladás azonban számos betegségben, például asztmában, ischaemiás stroke-ban és rákban tartós résképződéssel jár. Ilyen esetekben a BRAF fehérje általi szabályozás gátlása segíthet a sejt-sejt kapcsolatok megerősítésében. Már léteznek megközelítések az optimalizált siRNS bejuttatására meghatározott szervekbe vagy sejtípusokba, például a tüdő endotélsejtekbe történő bejuttatásra már vannak kezdeti eredmények, amely a közeljövőben embereken is alkalmazható lehet különböző betegségek kezelésére (162, 163). Érdekes lenne azt is megvizsgálni, hogy vajon a PLX8394 BRAF inhibitor, amely a BRAF-RAF1 heterodimer mennyiségének csökkentésével hasonló módon befolyásolhatja az aktin citoszkeleton viselkedését, mint a BRAF hiánya, a külső erő hatására megjelenő rések mennyiségét befolyásolja-e.

Az endotél sejtek megnyúlása a testmozgás által kiváltott értágulás során akár percek alatt is bekövetkezhet (163). Eredményeink arra utalnak, hogy a külső erő a megnövekedett résképződésen keresztül az endotél sejtréteg permeabilitásának növekedését idézheti elő. Valóban, mechanikai erő alkalmazása esetén a permeabilitás növekedését vagy fokozott gyulladást figyeltek meg korábbi munkákban is (164, 165, 166). Mivel egerekben a BRAF hiánya csökkenti az endotél permeabilitását, ezért a gyulladás csökkentésének érdekében a BRAF fehérje génjének csendesítése segíthet a külső erő által kiváltott permeabilitás-növekedés csökkentésében humán sejtekben is (1). Ezenkívül az endotél sejtek fiziológiásan megnyúlhatnak a megemelkedett vérnyomás következményeként, különösen azokban az artériákban, amelyekben az érfal egy darabjának pótlása a vénákkal történik, amelyek a beültetés után a magasabb (artériás) nyomás hatására környezetüktől eltérő barrier funkciót fognak mutatni (167, 168).

6. Összefoglalás

PhD munkám során a BRAF fehérje szerepét vizsgáltam az aktin citoskeleton dinamikus átrendeződésében humán endotél sejtekben. Egyrészt a sejteket egy biokémiai ágens, a permeabilitás növekedését indukáló trombinnal aktiváltam, másrészt a sejtek aktin átrendeződését mechanikai perturbációval (a sejtréteg nyújtásával) indukáltam.

Eredményeim alapján a kontroll sejtekben a trombin hatására a kortikális aktin köteg átalakul és stressz-szálak képződnek, BRAF hiányában azonban nem alakulnak ki stressz-szálak. Az aktin citoskeleton szabályozó MLC fehérje foszforilációjának mértéke BRAF hiányában csökken és a sejt perifériájára korlátozódik, a cofilin foszforilációja magasabb és a cofilin mennyisége kisebb a sejtek perifériáján. Specifikus inhibitorok alkalmazásával azt is megmutattam, hogy az MLC perifériás jelenléte és a cofilin perifériás mennyiségének csökkenése a ROCK aktivitásához, nem pedig a BRAF MEK/ERK útvonalbeli szerepéhez köthető. Az aktin citoskeleton átrendeződése hatással van a sejtek mechanikai tulajdonságaira is. Atomierő-mikroszkópos mérések segítségével meghatároztam a trombin stimuláció hatását a sejtek rugalmassági modulusára, amely azt mutatta, hogy a trombin kezelés korai fázisában ugyan valószínűleg megtörténik az aktin perifériás átrendeződése (csökken a periféria rugalmassági modulusa), azonban ez az átrendeződés BRAF hiányában nem elegendő ahhoz, hogy kialakuljanak a stressz-szálak (azaz, hogy emelkedjen a rugalmassági modulus a sejtek közepén és a periférián).

A mechanikai perturbációra az endotél sejtek aktin citoskeletonja átrendeződik, az aktin a nyújtással párhuzamos sejtkapcsolatokban „dúsul fel”. BRAF hiányában ez a folyamat lassabban következik be és végső soron a nagyobb mértékű aktin átrendeződés hatására vastagabb aktin kötegek alakulnak ki a megnyúlt sejtkapcsolatokban. Ez azt eredményezi, hogy BRAF hiányában a mechanikai perturbáció hatására kevesebb rész alakul ki a sejtek között és kisebb mértékben nő a rések mérete. A mechanikai hatásra kialakult sejtválaszban a ROCK fehérjéknek is kitüntetett szerepe van, a ROCKII izoforma nagyobb mértékben járul hozzá a cofilin foszforilációjához a nyújtás során.

Humán endotél sejtekben a BRAF mind a biokémiai, mind a mechanikai perturbációra adott sejtválasz során a ROCK szabályozásán keresztül járul hozzá az endotél sejtek aktin citoskeletonjának átrendeződéséhez, amely hatással van az endotél sejtek barrier funkciójára. Emiatt az endotél sejtréteg barrier funkciójának sérüléséhez köthető betegségek terápiájában a BRAF potenciális célpontként használható.

7. Summary

In my PhD work, I investigated the role of BRAF in the regulation of the actin cytoskeleton dynamics in human endothelial cells. On one hand, the cells were activated by a biochemical permeability-increasing agent, thrombin. On the other hand, the actin rearrangement was induced by mechanical perturbation (stretching of the cell layer).

My results show that in control cells, the cortical actin bundle transforms, and stress fibres are formed in response to thrombin, but no stress fibres are formed in the absence of BRAF. Phosphorylation of the actin cytoskeleton-regulating protein MLC reduces in the absence of BRAF and the p-MLC is localized to the cell periphery, whereas cofilin phosphorylation is higher and its amount is reduced at the cell periphery. Using specific inhibitors, I have also shown that the peripheral presence of MLC and the decrease in the peripheral amount of cofilin are related to ROCK activity and not to the role of BRAF in the MEK/ERK pathway. The rearrangement of the actin cytoskeleton also affects the mechanical properties of the cells. I used atomic force microscopy measurements to determine the effect of thrombin stimulation on cell elastic modulus, which showed that although peripheral rearrangement of actin is likely to occur (decrease in peripheral elastic modulus) in the early phase of thrombin treatment, this rearrangement is not sufficient for stress fiber formation (i.e. to increase the elastic modulus in the middle and periphery of cells) in the absence of BRAF.

In response to mechanical perturbation, the actin cytoskeleton of endothelial cells rearranges, with actin enriched in cellular junctions parallel to the direction of stretch. In the absence of BRAF, this process occurs slower and eventually thicker actin bundles are formed in elongated cell junctions due to increased actin rearrangement. This results in fewer gaps forming between cells and a smaller increase in the area of gaps due to mechanical perturbation in the absence of BRAF. ROCK proteins also play a prominent role in the cellular response to mechanical stress, the ROCKII isoform has a preferential role in the phosphorylation of cofilin during the stretch-induced response.

In human endothelial cells, BRAF contributes to the rearrangement of endothelial cell actin cytoskeleton through the regulation of ROCK in both biochemical and mechanical perturbation responses, which affects endothelial cell barrier function. For this reason, BRAF can be considered as a potential target in the therapy of diseases associated with endothelial cell barrier function damage.

8. Saját publikációs jegyzék

8.1. Az értekezésen alapuló közlemények

- **Hollósi A.**, Pászty K., Bunta B. L., Bozó T., Kellermayer M., Debreczeni M., Cervenak L., Baccarini M., Varga A. BRAF increases endothelial cell stiffness through reorganization of the actin cytoskeleton. *The FASEB Journal*. 2022. 36(9): e22478. DOI: 10.1096/fj.202200344R. (IF: 5.834)
- **Hollosi A.**, Pászty K., Kellermayer M., Charras G., Varga A. BRAF Modulates Stretch-Induced Intercellular Gap Formation through Localized Actin Reorganization. 2021. *Int J Mol Sci* 22(16). DOI: 10.3390/ijms22168989. (IF: 6.208)

8.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények

- Varga, K., **Hollósi A.**, Pászty K., Hegedűs L., Szakács G., Tímár J., Papp B., Enyedi Á., Padányi R. Expression of calcium pumps is differentially regulated by histone deacetylase inhibitors and estrogen receptor alpha in breast cancer cells. 2018. *BMC Cancer* 18(1): 1029. (IF: 2.933)

9. Irodalomjegyzék

1. Dorard C, Cseh B, Ehrenreiter K, Wimmer R, Varga A, Hirschmugl T, Maier B, Kramer K, Furlinger S, Doma E, Baccarini M. (2019) RAF dimers control vascular permeability and cytoskeletal rearrangements at endothelial cell-cell junctions. *FEBS J*, 286: 2277-2294.
2. Strilic B, Offermanns S. (2017) Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. *Cancer Cell*, 32: 282-293.
3. Planchard D, Besse B, Groen HJM, Souquet PJ, Quoix E, Baik CS, Barlesi F, Kim TM, Mazieres J, Novello S, Rigas JR, Upalawanna A, D'Amelio AM, Jr., Zhang P, Mookerjee B, Johnson BE. (2016) Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 17: 984-993.
4. Yeh YT, Serrano R, Francois J, Chiu JJ, Li YJ, Del Alamo JC, Chien S, Lasheras JC. (2018) Three-dimensional forces exerted by leukocytes and vascular endothelial cells dynamically facilitate diapedesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: 133-138.
5. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. (2013) The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*, 9: 1057-1069.
6. Hennigs JK, Matuszcak C, Trepel M, Korbelin J. (2021) Vascular Endothelial Cells: Heterogeneity and Targeting Approaches. *Cells*, 10.
7. Claesson-Welsh L, Dejana E, McDonald DM. (2021) Permeability of the Endothelial Barrier: Identifying and Reconciling Controversies. *Trends Mol Med*, 27: 314-331.
8. Mussbacher M, Schossleitner K, Kral-Pointner JB, Salzmann M, Schrammel A, Schmid JA. (2022) More than Just a Monolayer: the Multifaceted Role of Endothelial Cells in the Pathophysiology of Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 24: 483-492.
9. Cerutti C, Ridley AJ. (2017) Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Exp Cell Res*, 358: 31-38.
10. Bazzoni G, Dejana E. (2004) Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*, 84: 869-901.

11. Tornavaca O, Chia M, Dufton N, Almagro LO, Conway DE, Randi AM, Schwartz MA, Matter K, Balda MS. (2015) ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J Cell Biol*, 208: 821-838.
12. Balda MS, Matter K. (2016) Tight junctions as regulators of tissue remodelling. *Curr Opin Cell Biol*, 42: 94-101.
13. Strell C, Entschladen F. (2008) Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Commun Signal*, 6: 10.
14. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. (2008) Cadherin switching. *J Cell Sci*, 121: 727-735.
15. Giannotta M, Trani M, Dejana E. (2013) VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell*, 26: 441-454.
16. Duong CN, Vestweber D. (2020) Mechanisms Ensuring Endothelial Junction Integrity Beyond VE-Cadherin. *Front Physiol*, 11: 519.
17. Reglero-Real N, Colom B, Bodkin JV, Nourshargh S. (2016) Endothelial Cell Junctional Adhesion Molecules: Role and Regulation of Expression in Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 36: 2048-2057.
18. Wallez Y, Huber P. (2008) Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1778: 794-809.
19. Hashimoto Y, Campbell M, Tachibana K, Okada Y, Kondoh M. (2021) Claudin-5: A Pharmacological Target to Modify the Permeability of the Blood-Brain Barrier. *Biol Pharm Bull*, 44: 1380-1390.
20. Luissint AC, Nusrat A, Parkos CA. (2014) JAM-related proteins in mucosal homeostasis and inflammation. *Semin Immunopathol*, 36: 211-226.
21. József S. *Molekuláris sejtbológia. Dialóg Campus Kiadó*2014.
22. Hodge RG, Ridley AJ. (2016) Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17: 496-510.
23. Dorland YL, Huveneers S. (2017) Cell-cell junctional mechanotransduction in endothelial remodeling. *Cell Mol Life Sci*, 74: 279-292.
24. Pannekoek WJ, Post A, Bos JL. (2014) Rap1 signaling in endothelial barrier control. *Cell Adh Migr*, 8: 100-107.

25. Wittchen ES, van Buul JD, Burridge K, Worthylake RA. (2005) Trading spaces: Rap, Rac, and Rho as architects of transendothelial migration. *Curr Opin Hematol*, 12: 14-21.
26. Debreczeni ML, Nemeth Z, Kajdacs E, Farkas H, Cervenak L. (2021) Molecular Dambusters: What Is Behind Hyperpermeability in Bradykinin-Mediated Angioedema? *Clin Rev Allergy Immunol*, 60: 318-347.
27. Gao Y, Chen T, Raj JU. (2016) Endothelial and Smooth Muscle Cell Interactions in the Pathobiology of Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 54: 451-460.
28. Hsu T, Nguyen-Tran HH, Trojanowska M. (2019) Active roles of dysfunctional vascular endothelium in fibrosis and cancer. *J Biomed Sci*, 26: 86.
29. Millan J, Cain RJ, Reglero-Real N, Bigarella C, Marcos-Ramiro B, Fernandez-Martin L, Correas I, Ridley AJ. (2010) Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells. *BMC Biol*, 8: 11.
30. Dalal PJ, Muller WA, Sullivan DP. (2020) Endothelial Cell Calcium Signaling during Barrier Function and Inflammation. *Am J Pathol*, 190: 535-542.
31. Vestweber D. (2015) How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol*, 15: 692-704.
32. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7: 678-689.
33. Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, Lee ES, Wu MH, Yuan SY. (2009) Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev Mol Med*, 11: e19.
34. Fidler IJ. (2002) The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation*, 70: 498-505.
35. Yang X, Chang Y, Wei W. (2016) Endothelial Dysfunction and Inflammation: Immunity in Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm*, 2016: 6813016.
36. Wettschureck N, Strilic B, Offermanns S. (2019) Passing the Vascular Barrier: Endothelial Signaling Processes Controlling Extravasation. *Physiol Rev*, 99: 1467-1525.

37. Nguyen DX, Bos PD, Massague J. (2009) Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*, 9: 274-284.
38. Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY, Li JF, Goswami S, Stanley ER, Segall JE, Pollard JW, Condeelis J. (2007) Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res*, 67: 2649-2656.
39. Reymond N, d'Agua BB, Ridley AJ. (2013) Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer*, 13: 858-870.
40. Goswami D, Vestweber D. (2016) How leukocytes trigger opening and sealing of gaps in the endothelial barrier. *F1000Res*, 5.
41. Muller WA. (2011) Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. *Annu Rev Pathol*, 6: 323-344.
42. Granger DN, Senchenkova E. In: *Inflammation and the Microcirculation*, doi:10.4199/C00013ED1V01Y201006ISP008, San Rafael (CA), 2010.
43. Schoppmeyer R. (2021) The diapedesis synapse: dynamic leukocyte-endothelium interactions. *Current Opinion in Physiology*, Volume 19: Pages 1-9.
44. Bauer K, Mierke C, Behrens J. (2007) Expression profiling reveals genes associated with transendothelial migration of tumor cells: a functional role for alphavbeta3 integrin. *Int J Cancer*, 121: 1910-1918.
45. Schaefer A, Te Riet J, Ritz K, Hoogenboezem M, Anthony EC, Mul FP, de Vries CJ, Daemen MJ, Figdor CG, van Buul JD, Hordijk PL. (2014) Actin-binding proteins differentially regulate endothelial cell stiffness, ICAM-1 function and neutrophil transmigration. *J Cell Sci*, 127: 4470-4482.
46. Schimmel L, Heemskerk N, van Buul JD. (2017) Leukocyte transendothelial migration: A local affair. *Small GTPases*, 8: 1-15.
47. Arts JJ. (2021) *Cell Biology Immunology and Inflammation*, doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.66074>.
48. Heemskerk N, Schimmel L, Oort C, van Rijssel J, Yin T, Ma B, van Unen J, Pitter B, Huveneers S, Goedhart J, Wu Y, Montanez E, Woodfin A, van Buul JD. (2016) F-actin-rich contractile endothelial pores prevent vascular leakage during leukocyte diapedesis through local RhoA signalling. *Nat Commun*, 7: 10493.
49. Madsen CD, Sahai E. (2010) Cancer dissemination--lessons from leukocytes. *Dev Cell*, 19: 13-26.

50. Joyce JA, Pollard JW. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*, 9: 239-252.
51. Reid SE, Kay EJ, Neilson LJ, Henze AT, Serneels J, McGhee EJ, Dhayade S, Nixon C, Mackey JB, Santi A, Swaminathan K, Athineos D, Papalazarou V, Patella F, Roman-Fernandez A, ElMaghloob Y, Hernandez-Fernaund JR, Adams RH, Ismail S, Bryant DM, Salmeron-Sanchez M, Machesky LM, Carlin LM, Blyth K, Mazzone M, Zanivan S. (2017) Tumor matrix stiffness promotes metastatic cancer cell interaction with the endothelium. *EMBO J*, 36: 2373-2389.
52. Bielenberg DR, Zetter BR. (2015) The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer J*, 21: 267-273.
53. Heyder C, Gloria-Maercker E, Entschladen F, Hatzmann W, Niggemann B, Zanker KS, Dittmar T. (2002) Realtime visualization of tumor cell/endothelial cell interactions during transmigration across the endothelial barrier. *J Cancer Res Clin Oncol*, 128: 533-538.
54. Sokeland G, Schumacher U. (2019) The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. *Mol Cancer*, 18: 12.
55. Kikkawa H, Kaihou M, Horaguchi N, Uchida T, Imafuku H, Takiguchi A, Yamazaki Y, Koike C, Kuruto R, Kakiuchi T, Tsukada H, Takada Y, Matsuura N, Oku N. (2002) Role of integrin alpha(v)beta3 in the early phase of liver metastasis: PET and IVM analyses. *Clin Exp Metastasis*, 19: 717-725.
56. Jufri NF, Mohamedali A, Avolio A, Baker MS. (2015) Mechanical stretch: physiological and pathological implications for human vascular endothelial cells. *Vasc Cell*, 7: 8.
57. Charras G, Yap AS. (2018) Tensile Forces and Mechanotransduction at Cell-Cell Junctions. *Curr Biol*, 28: R445-R457.
58. Chin L, Xia Y, Discher DE, Janmey PA. (2016) Mechanotransduction in cancer. *Curr Opin Chem Eng*, 11: 77-84.
59. Tarbell JM, Simon SI, Curry FR. (2014) Mechanosensing at the vascular interface. *Annu Rev Biomed Eng*, 16: 505-532.
60. Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. (2007) Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary

- atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol*, 49: 2379-2393.
61. Souilhol C, Serbanovic-Canic J, Fragiadaki M, Chico TJ, Ridger V, Roddie H, Evans PC. (2020) Endothelial responses to shear stress in atherosclerosis: a novel role for developmental genes. *Nat Rev Cardiol*, 17: 52-63.
 62. Dejana E, Vestweber D. (2013) The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 116: 119-144.
 63. Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM. (2009) The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell*, 16: 209-221.
 64. Liu Z, Tan JL, Cohen DM, Yang MT, Sniadecki NJ, Ruiz SA, Nelson CM, Chen CS. (2010) Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 9944-9949.
 65. Papusheva E, Heisenberg CP. (2010) Spatial organization of adhesion: force-dependent regulation and function in tissue morphogenesis. *EMBO J*, 29: 2753-2768.
 66. Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, Schwartz MA. (2005) A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*, 437: 426-431.
 67. Barry AK, Wang N, Leckband DE. (2015) Local VE-cadherin mechanotransduction triggers long-ranged remodeling of endothelial monolayers. *J Cell Sci*, 128: 1341-1351.
 68. Collins C, Guilluy C, Welch C, O'Brien ET, Hahn K, Superfine R, Burridge K, Tzima E. (2012) Localized tensional forces on PECAM-1 elicit a global mechanotransduction response via the integrin-RhoA pathway. *Curr Biol*, 22: 2087-2094.
 69. Osawa M, Masuda M, Kusano K, Fujiwara K. (2002) Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule? *J Cell Biol*, 158: 773-785.
 70. Timmerman I, Heemskerk N, Kroon J, Schaefer A, van Rijssel J, Hoogenboezem M, van Unen J, Goedhart J, Gadella TW, Jr., Yin T, Wu Y, Huveneers S, van Buul

- JD. (2015) A local VE-cadherin and Trio-based signaling complex stabilizes endothelial junctions through Rac1. *J Cell Sci*, 128: 3041-3054.
71. Abu Taha A, Taha M, Seebach J, Schnittler HJ. (2014) ARP2/3-mediated junction-associated lamellipodia control VE-cadherin-based cell junction dynamics and maintain monolayer integrity. *Mol Biol Cell*, 25: 245-256.
 72. Noda K, Zhang J, Fukuhara S, Kunimoto S, Yoshimura M, Mochizuki N. (2010) Vascular endothelial-cadherin stabilizes at cell-cell junctions by anchoring to circumferential actin bundles through alpha- and beta-catenins in cyclic AMP-Epac-Rap1 signal-activated endothelial cells. *Mol Biol Cell*, 21: 584-596.
 73. Ando K, Fukuhara S, Moriya T, Obara Y, Nakahata N, Mochizuki N. (2013) Rap1 potentiates endothelial cell junctions by spatially controlling myosin II activity and actin organization. *J Cell Biol*, 202: 901-916.
 74. Huvneers S, Oldenburg J, Spanjaard E, van der Krogt G, Grigoriev I, Akhmanova A, Rehmann H, de Rooij J. (2012) Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling. *J Cell Biol*, 196: 641-652.
 75. van Buul JD, Timmerman I. (2016) Small Rho GTPase-mediated actin dynamics at endothelial adherens junctions. *Small GTPases*, 7: 21-31.
 76. Yamada S, Nelson WJ. (2007) Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. *J Cell Biol*, 178: 517-527.
 77. Vitorino P, Hammer M, Kim J, Meyer T. (2011) A steering model of endothelial sheet migration recapitulates monolayer integrity and directed collective migration. *Mol Cell Biol*, 31: 342-350.
 78. Brevier J, Montero D, Svitkina T, Riveline D. (2008) The asymmetric self-assembly mechanism of adherens junctions: a cellular push-pull unit. *Phys Biol*, 5: 016005.
 79. Fraccaroli A, Franco CA, Rognoni E, Neto F, Rehberg M, Aszodi A, Wedlich-Soldner R, Pohl U, Gerhardt H, Montanez E. (2012) Visualization of endothelial actin cytoskeleton in the mouse retina. *PLoS One*, 7: e47488.
 80. Sauteur L, Krudewig A, Herwig L, Ehrenfeuchter N, Lenard A, Affolter M, Belting HG. (2014) Cdh5/VE-cadherin promotes endothelial cell interface

- elongation via cortical actin polymerization during angiogenic sprouting. *Cell Rep*, 9: 504-513.
81. Schulte D, Kupperts V, Dartsch N, Broermann A, Li H, Zarbock A, Kamenyeva O, Kiefer F, Khandoga A, Massberg S, Vestweber D. (2011) Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability. *EMBO J*, 30: 4157-4170.
 82. van Geemen D, Smeets MW, van Stalborch AM, Woerdeman LA, Daemen MJ, Hordijk PL, Huvneers S. (2014) F-actin-anchored focal adhesions distinguish endothelial phenotypes of human arteries and veins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34: 2059-2067.
 83. Orsenigo F, Giampietro C, Ferrari A, Corada M, Galaup A, Sigismund S, Ristagno G, Maddaluno L, Koh GY, Franco D, Kurtcuoglu V, Poulidakos D, Baluk P, McDonald D, Grazia Lampugnani M, Dejana E. (2012) Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nat Commun*, 3: 1208.
 84. Wessel F, Winderlich M, Holm M, Frye M, Rivera-Galdos R, Vockel M, Linnepe R, Ipe U, Stadtmann A, Zarbock A, Nottebaum AF, Vestweber D. (2014) Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat Immunol*, 15: 223-230.
 85. Lakshmikanthan S, Zheng X, Nishijima Y, Sobczak M, Szabo A, Vasquez-Vivar J, Zhang DX, Chrzanowska-Wodnicka M. (2015) Rap1 promotes endothelial mechanosensing complex formation, NO release and normal endothelial function. *EMBO Rep*, 16: 628-637.
 86. Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ. (2005) Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*, 123: 889-901.
 87. Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI. (2005) Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*, 123: 903-915.
 88. Kwiatkowski AV, Maiden SL, Pokutta S, Choi HJ, Benjamin JM, Lynch AM, Nelson WJ, Weis WI, Hardin J. (2010) In vitro and in vivo reconstitution of the cadherin-catenin-actin complex from *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 14591-14596.

89. Yonemura S, Wada Y, Watanabe T, Nagafuchi A, Shibata M. (2010) alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat Cell Biol*, 12: 533-542.
90. le Duc Q, Shi Q, Blonk I, Sonnenberg A, Wang N, Leckband D, de Rooij J. (2010) Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *J Cell Biol*, 189: 1107-1115.
91. Buckley CD, Tan J, Anderson KL, Hanein D, Volkmann N, Weis WI, Nelson WJ, Dunn AR. (2014) Cell adhesion. The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science*, 346: 1254211.
92. Kim TJ, Zheng S, Sun J, Muhamed I, Wu J, Lei L, Kong X, Leckband DE, Wang Y. (2015) Dynamic visualization of alpha-catenin reveals rapid, reversible conformation switching between tension states. *Curr Biol*, 25: 218-224.
93. Yao M, Qiu W, Liu R, Efremov AK, Cong P, Seddiki R, Payre M, Lim CT, Ladoux B, Mege RM, Yan J. (2014) Force-dependent conformational switch of alpha-catenin controls vinculin binding. *Nat Commun*, 5: 4525.
94. Huvneers S, Daemen MJ, Hordijk PL. (2015) Between Rho(k) and a hard place: the relation between vessel wall stiffness, endothelial contractility, and cardiovascular disease. *Circ Res*, 116: 895-908.
95. Conway DE, Breckenridge MT, Hinde E, Gratton E, Chen CS, Schwartz MA. (2013) Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1. *Curr Biol*, 23: 1024-1030.
96. Amado-Azevedo J, Valent ET, Van Nieuw Amerongen GP. (2014) Regulation of the endothelial barrier function: a filum granum of cellular forces, Rho-GTPase signaling and microenvironment. *Cell Tissue Res*, 355: 557-576.
97. Birukov KG. (2009) Small GTPases in mechanosensitive regulation of endothelial barrier. *Microvasc Res*, 77: 46-52.
98. Mikelis CM, Simaan M, Ando K, Fukuhara S, Sakurai A, Amornphimoltham P, Masedunskas A, Weigert R, Chavakis T, Adams RH, Offermanns S, Mochizuki N, Zheng Y, Gutkind JS. (2015) RhoA and ROCK mediate histamine-induced vascular leakage and anaphylactic shock. *Nat Commun*, 6: 6725.

99. Guilluy C, Swaminathan V, Garcia-Mata R, O'Brien ET, Superfine R, Burridge K. (2011) The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nat Cell Biol*, 13: 722-727.
100. Lessey-Morillon EC, Osborne LD, Monaghan-Benson E, Guilluy C, O'Brien ET, Superfine R, Burridge K. (2014) The RhoA guanine nucleotide exchange factor, LARG, mediates ICAM-1-dependent mechanotransduction in endothelial cells to stimulate transendothelial migration. *J Immunol*, 192: 3390-3398.
101. Abiko H, Fujiwara S, Ohashi K, Hiattari R, Mashiko T, Sakamoto N, Sato M, Mizuno K. (2015) Rho guanine nucleotide exchange factors involved in cyclic-stretch-induced reorientation of vascular endothelial cells. *J Cell Sci*, 128: 1683-1695.
102. Wang N, Tytell JD, Ingber DE. (2009) Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 75-82.
103. Matthews BD, Overby DR, Mannix R, Ingber DE. (2006) Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. *J Cell Sci*, 119: 508-518.
104. Li X, Wang J. (2020) Mechanical tumor microenvironment and transduction: cytoskeleton mediates cancer cell invasion and metastasis. *Int J Biol Sci*, 16: 2014-2028.
105. Gumbiner BM, Kim NG. (2014) The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth. *J Cell Sci*, 127: 709-717.
106. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S, Elvassore N, Piccolo S. (2011) Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474: 179-183.
107. Dupont S. (2016) Role of YAP/TAZ in cell-matrix adhesion-mediated signalling and mechanotransduction. *Exp Cell Res*, 343: 42-53.
108. Choi HJ, Zhang H, Park H, Choi KS, Lee HW, Agrawal V, Kim YM, Kwon YG. (2015) Yes-associated protein regulates endothelial cell contact-mediated expression of angiopoietin-2. *Nat Commun*, 6: 6943.
109. Wojciak-Stothard B, Potempa S, Eichholtz T, Ridley AJ. (2001) Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *J Cell Sci*, 114: 1343-1355.

110. Szulcek R, Beckers CM, Hodzic J, de Wit J, Chen Z, Grob T, Musters RJ, Minshall RD, van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP. (2013) Localized RhoA GTPase activity regulates dynamics of endothelial monolayer integrity. *Cardiovasc Res*, 99: 471-482.
111. Mammoto A, Mammoto T, Ingber DE. (2008) Rho signaling and mechanical control of vascular development. *Curr Opin Hematol*, 15: 228-234.
112. Pertz O, Hodgson L, Klemke RL, Hahn KM. (2006) Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature*, 440: 1069-1072.
113. Weis SM, Cheresh DA. (2005) Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*, 437: 497-504.
114. Hartmann S, Ridley AJ, Lutz S. (2015) The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease. *Front Pharmacol*, 6: 276.
115. Peng Y, Chen Z, Chen Y, Li S, Jiang Y, Yang H, Wu C, You F, Zheng C, Zhu J, Tan Y, Qin X, Liu Y. (2019) ROCK isoforms differentially modulate cancer cell motility by mechanosensing the substrate stiffness. *Acta Biomater*, 88: 86-101.
116. Shi J, Wu X, Surma M, Vemula S, Zhang L, Yang Y, Kapur R, Wei L. (2013) Distinct roles for ROCK1 and ROCK2 in the regulation of cell detachment. *Cell Death Dis*, 4: e483.
117. Berridge M. *Cell Signalling Biology*. Portland Press 2014.
118. Lessey EC, Guilluy C, Burrridge K. (2012) From mechanical force to RhoA activation. *Biochemistry*, 51: 7420-7432.
119. Croft DR, Coleman ML, Li S, Robertson D, Sullivan T, Stewart CL, Olson MF. (2005) Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *J Cell Biol*, 168: 245-255.
120. Wickman GR, Julian L, Mardilovich K, Schumacher S, Munro J, Rath N, Zander SA, Mleczak A, Sumpton D, Morrice N, Bienvenut WV, Olson MF. (2013) Blebs produced by actin-myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. *Cell Death Differ*, 20: 1293-1305.

121. Lin T, Zeng L, Liu Y, DeFea K, Schwartz MA, Chien S, Shyy JY. (2003) Rho-ROCK-LIMK-cofilin pathway regulates shear stress activation of sterol regulatory element binding proteins. *Circ Res*, 92: 1296-1304.
122. Desideri E, Cavallo AL, Baccarini M. (2015) Alike but Different: RAF Paralogs and Their Signaling Outputs. *Cell*, 161: 967-970.
123. Roskoski R, Jr. (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*, 66: 105-143.
124. Degirmenci U, Wang M, Hu J. (2020) Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells*, 9.
125. Ehrenreiter K, Piazzolla D, Velamoor V, Sobczak I, Small JV, Takeda J, Leung T, Baccarini M. (2005) Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration. *J Cell Biol*, 168: 955-964.
126. Lavoie H, Therrien M. (2015) Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16: 281-298.
127. Varga A, Ehrenreiter K, Aschenbrenner B, Kocieniewski P, Kochanczyk M, Lipniacki T, Baccarini M. (2017) RAF1/BRAF dimerization integrates the signal from RAS to ERK and ROKalpha. *Sci Signal*, 10.
128. Romano D, Nguyen LK, Matallanas D, Halasz M, Doherty C, Kholodenko BN, Kolch W. (2014) Protein interaction switches coordinate Raf-1 and MST2/Hippo signalling. *Nat Cell Biol*, 16: 673-684.
129. Ehrenreiter K, Kern F, Velamoor V, Meissl K, Galabova-Kovacs G, Sibia M, Baccarini M. (2009) Raf-1 addiction in Ras-induced skin carcinogenesis. *Cancer Cell*, 16: 149-160.
130. Wimmer R, Cseh B, Maier B, Scherrer K, Baccarini M. (2012) Angiogenic sprouting requires the fine tuning of endothelial cell cohesion by the Raf-1/Rok-alpha complex. *Dev Cell*, 22: 158-171.
131. Dorard C, Vucak G, Baccarini M. (2017) Deciphering the RAS/ERK pathway in vivo. *Biochem Soc Trans*, 45: 27-36.
132. Pannekoek WJ, van Dijk JJ, Chan OY, Huveneers S, Linnemann JR, Spanjaard E, Brouwer PM, van der Meer AJ, Zwartkruis FJ, Rehmann H, de Rooij J, Bos JL. (2011) Epac1 and PDZ-GEF cooperate in Rap1 mediated endothelial junction control. *Cell Signal*, 23: 2056-2064.

133. Kooistra MR, Corada M, Dejana E, Bos JL. (2005) Epac1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin. *FEBS Lett*, 579: 4966-4972.
134. Declercq M, Treps L. (2019) BRAF, A gatekeeper controlling endothelial permeability. *FEBS J*, 286: 2273-2276.
135. Pritchard CA, Hayes L, Wojnowski L, Zimmer A, Marais RM, Norman JC. (2004) B-Raf acts via the ROCKII/LIMK/cofilin pathway to maintain actin stress fibers in fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 24: 5937-5952.
136. Crissman JD, Hatfield J, Schaldenbrand M, Sloane BF, Honn KV. (1985) Arrest and extravasation of B16 amelanotic melanoma in murine lungs. A light and electron microscopic study. *Lab Invest*, 53: 470-478.
137. Rico F, Roca-Cusachs P, Gavara N, Farre R, Rotger M, Navajas D. (2005) Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 72: 021914.
138. Hino N, Rossetti L, Marin-Llaurado A, Aoki K, Trepats X, Matsuda M, Hirashima T. (2020) ERK-Mediated Mechanochemical Waves Direct Collective Cell Polarization. *Dev Cell*, 53: 646-660 e648.
139. Sah RL, Trippel SB, Grodzinsky AJ. (1996) Differential effects of serum, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor-2 on the maintenance of cartilage physical properties during long-term culture. *J Orthop Res*, 14: 44-52.
140. Kern F, Doma E, Rupp C, Niaux T, Baccarini M. (2013) Essential, non-redundant roles of B-Raf and Raf-1 in Ras-driven skin tumorigenesis. *Oncogene*, 32: 2483-2492.
141. Borbiev T, Verin AD, Birukova A, Liu F, Crow MT, Garcia JG. (2003) Role of CaM kinase II and ERK activation in thrombin-induced endothelial cell barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285: L43-54.
142. Sumi T, Matsumoto K, Takai Y, Nakamura T. (1999) Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J Cell Biol*, 147: 1519-1532.
143. Gronloh MLB, Arts JJG, van Buul JD. (2021) Neutrophil transendothelial migration hotspots - mechanisms and implications. *J Cell Sci*, 134.

144. Wiggan O, Shaw AE, DeLuca JG, Bamburg JR. (2012) ADF/cofilin regulates actomyosin assembly through competitive inhibition of myosin II binding to F-actin. *Dev Cell*, 22: 530-543.
145. Van Troys M, Huyck L, Leyman S, Dhaese S, Vandekerckhove J, Ampe C. (2008) Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur J Cell Biol*, 87: 649-667.
146. Oldenburg J, de Rooij J. (2014) Mechanical control of the endothelial barrier. *Cell Tissue Res*, 355: 545-555.
147. Tsuji T, Ishizaki T, Okamoto M, Higashida C, Kimura K, Furuyashiki T, Arakawa Y, Birge RB, Nakamoto T, Hirai H, Narumiya S. (2002) ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol*, 157: 819-830.
148. Hirano M, Hirano K. (2016) Myosin di-phosphorylation and peripheral actin bundle formation as initial events during endothelial barrier disruption. *Sci Rep*, 6: 20989.
149. Valent ET, van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VWM, Hordijk PL. (2016) Traction force dynamics predict gap formation in activated endothelium. *Exp Cell Res*, 347: 161-170.
150. Krishnan R, Klumpers DD, Park CY, Rajendran K, Trepap X, van Bezu J, van Hinsbergh VW, Carman CV, Brain JD, Fredberg JJ, Butler JP, van Nieuw Amerongen GP. (2011) Substrate stiffening promotes endothelial monolayer disruption through enhanced physical forces. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300: C146-154.
151. Yao Z, Gao Y, Su W, Yaeger R, Tao J, Na N, Zhang Y, Zhang C, Rymar A, Tao A, Timaul NM, McGriskin R, Outmezguine NA, Zhao H, Chang Q, Qeriqi B, Barbacid M, de Stanchina E, Hyman DM, Bollag G, Rosen N. (2019) RAF inhibitor PLX8394 selectively disrupts BRAF dimers and RAS-independent BRAF-mutant-driven signaling. *Nat Med*, 25: 284-291.
152. McDowell SAC, Quail DF. (2019) Immunological Regulation of Vascular Inflammation During Cancer Metastasis. *Front Immunol*, 10: 1984.
153. Kelkar M, Bohec P, Charras G. (2020) Mechanics of the cellular actin cortex: From signalling to shape change. *Curr Opin Cell Biol*, 66: 69-78.

154. Gordon E, Schimmel L, Frye M. (2020) The Importance of Mechanical Forces for in vitro Endothelial Cell Biology. *Front Physiol*, 11: 684.
155. Birukov KG, Jacobson JR, Flores AA, Ye SQ, Birukova AA, Verin AD, Garcia JG. (2003) Magnitude-dependent regulation of pulmonary endothelial cell barrier function by cyclic stretch. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285: L785-797.
156. Julian L, Olson MF. (2014) Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases*, 5: e29846.
157. Duda M, Kirkland NJ, Khalilgharibi N, Tozluoglu M, Yuen AC, Carpi N, Bove A, Piel M, Charras G, Baum B, Mao Y. (2019) Polarization of Myosin II Refines Tissue Material Properties to Buffer Mechanical Stress. *Dev Cell*, 48: 245-260 e247.
158. Lee S, Kumar S. (2020) Cofilin is required for polarization of tension in stress fiber networks during migration. *J Cell Sci*, 133.
159. Higashi T, Chiba H. (2020) Molecular organization, regulation and function of tricellular junctions. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1862: 183143.
160. Acharya BR, Nestor-Bergmann A, Liang X, Gupta S, Duszyc K, Gauquelin E, Gomez GA, Budnar S, Marcq P, Jensen OE, Bryant Z, Yap AS. (2018) A Mechanosensitive RhoA Pathway that Protects Epithelia against Acute Tensile Stress. *Dev Cell*, 47: 439-452 e436.
161. Escribano J, Chen MB, Moeendarbary E, Cao X, Shenoy V, Garcia-Aznar JM, Kamm RD, Spill F. (2019) Balance of mechanical forces drives endothelial gap formation and may facilitate cancer and immune-cell extravasation. *PLoS Comput Biol*, 15: e1006395.
162. Fehring V, Schaeper U, Ahrens K, Santel A, Keil O, Eisermann M, Giese K, Kaufmann J. (2014) Delivery of therapeutic siRNA to the lung endothelium via novel Lipoplex formulation DACC. *Mol Ther*, 22: 811-820.
163. Goto C, Nishioka K, Umemura T, Jitsuiki D, Sakaguchi A, Kawamura M, Chayama K, Yoshizumi M, Higashi Y. (2007) Acute moderate-intensity exercise induces vasodilation through an increase in nitric oxide bioavailability in humans. *Am J Hypertens*, 20: 825-830.

164. Birukova AA, Chatchavalvanich S, Rios A, Kawkitinarong K, Garcia JG, Birukov KG. (2006) Differential regulation of pulmonary endothelial monolayer integrity by varying degrees of cyclic stretch. *Am J Pathol*, 168: 1749-1761.
165. Kuebler WM, Uhlig U, Goldmann T, Schael G, Kerem A, Exner K, Martin C, Vollmer E, Uhlig S. (2003) Stretch activates nitric oxide production in pulmonary vascular endothelial cells in situ. *Am J Respir Crit Care Med*, 168: 1391-1398.
166. Xiong Y, Hu Z, Han X, Jiang B, Zhang R, Zhang X, Lu Y, Geng C, Li W, He Y, Huo Y, Shibuya M, Luo J. (2013) Hypertensive stretch regulates endothelial exocytosis of Weibel-Palade bodies through VEGF receptor 2 signaling pathways. *Cell Res*, 23: 820-834.
167. Caliskan E, de Souza DR, Boning A, Liakopoulos OJ, Choi YH, Pepper J, Gibson CM, Perrault LP, Wolf RK, Kim KB, Emmert MY. (2020) Saphenous vein grafts in contemporary coronary artery bypass graft surgery. *Nat Rev Cardiol*, 17: 155-169.
168. Conte MS, Mann MJ, Simosa HF, Rhyhart KK, Mulligan RC. (2002) Genetic interventions for vein bypass graft disease: a review. *J Vasc Surg*, 36: 1040-1052.

10. Köszönetnyilvánítás

Először is köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Varga Andreának, aki kutatásom során szakértő módon irányította munkámat. Köszönöm, hogy megosztotta velem tudását, tapasztalatát és megtanított talpon maradni és küzdeni a tudományos kutatómunka nehézségeivel szemben.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kellermayer Miklósnak, a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet igazgatójának, aki lehetőséget és háttérrel biztosított a kutatási munkám zavartalan működéséhez, továbbá az intézet minden munkatársának, aki segítségével hozzájárult dolgozatom elkészüléséhez. Szeretnék köszönetet mondani azoknak a munkatársaimnak, akik nem hagytak egyedül a kutatási munkám során, önzetlen segítségükért és támogatásukért, mert felbecsülhetetlen értékű volt számomra. Köszönöm Lór Krisztinának, Dr. Padányi Ritának, Dr. Tordai Hedvignek, Dr. Haluszka Dórának, Kiss Bálintnak, Dr. Altorjay Áronnak és Csányi Csillának, valamint köszönettel tartozom Dr. Herényi Leventének és Dr. Liliom Károlynak, hogy segítettek leküzdeni mindig az elem gördülő nehézségeket és haladni tovább a kutatás rögös útján. Hálás vagyok nekik, mert ez a dolgozat nélkülük nem jöhetett volna létre.

Hálával tartozom korábbi mentoromnak Dr. Varga Karolinának, akitől rengeteget tanultam, példaértékű tudással és szakértelemmel rendelkezik és kutatási munkám alapjait neki köszönhetem, amire későbbiekben építkezni tudtam. Hálás vagyok neki, hogy nagy odafigyeléssel, gondosan vezette kezdő kutatói pályám és mindezek mellett barátként is mindig számíthattam rá. Hálával tartozom korábbi témavezetőimnek és azoknak, akik segítettek a tudományos életem, köszönettel tartozom Dr. Enyedi Ágnesnek, Dr. Michael Gruschnak, Prof. Dr. Tímár Józsefnek és Dr. Csókay Katalinnak rengeteget tanultam tőlük és nagyban hozzájárultak a kutatói szemléletem kialakításához.

Köszönettel tartozom az új munkatársaimnak, akikre mindig számíthatok, támogatnak és segítenek az elem gördülő nehézségek leküzdésében. Az ő támogatásuk nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

És végül, de nem utolsósorban köszönöm férjemnek, családomnak és barátaimnak és kutyusaimnak, akik mindvégig kifogyhatatlan és végtelen türelemmel és szeretettel támogattak, és osztoztak örömben és bánatomban egyaránt.