

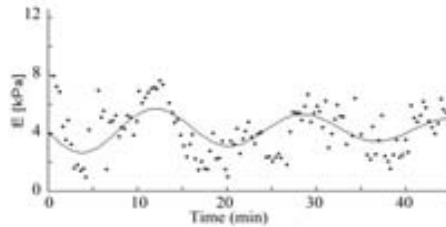
## Szakmai zárójelentés az OTKA 81180 pályázatáról

Amint azt a K81180-as OTKA pályázatban leírtuk, fő kutatási témánk, a vér-agy gátat alkotó agyi endotél sejtek mechanikai tulajdonságainak a tanulmányozása atomerő mikroszkóp (AFM) segítségével. Az AFM alkalmas nemcsak vákuumban, hanem levegőn, sőt folyadékban végzett mérésre is. Ebből következik, hogy élő sejteket lehet vele megfigyelni. Az endotél sejtek alkotják a mikro-kapilláris vérereket, amelyek átteresztik az érfalon az agy működéséhez szükséges anyagokat és kiszűrik a testidegen vegyületeket. Ezt nevezzük vér-agy gátnak.

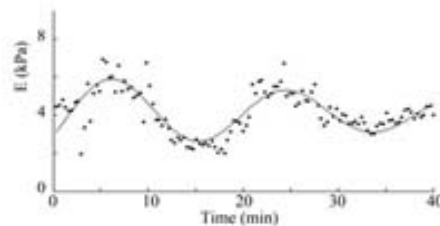
Meghatároztuk az endotél sejtek sztatikus rugalmasságát, keménységét, valamint a rugalmasság függését térben és időben. Megmértük, hogy a sejtek keményebbek a peremüknél a sejtmaghoz viszonyítva. Ez a különbség fixált sejteken eltűnik, vagyis az élő sejt tulajdonsága. A rugalmasság időbeni függése hosszú periódusú rezgést mutat (Ábra). Konfluens sejt kultúrán a legnagyobb ez a rezgés, míg fixált sejteken ez is eltűnik (1). Az oszcilláció eredete és szerepe a sejt életében, nyitott kérdés, amire keressük a választ.

AFM segítségével meg lehet határozni két objektum közötti kölcsönhatást. Sejteknél a köztük létrejövő adhéziós erőt lehet mérni. Ehhez az egyik sejtet a mérőasztalhoz, a másikat pedig a rugólapkához kötjük kémiai kötéssel. A két sejtet rövid ideig összenyomjuk, majd széthúzzuk. A széthúzáskor mérhető szakadási görbéből számolható az adhézió. Analizálva a mért görbét, megállapítottuk, hogy létezik egy minimális szakadási erő (kb. 20 pN).

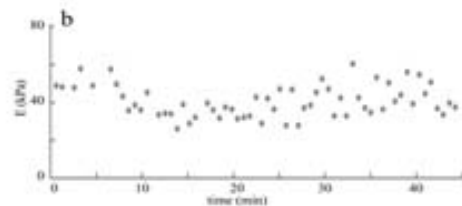
Kísérleteink során megfigyeltük az adhéziós erő létrejöttének folyamatát az agyi endotél és a melanoma sejtek között, valamint a kölcsönhatás egyes tulajdonságait (2). A melanoma sejtek aránylag könnyen legyőzik a vér-agy gátat, áttétet hozva létre az agyban. Az áthatoláshoz, hogy „feltörje” a gátat, meg kell tapadjon az endotél sejteken. Ebben fontos szerepe van a két sejt között



Különálló  
élő sejtek



Konfluens  
élő sejtek



Fixált  
sejtek

Ábra: A rugalmasság időfüggése három különböző állapotában az endotél sejteknek.

létrejövő adhézióknak. Mértük a kialakuló adhéziós erő nagyságát néhány külső paraméter, mint például: a tápoldatba adagolt vegyszerek, az összenyomás ereje és időtartama és a rugólapka visszahúzási sebességének a függvényében. Így megismerve a kétfajta sejt közötti kölcsönhatást, megpróbáltuk meghatározni, milyen változását az adhézióknak idézi elő a melanoma sejt jelenléte.

Vizsgáltuk a Rho/ROCK jelátviteli útvonalat. Kimutattuk, hogy az Y27632 ROCK inhibitor gátlása megemelte az endotél sejtrétegen áthaladó melanoma sejtek számát és megerősítette a két sejtípus közti adhéziós erőt. Ezzel szemben a PP2 szelektív SRC kináz inhibitor és az LY294002 rák kináz inhibitoroknak semmi kimutatható hatása nincs a sejtek fentebb említett tulajdonságaira. Ezek a

megfigyelések nemcsak alapkutatási hanem orvos-diagnosztikai jelentőséggel is bírnak (3) ..

A melanoma sejtből származó exoszómák AFM képe két jól meghatározott méretet mutat. Az exoszómák gyorsították a dendrit sejtek érését, elősegítve a T sejtek szaporodását. Az exoszómák aktiválták a makrofágokat. A tumor sejtekből származó exoszómák karakterisztikus különbséget mutattak az egészséges sejtből származókhöz viszonyítva. Ez utal arra, hogy szerepük lehet a tumor fejlődésének alakulásában (4) .

Vizsgáltuk a dupla fonalas RNS (ds-RNS) hatását primer humán tüdő artériás endotél sejtekre. A mikroszkópos képen a sejtek elnyúlt alakot mutatnak. Az AFM-es rugalmassági modulus mérések növekvő értéket mutatnak, növekvő Poly I:C kezelés hatására. A sejtek ds-RNS kezelése több változást hozott létre: modulálta a  $Ca^{2+}$  jelátvitelt, a sejtek szaporodása csökkent (5) . Ezt a munkát egy grazi kutatócsoporttal együtt készítettük.

A sejtek felépítésében meghatározó jellegű alkotó elem a különböző részeket elválasztó és egyben összekötő biológiai membrán. Ezért szükségesnek találtuk a membránok tulajdonságainak a tanulmányozását.

Ahhoz, hogy a membránokat AFM segítségével leképezhessük, egy szilárd felületre kell rögzíteni. A felületként legtöbbször a csillámot használják, Célunk volt egy olyan mesterséges rendszer kiépítése, amely jobban modellezi a természetes membránokat. A fő probléma, hogy a szilárd hordozóra felvitt membránok alatt nincs hely az oda transzportált anyagok tovább haladására. Intézetünkben kifejlesztettek egy módszert, a membránok többrétegű polielektrolit hordozóra való lerakásával . Kazein micellák kialakulását figyeltük meg egy ilyen felületen. Kimutattuk, hogy a  $\kappa$ -kazein lezárja a micellák kialakulását. Erre a felületre jól kontrollált lipid egyréteget tesznek, amelyek a megválasztott töltésviszonyok következtében összetapadnak, kettős réteget vagy akár több réteget alkotva (6) .

Megvizsgáltuk, hogyan hat a mesterséges és egyes természetes membránra egy antibakteriális peptid az indolicidin,. Az indolicidin rövid idő alatt tönkretette a dipalmitoyl phosphatidilcholin mesterséges membránt. A nagy mennyiségben

bakteriorodopszint tartalmazó bíbor membránra sokkal gyengébb hatással volt. Úgy tűnik hogy az indolicidin a membrán lipidjeire hat (7) .

Felkérésre, egy összefoglalót írtunk a mesterséges és természetes membránokon végzett mérésekről, amely egy biológiai orientáltságú AFM könyvben jelent meg (8) .

A biológiai membrán, mint komplex objektum, tovább bontható lipidekre és membrán fehérjékre. Két membrán fehérjén végeztünk méréseket: a bakteriorodopszinon és a fotoszintetikus reakció centrumon. Mivel a bakteriorodopszinnak a fizikai és kémiai tulajdonságai jól ismertek és köztudott, hogy a fehérje kétdimenziós kristályt képez a bíbor membránban ezért a második harmonikus gerjesztéssel a fehérje optikai kiralitását határoztuk meg. A különböző nemlineáris optikai folyamat közül a második harmonikus gerjesztés a legtanulmányozottabb Ezt a munkát egy francia kutatócsoporttal együtt végeztük (9-12) .

Az SzTE egy kutatócsoportjával együttműködve tanulmányoztuk a szén nanocső és fotoszintetikus reakciócentrum keverékéből előállított nano-biokompozit fénygerjesztésre adott válaszjelét konkrétan a *R. sphaeroides* reakciócentrum optikai tulajdonságainak a változását mértük, száraz mintát készítve belőle ITO réteggel bevont üvegen. Kimutattuk egy eddig ismeretlen triplet állapot létét a gerjesztett reakciócentrumban (13, 14) .

Amint ebből a beszámolóból is kitűnik, az utolsó négy évben végzett munkánk során követtük a pályázatban foglaltakat. Vagyis fő kutatási objektumunk az élő endotél sejt volt, míg másodlagos témánk a biológiai membránok és két nano-biokompozit volt. Folytatni szeretnénk ezeket a munkákat, ha sikerül támogatást szerezni rá.

## Bibliográfia

1. Végh,G.A. *et al.* Spatial and temporal dependence of the cerebral endothelial cells elasticity. *Journal of Molecular Recognition* **124**, 422-428 (2011).
2. Végh,G.A. *et al.* Adhesion and stress relaxation forces between melanoma and cerebral endothelial cells. *European Biophysics Journal With Biophysics Letters* **41**, 139-145 (2012).
3. Wilhelm,I. *et al.* Role of RHO/ROCK signaling in the interactionn of melanoma cells with the blood-brain barrier. *Pigment Cell Melanoma Res.* **27**, 113-123 (2014).
4. Marton,A. *et al.* Melanoma cell-derived exosomes alter macrophage and dendritic cell function *in vitro*. *Immunology Lettes* **148**, 34-38 (2012).
5. Bálint,Z. *et al.* Double-stranded RNA attenuates the barrier function of human pulmonary artery endothelial cells. *PLOS ONE* **8**, (2013).
6. Nagy,K., Váró,G. & Szalontai,B. k-Casein terminates casein micelle build-up by its "soft" secondary structure. *European Biophysics Journal With Biophysics Letters* **41**, 959-968 (2012).
7. Végh,G.A. *et al.* Effect of antimicrobial peptide-amide,indolicidin on biological membranes. *J. Biomed. Biotechnol.* doi:**10.1155/2011/670589**, (2011).
8. Váró,G. & Szegletes,Z. Atomic force microscopy. Investigation into biology - from cell to protein. Frewin,L.C. (ed.), pp. 219-232 (InTech,2012).
9. Bovino,F.A. *et al.* Detection of second-order nonlinear optical magnetization by mapping normalized Stokes parameters. *J. Opt. Soc. Am. B* **30**, 568-575 (2013).
10. Bovino,F.A., Larciprete,M.C., Sibilìa,C., Váró,G. & Gergely,C. Evidence of multipolar response of bacteriorhodopsin by noncollinear second harmonic generation. *Optics Express* **20**, 14621-14631 (2012).
11. Bovino,F.A. *et al.* Nonlinear optics. Kamanina,N. (ed.), pp. 117-132 (InTech,2012).
12. Larciprete,M.C.; Belardini,A.; Sibilìa,C.; Saab,M.; Váró,G. és Gergely,C. Optical chirality of bacteriorhodopsin films via second harmonic Maker's fringes measurements. *Applied Physics Letters* **96**, 221108-1-221108-3. 2010.
13. Szabó,T. *et al.* Photosynthetic reaction centers/ITO hybrid nanostructure. *Materials Science & Engineering C* **33**, 769-773 (2013).
14. Hajdu,K. *et al.* Photosynthetic reaction center protein in nanostructures. *Physica Status Solidi B* doi **10.1002/pssb.201100046**, (2011).