

MTA Doktora Pályázat

Doktori Értekezés

A VÉR-AGY GÁT FIZIOLÓGIÁS ÉS PATOLÓGIÁS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTTI MŰKÖDÉSÉNEK VIZSGÁLATA

Dr. Krizbai István Adorján

Szeged

2011

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	6
2.1. A vér-agy gát	6
2.1.1. A vér-agy gát szerepe	6
2.1.2. A vér-agy gát szerkezete	8
2.2. Az interendoteliális kapcsolatok	11
2.2.1. Szoros kapcsolatok (tight junction, TJ)	11
2.2.2. Adherens kapcsolatok	17
2.3. Jelátviteli folyamatok az agyi endotélsejtekben	
2.3.1. A glutamát	19
2.3.2. A szerotonin	
2.3.3. A junkcionális komplexum szabályozásában résztvevő jelt	ovábbító
folyamatok	20
2.4. A vér-agy gát patológiás körülmények között	
2.4.1. A vér-agy gát sérülése hipoxia és oxidatív stressz során	
2.4.2. A hemorrágiás sokk hatásai a vér-agy gátra	
2.4.3. A vér-agy gát gyulladásos folyamatokban	
2.4.4. A dohányzás hatásai a vér-agy gátra	
2.4.5. Az agyi endotélsejtek működése hiperozmotikus stressz körü	lmények
között	
2.4.6. A vér-agy gát szerepe rosszíndulatú daganatok agyi metasztá	izisainak
kialakulásában	
3. CELKITUZESEK	
4. MODSZEREK	
4.1. Vegyszerek	
4.2. In vitro modellek	
4.3. Molekuláris biológiai módszerek	
4.4. Fehérje vizsgálati módszerek	
4.5. Mikroszkópos vizsgálatok	
4.6. In vivo kísérletek	
5. EREDMENYEK	
5.1. A junkcionális fehérjék expressziójának sajátosságai a vér-agy gát sejtjei	ben 49
5.1.1. Az occludin expressziója asztrocitákban	
5.1.2. Különböző fenotípusú agyi endotélsejtek funkcionális és mo	lekuláris
sajátosságainak jellemzése	
5.2. A szignáltranszdukció sajátosságainak vizsgálata agyi endotélsejtekben	
5.2.1. Glutamát receptorok és glutamát transzporterek expressziója	
5.2.2. A szerotonin transzporter expressziója	
5.2.3. A G-fehérjék szerepe agyi endotélsejtekben	
5.2.4. A ZO-2 szerepe a jeltovábbításban	
5.3. Az agyi endotélsejtek patológiás körülmények között: extrac	elluláris
stresszfaktorok hatása	
5.3.1. A hipoxia hatása a junkcionális komplexum működésére	
5.3.2. A vérzéses sokk által indukált vér-agy gát károsodások	
5.3.3. A vér-agy gát gyulladásos folyamatokban: a TLR2/6 szerepe	73
5.3.4. A dohányfüst egyes összetevőinek hatása a vér-agy gátra	
5.3.5. Az occludin lebontásának mechanizmusa	

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5-HT: 5-hidroxi-triptamin, szerotonin ABC transzporterek: ATP-binding casette transzporterek AFM: atomic force microscope (atomi erő mikroszkóp) AJ: adherens junction (adherens kapcsolat) AMPA: 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2- oxazol-4-il)propánsav BSA: bovine serum albumin (marha szérum albumin) bFGF: basic fibroblast growth factor (bázikus fibroblaszt növekedési faktor) CAM-PK II: calmodulin protein kinase II (kalmodulin-dependens protein kináz II) CAR: coxsackie és adenovírus receptor Cdc42: cell division cycle 42 CK: casein kinase (kazein kináz) CPT-cAMP: 8-(4-chlorophenylthio)-cyclic adenosine monophosphate Ct: threshold cycle (küszöbciklus) Da, kDa: dalton, kilodalton DAMP: damage associated molecular pattern DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium DMNQ: 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (2,3-dimetil-1,4-naftokinon) DPPIV: dipeptidyl peptidase IV EAAT: excitatory amino-acid transporter EBA: Evans blue albumin (Evans kék albumin) EBM-2: endothelial basal medium-2 ECGF: endothelial cell growth factor (endoteliális növekedési faktor) EDTA: etiléndiamintetraacetát EGM-2: endothelial growth medium-2 ERK: extracellular signal-related kinase ESAM: endothelial cell-selective adhesion molecule FAK: fokális adhéziós kináz FCS: fetal calf serum (magzati borjúsavó) GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz) GDNF: glial derived neurotrophic factor GFAP: glial fibrillary acidic protein GLUT-1: glükóz transzporter-1 GPCR: G-protein-coupled receptor HA: hemagglutinin hCMEC/D3 (D3): human cerebral microvascular endothelial cell line, D3 clone (humán agyi mikrovaszkuláris endotélsejt vonal, D3 klón) HUVEC: human umbilical vein endothelial cells (humán köldökvéna endotélsejtek) IL: interleukin IFN: interferon IP: immunprecipitálás JAM: junkcionális adhéziós molekula JNK: c-Jun N-terminal kinase

dc_218_11

LDH: laktát-dehidrogenáz LDL: low density lipoprotein LPS: lipopoliszacharid M2-PK: M2-piruvát kináz MA (1-MA): metilantracén (1-metilantracén) MAP kináz: mitogén aktivált protein kináz MDCK: Madin-Darby canine kidney MEM: Minimum Essential Medium MW: molecular weight (molekulatömeg) NFκB: nukleáris faktor κB NMDA: N-metil-D-aszpartát OG: Oregon Green (Oregon zöld) PAGE: poliakrilamid gélelektroforézis PAH: polycyclic aromatic hydrocarbons (policiklusos aromás szénhidrogének) PAMP: pathogene associated molecular pattern (patogén asszociált molekuláris mintázat) PBS: phosphate buffered saline PCR: polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció) PDTC: pirrolidin ditiokarbamát Ph: phenanthrene (fenantrén) PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase (foszfatidilinozitol-3 kináz) PK: protein kináz PLA2: phospholipase A2 (foszfolipáz A2) PP: protein phosphatase (protein foszfatáz) PTP: protein tyrosine phosphatase (protein tirozin foszfatáz) PY: phosphotyrosine (foszfotirozin) RBEC: rat brain endothelial cell (patkány agyi endotélsejt) ROCK: Rho-associated coiled-coil containing protein kinase (Rho-kináz) **RPMI:** Roswell Park Memorial Institute medium RT: reverse transcription (reverz transzkripció) SAF-B: Scaffold attachment factor B SD: standard deviáció SDS: sodium dodecyl sulfate SLC: solute carrier TEER: transzendoteliális/-epiteliális elektromos rezisztencia TGF- β : transforming growth factor- β TJ: tight junction (szoros kapcsolat) TLR: Toll like receptor (Toll-szerű receptor) TNF-α: tumor nekrózis faktor-α Tx-100: Triton X-100 VEGF: vascular endothelial growth factor (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor) WB: Western-blot ZO: zonula occludens

2. BEVEZETÉS

2.1. A vér-agy gát

A központi idegrendszer működése számára elengedhetetlen állandó belső környezet fenntartásában a vér-agy gátnak döntő jelentősége van. Köszönhető ez annak, hogy a perifériás kapillárisokkal ellentétben, amelyek egy relatív szabad anyagáramlást tesznek lehetővé a sejtek között és a sejteken keresztül, az agyi kapillárisok egy több pilléren alapuló védvonal révén korlátozzák az anyagforgalmat a vér és a központi idegrendszer között.

A vér-agy gát fogalmának kialakulásához Paul Ehrlich felfedezése vezetett, aki az 1880-as évek elején megfigyelte, hogy az érrendszerbe adott anilin festékek a központi idegrendszer kivételével egyenletesen oszlanak el a szövetekben (Ehrlich, 1885). A jelenséget ő akkor úgy értelmezte, hogy a festék affinitása kisebb az agyhoz, a többi szövethez képest. Azonban Goldman az 1910-es évek elején megfigyelte, hogy a cerebrospinális folyadékba juttatott festék megfestette az agyat, viszont nem jutott be a vérkeringésbe, ami arra utalt, hogy a központi idegrendszer és a szervezet többi része között ezen festékek átjutása korlátozott. A vér-agy gát lokalizációja hosszú évtizedekig vita tárgyát képezte, míg a hatvanas évek végén tormaperoxidáz alkalmazásával végzett elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével kimutatták, hogy emlősökben a vér-agy gát morfológiai alapját az agyi kapillárisok endotélsejtjei képezik (Reese és Karnovsky, 1967, Brightman és Reese, 1969). Nagy előrelépés volt a vér-agy gát szerkezetének és működésének megértésében az asztrociták szerepének felismerése (DeBault és Cancilla, 1980, Janzer és Raff, 1987), majd a kilencvenes években, az első transzmembrán tight junction (TJ) fehérjék felfedezésével megnyílt az út a vér-agy gát működésének molekuláris szintű tanulmányozásához.

2.1.1. A vér-agy gát szerepe

A vér-agy gát, amelynek morfológiai alapját az agyi erek endotélsejtjei alkotják, egy aktív határfelületet képez a keringés és központi idegrendszer között. A vér-agy gát kettős funkciót lát el: egyrészt relatív impermeabilitása révén megakadályozza, hogy potenciálisan károsító anyagok bejussanak a központi idegrendszerbe, és ezzel nagymértékben hozzájárul a központi idegrendszer homeosztázisának fenntartásához

(barrier funkció). Másrészt transzportrendszerei segítségével aktív szerepet játszik a központi idegrendszer tápanyagellátásában és a keletkező anyagcsere termékek eltávolításában (szállító funkció).

Az agyi mikroerek felszíne jelentős méretű, mintegy 150-200 cm²/gramm agyszövetet is elérhet, ami azt jelenti, hogy egy átlagos felnőttben a keringés és a központi idegrendszer közötti aktív határfelület mintegy 12-18 m² (Abbott és mtsai, 2010). A kapilláris hálózat a központi idegrendszerben igen sűrű, az átlagos távolság a kapillárisok között kb. 40 µm (Duvernoy és mtsai., 1983), ami lehetővé teszi az agyszövet tápanyaggal való gyors ellátását. A kapillárisokat folytonosan bélelő endotélsejtek szoros kapcsolatok révén kapcsolódnak egymáshoz, amelyek, gátolván a szabad ionáramlást, elektromos ellenállás kialakulásához vezetnek, melynek értéke 1000 Ω •cm² nagyságú is lehet (Crone és Christensen, 1981, Butt és mtsai., 1990), ezt azonban a parenchima kapillárisaiban még nem sikerült közvetlenül megmérni.

Barrier funkció

A vér-agy gát egy négyszeres védvonalat hoz létre a keringés és a központi idegrendszer határfelületén (Wilhelm és mtsai., 2011):

i) Egyrészt paracelluláris barrierként működik, azaz megakadályozza a sejtek közötti szabad anyagáramlást. Ennek morfológiai alapját az agyi endotélsejteket összekötő szoros kapcsolatok képezik.

ii) A vér agy-gát transzcelluláris barrierként is működik, ami azt jelenti, hogy a sejten keresztüli transzport is alacsony szintű; ez az agyi endotélsejtekben megfigyelt alacsony pinocitotikus aktivitás következménye.

iii) Az agyi endotélsejtek komplex enzimrendszerekkel rendelkeznek (kolinészteráz, alkalikus foszfatáz, γ-glutamil transzpeptidáz, monoamino oxidáz), amelyek az endotélsejtekbe jutó szubsztrátjaikat enzimatikus úton elbontják.

iv) Az agyi endotélsejtek ezen túlmenően rendelkeznek efflux transzporterekkel (pl. ABC-B1, ABC-C1-5, ABC-G2), amelyek képesek kipumpálni a sejtbe jutott xenobiotikumok széles tárházát. Ennek következtében az ABC (ATP-binding cassette) családba tartozó efflux transzporterek fontos szerepet játszanak a központi idegrendszeri megbetegedések terápiájában, ugyanis jelentősen befolyásolják a gyógyszerek disztribúcióját, gyakran megakadályozva azt, hogy a azok terápiás koncentrációt érjenek el a központi idegrendszerben. Eddigi ismereteink szerint az agyi endotélsejtekben a

legnagyobb jelentőséggel a P-glikoprotein (ABC-B1) rendelkezik, amely számos lipofil anyagot képes transzportálni (Löscher és Potschka, 2005).

Szállító funkció

Mivel a vér-agy gát a vízben oldékony anyagok számára csak korlátozottan átjárható, az agy működése számára elengedhetetlen vízoldékony anyagok bejuttatása specifikus transzportrendszerek segítségével történik. Ezeknek nagy része az úgynevezett SLC (solute carrier) transzporter családba tartozik. Az agyi endotélsejtek számos ilyen transzportert expresszálnak, mint a glükózt transzportáló SLC2-A2 (GLUT-1 - glükóz transzporter-1), az aminosav transzportban részt vevő SLC3 és SLC7 család tagjai (pl. LAT-1 - L-típusú aminosav transzporter-1), a glutamát transzportban részt vevő SLC1 család tagjai, vagy az SLC15 (proton/oligopetid transzporter), az SLC16 (monokarboxilát transzporter), az SLC21 (organikus anion transzporter), az SLC22 (organikus anion/kation transzporter) család tagjai. A vér-agy gáton különböző ionpumpák révén aktív iontranszport zajlik (Na⁺/K⁺-ATP-áz, Na⁺/K⁺/Cl⁻-transzporter, Na⁺/H⁺-antiporter, H⁺-ATP-áz), de specifikus transzport szerepe van a transzferrin receptornak vagy az LDL (low density lipoprotein) receptornak is (Abbott és mtsai., 2010).

2.1.2. A vér-agy gát szerkezete

A vér-agy gát morfológiai alapját az agyi endotélsejtek képezik, amelyek azonban szoros funkcionális kapcsolatban állnak elsősorban az asztrocitákkal és a pericitákkal, amelyek a barrier tulajdonságok kialakulását és fenntartását segítik elő. Az egymással szorosan összekapcsolódó endotélsejtek egy folyamatos sejtréteget képeznek az erek luminális felszínén. Az endotélsejtek abluminális oldala a bazális membránnal érintkezik, melynek kettőződésében a periciták foglalnak helyet. A kapillárisokat az asztrociták végtalpai fedik be, agyi területenként változó mértékben (1. ábra).

Endotélsejtek

Az agyi kapillárisokat bélelő endotélsejtek lapos sejtek, amelyekre jellemző a folytonos szoros kapcsolatok jelenléte (Brightman és Reese, 1969), a nagyszámú mitokondrium (Oldendorf és mtsai., 1977), a caveolák alacsony száma a luminális membránban (Nag, 2003), ami legalább egy nagyságrenddel kisebb, mint az idegrendszeren kívül elhelyezkedő kapillárisokban. A szoros kapcsolatok, amelyek a szomszédos sejtek egymásra fekvő membránjai között alakulnak ki, egy folyamatos

övszerű struktúrát képeznek a sejtek apikális részén. A metszeti képen membrán fúziós pontok sorozataként ("kissing points") jelennek meg, fagyasztva töréssel azonban jól vizualizálható a szoros kapcsolatok szálas szerkezete (TJ strands, fonatok). Az agyi endotélsejtek tulajdonságai között tehát az általános, endotélsejtekre jellemző tulajdonságok (von-Willebrand faktor jelenléte, magas alkalikus foszfatáz és γ-glutamil transzpeptidáz aktivitás, acetilált LDL felvétel) mellet megtalálhatóak az epitélsejtekre jellemző tulajdonságok is: folyamatos szoros kapcsolatok, alacsony pinocitózis, magas elektromos ellenállás, amelyek elengedhetetlenek a barrier funkció ellátásához.

Más endotélsejtekhez hasonlóan az agyi endotélsejtek sem képeznek egy homogén populációt (Palade, 1988). Különbözhetnek egymástól biokémiai és fiziológiai sajátosságokban az ér méretétől függően vagy lokalizációtól függően. Ezek a különbségek, amelyek a többek között az muszkarin típusú acetilkolin receptor (Badaut és mtsai., 1997), a von Willebrand faktor (Yamamoto és mtsai., 1998) vagy trombomodulin (Wang és mtsai., 1997) expressziójában nyilvánulnak meg, jól tükrözik az agyi endotélsejtek alkalmazkodóképességét a funkcionális igényekhez. Az endotélsejtek fenotípusainak modulálásában számos tényező játszik szerepet: ezek közül is kiemelkednek a különböző növekedési faktorok, mint amilyen a bázikus fibroblaszt növekedési faktor vagy TGF-β. A moduláció nemcsak a sejtek morfológiájára terjed ki, hanem biokémiai, és funkcionális sajátosságokra is (Terranova és mtsai., 1985, Garfinkel és mtsai, 1996, Kumar és mtsai., 1998). Agyi mikroerekből izolált endotélsejtek különböző morfológiai jellegzetességekkel rendelkeznek (Rupnick és mtsai., 1988). Azonban ezek a különbségek nemcsak a primér tenyészetek morfológiai heterogenitásából adódnak, hanem indukálhatóak fenotipikusan azonos klónokból is. Tontsch és Bauer kimutatták (Tontsch és Bauer, 1989), hogy egyazon klónból származó agyi endotélsejtek epiteliális és mezenchimális alakot is felvehetnek.



1. ábra. A vér-agy gát szerkezete

Periciták

A periciták szoros fizikai kapcsolatban vannak az endotéliummal. Patkány agyban a kapillárisok pericita lefedettsége 22-32% között változik (Sims, 1991), izolált kapillárisokban átlagosan 1 pericita jut 3-5 endotélsejtre (Pardridge, 1999). Annak ellenére, hogy a pericitákat és endotélsejteket a bazális membrán elválasztja, sikerült e két sejttípus között gap junctionokat is kimutatni (Cuevas és mtsai., 1984). Ez oly módon jöhet létre, hogy a periciták nyúlványokat képeznek, amelyek a bazális membránon áthatolva közvetlen kapcsolatba kerülnek az endotélsejtekkel. A periciták, kontraktilitásuk révén, szerepet játszhatnak a mikrovaszkuláris véráramlás szabályozásában. Ezen túlmenően szabályozó funkciót tölthetnek be az endoteliális proliferációban, angiogenézisben és gyulladásos folyamatokban. A periciták jelentőségére utal, hogy hiányukban endoteliális hiperplázia és abnormális vaszkulogenézis lép fel az agyban (Hellström és mtsai., 2001), illetve megnő a vér-agy gát permeabilitása (Armulik és mtsai., 2010).

Asztrociták

Az asztrociták igen fontos szerepet játszanak a vér-agy gát tulajdonságok kialakításában (Tao-Cheng és mtsai., 1987, Janzer és Raff, 1987, Abbott és mtsai., 2006). Az asztrociták végtalpai finom lemezes szerkezetükkel gyakorlatilag beborítják az endotélsejteket (Kacem és mtsai., 1998). Azonban ez a borítás nem mindenütt folytonos, lehetővé téve az idegvégződések közvetlen kapcsolatát a bazális membránnal (Cohen és mtsai., 1997, Paspalas és Papadopoulos, 1996). Az asztrociták és endotélsejtek között kétirányú kapcsolat alakulhat ki, ami jellegét tekintve lehet közvetlen fizikai kapcsolat gap junctionokon keresztül, illetve kémiai kapcsolat. Ez utóbbi mediálásában fontos szerepet játszik többek között a TGF-β (transforming growth factor-β) (Tran és mtsai., 1999), a GDNF (glial derived neurotrophic factor) (Igarashi és mtsai., 1999), a bFGF (bázikus fibroblaszt növekedési faktor) (Sobue és mtsai., 1999), az IL (interleukin)-6 (Sun és mtsai., 1997) és a hidrokortizon (Hoheisel és mtsai., 1998). Azokban az egerekben, amelyek GFAP (glial fibrillary acidic protein) hiányosak, és így nem rendelkeznek teljes funkcionalitású asztrocitákkal, a vér-agy gát funkciója sérült (Liedtke és mtsai., 1996), illetve ezek az asztrociták nem képesek vér-agy gát tulajdonságokat indukálni (Pekny és mtsai., 1998).

Bazális membrán

A bazális membrán egy specializált extracelluláris mátrix, amely beborítja az endotélsejteket, és amelynek kettőzetében foglalnak helyet a periciták. Felépítésében főleg laminin, fibronektin, tenaszcin, kollagén (elsősorban IV-es típusú) és proteoglikánok vesznek részt (Nag, 2003). Az extracelluláris mátrix mintegy horgonyként szolgál az endotélsejtek számára, amely a laminin és egyéb mátrix proteinek, illetve az endoteliális integrin receptorok közötti kapcsolat révén valósul meg (Hynes, 1992). A sejt-mátrix kölcsönhatás számos intracelluláris jeltovábbító útvonalat befolyásol (Tilling és mtsai, 2002), és a mátrix fehérjék elősegítik az endoteliális TJ fehérjék kifejeződését is (Savettieri és mtsai., 2000). A bazális membrán ezen túlmenően fontos szerepet játszik a sejttapadásban, migrációban, és barrierként szolgálhat a makromolekulák passzázsa számára.

2.2. Az interendoteliális kapcsolatok

Az endotélsejtek barrier tulajdonságainak meghatározásában alapvető szerepet játszanak az intercelluláris kapcsolatok, ezen belül is a szoros kapcsolatok (tight junction, TJ), illetve az adherens kapcsolatok (adherens junction, AJ) (2. ábra). A szoros kapcsolatok az interendoteliális junkció legapikálisabb részén helyezkednek el, és kettős funkcióval rendelkeznek: egyrészt paracelluláris barrierként megakadályozzák a sejtek közötti anyagáramlást, másrészt megakadályozzák a membránfehérjék szabad vándorlását az apikális és bazolaterális rész között, biztosítva az endotélsejtek polarizáltságát.

2.2.1. Szoros kapcsolatok (tight junction, TJ)

A szoros kapcsolatok felépítésében transzmembrán fehérjék és perifériás fehérjék (junkcionális plakk fehérjék) vesznek részt (Bauer és mtsai., 2011).

Transzmembrán fehérjék

A szoros kapcsolatok transzmembrán fehérjéi három családba sorolhatóak: a négy transzmembrán domént tartalmazó fehérjék (occludin, claudinok, tricellulin/marvelD2, marvelD3), az immunglobulin szupercsaládba tartozó molekulák egy transzmembrán régióval (JAM - junkcionális adhéziós molekula, CAR - coxsackie és adenovírus receptor, ESAM - endothelial cell-selective adhesion molecule), illetve a nem immunglobulin családba tartozó egy transzmembrán régióval rendelkező fehérjék (CRB3 - crumbs

homolog 3, Bves - blood vessel epicardial substance). Ezek közül agyi endotélsejtekben a leginkább jellemzettek az occludin, a claudinok, illetve a junkciós adhéziós molekulák (JAM-ek) (Bauer és mtsai., 2011).

<u>Occludin</u>

A 65 kDa molekulasúlyú occludin volt az első transzmembrán tight junction fehérje, amelyet sikerült azonosítani (Furuse és mtsai., 1993). Szerkezetére jellemző a négy transzmembrán régió, a két extracelluláris hurok, egy rövidebb, citoplazmatikus Nterminális régió, valamint egy hosszabb, szintén citoplazmatikus C-terminális domén. A két extracelluláris hurok gazdag tirozinban és glicinben, és kulcsszerepet játszik az occludin membrán lokalizációjában és a szoros kapcsolatok zárásában (Wong és Gumbiner, 1997, Lacaz-Vieira és mtsai., 1999). Az occludin számos fehérjéhez képes kapcsolódni, amelyek között kiemelt szerepet játszanak a tight junction felépítésében résztvevő fehérjék (ZO - zonula occludens fehérjék, claudin, JAM), és a jeltovábbító molekulák (PKC, c-Yes, c-Src, kazein kináz-2) (Gonzalez-Mariscal és mtsai., 2008). Az occludin több izoformája is ismeretes (Muresan és mtsai., 2000, Ghassemifar és mtsai., 2002, Mankertz és mtsai., 2002), azonban ezek funkciója még nincs tisztázva. Az occludin hiánya nem akadályozza meg a szoros kapcsolatok létrejöttét (Saitou és mtsai., 1998), ennek ellenére az occludin hiányos egerek súlyos fejlődési rendellenességekkel jönnek világra, amelyekre jellemző a gyomor nyálkahártyájának hiperpláziája és krónikus gyulladása, kalcium és foszfor lerakódások a kisagyban és a bazális ganglionokban, valamint csontfejlődési zavarok (Saitou és mtsai., 2000).



Az occludin expressziójának és működésének szabályozása

Az occludin különböző szövetekben expresszálódik, elsősorban epitélsejtekben és endotélsejtekben. Ezt a specifikus expressziót a gén promóter régiójához kapcsolódó transzkripciós faktorok szabályozzák. Így például kimutatták, hogy agyi endotélsejtekben Sp3, míg tüdő endotélsejtekben YY1 transzkripciós faktor kötődik az occludin promóteréhez, így indukálva az occludin expresszióját agyi endotélsejtekben és represszálva azt más endotélsejtekben (Sade és mtsai., 2009). Azonban a szabályozás ennél sokkal komplexebb mivoltára utal, hogy az occludin expresszióját a TNF- α (tumor nekrózis faktor- α), IFN- γ (interferon- γ) (Mankerz és mtsai., 2000), a retinsav (Kubota és mtsai., 2001) és a "snail" transzkripciós represszor (Ikenouchi és mtsai., 2003) is tudja szabályozni, ami magyarázatot adhat arra, hogy az occludin adott körülmények között nem kizárólag endotél- és epitélsejtekben expresszálódik.

Az occludin működésének szabályozásában a foszforilációnak van fontos szerepe. Western-blot analízissel vizsgálva az occludin számos sáv formájában jelentkezhet 62-82 kDa között. Ezek a sávok az occludin különböző foszforilációs állapotainak felelnek meg. MDCK sejtekben kimutatták, hogy a magasabb molekulasúlyú sávok szerinen, kisebb mértékben treoninon, de nem tirozinon foszforilált occludin izoformák, amelyek alkalikus foszfatáz kezeléssel (Sakakibara és mtsai., 1997), illetve a sejt-sejt kontaktusok felszakadása esetén (Wong, 1997) eltűnnek. Ezzel ellentétben az occludin tirozin oldalláncokon történő foszforilációja a junkciók sérüléséhez vezethet (Kale és mtsai., 2003), noha ez a folyamat sejttípus-függő lehet (Jepson, 2003). Agyi endotélsejtekben az occludin tirozin foszforilációját figyelték meg iszkémia során (Kago és mtsai., 2006), illetve glutamát jelenlétében (András és mtsai., 2007), mely folyamatok során sérül a véragy gát.

Az occludin foszforilációs állapotát számos kináz és foszfatáz egyensúlya határozza meg, mint például: Src (Basuroy és mtsai., 2003), különböző PKC izoformák (Suzuki és mtsai., 2009), Rho-kináz (Persidsky és mtsai., 2006), CK1ε (kazein kináz 1ε) (McKenzie és mtsai., 2006) és CK2 (Smales és mtsai., 2003), illetve PP2A, PP1 (Seth és mtsai., 2007) és PTP1B (Atkinson és Rao, 2001). Az occludin foszforilációja specifikus Ser/Thr/Tyr oldalláncokon meghatározó szereppel bír a különböző junkcionális fehérjékkel való kapcsolódásában, és így a paracelluláris permeabilitás szabályozásában (összefoglalva: Rao, 2009).

Az occludin szabályozásában fontos szerepet játszanak lebontási folyamatok is, ezekről azonban kísérleteink megkezdésekor még nem álltak rendelkezésre kísérleti adatok.

<u>Claudinok</u>

A claudinokat 1998-ban, öt évvel az occludin után fedezték fel (Furuse és mtsai., 1998). A claudinok az occludinhoz hasonlóan négy transzmembrán régióval rendelkeznek, azonban molekulasúlyuk csak 20-25 kDa között változik, és jelentős szekvencia homológia sem mutatható ki az occludinnal. A két extracelluláris hurok közül az első 41-55 aminosavat, a második 10-21 aminosavat tartalmaz, míg a C-terminális rész 21-44 aminosav hosszúságú. A claudin interakciói számára a C-terminális régiónak van kiemelt jelentősége, mert ez a rész tartalmazza a PDZ kötő doméneket, és ennek révén képes a claudin más fehérjékhez kapcsolódni. Ezen túlmenően a claudinok egymáshoz is képesek kapcsolódni, ami a tight junction fonatok kialakulásában játszik szerepet (Piontek és mtsai., 2008). Az agyi endotélsejtekben először a claudin-5-öt és -1-et sikerült kimutatni (Morita és mtsai., 1999, Liebner és mtsai., 2003), később kimutatták a claudin-3 és claudin-12 jelenlétét is (Wolburg és mtsai., 2003, Nitta és mtsai., 2003), de ezen kívül még számos claudin mRNS-e van jelen agyi endotélsejtekben (Ohtsuki és mtsai., 2008). Az egyes claudinok pontos funkciója nem ismeretes, a claudin-5 hiánya a vér-agy gát méret szelektív megnyílását okozza (Nitta és mtsai., 2003).

A claudinok szabályozása

A claudinok expressziójának szabályozását számos tényező befolyásolja. Gyulladásos mediátorok, mint a TNF- α (Mazzon és Cuzzocrea, 2007), a bradikinin (Liu és mtsai., 2008), az IL-1 β (Williams és mtsai., 2008) és a VEGF-A (Argaw és mtsai., 2009) csökkentik az agyi endotélsejtekben legfontosabb claudin, a claudin-5 mennyiségét. Az adherens junction fehérje VE-cadherin is szerepet játszik a claudin-5 szabályozásában azáltal, hogy megakadályozza a FoxO1 és β -catenin magi felhalmozódását, amelyek a claudin-5 promótert gátolják (Gavard és Gutkind, 2008). A glukokortikoidok szintén növelik a claudin-5 mennyiségét (Förster és mtsai., 2008).

A claudinok poszt-transzlációs módosulással történő szabályozása történhet foszforiláció és palmitoiláció útján (összefoglalva: Findley és Koval, 2009). A claudin-5 foszforilációjában szerepet játszik a PKA (Ishizaki és mtsai., 2003), valamint a Rho-kináz (Yamamoto és mtsai., 2008).

Junkcionális adhézios molekulák

A junkcionális adhéziós molekulák (JAM) alkotják a tight junction transzmembrán fehérjéinek harmadik családját (Martin-Padura és mtsai., 1998). A ma ismert JAM fehérjék közül agyi endotélsejtekben elsősorban a JAM-1 (JAM-A) és a JAM-3 (JAM-B) (Aurrand-Lions és mtsai., 2001) van jelen. A JAM fehérjékre jellemző az egy transzmembrán domén, két extracelluláris, immunglobulinszerű hurok és a homofil kötődés. Fontos szerepet játszanak az immunsejtek vér-agy gáton történő átjutásában.

További transzmembrán junkcionális fehérjék

Az egyik legfrissebben felfedezett transzmembrán tight junction fehérje a tricellulin (Ikenouchi és mtsai., 2005), amely a hármas sejthatárokhoz koncentrálódik. Elsősorban epitélsejtekben expresszálódik, agyi endotélsejtekben még nem írták le expresszióját. Szintén epitélsejtekben expresszálódik a CAR (Raschperger és mtsai., 2006). Korábban leírtak egy 1G8 antigén nevű JAM-hez hasonló transzmembrán fehérjét is, amely endotél specifikus (Nasdala és mtsai., 2002). Bioinformatikai módszerekkel azonosították a marvelD3-at (Steed és mtsai., 2009), de agyi endotélsejtekben még nem írták le jelenlétét.

Plakk fehérjék

PDZ domént tartalmazó fehérjék

A PDZ domén neve három fehérjéből ered: PSD-95 (post-synaptic density protein 95), Dlg (discs large protein) és ZO-1 (zonula occludens-1). Fontos szerepet játszik más fehérjék PDZ doménjéhez, illetve a transzmembrán fehérjék C-terminális részén található E-S/T-X-V motívumhoz való kapcsolódásban (Songyang és mtsai., 1997). Ezáltal a PDZ domént tartalmazó junkcionális fehérjék egy hálózatot hoznak létre, amely membrán proteineket és jelátviteli molekulákat kapcsol össze.

Zonula occludens (ZO) fehérjék

A 220 kDa molekulasúlyú ZO-1 volt az első TJ fehérje, amelyet máj membrán preparátum ellen termeltetett specifikus monoklonális ellenanyag segítségével sikerült azonosítani (Stevenson és mtsai., 1986). Később felfedezték a kisebb molekulasúlyú ZO-2-t (Gumbiner és mtsai., 1991) és a ZO-3-at (Haskins és mtsai., 1998) is, amelyek koprecipitálnak a ZO-1-gyel. A ZO-3 az eddigi adatok szerint nem expresszálódik jelentős mennyiségben az endotélsejtekben (Inoko és mtsai., 2003). A ZO-1, ZO-2 és ZO-3 hasonló felépítésű: jellemző rájuk az N-terminális régióban helyet foglaló három PDZ domén, amelyet egy SH3 (Src homológia 3) domén és egy GUK (guanilát kináz, mely enzimatikus

aktivitással nem rendelkezik) domén követ, amely révén a ZO fehérjék a MAGUK (membrán asszociált guanilát kináz) fehérje családhoz is tartoznak. A junkcionális plakkban a ZO fehérjék a fehérje-fehérje kapcsolatok fontos szervezőjeként működnek, és ebben a szerepben nagyon fontos helye van a PDZ doméneknek. A ZO-1 első PDZ doménje kapcsolódik a claudinok C-terminális részéhez, és ennek a kapcsolatnak fontos szerepe van a TJ szálak kialakításában (Umeda és mtsai., 2006). A ZO fehérjék szerepének redundanciájára utal, hogy azok az epitélsejtek, amelyekből kiütötték a ZO-1-et és a ZO-2t, nem képeznek TJ szálakat, azonban abban az esetben, ha ezekbe a sejtekbe exogén ZO-1-et vagy ZO-2-t juttatnak, a TJ szálak ismét megjelennek (Umeda és mtsai., 2006). A ZO-1 második PDZ doménje felelős a homo- illetve heterodimerizációért (Utepbergenov és mtsai., 2006), valamint a connexinnel való kapcsolatért (Giepmans és Moolenaar, 1998), a harmadik PDZ pedig a JAM-1-hez való kötődésben játszik szerepet (Ebnet és mtsai., 2000). Az SH3 domén kinázokkal (Balda és mtsai., 1996), a ZONAB nevű transzkripciós faktorral (Balda és Matter, 2000), vagy az Apg-2 nevű hősokk fehérjével (Tsapara és mtsai., 2006) képes kapcsolódni, míg a GUK domén felelős az occludinnal és az αcateninnel való kapcsolatért (Müller és mtsai., 2005). A C-terminális, prolinban gazdag régió aktinnal (Fanning és mtsai., 1998) és kortaktinnal (Katsube és mtsai., 1998) képes interakcióba lépni, így a ZO-1 kapcsolatot teremt a szoros kapcsolatok membránfehérjéi és a citoszkeleton között.

A 160 kDa molekulasúlyú ZO-2 felépítése hasonló a ZO-1-éhez, azonban egy rövidebb C-terminális régióval rendelkezik, amely 25% homológiát mutat a ZO-1-gyel (Jesaitis és Goodenough, 1994, Beatch és mtsai., 1996). A ZO-1-hez hasonlóan a ZO-2 is az első PDZ doménje révén kapcsolódik a claudinokhoz, a második PDZ doménen keresztül kapcsolódik a connexinhez és más ZO fehérjékhez, a C-terminális rész pedig aktinhoz kötődik, míg az occludinnal és az α -cateninnel való kapcsolatért az SH3 és a GUK domén felelős (Itoh és mtsai., 1999a, Itoh és mtsai., 1999b). A ZO-2 szerkezeti analízise felderítette azt is, hogy a fehérje nukleáris lokalizációs és nukleáris export szignál szekvenciákkal is rendelkezik (Islas és mtsai., 2002).

Említésre méltók a ZO-1 és ZO-2 szerepét illetően a knock out állatokon illetve géncsendesített sejteken végzett vizsgálatok eredményei. Így a ZO-1-től homológ rekombináció segítségével megfosztott sejtek polarizált monolayerek alkotására képesek, melyekben funkcionális szoros kapcsolatok alakulnak ki, bár részletesebb vizsgálatokkal működészavar mutatható ki (Umeda és mtsai., 2004). Ehhez hasonló módon a ZO-1 és a

ZO-2 gének csendesítése is relatív kis mértékben rontja a barrier funkciókat epitélsejtekben (McNeil és mtsai., 2006, Hernandez és mtsai., 2007). Ezzel szemben azok az egerek, amelyekben homológ rekombinációval távolították el a ZO-1-et vagy ZO-2-t, nem életképesek. A ZO-1 knock-out egerek embriói legkésőbb a 11,5 fejlődési napon elpusztulnak, amelynek részben a súlyos vaszkuláris fejlődési zavar az oka (Katsuno és mtsai., 2008). A ZO-2 knock out egereknél feltételezhető, hogy a fejletlen szoros kapcsolatok és gap junctionok felelősek az embrionális letalitásért (Xu és mtsai., 2008). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a ZO fehérjék átvehetik egymás szerepét a kifejlett szoros kapcsolatokban, ellenben az embrionális fejlődés során funkcióik nem redundánsak.

PDZ domént tartalmazó egyéb fehérjék

A szoros kapcsolatokban a zonula occludens fehérjéken kívül sok más PDZ domént tartalmazó fehérje is megtalálható, mint az AF6/afadin (Ikeda és mtsai., 1999), a MUPP1 (multi-PDZ-domain protein) (Hamazaki és mtsai., 2002), a MAGI (membrane associated guanylate kinase inverted) -1, -2 és -3 (Ide és mtsai., 1999, Wu és mtsai., 2000a, Wu és mtsai., 2000b), PAR-3 és -6 (Izumi és mtsai., 1998, Hung és Kemphues, 1999). Ezek a fehérjék képesek más junkcionális fehérjékhez kötődni, és fontos szerepük lehet a junkcionális komplexum működésének szabályozásában. Ezen fehérjéket elsősorban epitélsejtekben jellemezték.

PDZ domént nem tartalmazó plakk fehérjék

Ebbe a csoportba tartozik az elsősorban epitélsejtekben expresszálódó cingulin (Citi és mtsai., 1988, Citi és mtsai., 1989) és a vele homológ paracingulin/JACOP (Ohnishi és mtsai., 2004), a 7H6 (Zhong és mtsai., 1993), illetve számos jelátviteli fehérje, amelyek a junkciók szabályozásában vesznek részt.

2.2.2. Adherens kapcsolatok

Az adherens kapcsolatok fontos szerepet játszanak a szoros kapcsolatok kialakításában és fenntartásában, valamint a permeabilitás szabályozásában is (Walsh és mtsai., 2011). A szoros kapcsolatok közelében helyezkednek el, azoktól bazolaterális irányban, és szintén transzmembrán és citoplazmatikus fehérjékből épülnek fel.

Az adherens kapcsolatok transzmembrán fehérjéi, a cadherinek, kalciumfüggő sejtadhéziós molekulák. A cadherin fehérjecsaládot több alcsaládra osztják. Ma már több mint negyvenféle cadherin ismert, melyek szövetspecifikusan expresszálódnak. Ezek közül legalaposabban az I-es típusú cadherineket tanulmányozták. Ide tartozik a VE- (vaszkuláris

endoteliális) cadherin is, amely a legfontosabb cadherin endotélsejtekben. A VE-cadherin mellett az agyi endotélsejtek kisebb mennyiségben expresszálnak még N- (neuronális) cadherint illetve T-cadherint, ám ezek nem endotél specifikusak, és fiziológiás körülmények között kevéssé lokalizálódnak a junkciók területére (Navarro és mtsai., 1998, Ivanov és mtsai., 2001).

A szomszédos sejteken expresszálódó cadherinek extracelluláris doménjeiken keresztül homotipikus kölcsönhatásba lépnek egymással, citoplazmatikus részükkel pedig más fehérjékhez (főleg cateninekhez) kapcsolódnak. A VE-cadherin citoplazmatikus része p120-, β - és γ -cateninekhez kapcsolódik. A β -catenin és γ -catenin (plakoglobin) α -cateninhez kötődik, amely közvetlenül, vagy a ZO-1 fehérjén keresztül kapcsolja a cadherin-catenin komplexeket az aktin citoszkeletonhoz. A cadherin-komplexum, amely VE-cadherinből és a hozzá kapcsolódó cateninekből áll, állandó kölcsönhatásban van az aktin citoszkeletonnal, azonban ennek molekuláris alapja még nem teljesen tisztázott, ugyanis kimutatták, hogy az α -catenin nem képes egyszerre kötni a β -catenint és az aktint (összefoglalva: Weis és Nelson, 2006). Az adherens junkciók egyéb fehérjéi a vinculin, az α -actinin és a nectin-afadin komplexum, amelyeket főleg epitélsejtekben tanulmányoztak.

A β -cateninnek igen fontos szerepe van a vaszkuláris integritás és permeabilitás szabályozásában. Ezt igazolja az is, hogy a β -catenin gén endotél specifikus inaktivációja rendellenes lumenű, hemorrágiás és fokozott permeabilitású erek kialakulásához vezet (Cattelino és mtsai., 2003). A β -cateninnek azonban nemcsak a sejtkapcsolatok kialakításában van fontos szerepe, hanem a transzkripciós regulációban is, ugyanis képes a sejtmagba vándorolni és ott szabályozni a TCF/LEF, illetve FOXO típusú transzkripciós faktorok által mediált génátírást (összefoglalva: Jin és mtsai., 2008).

2.3. Jelátviteli folyamatok az agyi endotélsejtekben

Ahhoz, hogy az agyi endotélsejtek adekvát módon tudjanak alkalmazkodni a külső környezetből jövő ingerekhez, számos receptorral kell rendelkezzenek. Ismeretes, hogy az idegrendszeri környezet alapvetően befolyásolja az agyi endotélsejtek tulajdonságait, így nem meglepő, hogy az agyi endotélsejtek neurotranszmitter receptorokkal is rendelkeznek, mint amilyenek az adrenerg, a szerotonin vagy a dopamin receptorok.

2.3.1. A glutamát

A glutamát a központi idegrendszer egyik legfontosabb serkentő neurotranszmittere, de fontos szerepet játszhat számos központi idegrendszeri megbetegedés patogenézisében, mint amilyen az agyi hipoxia (Choi, 1988), neurodegeneratív megbetegedések (Meldrum és Garthwaite, 1990, Schousboe és mtsai., 1997) vagy az epilepszia (Dingledine és mtsai., 1990). Intracerebrális mikrodialízis vizsgálatok kimutatták, hogy a glutamát és aszpartát extracelluláris szintje jelentősen megnövekedik olyan patológiás körülmények között, mint amilyen az agyi iszkémia (Lekieffre és mtsai., 1992) vagy a vazogén agyödéma (Westergren és mtsai., 1994). A fiziológiást meghaladó mennyiségű glutamát a glutamát receptorok aktiválása révén okozhat agyödémát (Mrsulja és mtsai., 1990), energiaháztartási zavarokat vagy fehérjeszintézis gátlást (Djuricic és mtsai., 1994).

A glutamát hatását a glutamát receptorok mediálják, amelyek lehetnek ioncsatornaként működő ionotróp receptorok, vagy G-fehérjéhez kapcsolt metabotróp receptorok. Az ionotróp receptorok tovább osztályozhatóak NMDA (NMDAR1, NMDAR2A-D), AMPA (GluR1-4), illetve kainát (GluR5-7, KA1-2) receptorokra. A glutamát receptor antagonisták védenek az agyi iszkémia által okozott károsodásokkal szemben (Pohorecki és mtsai., 1990), azonban felvetődött a kérdés, hogy a neuronok és asztrociták mellett az agyi kapillárisok endotélsejtjei is részt vesznek-e ezen protektív hatás mediálásában. Kísérleti adatok utaltak arra, hogy a glutamát közvetlenül is hatással van az agyi endotélsejtekre (Koenig és mtsai., 1992), azonban ezt nem minden eredmény támasztotta alá (Gobbel és mtsai., 1994).

A glutamát koncentrációja fiziológiás körülmények között az extracelluláris folyadékban igen alacsony (1-3 µmol/l) (Tossman és mtsai., 1986), szemben a teljes agyra kivetített 12 µmol/g koncentrációval (Hawkins és mtsai., 1983). Az alacsony glutamát koncentráció fenntartásában fontos szerepet játszanak az asztrocitákon és neuronokban működő glutamát transzporterek, de kísérleti adatok utaltak arra is, hogy a vér-agy gát is szerepet játszik a glutamát transzportban. Így Drewesnak és munkatársainak (Drewes és mtsai., 1977) glutamát effluxot sikerült kimutatniuk kutya agyból, és izolált kapillárisokban is sikerült ezt a transzportot kimutatni (Hutchison és mtsai., 1985). Ezen kísérleti eredmények felvetették a glutamát transzporterek expressziójának lehetőségét az agyi kapillárisok endotélsejtjeiben.

A glutamát transzporterek azonosítása a 90-es években kezdődött. Elsőként két nátriumfüggő transzportert sikerül klónozni patkány agyból, a GLAST-ot és a GLT-1-et

(Pines és mtsai., 1992), valamint egyet nyúl agyból (EAAC1) (Kanai és Hediger, 1992). E három transzporter humán homológjait is sikerült azonosítani, ezek az EAAT1 (Excitatory amino-acid transporter) (GLAST), EAAT2 (GLT-1), illetve EAAT3 (EAAC1) (Arriza és mtsai., 1994), majd megklónozták az EAAT4-et és EAAT5-öt is humán cerebellumból és retinából (Fairman és mtsai., 1995, Arriza és mtsai, 1997, összefoglalva: Benarroch, 2010).

2.3.2. A szerotonin

A szerotonin (5-HT) amellett, hogy egy fontos neurotranszmitter, igen fontos szerepet játszik a mikroerek működésének szabályozásában. Számos kísérleti eredmény utal arra, hogy az agyi endotélsejtek a szerotonin hatásának célpontjai lehetnek, ugyanakkor aktívan részt vesznek a szerotonin anyagcseréjében is. Már a nyolcvanas évek közepén kimutatták, hogy a szerotoninnak permeabilitást fokozó hatása van béka agyban (Olesen, 1985, Olesen és Crone 1986), később hasonló hatást sikerült kimutatni emlősökben is (Sharma és mtsai., 1990, Sharma és mtsai., 1995). RT-PCR (reverz transzkripciós polimeráz láncreakció) segítségével sikerült igazolni az 5-HT2b típusú receptor expresszióját humán agyi endotélsejtekben (Cohen és mtsai., 1999). A szerotonin inaktivációjában a monoamino oxidáz (MAO) játszik fontos szerepet, és ez az enzim megtalálható az agyi endotélsejtekben is (Kalaria és Harik, 1987). A MAO jelenléte felvetette egy specifikus transzport rendszer jelenlétét az agyi endotélsejtekben. Ennek jelenlétére utalt az is, hogy az imipramin és paroxetin, amelyek specifikusan kötődnek a neuronális szerotonin transzporterhez, specifikusan kötődnek a sertés agy mikroereihez is (Brust és mtsai., 1995). A szerotonin transzporter génjének azonosítása (Blakely és mtsai., 1991, Hoffman és mtsai., 1991) lehetővé tette e transzporter közvetlen kimutatását agyi endotélsejtekben.

2.3.3. A junkcionális komplexum szabályozásában résztvevő jeltovábbító folyamatok

Tekintettel arra, hogy az endotélium egyik legfontosabb funkciója egy paracelluláris barrier képzése, nem meglepő, hogy az interendoteliális junkciók szoros szabályozás alatt állnak. Ezt mi sem bizonyítja jobban, mint az, hogy a junkciók területére számos jelátviteli molekula lokalizálódik (összefoglalva: Gonzalez-Mariscal és mtsai., 2008). A junkcionális fehérjék expressziója, lokalizációja és poszttranszlációs módosulásai precíz kontroll alatt

állnak. A kísérleti eredmények túlnyomó többsége azonban epitélsejtekből ered, és sokkal kevesebbet tudunk az endoteliális junkciók szabályozásáról.

A junkciókat szabályozó jeltovábbító molekulák közül a legfontosabbak: ciklikus nukleotidok, Ca²⁺, G-fehérjék, illetve számos kináz és foszfatáz. Az egyik legfontosabb szabályozási mechanizmus a foszforiláció/defoszforiláció. A junkcionális fehérjék számos szerin/treonin, illetve tirozin oldallánccal rendelkeznek, melyeknek foszforilációs állapota meghatározó jelentőségű a paracelluláris permeabilitás szempontjából. Számos adat utal arra, hogy a MAP kinázok, a különböző PKC izoformák, a Rho-kinázok, a PKA és PKG, a miozin könnyű lánc kináz és a PI3K/Akt útvonal, illetve a PP1, PP2A és PTP1B foszfatázok játszanak szerepet a szoros és adherens kapcsolatok szabályozásában.

A G-fehérjékhez kötött szignalizáció szerepe

A G-fehérjék (guanin nukleotid kötő fehérjék) a GTP-ázok családjába tartoznak és számos fiziológiás és patológiás folyamatot szabályoznak. Két fő csoportra oszthatók: heterotrimer G-fehérjékre, amelyek G-proteinhez kötött receptorokon (G-protein-coupled receptors, GPCRs) keresztül aktiválódnak és α , β és γ alegységekkel rendelkeznek; illetve kis G-fehérjékre, amelyek a Ras szupercsalád tagjai. Ez utóbbiak a heterotrimer G-fehérjék α -alegységével mutatnak homológiát.

A heterotrimer G-fehérjéket az α -alegység alapján osztályozhatjuk. Így megkülönböztetünk G α s, G α i, G α q/11, G α 12/13s altípusokat, amelyek különböző szignalizációs útvonalakat aktiválnak. A G α s a cAMP/PKA útvonalat aktiválja, amelynek igen fontos szerepe van a paracelluláris permeabilitás szabályozásában elsősorban agyi endotélsejtekben. Számos kísérleti adat utal arra, hogy cAMP jelenlétében az agyi endotélsejtek komplexebb tight junction hálózatot hoznak létre, melynek következtében nő a sejtréteg transzendoteliális elektromos ellenállása (Wolburg és mtsai., 1994, Deli és mtsai., 1995, Krizbai és Deli, 2003). A cAMP a claudin-5 expressziójának és foszforilációjának fokozódását indukálja PKA-dependens és -independens módon (Ishizaki és mtsai., 2003).

A kis G-fehérjék közül kiemelkedő jelentősége van a Rho családnak, melynek tagjai a RhoA, a Rac és a Cdc42 (cell division cycle 42). A RhoA legfontosabb downstream effektorai a Rho-kinázok, melyek szerin-treonin kinázok, és két formájuk ismert, a p160ROCK (ROKb/ROCKI) és a ROKa (ROCKII). A Rho-kinázok a miozin könnyű láncának foszforilálása révén az akto-miozin kontraktilitás fokozódásához vezethetnek (Hopkins és mtsai., 2003), amelynek nagy jelentősége van a szoros és adherens

kapcsolatok szabályozásában, hiszen számos junkcionális plakk fehérje kapcsolódik közvetlenül az aktinhoz. Ez a folyamat járul hozzá a junkciók stabilizálásához a sejthatárokon, ugyanakkor biztosítja a junkciók szétszakításához szükséges erőt is a perijunkcionális aktingyűrűn keresztül. Az optimális barrier funkció kialakításához és fenntartásához elengedhetetlen a Rho GTP-ázok megfelelő működése (Hopkins és mtsai., 2003).

Agyi endotélsejtekben számos patológiás folyamat során aktiválódik a Rho/Rhokináz útvonal, melynek következtében sérülnek a junkciók. A Rho és Rho-kináz fontos szereppel bír a kemokinek által indukált junkcionális változásokban (Stamatovic és mtsai., 2003, Stamatovic és mtsai., 2006). A Rho útvonal gátlása a junkcionális fehérjék expressziójának növekedéséhez vezet, csökkenti az occludin és claudin-5 (monociták által okozott) foszforilációját, és csökkenti a monociták átvándorlását az agyi endotélsejt rétegen (Persidsky és mtsai., 2006, Yamamoto és mtsai., 2008, Ramirez és mtsai., 2008). A RhoA aktiválódása szerepet játszik a metamfetamin, a gp 120 HIV protein és a reaktív oxigéngyökök által okozott junkcionális sérülésben (Mahajan és mtsai., 2008, Schreibelt és mtsai., 2007), valamint a tüdőkarcinómasejtek transzendoteliális migrációjában (Li és mtsai., 2006).

A Ca²⁺ szerepe a junkciók szabályozásában

Úgy az intracelluláris, mint az extracelluláris Ca^{2+} központi szerepet játszik a junkcionális permeabilitás szabályozásában. Az intracelluláris Ca^{2+} számos jelátviteli út kulcseleme. A hipoxia növeli az intracelluláris Ca^{2+} -szintet agyi endotélsejtekben (Brown és mtsai., 2004). Az intracelluláris Ca^{2+} gátlása részben megakadályozza a HIV Tat protein által okozott változásokat a claudin-5 mennyiségében és lokalizációjában (András és mtsai., 2005). Ugyanez érvényes a glutamát okozta permeabilitás fokozódásra (Kuhlmann és mtsai., 2008).

Az extracelluláris Ca²⁺ jelenléte alapvető fontosságú a junkciók kialakulásához és működéséhez (Gonzalez-Mariscal és mtsai., 1990, Pitelka és mtsai., 1983, Nagy és mtsai., 1985, Rothen-Rutishauser és mtsai., 2002). Olyannyira fontos az extracelluláris Ca²⁺ fiziológiás koncentrációja, hogy a Ca²⁺-switch kísérleteket (a Ca²⁺ megvonását és utólagos visszaadását) a junkciók kialakulásának tanulmányozására használják.

A tirozin foszforiláció szerepe

A junkciók biogenézise során erős tirozin foszforiláció észlelhető a laterális membránban, illetve annak közelében (Meyer és mtsai., 2001). Ugyanakkor a kialakult

junkciókban a fehérjék tirozin foszforilációs állapotának növelése a junkciók szétesését eredményezheti (Staddon és mtsai., 1995). A tirozin foszforiláció érinti úgy a szoros, mint az adherens kapcsolatok fehérjéit. Ezen folyamatokat tirozin kinázok és foszfatázok szabályozzák.

A tirozin kinázok közül az agyi endotélsejtekben fontos szerepet játszanak úgy a receptor, mint a non-receptor tirozin kinázok. Előbbiek közül megemlíthető számos növekedési faktor receptora, mint például a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor, a VEGF receptorai, a VEGFR-1 (Flt-1) és a VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Fontos megjegyezni, hogy a VEGF növeli a vér-agy gát permeabilitását, melynek egyik mechanizmusa a claudin-5 expresszió csökkentése (Argaw és mtsai., 2009).

A non-receptor tirozin kinázok közül egyik legfontosabb az Src kinázok családja. Epitélsejtekben az oxidatív stressz hatására aktiválódó c-Src fontos szerepet játszik a ZO-1 és a β-catenin tirozin foszforilációjában, a szoros kapcsolatok szétesésében és a permeabilitás fokozódásában (Basuroy és mtsai., 2003). A c-Src képes foszforilálni az occludint, amely folyamat a szoros kapcsolatok károsodásához vezet (Kale és mtsai., 2003). A junkciók kialakulásához ugyanakkor elengedhetetlen az occludin tirozinon történő foszforilációja, amelyet a c-Yes szabályoz (Chen és mtsai., 2002).

A junkciók szabályozásában ugyancsak fontos szerepe van a fokális adhéziós kináznak (FAK), melynek aktivációja HIV-encephalitiszben hozzájárul az agyi endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok felbomlásához (Ivey és mtsai., 2009). Sertoli sejtekben kimutatták, hogy a FAK protein komplexet képez az occludinnal (Siu és mtsai., 2009).

A Janus kinázok közül a JAK3 szerepét lehet kiemelni, hiszen a JAK3/STAT1 útvonal mediálja agyi endotélsejtekben a claudin-5, ZO-1 és ZO-2 expressziójának csökkenését HIV encephalitiszben (Chaudhuri és mtsai., 2008).

<u>A foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K)/Akt útvonal</u>

A PI3-kinázok az inozitol gyűrű harmadik hidroxil csoportját foszforilálják. Az I. osztályba tartozó PI3-kinázok katalitikus (p110) és szabályozó egységekből épülnek fel, amelyek a plazmamembrán közelében helyezkednek el, és az Akt (protein kináz B, PKB) szerin/treonin kináz aktivációját indukálják. Ezen jelátviteli útvonalnak jelentős szerepe van a sejtek túlélésében és proliferációjában.

Agyi endotélsejtekben a PI3K/Akt útvonal aktiválódása a barrier funkció károsodásához vezet, például hipoxia, VEGF, reaktív oxigéngyökök, HIV-1 Tat protein,

vagy fokális cerebrális iszkémia hatására (Fischer és mtsai., 2004, Vogel és mtsai., 2007, Schreibelt és mtsai., 2007, András és mtsai., 2005, Kilic és mtsai., 2006). Ugyanakkor Aktfüggőnek bizonyult az a folyamat is, melynek során a hipoxiás prekondicionálás megvédi az agyi endotélsejteket az apoptózistól (Zhang és mtsai., 2007). A PI3K/Akt útvonal agyi endotélsejtekben is proangiogenetikus és citoprotektív hatásúnak bizonyult (Lok és mtsai., 2009).

A mitogén aktivált protein kinázok (MAP kinázok) szerepe

A MAP-kinázok számos sejtszintű folyamat szabályozásában vesznek részt, mint a génexpresszió, mitózis, differenciáció, proliferáció, túlélés, illetve apoptózis. A MAP kináz család tagjai közül a legismertebbek az ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2), a p38 és a JNK (c-Jun N-terminal kinase) fehérjék.

A MAP kinázoknak kettős szerepe van a junkciók és a paracelluláris permeabilitás szabályozásában. Egyrészt az occludin downregulációja által a permeabilitás növekedését okozhatják (Chen és mtsai., 2000, Kevil és mtsai., 2000). Az oxidatív stressz által okozott junkcionális károsodásban úgy az ERK-nek, mint a p38-nak is szerepe van (Kevil és mtsai., 2000, Kevil és mtsai., 2000, Kevil és mtsai., 2001). Az ERK1/2 HIV fehérjék vagy alkohol hatására is aktiválódik hozzájárulva a vér-agy gát permeabilitásának növekedéséhez (Pu és mtsai., 2005, Singh és mtsai., 2007a). Ugyanakkor az ERK-nek alapvető szerepe van az endoteliális barrier újraépítésében iszkémia után (Wachtel és mtsai., 2002).

Az említettek mellet még számos szignalizációs molekula illetve útvonal játszhat szerepet a paracelluláris permeabilitás szabályozásában, ami jelzi a szabályozás komplexitását. Ezeknek pontos szerepe még csak részben tisztázott, főleg agyi endotélsejtekben, hiszen a szoros kapcsolatokra vonatkozó adatok túlnyomó többsége epitélsejtekkel végzett kísérleteken alapul.

2.4. A vér-agy gát patológiás körülmények között

A vér-agy gátnak a klinikai gyakorlatban két okból is nagy gyakorlati jelentősége van. Egyrészt a vér-agy gát működésének megértése létfontosságú számos idegrendszeri megbetegedés patomechanizmusának tisztázásához, illetve kezelési stratégiájának kialakításához. Különböző kórfolyamatok, mint amilyen az agyi iszkémia, a központi idegrendszer gyulladásos megbetegedései, neurodegeneratív megbetegedések a vér-agy gát sérüléséhez, és ezáltal a központi idegrendszer homeosztázisának felbomlásához

vezethetnek, amelynek súlyos kihatása lehet a kórkép lefolyására. E megbetegedések jelentős részében a vér-agy gát nemcsak passzív célpontként szerepel, hanem aktív résztvevője a kórfolyamatnak, sőt kulcsszerepet is játszhat (Banks, 2010).

Másrészt a vér agy-agy gát relatív impermeabilitása sok esetben megakadályozza, hogy különböző farmakonok terápiás koncentrációt érjenek el a központi idegrendszerben. Ezért a központi idegrendszer megbetegedéseinek terápiájára tervezett gyógyszerek esetében igen fontos kérdés a vér-agy gáton való átjutás. Az átjuttatásra irányuló módszerek – mint amilyen a vér-agy gát tranziens megnyitása, farmakonok kémiai módosítása a permeabilitás fokozása érdekében, specifikus receptorok felhasználása – széles tárháza ellenére sem tekinthető a kérdés megoldottnak.

A központi idegrendszer patológiás folyamataihoz társuló leggyakoribb funkciózavar a permeabilitás megnövekedése. A sejtek közötti permeabilitást az endotélsejtek közötti kapcsolatok határozzák meg, de igen fontos szerepe van a permeabilitás szabályozásában a transzcitózisnak, a patológiás körülmények között kialakuló transzendoteliális csatornáknak, az endotélsejtek felszínének negatív töltésének, illetve a citoszkeletonnak.

A paracelluláris barrier funkció ellátása szempontjából kiemelt jelentősége van az interendoteliális junkcióknak, a szoros kapcsolatoknak, illetve az adherens kapcsolatoknak: az áteresztőképességet elsősorban az interendoteliális kapcsolatokat alkotó fehérjék működése határozza meg. E fehérjék expressziója, membrán lokakizációja, egymással való interakciója, számos megbetegedésben változhat, ezért ezek vizsgálata képezte kísérletes munkánk egyik fő tárgyát.

Bár munkánk során ezt a kérdést nem vizsgáltuk, nem hagyható figyelmen kívül a transzcitózis fokozódása sem mint permeabilitást szabályozó tényező. Ez számos humán patológiai folyamatot modellező állatkísérletben volt megfigyelhető, mint akut magas vérnyomás (Nag és mtsai., 1977, Westergaard és mtsai., 1977), kémiailag indukált görcsök (Hedley-Whyte és mtsai., 1977) experimentális autoimmun encephalomyelitis (Kato és Nakamura, 1989), agyi trauma (Povlishock és mtsai., 1978). Ezen túlmenően gyulladásos mediátorok is képesek fokozni a transzcitózist, mint a bradikinin (Raymond és mtsai., 1986) és hisztamin (Dux és Joó, 1982). A kísérleti adatok arra utalnak, hogy a transzcitózis a legtöbb esetben folyadék fázisú, és kevésbé receptor mediált. A permeabilitás fokozódás igen korán megjelenik, akut magas vérnyomás fellépése után néhány perccel a vezikulák száma a többszörösére nő, és a transzport iránya luminális-abluminális irányba történik.

Fiziológiás körülmények között transzendoteliális csatornák nem találhatóak az agyi endotéliumban, azonban patológiás körülmények között, mint hiperozmózis (Farrell és Shivers, 1984), hiperglikémia (Shivers és Harris, 1984) vagy agyi trauma (Lossinsky és mtsai., 1989) megfigyelték jelenlétüket. A transzcelluláris csatornák jelentősége és részaránya a transzportfolyamatokban vitatott.

2.4.1. A vér-agy gát sérülése hipoxia és oxidatív stressz során

Az agyi hipoxia és iszkémia a központi idegrendszert érintő patológiás állapotok közül a legfontosabb, leggyakoribb és legsúlyosabb következményekkel járó folyamatok közé tartoznak, amelyek bármely életkorban előfordulhatnak. A központi idegrendszerben a hipoxiára legérzékenyebb sejtek a neuronok, azonban számos adat utal arra, hogy az asztrociták és az agyi endotélsejtek is részt vesznek az iszkémiás károsodás patogenézisében.

A hipoxia és az azt követő reoxigenáció egyik legkárosítóbb következménye az oxidatív stressz. Az oxidatív stressz a reaktív oxigén és nitrogén vegyületek (ROS) termelődése és eliminálása közötti egyensúly felbomlása során jön létre. Bár fiziológiás körülmények között is termelődnek reaktív oxigén és nitrogén vegyületek, ezeket a sejtek a bennük működő antioxidáns mechanizmusok révén (szuperoxid-diszmutáz, kataláz, glutation reduktáz) semlegesíteni tudják. Patológiás körülmények között azonban, mint amilyen a hipoxia, termelődésük oly mértékben megnő, hogy azt a sejtek már nem képesek semlegesíteni. A ROS-ok lehetnek szabadgyökök (pl. szuperoxid gyök vagy hidroxil gyök) és nem gyök jellegű vegyületek (pl. hidrogén-peroxid). A reaktív oxigén vegyületek gyakorlatilag bármelyik biomolekulát képesek megtámadni, a leggyakoribb célpontok azonban a lipidek, a DNS illetve a fehérjék (Lehner és mtsai., 2011).

A hipoxia (az oxigénellátás zavara) ritkán jelentkezik izoláltan, sokkal gyakrabban az iszkémia (a vérellátás zavara) része, és így együtt jár hipo-, vagy aglikémiával és a metabolikus termékek felszaporodásával. Kísérleteink kezdetekor számos adat utalt arra, hogy a hipoxia/aglikémia károsítja az agyi endotélsejteket (Wu és mtsai., 1998, Lagrange és mtsai., 1999, Kolev és mtsai, 2003). Hipoxiás körülmények között sérül a pH homeosztázis (Sipos és mtsai., 2005), fokozódhat vazoaktív vagy mitogén fehérjék génjének expressziója, mint amilyen a ciklooxigenáz (North és mtsai., 1994), a nitrogén monoxid szintetáz (Xu és mtsai., 2000) vagy az endotelin (Tsang és mtsai., 2001), illetve a

hipoxia képes szabályozni az integrinek (Suzuma és mtsai., 1998) és ICAM (Hess és mtsai., 1994) expresszióját is, amelyek a sejtadhézióban szerepet játszó fehérjék.

Az idegrendszeri betegségek patogenézise szempontjából nagy jelentőséggel bírhat, hogy hipoxia hatására fokozódik az agyi erek permeabilitása, ami hozzájárul az agyi ödéma kialakulásához. A permeabilitás növekedésének hátterében részben a paracelluláris permeabilitás növekedése (Abbruscato és Davis, 1999), másrészt a transzcelluláris transzportfolyamatok fokozódása állhat (Plateel és mtsai., 1997). A paracelluláris permeabilitás szabályozásában meghatározó szerepet játszanak a szoros kapcsolatok fehérjéi, így ezen fehérjék vizsgálata oxidatív stressz hatására a figyelem középpontjába került. Több kísérleti eredmény is utalt arra, hogy az epitél- és endotélsejtek egyes junkcionális fehérjéi érzékenyen reagálnak a hipoxiára illetve oxidatív stresszre (Park és mtsai., 1999, Mark és Davis, 2002, Brillaut és mtsai., 2002, Fischer és mtsai., 2002).

A paracelluláris permeabilitás befolyásolása mellett ugyanakkor az oxidatív stressz genotoxikus hatásokat is kifejthet. Így például köldökvéna endotélsejtekben kimutatták, hogy a hipoxia önmagában is okozhat apoptózist a p53 tumor szuppresszor gén indukálása révén (Stempien-Otero és mtsai., 1999), az oxidatív stressz pedig a PARP-1 enzim által okozott ATP-depléció, illetve a kaszpáz-3 aktiválása révén vezet apoptózishoz (Mathews és Berk, 2008, Zhao és mtsai., 2003). Az oxidatív stressz korai öregedéshez is vezet (Unterluggauer és mtsai., 2003). Az oxigén szabadgyökök lipid peroxidációt okoznak, melynek során vízoldékony karbonil vegyületek keletkeznek. Ezek agyi endotélsejtekben kromoszomális aberrációt és mikronukleusz képződést indukálnak (Karlhuber és mtsai., 1997).

Oxidatív stressz nemcsak a hipoxiát követő reoxigenáció során léphet fel, hanem egyéb patológiás folyamatok és stresszfaktorok hatására is, mint a HIV (Toborek és mtsai., 2003), az alkohol (Haorah és mtsai., 2005) vagy a metamfetamin (Ramirez és mtsai., 2009). Hasonlóképp a cigarettafüst is számos oxidánst tartalmaz (Yamaguchi és mtsai., 2007).

2.4.2. A hemorrágiás sokk hatásai a vér-agy gátra

A sokk a szöveti perfúzió olymértékű csökkenését jelenti, amely a sejtek metabolikus szükségleteit nem elégíti ki. Ez egy súlyos, életet veszélyeztető állapot, melynek több formája ismert, ezek közül az egyik a sérülések vagy sebészi beavatkozások kapcsán fellépő kontrollálatlan vérzés által okozott hemorrágiás sokk.

Amíg a hipovolémiát a neuroendokrin válaszreakciók kompenzálni tudják, kompenzált hemorrágiás sokkról beszélünk. Amikor ezen mechanizmusok kimerülnek, a sokk dekompenzált fázisba kerül, amely szervi és sejtszintű működészavarral jár. Ebben a fázisban a folyamat még visszafordítható a normovolémia visszaállításával. Azonban ha a folyamat tovább progrediál, a sokk az irreverzibilis fázisig juthat, amikor az életfontosságú szervek működése leáll, masszív sejtpusztulás következik be, és hamarosan beáll a halál.

A hemorágiás sokkban fellépő vér-agy gát változásokról kevés adat áll rendelkezésre. A hipoperfúzió során fellépő hipoxia és hipoglikémia azonban mindenképp befolyásolja a vér-agy gát működését. Ugyanakkor számos tanulmányban kimutatták a vér-agy gát permeabilitásának fokozódását szeptikus sokkban (Ekström-Jodal és Larsson, 1982, Patrick és mtsai., 1992, Veszelka és mtsai., 2003). A vér-agy gát permeabilitásának növekedése súlyosbíthatja a sokk kimenetelét a központi idegrendszer homeosztázisának felborítása, szérum proteinek agyba való bejutása és agyödéma kialakulása révén.

2.4.3. A vér-agy gát gyulladásos folyamatokban

Mivel az agyi endotélsejtek közvetlen kapcsolatban vannak a vérrel, a központi idegrendszer védelmi rendszerének frontvonalában vannak, és kulcsszerepük van a különböző stresszfaktorok érzékelésében és a rájuk adott válaszreakciókban. A különböző patogének által okozott gyulladások gyakran társulnak több szervet vagy szervrendszert érintő tünetekkel, és gyakran a központi idegrendszer is érintett. Az idegrendszeri tünetek megjelenésének egyik oka lehet a vér-agy gát sérülése. A kórokozók által kiváltott szisztémás hatások létrejöttében a Toll-szerű receptoroknak (Toll like receptors, TLR) fontos szerepe van. A TLR-ek a veleszületett immunrendszer fontos felismerő receptorai. A TLR családnak jelenleg 13 tagja ismert, egérben mindegyik expresszálódik, ezzel szemben emberben eddig csak tízet azonosítottak. A TLR-ek mintázat felismerő receptorok, és rendszerint olyan molekuláris mintázatokat ismernek fel, amelyek jól konzerválódtak a patogénekben, és jól elkülöníthetőek a gazdaszervezet molekuláitól. Ilyen molekulák bakteriális lipopoliszacharidok (LPS), lipopetidek, különböző virális DNS és RNS (összefoglaló: Akira és Hemmi, 2003) – ezek a patogén asszociált molekuláris mintázatok (PAMP). Ezen túlmenően némelyik TLR sérült szövetekből származó termékeket is felismer, mint hősokk fehérjék, fibronektin és hialuronán fragmentumok (Vabulas és mtsai., 2001, Okamura és mtsai., 2001, Scheibner és mtsai., 2006), ezek a szakirodaolmban DAMP (damage associated molecular pattern) néven ismertek. A TLR-ek

szélesen elterjedtek az immunrendszer sejtjein, de számos, és egyre több kísérleti adat utal arra, hogy TLR-ek expresszálódnak egyéb sejttípusokban is, mint amilyenek az epitélvagy endotélsejtek (Loos és mtsai., 2006, Koff és mtsai., 2008, Pryshchep és mtsai., 2008). Viszonylag kevés adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy milyen TLR-ek expresszálódnak agyi endotélsejteken, és ezek aktiválása milyen következményekkel jár. Néhány közelmúltban megjelent publikáció arra enged következtetni, hogy a TLR2 (Ziegler és mtsai., 2007), TLR3 (Fischer és mtsai., 2009) és a TLR4 (Veszelka és mtsai., 2007, Singh és mtsai., 2007b) funkcionálisan aktívak lehetnek az agyi endotéliumban, és részt vehetnek különböző patológiás folyamatokban.

2.4.4. A dohányzás hatásai a vér-agy gátra

A dohányzás, tekintettel arra, hogy számos súlyos megbetegedés kialakulásában játszik fontos szerepet, vezető helyet foglal el az elhalálozások megelőzhető okai között, és érinti úgy az aktív, mint a passzív dohányosokat. A dohányfüst számos vegyi anyagot tartalmaz, melyek közül a legfontosabbak a nikotin és a policiklusos aromás szénhidrogének (PAH). A dohányzással összefüggésbe hozható neurológiai megbetegedések gyakorisága és jellege arra utal, hogy a dohányfüstben található vegyületek egyik legfontosabb célpontja a központi idegrendszer és ennek keringése lehet. A dohányzók körében igen gyakoriak az agyérkatasztrófák, és ezen folyamatokban érintett a vér-agy gát is. Igen keveset tudunk azonban a dohányzás vér-agy gátra kifejtett hatásáról.

A nikotin endotélsejtekre kifejtett hatását elsősorban nem agyi eredetű endotélsejtekben vizsgálták. Aorta endotélben a nikotin a citoszkeleton reorganizációját és a VEGF expressziójának növekedését okozta (Cucina és mtsai., 2000, Conklin és mtsai., 2002). Agyi endotélsejtekben a plazminogén aktivátor inhibitor-1 termelés növekedését (Zidovetzki és mtsai., 1999), a Na,K-ATPáz α -2 izoformájának mennyiségi csökkenését (Wang és mtsai., 1994) és a ZO-1 expressziójának csökkenését (Abbruscato és mtsai., 2002, Hawkins és mtsai., 2004) mutatták ki nikotin hatására.

Még kevesebb adat áll rendelkezésünkre a policiklusos aromás szénhidrogének véragy gátra kifejtett hatásáról. Köldökvéna, illetve aorta endotélsejteket vizsgálva megállapították, hogy a cigarettafüst kondenzátum gátolja a sejtmigrációt (Snajdar és mtsai., 2001), növeli számos sejtadhéziós molekula sejtfelszíni expresszióját és a monociták transzendoteliális migrációját (Shen és mtsai., 1996), valamint gyulladásos mediátorok termelését (Nordskog és mtsai., 2005). Az 1-metilantracén (1-MA), a fenantrén

(Ph) és a benzopirén policiklusos aromás szénhidrogének apoptózist indukálnak koronária eredtű endotélsejtekben a foszfolipáz A₂ (PLA₂) aktiválása révén (Tithof és mtsai., 2002).

2.4.5. Az agyi endotélsejtek működése hiperozmotikus stressz körülmények között

A vér-agy gát komoly problémát jelent a neurológiai és pszichiátriai betegségek kezelésében, hiszen megakadályozza a gyógyszerek terápiás koncentrációban való bejuttatását az agyba. A szoros kapcsolatok hidrofil anyagokkal szembeni impermeabilitása, a metabolikus és enzimatikus barrier, illetve az efflux transzporterek jelenléte miatt a vér-agy gát a lehetséges neuroterapeutikumok mintegy 98%-át nem engedi át. Ennek leküzdésére számos módszerrel kísérleteznek: egyrészt gyógyszermolekulák módosításával, karrierekhez való kötésével, illetve a vér-agy gát terápiás megnyitásával.

Ez utóbbi elérhető hiperozmotikus mannitol beadásával (Nagy és mtsai, 1979), amit sikeresen alkalmaznak néhány intenzív terápiás centrumban (összefoglalva: Kroll és Neuwelt, 1998, Rapoport, 2000). A hiperozmotikus sokk által okozott vér-agy gát megnyitás gyors (perceken belüli) és reverzíbilis. A barrier tulajdonságok visszaalakulása 1 órán belül elkezdődik, és 6-8 óra alatt válik teljessé (Siegal és mtsai., 2000).

A hiperozmózis számos kompenzáló és adaptív válaszreakciót indukál a sejtekben (összefoglalva: Burg és mtsai., 2007). Ide tartozik az aktin citoszkeleton reorganizációja (Di Ciano és mtsai., 2002), a Rho, Rac és Cdc42 aktiválása (Di Ciano-Oliveira és mtsai., 2003, Lewis és mtsai., 2002), a kortaktin (Kapus és mtsai., 1999) és a fokális adhéziós kináz (Lunn és Rozengurt, 2004) foszforilációja.

Kevésbé ismert azonban, hogy milyen hatása van az ozmotikus stressznek az agyi endotélsejtekre, illetve hogy milyen molekuláris mechanizmus révén nyitja meg a vér-agy gátat a hiperozmotikus mannitol.

2.4.6. A vér-agy gát szerepe rosszindulatú daganatok agyi metasztázisainak kialakulásában

A vér-agy gát fontos szerepet játszik különböző rosszindulatú daganatok agyi metasztázisainak kialakulásában is. Mivel a központi idegrendszer nem rendelkezik nyirokkeringéssel, az agyi metasztázisok kialakulása csak hematogén úton történhet, így az áttétek kialakulásának feltétele, hogy a metasztatikus sejtek átjussanak a vér-agy gáton. Az agy rosszindulatú daganatai között a metasztázisok száma messze meghaladja a primér

daganatok számát. Az agyi metasztázisok nagy része melanóma, emlő- vagy tüdőkarcinóma eredetű, és a melanóma az a daganat, amelyik a legnagyobb százalékban ad agyi áttétet: a kórbonctani eredmények azt mutatják, hogy a melanómás betegek több mint 50%-ában megjelenik az agyi metasztázis. A nagy gyakorlati jelentőség ellenére a metasztatikus melanóma sejtek transzendoteliális migrációjáról kevés adat áll rendelkezésre, és az ismereteink nagy része nem agyi endotéllel végzett kísérletekből származik. Az eddigi kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a transzmigrációban integrinek (Liang és Dong, 2008), cadherinek (Qi és mtsai, 2006), a melanotranszferrin (Rolland és mtsai., 2009), illetve különböző proteázok játszhatnak fontos szerepet. A közelmúltban screening kísérletek segítségével probáltak azonosítani agyi metasztázis specifikus géneket, amelyek között megtalálható volt az α -2,6-szialiltranszferáz ST6GALNAC5 is (Bos és mtsai, 2009). Egy hasonló kísérletben 73 gént azonosítottak (Klein és mtsai., 2009), azonban a két kísérlet során azonosított gének között alig volt átfedés.

3. CÉLKITŰZÉSEK

A vér-agy gát egy aktív határfelületet képez a központi idegrendszer és a keringés között, és ezáltal fontos szerepet játszik a központi idegrendszer homeosztázisának szabályozásában, valamint különböző idegrendszeri megbetegedések patogenézisében és terápiájában egyaránt. Az agyi endotélsejtek kulcsszerepet töltenek be a vér-agy gát fő funkcióinak ellátásában, ezért munkánk nagy részében ezen sejtek vizsgálata került előtérbe.

A több mint egy évtizedet átölelő munkánk során kísérleteinket néhány nagyobb, egymással azonban szorosan összefüggő témakör köré csoportosítva próbáltunk választ kapni a vér-agy gát működésének sajátosságaira fiziológiás és patológiás körülmények között.

1. A vér-agy gát permeabilitásának szabályozásában a junkcionális fehérjék kiemelt szerepet játszanak, azonban funkciójuk nem korlátozódik kizárólag strukturális feladatok ellátására. A junkcionális fehérjék vizsgálata során elsősorban arra kerestünk választ, hogy az endoteliális növekedési faktor miként befolyásolja az agyi endotélsejtek junkcionális fehérjéinek expresszióját, illetve milyen morfológiai és funkcionális változásokat indukál ezekben a sejtekben. Továbbá kíváncsiak voltunk arra is, hogy az occludin expressziója csak az endotélsejtekre korlátozódik-e, vagy a vér-agy gát kialakításában szintén fontos szerepet játszó asztrociták is képesek lehetnek ezen junkcionális fehérje kifejezésére.

2. Céljaink között szerepelt az agyi endotélsejtekben zajló szignalizációs mechanizmusok egyes sajátosságainak feltárása is. Itt egyrészt a glutamát receptorok és transzporterek, illetve szerotonin transzporter expresszióját kívántuk megvizsgálni. Egy igen izgalmas kérdésnek bizonyult annak vizsgálata, hogy a ZO-2 junkcionális fehérje a strukturális szerep mellett képes-e jeltovábbító útvonalak aktív részese is lenni. Választ kerestünk arra is, hogy milyen G-fehérjék expresszálódnak agyi endotélsejtekben, illetve a kis G-fehérjék közül a Rho kináz, és ezzel összefüggésben a Rho-kináz valamint a Ca²⁺ milyen szerepet játszik az endotélsejtek működésének szabályozásában.

3. Fontos célkitűzés volt az agyi endotélsejtek működésének feltárása patológiás körülmények között. A hipoxia/reoxigenáció illetve az oxidatív stressz hatásainak

vizsgálata során a paracelluláris permeabilitás növekedés mechanizmusainak és a genotoxikus hatásoknak a feltárása volt a cél. További vizsgálataink során arra kerestünk választ, hogy a hipovolémiás sokk, a dohányfüst egyes összetevői, a TLR2/6 receptor agonisták, illetve a hiperozmózis hogyan befolyásolják a junkcionális komplexum működését, és az indukált változásokat milyen jeltovábbító útvonalak közvetítik. Mivel a központi idegrendszer nem rendelkezik nyirokkeringéssel, a vér-agy gátnak fontos szerepe van rosszindulatú daganatok agyi metasztázisainak kialakulásában is. Az egyik legnagyobb százalékban agyi metasztázist képező daganat a melanóma, így céljaink között szerepelt a melanóma sejtek vér-agy gáton történő transzmigrációjának molekuláris szintű vizsgálata is.

4. MÓDSZEREK

4.1. Vegyszerek

Minden reagens, ha másként nincs jelölve, a Sigma Aldrich Kft. terméke. A kísérletek során a következő vegyületeket alkalmaztuk: PDS (plasma derived serum) (First Link), FCS (fetal calf serum, magzati borjúsavó), DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium and Ham's F-12 Nutrient Mixture), MEM (Minimum Essential Medium), RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium), II-es típusú kollagenáz, Percoll, puromicin, EBM-2 (endothelial basal medium-2), EGM-2 (endothelium growth medium-2) Bullet Kit (Cambrex), bFGF, hidrokortizon, CPT-cAMP (8-(4-klór-fenil-tio)-cAMP), RO-201724 (Roche), kollagenáz/diszpáz (Roche), leupeptin (Roche), E64 (Roche), pepstatin (Roche), Pefabloc (Roche), PP-1 (Tocris), Y27632 (Tocris), GM6001 (Calbiochem), MG-132 (Calbiochem), zVAD (Calbiochem), U0126 (Cell Signaling Technology), pirrolidin ditiokarbamát (PDTC), 2,3-dimetil-1,4-naftokinon (DMNQ), nátrium-vanadát, zymosan A, citalopram (Lundbeck), 5-HT (17,9 Ci/mmol, Amersham), protein A és G szefaróz (GE Healthcare), glutamát, MK-801, ECGF (endoteliális növekedési faktor) (Collaborative Research), TGF-β1 (R&D), TNF-α és IL-1β.

A következő ellenanyagokat használtuk:

1. Junkcionális fehérjék elleni antitestek: occludin, claudin-1 és -5, ZO-1, ZO-2 (Zymed), α -, β -, γ -catenin, pan-cadherin (Sigma), VE-cadherin (Santa Cruz), β -catenin, N-cadherin (Transduction Laboratories).

2. Jelátviteli és egyéb fehérjék elleni antitestek: Gsα, Go1,2α, Gi1,2α (Du Pont-NEN) Gq11α, Gi2α, Gi3α (Prof. G. Schultz és Dr. K. Spicher ajándéka), ERK, foszfo-ERK, foszfo-p38, Akt, foszfo-Akt (Cell Signaling), p53 (Beckton Dickinson), M2-PK (ScheBo), Axl (Santa Cruz), foszfotirozin (PY20 klón) (Sigma, Transduction Laboratories), HRPkonjugált-anti-foszfotirozin (Hypromatrix).

3. Egyéb fehérjék elleni ellenanyagok: α - és β -aktin (Sigma), fibronektin (Chemicon), c-myc (Santa Cruz), HA, GFP (Clontech), β -tubulin (Sigma), SAF-B (Abcam), α 3 integrin (Chemicon), ubiquitin (Santa Cruz), hSAF-B (Dr. Frank O. Fackelmayer, Hamburgi Egyetem, Németország).

4. Szekundér ellenanyagok: torma peroxidázzal (HRP) kapcsolt anti-nyúl és anti-egér IgG (Thermo Scientific), Cy3- (karbocianin-3) kapcsolt anti-nyúl, -egér és -kecske IgG, és Cy2-kapcsolt anti-egér IgG (Jackson).

4.2. In vitro modellek

Sejttenyésztés

Agyi endotélsejt tenyészetek:

Kísérleteinkhez primér patkány agyi mikrovaszkuláris endotél tenyészeteket, illetve humán, egér, patkány és sertés agyi endotélsejt vonalakat használtunk.

A primér endotél tenyészetek kéthetes patkány agyakból készültek. Az agyhártya eltávolítása után a szürkeállományt két lépésben emésztettük kollagenáz és kollagenáz/diszpáz enzimekkel. A mikroereket IV-es típusú kollagénnel és fibronektinnel bevont felszínekre szélesztettük. A kontamináló sejteket szelekciós médium segítségével távolítottuk el, amely Thy1.1 ellenanyagot és nyúl komplementet, vagy 4 μ g/ml puromicint tartalmazott. A sejteket DMEM/F12 médiumban tenyészettük 20% PDS jelenlétében, amelyhez bázikus fibroblaszt növekedési faktort (1 ng/ml) és heparint (100 μ g/ml) adtunk. A tenyészetek 5-7 nap alatt érték el a konfluenciát.

A klónozott egér és sertés agyi endotélsejt vonalakat Tontsch és Bauer (1989) módszere alapján készítettük limitált passzálással. A sejteket 10% borjúsavót és heparint (100 μg/ml) tartalmazó DMEM médiumban tenyésztettük, ECGF (4 ng/ml) jelenlétében, vagy hiányában.

Az RBE4 és GP8 immortalizált patkány agyi endotélsejt vonalakat az előállítóktól szereztük be, és a megadott protokoll szerint tenyésztettük (Roux és mtsai., 1994, Greenwood és mtsai., 1996). A hCMEC/D3 immortalizált humán agyi endotélsejt vonalat az eredeti leírás alapján tenyésztettük (Weksler és mtsai., 2005).

Egyéb tenyészetek:

A permeabilitási vizsgálatokhoz az agyi endotélsejteket asztrocitákkal tenyészettük együtt, amelyeket újszülött egérből, illetve patkányból izoláltunk. Az agyhártyák eltávolítása után a cortexeket 10% FCS-t tartalmazó DMEM tápfolyadékban mechanikailag szétválasztottuk. A sejteket poli-L-lizinnel bevont 12 lyukú tenyésztőedényekbe (Costar) helyeztük, és a konfluencia elérése után használtuk fel őket. Az endotélsejtekkel való együtt tenyésztést oly módon valósítottuk meg, hogy az asztrociták a tenyésztőedény alján, az endotélsejtek pedig a tenyésztőedénybe helyezett filteren nőttek.

A szoros kapcsolatok fehérjéinek vizsgálata során egyes kísérleteinkhez epitélsejt vonalakat használtunk. Az MDCK kutya veseepitél és LLC-PK1 sertés veseepitél sejteket

DMEM vagy DMEM/F12 médiumban tenyészettük 10% FCS jelenlétében, a HEK293 sejtek tenyésztéséhez 10% lószérumot tartalmazó MEM-et használtunk. Az NIH 3T3, az egér asztrocitóma (DBT) és COS-1 sejteket 10% FCS-t tartalmazó DMEM-ben tenyésztettük.

A neuronokat Bauer és Tontsch (1990) módszere alapján izoláltuk 14 napos egér embrió agyából. A tenyészeteket neurofilamentum festéssel jellemeztük.

Az A2058 humán melanóma sejteket 5% FCS-t tartalmazó MEM médiumban tenyésztettük, amit Glutamax-szal egészítettünk ki. A B16/F10 egér melanóma sejtvonal tenyésztéséhez RPMI tápfolyadékot használtunk.

Transzfektált epitél- és endotélsejtek:

A következő ZO-2, illetve fSAF-B szekvenciákat tartalmazó plazmidokkal transzfektált sejteket használtuk: pEGFP-ZO-2 (1-1174 aminosavak, GenBank kód: <u>AAC37332</u>), pEGFP-ZO-2nuc (1-1174 repetitív [n=3] SV40 nukleáris lokalizációs szignálhoz fuzionálva [=3xNLS]), pEGFP-fSAF-B. A sejteket 70-80% konfluenciáig növesztettük, és a transzfekciót szuszpenzióban végeztük EffecteneTM (Qiagen), illetve Lipofectamin2000TM (Invitrogen) transzfekciós reagenssel a gyártó által megadott protokoll szerint. A stabil transzfekcióhoz a pEGZ/MCS-HA-Phoenix HEK293-T retrovirális rendszert használtuk. Szelekciós antibiotikumként Zeocin-t használtunk.

Tenyészetek kezelése

<u>*Ca*²⁺ depléciós kísérletek ("*Ca*²⁺-switch").</u> Az MDCK-ZO-2nuc és MDCK sejteket konfluenciáig tenyésztettük. A sejteket megmostuk Ca²⁺ és Mg²⁺ mentes PBS-sel, és a tápfolyadékot Ca²⁺ mentes DMEM-re cseréltük. Ebben tartottuk a sejteket 4 óra és 12 óra közötti időtartamon keresztül, amit immunfluoreszcens vizsgálatok követtek. Az agyi endotélsejtek esetén hasonló módon jártunk el annyi különbséggel, hogy a sejteket 150 percig tartottuk Ca²⁺ mentes tápfolyadékban, ami után 4 órán át ismét Ca²⁺-tartalmú DMEM/F12-ben tenyésztettük őket. Ahol ezt külön jelöltük, ott a tápfolyadék tartalmazott Rho-kináz inhibitort (Y27632, 10 µM) vagy 50 µM proteaszóma inhibitort (MG-132).

<u>*Glutamát.*</u> Primér patkány agyi endotélsejteket 30 percig kezeltünk glutamáttal (2 mM) majd a foszforilációt 0, 10 és 60 perccel a glutamát hatás megszűnte után vizsgáltuk. Az MK-801-et 100 µM-os koncentrációban alkalmaztuk.

<u>*Hipoxia/reoxigenáció.*</u> A hipoxia létrehozásához a sejteket egy légmentesen lezárható kamrában (Billups-Rothenburg) tartottuk 16 órán keresztül 37°C-on, 5% CO₂-ot és 95% N₂-t tartalmazó atmoszférában. Az ezt követő reoxigenáció 5% CO₂, 70% N₂ és 25% O₂
jelenlétében, 4 órán keresztül történt. A kezeléseket glükóz jelenlétében és hiányában is elvégeztük.

<u>Oxidatív stressz</u>. Az oxidatív stressz kémiai úton történő kiváltásához 5-10 µM DMNQ-t használtunk glükóz jelenlétében illetve hiányában.

Zymosan kezelés. A kísérletek során a konfluens agyi endotélsejt tenyészeteket szérummentes tápfolyadékban kezeltük 10, 50 vagy 100 µg/ml zymosan A-val. A zymosan kezeléseket a TLR2/6 aktiváció és oxidatív stressz együttes hatásának vizsgálatára 5 µM DMNQ jelenlétében is elvégeztük. Egyes esetekben a 100 µg/ml zymosannal együtt 10 µM U0126-ot, 100 µM PDTC-t vagy 5 µM DMNQ-t adtunk a tápfolyadékhoz, a vegyületek együttes hatásainak vizsgálatára. A TLR expresszió vizsgálatok esetében a sejteket 10 ng/ml TNF-α-val vagy 10 ng/ml IL-1β-val is megkezeltük.

<u>Nikotin, PAH.</u> A nikotint 100 nM-100 μ M, a fenantrént és a metilantracént 30 μ M végkoncentrációban adtuk az endotélsejtek tápfolyadékához. Végül a 10 μ M-os nikotin kezelést 10 μ M DMNQ-val is kiegészítettük, a vegyületek együttes hatásaink tesztelésére.

<u>Mannitol.</u> A hiperozmotikus stressz kiváltásához 10-20%-os mannitol (0,55-1,1 M) kezelést használtunk 10, 30, illetve 60 percig. A mannitol kezeléssel párhuzamosan a különböző inhibitorokat is alkalmaztunk, a genisztein kezelést 1 órás előinkubációval alkalmaztuk.

A transzendoteliális és transzepiteliális elektromos ellenállás (TEER) mérése

A sejteket 0,4 µm pórusméretű filtereken tenyésztettük a konfluencia eléréséig. A TEER méréséhez kamra-, illetve botelektródot használtunk és egy EVOM voltohmmétert (World Precision Instruments). A sejteket nem tartalmazó filter ellenállását levontuk a mért értékből, így kaptuk meg az endotélréteg saját ellenállását. Későbbi kísérleteink során a TEER mérésére a cellZscope (Nanoanalytics) berendezést használtuk, ami alkalmas a TEER folyamatos és több mintán történő párhuzamos mérésére anélkül, hogy a tenyészeteket ki kelljen venni a termosztátból.

A vér-agy gát permeabilitásának mérése in vitro

Az in vitro vér agy-gát modell permeabilitásának mérésére a 376 Da molekulatömegű nátrium fluoreszceint, és a 67 kDa molekulatömegű Evans kékkel jelölt albumint (Evans blue labeled albumin, EBA) alkalmaztuk. A sejteket 0,4 μm pórusméretű filtereken tenyésztettük a konfluencia eléréséig, asztrocitákkal közös tenyészetben. A sejteket Ringer-HEPES oldattal mostuk (150 mM NaCl, 5,2 mM KCl, 2,2 mM CaCl₂, 0,2 mM MgCl₂, 6 mM NaHCO₃, 5 mM HEPES, 2,8 mM D-glükóz, pH=7,4). A filterek alsó

(abluminális) részéhez Ringer-HEPES-t adtunk. A felső, luminális oldalhoz 10 μg/ml nátrium fluoreszceint, 170 μg/ml Evans kéket és 10 mg/ml marha szérum albumint (BSA) tartalmazó Ringer-HEPES oldatot adtunk. A sejteket enyhén rázva, 37°C-on egy órán át inkubáltuk, majd az abluminális térrészből mintát vettünk. A nátrium fluoreszcein és az EBA koncentrációját fluoreszcens leolvasóval mértük (FLUOstar Optima microplate reader, BMG Labtechnologies), 485/520 nm-es excitációs/emissziós hullámhosszon a nátrium fluoreszcein és 584/680 nm-en az Evans kék albumin esetében.

A fagokinetikus nyomvonal esszé

A kísérleteket Albrecht-Bühler (1977) módszere alapján végeztük. A sejteket arannyal bevont tárgylemezeken növesztettük 48 órán át 1 ng/ml TGF-β jelenlétében, majd 3,5% formaldehiddel fixáltuk 30 percig, majd Gelvatol (Monsanto, USA) segítségével beágyaztuk. A nyomvonalakat sötét látóteres mikroszkóppal vizsgáltuk és HIPAD digitizer segítségével mértük. A statisztikai analízist három független kísérletből 50-50 nyomvonal alapján készítettük.

Sértési esszé

Sato és Rifkin (1989) módszere alapján, a kollagénnel bevont csészékben növesztett szubkonfluens sejttenyészetet egy pengével megsértettük, majd háromszor megmostuk és két napig inkubáltuk a megfelelő médiumban. A sértés vonalától a denudált területre vándorolt sejteket mikroszkóp alatt számoltuk.

Sejtviabilitás meghatározása

A sejtek viabilitását a tápfolyadékba felszabadult laktát-dehidrogenáz (LDH) alapján határoztuk meg, kereskedelemben kapható citotoxicitási teszt (Roche) segítségével. A további kísérletekhez csak azon tenyészeteket használtuk fel, amelyekben nem növekedett az LDH aktivitás oxidatív stressz hatására.

[3H]5-HT felvétel

A konfluens tenyészeteket Krebs-Ringer oldatba tettük 24°C-on, amely radioaktívan jelölt szerotonint (17,9 Ci/mmol) tartalmazott. Az inkubációs periódus után a sejteket óvatosan megmostuk és Lowry reagensben szolubilizáltuk 30 percig. A fehérjekoncentrációt Lowry módszerével határoztuk meg. Az uptake meghatározásához 350 µl sejtlizátumhoz 4 ml szcintillációs koktélt (Ultima Gold, Packard) adtunk. A nemspecifikus kötődés és uptake meghatározásához a tenyészeteket 4°C-on inkubáltuk.

Melanóma adhéziós kísérletek

Az agyi endotél sejteket (primér patkány: RBEC, illetve humán hCMEC/D3) 24lyukú tenyésztő edényekben konfluenciáig növesztettük. A melanóma sejteket fluoreszcensen megjelöltük Oregon Green® 488-karboxilsav-diacetát-szukcinimidil-észter (röviden: OG, Invitrogen) segítségével, és 5•10⁴ melanóma sejtet helyeztünk lyukanként az endotélsejtekre. Az úszó sejtek lemosása után a mintát fixáltuk etanol/ecetsav 95/5 keverékével 5 percig -20°C-on. Az endotélsejtekhez tapadt melanóma sejteket lefényképeztük és az Image-Pro Plus szoftver segítségével megszámoltuk.

Melanóma transzmigrációs kísérleti rendszer

A primér patkány agyi endotélsejteket óvatosan feltripszineztük, és fibronektinnel és kollagénnel bevont 8 μm pórusméretű filterekre (1,13 cm², Millipore) passzáltuk. Amikor a tenyészet konfluenssé vált, a felső kompartimentumba 550 nM hidrokortizont, 250 μM CPT-cAMP-t és 17,5 μM RO-201724-t, az alsó kompartimentumba asztrocita-kondícionált médiumot adtunk a magas transzendoteliális rezisztencia elérése érdekében.

A melanóma sejteket OG-vel megjelöltük, és szérummentes médiumban 10^5 sejtet helyeztünk az endotél rétegre a felső kompartimentumba. Az alsó kompartimentumba ekkor 100 µg/ml 1-es típusú kollagént tartalmazó szérummentes médiumot tettünk. A Pefabloc[®]-ot 200 µM-os koncentrációban használtuk mindkét kompartimentumban. 5 óra után a tenyészeteket fixáltuk, majd a felső kompartimentumban levő sejteket letöröltük. Az endotél rétegen és a filter pórusain átjutott melanóma sejtek a filter alsó felszínén gyűltek össze, így számolhatóvá váltak fluoreszcens mikroszkóppal.

4.3. Molekuláris biológiai módszerek

Polimeráz láncreakció (PCR, polymerase chain reaction)

Az RNS izolálás Chomczynski és Sacchi (1987) módszerén alapuló metodikákkal történt. Az RNS cDNS-sé való átírását a kereskedelemben kapható kitek segítségével végeztük. A polimeráz láncreakcióhoz specifikus primereket használtunk, amelyeket az NCBI adatbázisban található szekvenciák alapján, illetve irodalmi adatok alapján terveztük. Ezek a következők voltak:

NR1	ACGGAATGATGGGCGAGC
	GGCATCCTTGTGTCGCTTGTAG
NR2A-C	GGG(G/C)TTCTG(T/C)AT(T/C)GACATCC

	GACAGC(A/G)AAGAAGGCCCACAC
GluR1-4	CCTTTGGCCTATGAGATCTGGATGTG
	TCGTACCACCATTTGTTTTTCA
mGluR	GCCCTN(G/C/T)TNACNAA(A/G)ACNAA
	AT(A/G)CANGTNGT(A/G)TACATNGT(A/G)AA
	(N = A/T/G/C)
GAP43	CACCATGCTGTGCTGTATGA
	ATCATCCTTCTCCTTGGCCT
GFAP	CACAGGACCTCGGCACCCTG
	GGAGCAGCTCTGCGTTGCGG
GLT1	GACAGCCACCTCAGCTCCGA
	ACTCCACCATCAGCTTGGCC
GLAST	CTACTCACCGTCAGCGCTGT
	AGCACAAATCTGGTGATGCG
Occludin:	GGGGCTCGGCAGGTTCGCTTAT
	GCCTGGGCCGTCGGGTTCACT
5-HT transzporter:	CATCTGGAAAGGCGTCAA
	AGAGACGAAGCTTGTCATG
illetve:	CATCTGGAAAGGCGTCAAAAC
	ACGATGAGCACGAACCATTC

Valós idejű polimeráz láncreakció

A valós idejű polimeráz láncreakcióhoz az RNS-t kezeletlen illetve kezelt sejtekből TRIzol reagens segítségével izoláltuk (Invitrogen), követve a gyártó használati utasításait. Abban az esetben, ha a primerek azonos exonból származtak, az esetlegesen jelenlevő genomiális DNS szennyeződésből származó amplifikációs termékek elkerülése érdekében az RNS-t DNáz kezelésnek vetettük alá. Az RNS átírása cDNS-sé reverz transzkripciós kit segítségével történt (iScript cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad Laboratories). Az amplifikációt egy Bio-Rad iQ5 készülékkel végeztük a Bio-Rad iQ SYBR Green Supermix felhasználásával az alábbi körülmények között: 40 ciklus, 95°C 15 s, 56°C 30 s, 72°C 30 s. Kontrollként glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz-t (GAPDH) használtunk. A küszöbciklus meghatározása és a kvantifikáció a készülék szoftverével történt. A génexpresszió változásait a küszöbciklus meghatározásával (ΔΔCt módszer) értékeltük ki. Kísérleteinkhez a következő primerpárokat használtuk:

GAS6	TGCTGTCATGAAAATCGCGG	CATGTAGTCCAGGCTGTAGA
Axl	CTCAGATACTCCATGCCACT	CTCAGATACTCCATGCCACT
GAPDH	GTGAAGGTCGGTGTCAACG	GTGAAGACGCCAGTAGACTC
Humán TI	LR:	
TLR1	GCCTTGTCTATACACCAAGT	CCAATTGTTGCAGAGACTTC
TLR2	TCTCCCATTTCCGTCTTTTT	GGTCTTGGTGTTCATTATCTTC
TLR3	TAAACTGAACCATGCACTCT	TATGACGAAAGGCACCTATC
TLR4	CCGCTTCCTGGTCTTATCAT	TCTGCTGCAACTCATTTCAT
TLR5	ACGGACTTGACAACCTCCAA	AGTGGATGAGGTTCGCTGTA
TLR6	CCCAAGGAGAAAAGCAAAC	TTCACCATCATCCAAGTAAAT
TLR7	CAGAGCTGAGATATTTGGACT	TTGGTAAGTATCTGTTATCACCT
TLR8	CGGCAGAGTTATGCAAATAGT	GTAAGAGCACTAGCATTATCA
TLR9	GGCAAAGTGGGCGAGATGAG	AGTGGTGGTTGTCCCTGGTC
TLR10	CTCCCAACTTTGTCCAGAAT	TGGTGGGAATGCAATAGAAT
Patkány T	LR:	
TLR1	TACCCTGAACAACGTGGACA	ATCGACAAAGCCCTCAGAGA
TLR2	GGAGACTCTGGAAGCAGGTG	CGCCTAAGAGCAGGATCAAC
TLR3	AGCCTTCAACGACTGATGCT	GGAAATTAACGGGACCACCT
TLR4	CCAGAGCCGTTGGTGTATCT	TCAAGGCTTTTCCATCCAAC
TLR5	GCCAGACCAGATTGAAGTC	TGTGAATCTCGTTGGCAGAG
TLR6	GTCTCCCCACTTCATCCAGA	CCCACGTTTACCCTTCTCAA
TLR7	AGCTCTGTTCTCCTCCACCA	CATGGGTGTTTGTGCTATCG
TLR8	TAGTGGAAATCGCCTTGACC	AAGCCAGCAGGTAGGTGAGA
TLR9	TCAACAAGAACACGCTCAGG	GAGAGCTGGGGTGAGACTTG
TLR10	GATTGTCACCATTGTGCTGG	AGACAGAATCATGTGCAGCG

Géncsendesítés

A stealthTM siRNA duplex oligoribonukleotidokat az Invitrogen BLOCK-iTTM RNAi designer program segítségével terveztük. Az Axl gén csendesítésére a következő szekvenciákat használtuk: 5'-CAGGAACUGCAUGCUGAAUGAGAA-3' és 5'-UUCUCAUUCAGCAUGCAGUUCCUGG-3'. Az 50%-os konfluenciájú sejteket 10 nM RNS-sel transzfektáltunk LipofectamineTM RNAiMAX (Invitrogen) reagenssel 6 órán keresztül, két egymást követő napon. A hiperozmotikus kezelés a második transzfekció

után következett, amikor a tenyészet konfluenssé vált. A szepráz gén csendesítéséhez a következő szekvenciákat használtuk: 5'-AAGAAGUGUGUUACUUGCCAUCUAA-3', és 5'-UUAGAUGGCAAGUAACACACUUCUU -3'. Kontrollként a következő kevert (scrambled) oligonukleotidokat használtuk: 5'-GACGUAGAGAGAGUUCCGACAUA CA-3', és 5'-UGUAUGUCGGAACUCUCUCUACGUC-3'. Az 50%-os konfluenciájú A2058 sejteket 10 nM RNS-sel transzfektáltunk LipofectamineTM RNAiMAX (Invitrogen) reagenssel 8 órán keresztül, két egymást követő napon. A sejteket a második transzfekció után egy nappal használtuk fel.

Northern-blot

Az RNS izolálás Chomczynski és Sacchi (1987) módszerével történt. 10 μg RNS-t formaldehiddel denaturáltunk, 1%-os agaróz gélen elválasztottunk, majd zetaprobe membránra transzferáltunk. A prehibridizációt követően a filtereket ³²P-jelölt cDNS próbákkal hibridizáltuk, amelyek aktin-, illetve fibronektin-specifikusak voltak. A filtereket Kodak XAR filmekre exponáltuk -70 °C-on.

4.4. Fehérje vizsgálati módszerek

Western-blot

A mintákat Triton X-100, illetve RIPA lízispufferben homogenizáltuk, melyeknek összetétele a következő volt: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, detergensek (1% Triton X-100, illetve 1% deoxikolát és 0,1% SDS - sodium dodecyl sulfate) és proteáz inhibítorok. A mintákat egy órán át jégen inkubáltuk, majd lecentrifugáltuk (10000 x g, 4 °C, 10 perc). Egyes esetekben vízoldékony, Triton X-100-szolubilis és -inszolubilis frakciókat különítettünk el. A vízoldékony fehérjéket detergens-mentes pufferben homogenizáltuk.

A fehérje koncentrációt Bradford, illetve BCA (Pierce) módszerrel határoztuk meg. Azonos mennyiségű fehérjét tartalmazó mintákat SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választottunk el, a G-fehérjék esetében – a jobb feloldóképesség érdekében – urea jelenlétében. A fehérjéket ezután PVDF, illetve nitrocellulóz (G-fehérjék, VEcadherin, Axl esetében) membránra blottoltunk. A blokkolás után a membránokat az elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk, majd TBS-T-vel mostuk. Ezután HRP-konjugált másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk, mostuk, és kemilumineszcens detektáló kit segítségével hívtuk elő.

Immunprecipitálás

Az immunprecipitáláshoz a sejteket lízis pufferben homogenizáltuk (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 0,5% NP40, 2 mM CaCl₂, 5 mM NaF, 1 mM nátrium ortovanadát, 1mM Pefabloc), majd a homogenátumot lecentrifugáltuk (10000 x g, 4°C, 10 perc), és a felülúszót használtuk tovább. A fehérje koncentráció meghatározása után a fehérjemintákat előinkubáltuk protein A- vagy G-szefarózzal (preclearing), majd folyamatos keverés mellett a mintákat 1-5 µg ellenanyaggal inkubáltuk 4 órán át 4°C-on, amit protein A- (poliklonális ellenanyagok esetében: occludin, ZO-1, ZO-2, claudin-1), illetve protein G-szefarózzal (monoklonális ellenanyagok esetén: βcatenin, foszfotirozin, c-myc, illetve Axl) történő inkubáció követett. A szefaróz gyöngyök négyszeri jéghideg TBS-T-vel való mosása után az immunkomplexeket egyszeres SDS mintapufferben 95°C-on 3 percen át denaturáltuk. Az így előkészített mintákkal Westernblot analízist végeztünk.

<u>In vivo ubiquitináció.</u> HA-val jelzett ubiquitint expresszáló HEK 293 sejteket homogenizáltunk, és ebből anti-occludin ellenanyaggal precipitáltunk. A Western-blottot anti-HA ellenanyaggal végeztük.

SAF-B ZO-2 kötés (Far-Western)

MDCK sejthomogenátumból immunprecipitáltuk a ZO-1-et, a ZO-2-t és az occludint. Az immunprecipitátumot SDS elektroforézis segítségével elválasztottuk, PVDF membránra blottoltuk, majd a membránokat blokkolás után ³⁵S-el jelölt SAF-B-vel inkubáltuk. A kötést röntgenfilm segítségével vizualizáltuk. A ³⁵S-el jelölt SAF-B-t retikulocita lizátum rendszerrel (TNTTM, Promega) állítottuk elő.

Ellenanyag-mátrix

A mannitol által aktivált (foszforilált) fehérjék detektálására az ellenyag-mátrixot (Hypromatrix) a gyártó által megadott protokoll szerint használtuk. Röviden: a 60 ellenanyagot tartalmazó mátrixot a sejtlizátummal inkubáltuk, majd mostuk, ezután HRP-konjugált-anti-foszfotirozin (Hypromatrix) ellenanyaggal inkubáltuk, mostuk, végül ECL Plus (Amersham) segítségével hívtuk elő.

Proteomikai analízis

A sejteket jéghideg lízispufferben homogenizáltuk (2% NP40, 2% CHAPS, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (etiléndiamintetraacetát), 0,2 mM vanadát, 1 mM Pefabloc, 1 mM NaF, 2% amfolit), a fehérjekoncentrációt a BCA módszerrel mértük meg (Pierce). A

mintákat körülbelül 1 mg/ml koncentrációra hígítottuk rehidratációs puffer segítségével (7 M urea, 1% DTT, 2% CHAPS, 20 mM Tris-HCl). 17 cm-es lineáris pH gradiensű (pH=5-8) IPG csíkokat (ReadyStrip, BioRad Laboratories Inc.) 16 órán át rehidratáltunk 300 µl fehérje minta jelenlétében Protean IEF Cell-ben (BioRad) a következő lépéseket használva: 1) 250 V, 15 perc, 2) 10000 V, 3 h, 3) 50000 V/h.

A csíkokat 20 percig ekvilibráltuk I-es és II-es pufferben (I-es puffer: 6 M urea, 2% SDS, 0,375 M Tris-HCl, 20% glicerin, 2% DTT, II-es puffer: 2.5% jódacetamid). Az izoelektromos szétválasztást követő elektroforetikus szétválasztást 12%-os SDS gélen végeztük egy éjszakán át Protean II xi 2-D Cell (BioRad) készülékkel, majd a géleket ezüstfestéssel festettük meg egy MALDI tömegspektroszkópiával kompatibilis eljárást követve. A géleket PDQuest 7.3 (BioRad) szoftverrel elemeztük, majd a kiválasztott fehérje pöttyöket kivágtuk. A fehérjék azonosítását az MTA SZBK proteomikai laboratóriumában végezték.

Kétdimenzionális elektroforézis Western-blottal kombinálva

A sejteket Tris-szorbitol pufferrel mostuk (10 mM Tris, 25 mM szorbitol, pH=7), majd rehidráló pufferbe (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 1% DTT, 0,2 mM vanadát, 1 mM Pefabloc, 1 mM NaF, 0,2% amfolit, brómfenolkék) kapartuk és 1 órán át szobahőn inkubáltuk, majd lecentrifugáltuk (16000 x g, 20 min, 17°C). A kétdimenzionális elektroforézishez Protean IEF Cell-t és immobilizált pH gradiens sztripeket használtunk (7 cm, pH=4-7, BioRad), illetve Mini-Protean 3-at. A Western-blot analízis a második dimenziójú gélen történt.

Zimográfia

A szérummentes médiumban tenyészetett sejtek felülúszóját lecentrifugáltuk, és merkaptoetanol mentes mintapufferben készítettük elő. A mintákban levő fehérjéket 10 mg/ml zselatint tartalmazó poliakrilamid gélen választottuk el, nem denaturáló körülmények között. A gélekből az SDS-t 2,5% Triton X-100 tartalmú pufferrel mostuk ki. Ezután a géleket bivalens kationokat tartalmazó pufferben inkubáltuk 24-48 óráig, majd Coomassie Blue festékkel festettük és 10% metanol és 10% ecetsav segítségével távolítottuk el a nem kötődött festéket. Így fehér sávok formájában váltak láthatóvá a zselatináz aktivitású proteázok.

A melanóma sejtek által indukált proteolitikus aktivitás méréséhez a hCMEC/D3 sejteket 12-lyukú edényekben tenyésztettük, majd 2•10⁵ A2058 melanóma sejtet helyeztünk rájuk szérummentes tápfolyadékban. 5 óra után a tápfolyadékot

lecentrifugáltuk, és merkaptoetanol-mentes mintapufferben készítettük elő. A sejteket megmostuk, majd 1,5% Triton X-114-tartalmú pufferben lizáltuk. Centrifugálás után a felülúszókat 5 percre 37°C-ra helyeztük, majd szobahőmérsékleten 2 percig centrifugáltuk. A felső vizes fázist eldobtuk, és a membrán frakciót merkaptoetanol-mentes mintapufferben oldottuk fel. A minták elektroforetikus szétválasztása és a proteolitikus sávok vizualizásása az előzőekben leírtak szerint történt.

A glutamát indukálta foszforiláció vizsgálata

A tenyészetekből készített fehérje extraktumokat 50 µl esszé médiumban (25 mM Tris-MES puffer, 2 µCi [γ -32P]ATP és 2 mM EGTA vagy 100 mM Ca²⁺ és 2 mM calmodulin) inkubáltuk 2 percig. A reakciót SDS mintapuffer hozzáadásával állítottuk le, majd a fehérjéket 10% SDS gélelektroforézis segítségével választottuk szét. Az autoradiográfiához a géleket megszárítottuk a radioaktivitás detektálásához röntgen filmet használtunk (expozíciós idő: 3 nap). Az autoradiogramokat denzitometráltuk, a statisztikai analízishez Kruskal-Wallis ANOVA-t és Student-Newmann-Keuls módszert használtunk. A p<0,05 értéket tekintettük szignifikánsnak.

Nukleáris extraktumok készítése

A nukleáris extraktumok készítéséhez a sejteket PBS-be vettük fel. A sejtes üledéket 10 mM Tris-HCl-ot (pH=7,2) és 70 mM NaCl-ot tartalmazó pufferben reszuszpendáltuk, majd 5 perc jégen történő inkubálás után 4°C-on 500 x g-vel lecentrifugáltuk. Az üledéket 10 mM Tris-HCl-t (pH=7,2) és 0,1 mM PMSF-et tartalmazó oldatban üveg/teflon homogenizálóval homogenizáltuk, majd lecentrifugáltuk (700 x g, 5 perc, 4°C). Az így kapott sejtmagokat 0,88 M szukróz/1,5% citromsav tartalmú pufferben újra homogenizáltuk, majd a homogenátumhoz óvatosan hozzáadtunk egy 2,5 M szukrózt és 1,5% citromsavat tartalmazó oldatot és lecentrifugáltuk (1000 x g, 10 perc, 4°C). A sejtmagokat tartalmazó réteget óvatosan leszívtuk, megmostuk (10 mM HEPES pH=7,5, 120 mM KCl, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂, 1,1 mM EGTA, 0,1 mM PMSF, 5 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml pepstatin A), lecentrifugáltuk, majd SDS mintapufferben vettük fel.

Az occludin turnoverének meghatározása

Az LLC-PK1 sejteket metionin és cisztein mentes MEM-ben tartottuk 45 percig, majd a sejtek egy olyan cisztein és metionin mentes MEM tápfolyadékot kaptak, amelyhez 0,1 mCi/ml [35S] jelölt metionit adtunk (American Radiolabeled Chemicals), és ebben tenyésztettük a sejteket 1 órán át. Ezután a sejteket mosás után olyan, nem radioaktív,

metionin és cisztein mentes MEM-ben inkubáltuk, amihez nem radioaktív L-ciszteint (0,24 mg/ml) és L-metionint (0,15 mg/ml) adtunk. A sejteket 0-3 óra inkubálás után az immunprecipitálás illetve Western-blot alfejezetekben leírt módon homogenizáltuk, occludin vagy claudin-1 ellenanyaggal precipitáltuk, majd a kapott mintákat elektroforetikus elválasztás után autoradiográfiának tettük ki.

4.5. Mikroszkópos vizsgálatok

Immunfluoreszcencia és aktin festés

A fedőlemezeken tenyésztett sejteket kezelés után PBS-ben mostuk, majd 10 percig fixáltuk etanol/ecetsav 95/5 arányú keverékével, -20^{0} C-on. Újabb mosás után a fedőlemezeket 1% BSA-val blokkoltuk, ezután az elsődleges (anti- β -catenin, anti-occludin, anti-ZO-2, anti-claudin-1, illetve anti-Axl), majd a fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyaggal (Jackson, Molecular Probes) inkubáltuk. A festések vizualizálásához Nikon Eclipse TE2000U mikroszkópot, illetve Olympus Fluoview FV1000 konfokális mikroszkópot használtunk.

Az aktin fluoreszcensen jelölt falloidinnel történő festése esetében a következő képpen jártunk el: a sejteket 4% formaldehiddel fixáltuk és acetonnal permeabilizáltuk, majd FITC-falloidinnnal vagy Alexa488-falloidinnal inkubáltuk (1/100 hígításban a következő pufferben: 60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 140 mM NaCl). Mosás után a fedőlemezeket víz alapú beágyazó géllel rögzítettük a tárgylemezeken. A képeket fluoreszcens mikroszkóphoz kapcsolt digitális kamerával készítettük.

<u>Occludin festés agyi metszeteken.</u> A kísérletek után az állatokat 4%-os paraformaldehiddel perfundáltuk. Az eltávolított agyakat 24 órán át poszt-fixáltuk 4%-os paraformaldehiddel, majd 30%-os szukróz oldatba helyeztük. 10-20 µm vastag metszeteket készítettünk egy Leitz 1720 kriosztáttal. A metszeteket háromszor mostuk PBS-ben, 0,02%-os Triton X-100 segítségével permeabilizáltuk, és 3%-os BSA-val blokkoltuk. Az anti-occludin elsődleges ellenanyag Dr. M. Furuse-tól (Kyoto-i Egyetem) származott, a másodlagos ellenanyag Cy3-mal volt jelölve (Jackson).

A sejtmagok morfológiájának mikroszkópos analízise

A mikronukleuszt tartalmazó, apoptotikus, nekrotikus, illetve mitotikus sejtek számának meghatározására a sejtekmagokat DAPI vagy Hoechst 33342 festékkel jelöltük és a mintákat fluoreszcens mikroszkóppal analizáltuk. Mintánként 1000 sejtet vizsgáltunk

meg, és megszámoltuk az apoptotikus (félhold alakú, kondenzált vagy fragmentált kromatinnal rendelkező) sejtmagokat, a nekrotikus sejtmagokat (kis, piknotikus magok erősen kondenzált kromatinnal) és a mikronukleusszal rendelkező sejteket. Ezen módszerrel a mitotikus index is meghatározható. Az apoptotikus és nekrotikus sejtek számát AnnexinV/propidium jodid festéssel is meghatároztuk, illetve egyes esetekben az apoptotikus sejteket hasított kaszpáz-3 ellenanyaggal jelöltük.

Atomi erő mikroszkópos (AFM) vizsgálatok

Az atomi erő mikroszkóp alkalmas élő sejtek leképezésére nagy felbontásban. Segítségével felszíni és felszín alatti struktúrák térben és időben történő változásait követhetjük. Kísérleteinket 31°C-on végeztük, maximum 3 óra időtartamon belül. Irodalmi adatokkal összhangban ezen időintervallum alatt a sejtek megőrizték viabilitásukat.

A mérésekhez Asylum MFP-3D fejet és Molecular Force Probe kontrollert (Asylum Research) használtunk. A vezérlő program (MFP Xop) IGOR Pro szoftverben készült. Szilícium nitridből készült szilanizált tűket használtunk és a méréseket kontakt módban, folyadékban végeztük.

Elektronmikroszkópiás vizsgálatok

1%-os formaldehides és 1%-os glutáraldehides fixálást, majd ozmium tetroxidos posztfixálást követően a sejteket dehidráltuk, majd Spurr gyantába ágyaztuk. A metszeteket Leica ultramikrotómmal készítettük, uranil acetáttal és ólom citráttal kontrasztosítottuk, majd transzmissziós elektronmikroszkóppal (Zeiss 902) vizsgáltuk. A transzmigrációs kísérletekhez a primér patkány agyi endotél sejteket 8 μm pórusméretű filtereken tenyésztettük, majd 2•10⁵ A2058 melanóma sejtet helyeztünk rájuk. 5 óra után a sejteket megmostuk, és a fent leírt módon készítettük elő az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz.

4.6. In vivo kísérletek

Hemorrágiás sokk modell

Kísérleteinkhez 290-390 g-os hím Wistar patkányokat használtunk (n = 46). Az állatokat intraperitoneálisan adott uretánnal altattuk. Az állatok spontánul lélegeztek, és testhőmérsékletüket állandó 37°C-on tartottuk. A szisztémás vérnyomást a bal femorális artériában mértük. A jobb femorális artériába helyezett kanülön keresztül zajlott a véreztetéses vérnyomás csökkentés.

A hemorrágiás sokk különböző fázisait (kompenzált, illetve dekompenzált) a vérnyomás 40 Hgmm-re való csökkentésével értük el zárt rendszerbe való véreztetéssel.

Ezáltal a kísérleti állatok három csoportra oszthatók:

1. csoport (n = 14): kontroll, normotenzív.

2. csoport (n = 15): kompenzált hemorrágiás sokk, amelynek során az artériás vérnyomást 40 Hgmm-en tartottuk 15 percen keresztül.

3. csoport (n = 17): dekompenzált hemorrágiás sokk. Ennek során az artériás vérnyomást 40 Hgmm-en tartottuk, amíg a levett vérmennyiség felét az állat spontán visszavette: ez jelezte a dekompenzált sokk létrejöttét.

A vér-agy gát permeabilitásának mérése in vivo

Az állatok a kísérlet befejezése előtt 30 perccel intravénás injekció formájában (5 ml/kg) 2% Evans kék albumint (67 kDa) és 2% nátrium fluoreszceint (376 Da) kaptak. Az állatokat 250 ml izotóniás sóoldattal perfundáltuk és a különböző agyi régiókat 15%-os triklórecetsavban homogenizáltuk. Centrifugálás után a felülúszókból az Evans kék koncentrációt 620 nm-en történő abszorbcióval, míg a fluoreszcein koncentrációt fluoriméter segítségével határoztuk meg 440 nm-es excitációs, illetve 516 nm-es emissziós hullámhosszal.

Agyi kapillárisok izolálása

Az agyi kapillárisok izolálásához a patkányokat elaltattuk, majd fiziológiás sóoldattal perfundáltuk. Az agyat eltávolítottuk, majd szukróz pufferben (0,32 M szukróz, 3 mM HEPES, pH=7,4) homogenizáltuk. A homogenátumot 4°C-on 10 percig centrifugáltuk 1000 x g-n, és az üledéket ismét homogenizáltuk szukróz pufferben. Ezt újabb centrifugálási lépés követte (4°C, 10 perc, 1000 x g), majd az üledéket reszuszpendáltuk 5-6 ml szukróz pufferben. A szuszpenziót lecentrifugáltuk (4°C, 30 másodperc, 100 x g), a felülúszót áthelyeztük egy másik centrifuga csőbe, az üledéket pedig ismét reszuszpendáltuk szukróz pufferben, és újra lecentrifugáltuk. Az így keletkezett felülúszót összekevertük az előző centrifugálás során keletkezett felülúszóval, majd lecentrifugáltuk (4°C, 1 perc, 200 x g). Az üledéket kétszer megmostuk szukróz pufferben és egyszer PBS-ben. A mikroér frakció tisztaságát fáziskontraszt mikroszkóppal ellenőriztük.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A junkcionális fehérjék expressziójának sajátosságai a vér-agy gát sejtjeiben

5.1.1. Az occludin expressziója asztrocitákban

A junkcionális fehérjék, különösen a tight junction fehérjéi kulcsszerepet játszanak a paracelluláris barrier létrehozásában. Egyes kísérleti adatok azonban arra utaltak, hogy ezek a fehérjék nem kizárólag a polarizált epitél- illetve endotélsejtekben expresszálódnak (Howarth és mtsai., 1992). Ezért megvizsgáltuk, hogy a vér-agy gát működésében fontos szerepet játszó asztrocitákban kifejeződhet-e az occludin. A génexpressziós vizsgálatokhoz RT-PCR-t alkalmaztunk. Ezen vizsgálatok során kimutattuk, hogy amint az várható volt, az occludin az összes általunk vizsgált epitélsejteket tartalmazó szövetben (vese, placenta, illetve here) expresszálódott. Ugyancsak kimutatható volt az occludin mRNS-e embrionális és felnőtt egér agyban. Ezen túlmenően azonban az occludin transzkriptum megtalálható volt tenyésztett asztrocitákban és neuronokban is, ellenben egyáltalán nem volt detektálható NIH 3T3 fibroblasztokban (3.ábra).



3. ábra. Az occludin expressziója különböző szövetekben és sejtekben: RT-PCR vizsgálat Különböző egér sejtekből és szövetekből izolált RNS-t c-DNS-é írtunk át, majd az occludint specifikus primerek segítségével amplifikáltuk. A nyilak az amplifikáció során létrejött 680 bp méretű occludin fragmentum helyzetét jelölik.

Ahhoz, hogy az RT-PCR eredményeket fehérje szinten is megerősítsük, Western-blot analíziseket végeztünk (4. ábra). A várakozásoknak megfelelően nagy mennyiségű occludin expresszálódott epitélsejtekben és különböző típusú agyi kapilláris endotélsejtekben. Ugyanakkor, alátámasztva az RT-PCR eredményeket, a tenyésztett asztrociták, a DBT asztrocitóma sejtvonal sejtjei és neuronok is expresszáltak occludint, NIH 3T3 fibroblasztokban ellenben nem volt kimutatható e fehérje. Különbség mutatkozott azonban az epitélsejtekben illetve asztrocitákban előforduló occludin oldhatóságában. Ellentétben az MDCK sejtekkel, ahol a Triton X-100 szolubilis és

inszolubilis frakció egyaránt tartalmazott occludint, az asztrocitákban csak a Triton X-100 szolubilis frakcióban volt megtalálható az occludin. A junkcionális fehérjék jelenléte a Triton X-100 inszolubilis frakcióban a citoszkeletonnal való szoros kapcsolódást, illetve a raftokba való lokalizálódást jelenti (Nusrat és mtsai., 2000). Az occludin némely szövetben több sávot is adott, ami poszttranszlációs módosulások eredménye lehet (pl. foszforiláció/defoszforiláció).





A különböző szervekből és szövetekből készített fehérje preparátumot SDS gélelektroforézis segítségével szétválasztottuk, membránra blottoltuk, majd a membránokat specifikus antioccludin ellenanyaggal festettük.

Az asztrociták occludin expressziója nagymértékben függött a sejtek morfológiai sajátosságaitól. Immunoprecipitációs és Western-blot vizsgálatok során kimutattuk, hogy a kis passzázsszámú, epiteloid fenotípusú (azonban GFAP pozitív) asztrociták sokkal nagyobb mennyiségben expresszáltak occludint, mint a nyúlványokkal rendelkező, tipikus asztrocita fenotípust mutató tenyészetek (5A. ábra).





5A. Occludin immunoprecipitációja MDCK sejtekből, nyúlványokkal rendelkező, illetve epiteloid fenotípusú asztrocitákból. Az alsó blottok a felső blottok hosszabb ideig exponált változatai. A nyilak az occludin sávok (65 kDa), a csillagok az Ig nehéz lánc helyét jelölik.

5B. Occludin immunoreaktivitás epiteloid fenotípusú asztrocitákban. Mérce = 10 µm.

Az asztrocitákban előforduló occludin lokalizációjának meghatározására immunfluoreszcens vizsgálatokat végeztünk. Lézer konfokális mikroszkópia segítségével kimutattuk, hogy az occludin az epiteloid fenotípusú asztrocitákban, az epitél- illetve endotélsejtekben tapasztalhatóhoz hasonlóan, a sejt-sejt kontaktusok szintjén helyezkedik el (5B. ábra).

5.1.2. Különböző fenotípusú agyi endotélsejtek funkcionális és molekuláris sajátosságainak jellemzése

Az occludin expressziós vizsgálatok során megfigyeltük, hogy különböző fenotípusú agyi endotélsejtekben e fehérje mennyisége változó. Az agyi endotélsejtek azon képessége, hogy fenotípusukat változtatni tudják a külső környezet változásainak megfelelően, egy figyelemre méltó tulajdonsága ezen sejttípusnak. A sejtek morfológiai és funkcionális adaptációjában a növekedési faktorok közismerten fontos szerepet játszanak. Az egyik ilyen növekedési faktor az endoteliális növekedési faktor (ECGF). Kísérleteink során, melyekhez egér agyi endotélsejteket használtunk, az ECGF és kofaktora, a heparin hatását vizsgáltuk e sejtek morfológiai és funkcionális sajátosságaira, valamint az ezen sajátosságokat alapvetően befolyásoló junkcionális fehérjék expressziójára. ECGF és heparin jelenlétében az agyi endotélsejtek ún. macskakő elrendezést vettek fel (I-es típus), míg e növekedési faktor hiányában a sejtek elnyúlttá váltak (II-es típus). A morfológiai különbségeket jól tükrözte az átrendeződött aktin citoszkeleton is, amely az I-es típusú sejtekben egy jellemzően gyűrű alakú struktúra volt, ami a kortikális aktin hálózatnak felelhet meg, míg a II-es típusú sejtekben a kortikális aktin hálozat nagyrészt eltűnt, és a stressz filamentumokhoz hasonló hosszanti szálak jelentek meg (6. ábra).





A morfológiai változások együtt jártak funkcionális változásokkal is, aminek egyik megnyilvánulása az volt, hogy jelentősen megváltozott a sejtek vándorlási potenciálja. A fagokinetikus nyomvonal esszé eredményei azt mutatták, hogy ECGF hiányában a sejtek 40%-kal nagyobb motilitással rendelkeznek. A motilitást a TGF-β mindkét fenotípus esetében jelentősen csökkentette (13%-kal az I-es, 33%-kal a II-es típusú sejtekben) (7A. ábra). A sértési esszé segítségével végzett vándorlási képesség vizsgálata ezzel egybevágó eredményt hozott: ECGF hiányában a sejtmentes területre bevándorolt sejtek száma 33%-kal megnövekedett, és a sejtek távolabbra vándoroltak (7B. ábra).



7. ábra. ECGF hatása az agyi endotélsejtek motilitására és vándorlására

A. Az I-es és II-es típusú agyi endotélsejtek fagokinetikus nyomvonala: (a) I-es típus, (b) I-es típus + TGF- β 1, (c) II-es típus, (d) II-es típus + TGF- β 1.

B. Sértési esszé. I-es (a) és II-es (b) típusú agyi endotélsejtek 48 óra vándorlás után. A c és d ábra az I-es és II-es típusú sejteket mutatja közvetlenül a sértés után. A nyilak a sértés helyét jelölik. Mérce = $100 \mu m$.



8. ábra. ECGF hatása az agyi endotélsejtek metalloproteináz aktivitására és fibronektin termelésére A. Metalloproteinázok aktivitása az I-es és II-es típusú agyi endotélsejtekben. Kondicionált médium az I-es (1) és II-es (2) típusú sejtekből, membrán frakció a I-es (3) és II-es (4) típusú sejtekből.

B. Northern-blot vizsgálat. Fibronektin és aktin mRNS expressziója I-es (1) és II-es (2) sejtekben.

A fokozott sejtvándorlás illetve motilitás gyakrán jár együtt fokozott proteolitikus aktivitással is, amelyben a metalloproteinázoknak kiemelkedő szerepe van. Ezért annak tisztázására, hogy az ECGF hiánya által kiváltott megnövekedett vándorlási készség párosul-e magasabb metalloproteináz aktivitással, zimográfiás kísérleteket végeztünk. Ezen kísérletek eredményei azt mutatták, hogy míg az ECGF jelenlétében tenyésztett sejtek membrán frakciójában csak egy 70 kDa körüli proteolitikus sáv volt található, ECGF hiányában amellett, hogy a 70 kDa-os sáv erőteljessé vált, megjelent még egy 45 kDa körüli sáv is (8A. ábra). Irodalmi adatok alapján a 70 kDa körüli sáv az MMP-2-nek felelhet meg (Herron és mtsai., 1986), míg a 45 kDa méretű sáv a stromelizin aktivitását jelezheti (Matrisian, 1992). Emellett az extracelluláris mátrix egyik fontos komponensének, a fibronektinnek a termelése csökkent ECGF hiányában, ami szintén pozitív irányba befolyásolhatja az agyi endotélsejtek vándorlási képességeit (8B. ábra).

Az endotélsejtek egymáshoz való kapcsolódásában az intercelluláris junkciók, elsősorban a szoros kapcsolatok, illetve az adherens kapcsolatok játszanak fontos szerepet. Ezen struktúrák funkcionális állapota befolyásolhatja a sejtek morfológiáját, migrációját, ezért következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy a sejtközötti kapcsoló struktúrák kulcsfehérjéi, mint az occludin, cadherinek és cateninek, miként expresszálódnak a két fenotípusban. Western-blot vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a legnagyobb különbség a cadherin expressziójában van: míg ECGF jelenlétében jelentős mennyiségű cadherin expresszálódott, ECGF hiányában alig volt kimutatható az expresszió. Hasonló irányban változott az occludin expressziója is, ugyanakkor az α - és β -catenin mennyisége nem változott (9. ábra).



9. ábra. Junkcionális fehérjék expressziója I-es és II-es típusú agyi endotélsejtekben Az I-es és II-es fenotípusú sejtekből készített fehérje homogenátumot SDS-PAGE segítségével elválasztottuk, majd blottolás után a membránokat specifikus ellenanyagokkal inkubáltuk.

5.2. A szignáltranszdukció sajátosságainak vizsgálata agyi endotélsejtekben

5.2.1. Glutamát receptorok és glutamát transzporterek expressziója

Az agyi endotélsejtek – elhelyezkedésükből és szerepükből kifolyólag – úgy a központi idegrendszer, mint a keringés felől érkező jelzések szabályozása alatt állnak. E szabályozás egyik feltétele, hogy e sejtek rendelkezzenek specifikus membránreceptorokkal, amelyek képesek a különböző jelzéseket felfogni és a sejt belseje felé továbbítani. A glutamát, amely egyben az egyik legfontosabb neurotranszmitter, számos patológiás folyamatban játszik kulcsszerepet. Koenig és munkatársainak (1992) kísérletei arra utaltak, hogy a glutamát közvetlenül is képes hatni az agyi endotélsejtekre, ami felvetette annak a lehetőségét, hogy e sejtek funkcionális glutamát receptorokat expresszálnak. A glutamát receptor alegységek expressziójának vizsgálatára RT-PCR-t alkalmaztunk, amely a génexpresszió vizsgálatára alkalmas egyik legérzékenyebb módszer. Pozitív kontrollnak agyi cDNS-t használtunk. A genomi DNS szennyeződések által okozott esetleges fals pozitív eredmények kiküszöbölésére a primer párokat különböző exonokból választottuk, és szekvenciájuk megegyezett más laboratóriumok által használt primerek szekvenciáival. A primereket oly módon terveztük meg, hogy az NR2A-C, GluR1-4 és mGluR1-6 primerek több alegységet is felismerjenek (Okamoto és mtsai., 1994, Niedzielski és Wenthold, 1995). Az amplifikációt elvégeztük reverz transzkripció nélkül is, és ezen esetekben, amint az várható volt, nem kaptunk specifikus terméket. Az endotélsejtek tisztaságát specifikus neuronális (GAP-43), illetve glia (GFAP) markerekkel ellenőriztük, és a tesztek eredményei negatívak voltak (10. ábra).





Kísérleteink azt igazolták, hogy a primér patkány agyi endotélsejtek expresszálják az NR1, NR2A-C, GluR1-4 és mGluR receptorokat. A receptorok expressziójának vizsgálata mellett fontos kérdés volt azok funkcionalitásának vizsgálata is. A glutamát receptorokhoz

kapcsolódó jeltovábbítás fontos eleme a foszforiláció, és ismeretes, hogy a glutamát receptorok aktiválása a kalcium/kalmodulin-dependens protein kináz II (CAM-PK II) foszforilációjához vezet. Kísérleteink során a Ca²⁺ és kalmodulin igen erőteljesen indukálta egy 50-54 kDa fehérje foszforilációját (160,6 ± 21% az alaphoz képest, n = 5, p<0,05), amely saját előzetes és irodalmi adatok alapján azonos a CAM-PK II α alegységével (Mackie és mtsai., 1986, Deli és mtsai., 1993). 30 perces kezelés 2 mM glutamáttal szignifikánsan megnövelte a kalmodulin dependens foszforilációt (488,5 ± 52%), amely fennmaradt még 10 és 60 perccel a glutamát expozíció után is (321,7 ± 44.7% és 218,3 ± 23.5%) (11. ábra). A kalmodulin stimulálás nélküli alapfoszforiláció nem változott (11A. ábra). A glutamát indukálta CAM-PK II foszforiláció 100 µM MK-801-gyel gátolható volt, ami arra utal, hogy a folyamat NMDA receptor függő (11A. ábra, alsó kép). Az autoradiográfiák denzitometriás analízise a 11B. ábrán látható.



^{11.} ábra. A CAM-PK II foszforilációja glutamát hatására agyi endotélsejtekben
A. A kalcium/kalmodulin függő protein kináz α alegységének foszforilációja glutamát és glutamát + MK-801 hatására. A nyíl a CAM-PK II α alegységének helyzetét jelöli.
B. A Ca²⁺/kalmodulin jelenlétében történő foszforiláció denzitometriás analízise.

A glutamát hatásának szabályozásában igen fontos szerepet játszanak azok a mechanizmusok, amelyek a glutamát extracelluláris koncentrációját szabályozzák. Ebben a folyamatban a glutamát transzportereknek nagy jelentősége van, ezért megvizsgáltuk, hogy az agyi endotélsejtek képesek-e glutamát transzportereket expresszálni. Az EAAT1 (GLAST, SLC1A3), illetve EAAT2 (GLT1, SLC1A2) mRNS-ének kimutatására RT-PCR-t alkalmaztunk. Az amplifikációhoz szükséges primerpárok az esetleges genomiális

szennyeződésből származó artefaktumok elkerülése érdekében különböző exonokból származtak. Az amplifikációs termékek mérete megfelelt a primerpárok pozíciójából számított értékekkel. Mind a két általunk vizsgált glutamát transzporter mRNS-e jelen volt az agyi endotélsejtekben (12. ábra).



12. ábra. Glutamát transzporterek expressziója agyi endotélsejtekben A GLT1 és GLAST transzporterek expresszióját RT-PCR-rel vizsgáltuk. Pozitív kontrollként agyszövetet használtunk. Három független kísérlet reprezentatív eredményei láthatóak.

5.2.2. A szerotonin transzporter expressziója

A glutamát transzporterek mellett megvizsgáltuk a szerotonin transzporter expresszióját is agyi endotélsejtekben. Ezekhez a kísérletekhez az RBE4 patkány agyi endotélsejt vonalat használtuk. A szerotonin transzporter mRNS-ének kimutatására szintén RT-PCR-t alkalmaztunk. A két, egymástól független primerrel végzett PCR során kapott ampifikációs termék mérete (319 bp, illetve 600 bp) megfelelt a primerek lokalizációjából számolt értéknek, és az amplifikátum szekvenciája is egyezett a szerotonin transzporter szekvenciájával. Kísérleteink egyértelműen igazolták, hogy a szerotonin transzporter expresszálódik agyi endotélsejtekben (13. ábra).





Az 5-HT transzporter expresszióját agyi endotélsejtekben RT-PCR-rel vizsgáltuk. Pozitív kontrollként patkány placentát használtunk, negatív kontrollként az amplifikációt reverz transzipció nélkül végeztük el. Az RT-PCR amplifikációs termékeinek mérete 319 bp, illetve 600 bp. Két független kísérlet reprezentatív eredményei láthatóak.

A transzporter funkcionalitásának vizsgálatához 5-HT felvétel kísérleteket végeztünk, melyekhez RBE4 sejtek konfluens tenyészetét használtuk. A 14A. ábra mutatja a felvétel időfüggését, amely lineáris volt. A nem specifikus transzport meghatározása érdekében egy specifikus szerotonin felvétel inhibitort, a citalopramot használtuk 50 µM koncentrációban. A citalopram jelenlétében mért és a teljes transzport közti különbséget tekintettük specifikus transzportnak.





A szerotonin felvétel koncentrációfüggését a 14B. ábra mutatja. A transzport szaturációja 5 μ mol/l koncentráció környékén következett be. Az uptake adatok kinetikus analízise a K_m értékének 397 ± 64 nM értéket, míg V_{max}-nak 51,7 ± 3,5 pmol x g⁻¹ x min⁻¹ értéket eredményezett.

A transzport nátrium függőségét a NaCl fokozatos lítium- vagy kolinkloriddal történő helyettesítésével vizsgáltuk. Ha a NaCl-ot LiCl-ra cseréltük, a szerotonin felvétel körülbelül kétharmadát tette ki a NaCl jelenlétében mértnek. Ugyanilyen nagyságrendű volt a csökkenés, ha nagy koncentrációjú citalopramot használtunk az 5-HT transzport gátlására (15. ábra).





A felvételt 60 percig mértük. A NaCl-ot LiCl-dal helyettesítettük. A citalopram koncentrációja 10 μ M volt. Az adatok az átlagokat és a szórást képviselik. n = 6, *p<0,001.

5.2.3. A G-fehérjék szerepe agyi endotélsejtekben

A sokféle membránreceptor és transzporter mellett az agyi endotélsejtek komplex jeltovábbító útvonalakkal is rendelkeznek. Korábbi munkáink során kimutattuk, hogy az addig neuron-specifikusnak tartott CAM-PK II is expresszálódik agyi endotélsejtekben, és jellemeztük a PKC különböző izoformáinak expressziós mintázatát is. A G-fehérjék számos jeltovábbító útvonal fontos elemei, az azonban nem volt ismert, hogy milyen típusú G-fehérjék vannak jelen agyi endotélsejtekben. A G-fehérjék expressziójának vizsgálatát primér patkány agyi endotélsejtekben, illetve az RBE4 és GP8 patkány agyi endotélsejt vonalakban Western-blot segítségével végeztük el. Az összes általunk vizsgált Gα alegység (Gsα, Gi1α, Gi2α, Gi3α, Gq/11α és G0α) expresszálódott mindhárom típusú agyi endotélsejtben, csak kismértékű mennyiségi különbségek voltak megfigyelhetőek (16 ábra).





A G fehérjék α alegységei közül a Gsα és Gi csoportba tartozók az intracelluláris cAMP szint szabályozásában vesznek részt. Mivel e másodlagos hírvívő molekula részt vehet a paracelluláris permeabilitás szabályozásában, megvizsgáltuk, hogy primér agyi endotélsejtek transzendoteliális elektromos ellenállása (TEER) miként változik cAMP hatására. Már 1 óra kezelés után is észlelhető volt a TEER emelkedése, 6 óra kezelés után a TEER értéke megközelítette a kiindulási érték készeresét (17. ábra).





A szemipermeábilis filtereken tenyésztett konfluens primér agyi endotélsejteket 250 µM CPT-cAMP-vel és 17,5 µM RO-201724-gyel (foszfodiészteráz inhibitor) kezeltük. A TEER-t a cellZscope rendszerrel követtük nyomon.

Szintén a G-fehérjékhez, de az úgynevezett kis G fehérjék családjába tartozik a RhoA is, amelynek legfontosabb effektorai a ROCK1 és ROCK2 (Rho-associated coiledcoil containing protein kinase 1 és 2) (Rho-kináz). Igen aktív szerepet játszik a citoszkeleton szabályozásában, és ebből kifolyólag az interendoteliális kapcsolatok regulációjában is részt vehet. Az interendoteliális kapcsolatokat, illetve a szoros kapcsolatokat szabályozó egyik legfontosabb jeltovábbító molekula a Ca²⁺. Ca²⁺ hiányában a paracelluláris permeabilitás jelentősen fokozódik, az ehhez vezető jeltovábbító útvonalak azonban nem ismertek teljességükben. Kísérleteink során arra kerestük a választ, hogy a RhoA szerepet játszik-e a Ca²⁺ által indukált junkcionális változásokban.

Első lépésben azt vizsgáltuk, hogy extracelluláris Ca²⁺ hiányában milyen morfológiai változásokat szenvednek az agyi endotélsejtek. A kísérleteket atomi erő mikroszkóp segítségével végeztük, ami lehetővé teszi élő sejtek nagy felbontású vizsgálatát. Megfigyeltük, hogy Ca²⁺ hiányában a sejtek disszociáltak és eltávolodtak egymástól. Ezzel párhuzamosan megnőtt a sejtek magassága is: 1,5 µm-ről 3 µm-re a legmagasabb pontnál. A folyamat reverzíbilisnek bizonyult: a Ca²⁺ koncentráció visszaállításával a sejtek lelapultak és a közöttük levő szabad felszín eltűnt. A Ca²⁺ hiány okozta morfológiai változásokban szerepet játszott a Rho-kináz, hiszen az Y27632 Rho-kináz inhibitor jelenlétében nem következett be a sejtek disszociációja és magasságbeli növekedése (18. ábra).



18. ábra. Az extracelluláris Ca²⁺ depléciójának és visszaadásának hatása agyi endotélsejtekre: morfológiai vizsgálat élő sejteken

Fiziológiás Ca^{2+} koncentrációjú tápfolyadékban tenyésztett agyi endotélsejteket (kontroll: a, b, c) 150 percig Ca^{2+} mentes tapfolyadékban tartottunk (Ca^{2+} mentes: d, e, f), ami után a sejtek visszakapták a fiziológiás Ca^{2+} koncentrációjú médiumot (Ca^{2+} visszadás: g, h, i), illetve 10 μ M Y27632-t tartalmazó Ca^{2+} mentes tápfolyadékban tartottuk őket 150 percig (Ca^{2+} mentes + Y27632: j, k, l). 60x60 μ m területű atomierő mikroszkóp magassági kép (a, d, g, j), magassági profil a képeken jelölt vonal mentén (b, e, h, k) és deflexiós képek (c, f, i, l). A nyilak a tenyésztőedény alját jelölik.



19. ábra. Az Y27632 Rho-kináz inhibitor hatása a junkcionális fehérjék lokalizációjára Ca²⁺ megvonás és visszaadás (Ca²⁺ "switch") során Fiziológiás Ca²⁺ tartalmú tápfolyadékban tartott konfluens agyi endotélsejt tenyészeteket (a, d, g, j) 150 percig Ca²⁺ mentes tapfolyadékban tartottunk (b, e, h, k), ami után a sejtek visszakapták a fiziológiás Ca²⁺ koncentrációjú médiumot (c, f, i, l). A kísérleteket 10 μM Y27632 jelenlétében is elvégeztük. A tenyészeteket ZO-1 vagy claudin-5 ellenanyaggal festettük meg. Reprezentatív ábra három független kísérletből. A nyilak a junkcionális festés folytonosságának megszűnését jelölik.

Ezzel párhuzamosan a Ca^{2+} hiány junkcionális változásokhoz is vezetett. Immunfluoreszcens vizsgálataink igazolták, hogy a ZO-1 és claudin-5 festés szakadozottá vált (19b. és 19h. ábra). A folyamat reverzíbilis volt, a Ca^{2+} tápfolyadékhoz való visszadása után a festés visszanyerte folyamatos jellegét (19c. és 19i. ábra). Y27632 jelenlétében a Ca^{2+} megvonás nem vezetett a ZO-1 és claudin-5 folyamatos membránfestésének felszakadozásához (19e. és 19k. ábra), ami arra utal, hogy a folyamat a morfológiai változásokhoz hasonlóan Rho-kináz függő. A junkcionális fehérjék Ca^{2+} visszaadása utáni visszarendeződését a Rho-kináz gátlószer nem befolyásolta (19f. és 19l. ábra).



20. ábra. A Rho-kináz szerepe a Ca²⁺ "switch"-nek kitett agyi endotélsejtek aktin citoszkeletonjának átrendeződésében

Agyi endotélsejtek konfluens tenyészeteit (kontroll: a) 10 μ M Y27632-vel kezeltünk (b) vagy 150 percig Ca²⁺-mentes médiumban tartottuk őket 10 μ M Y27632 jelenlétében vagy hiányában (c, d). A sejteket fixálás után Alexa488-jelölt falloidinnal (zöld), anti-ZO-1 ellenenyaggal (piros) és Hoechst 33258-cal (kék magok) festettük meg. Atomierő mikroszkópos felvételek: magassági kép (e), magassági profil (f) és deflexiós kép (g) Ca²⁺-mentes médiumban tartott agyi endotélsejtekről. A nyilak a Ca²⁺-mentes médiumban létrejött aktin gyűrűt jelölik.

Atomi erő mikroszkópos mérésekkel és fluoreszcensen jelölt falloidin segítségével bebizonyítottuk, hogy Ca²⁺ megvonás hatására az aktin-citoszkeleton átrendeződése is bekövetkezett: a sejtek perifériás részén egy körkörös aktin gyűrű jelent meg, amely részben kolokalizálódott a szétesett junkciókkal (20. ábra). Ezen változások létrejöttét is megakadályozta a Rho-kináz gátló.

5.2.4. A ZO-2 szerepe a jeltovábbításban

A junkcionális fehérjék sejtkapcsoló szerkezetek alkotóelemei, és elsősorban strukturális szerepük van. Azonban saját korábbi kísérleti megfigyeléseink és irodalmi adatok egyaránt arra utaltak, hogy a ZO-1 és ZO-2 a szoros zárokapcsolatokban betöltött szerepe mellet a magban is megtalálható (Gottardi és mtsai., 1996, Islas és mtsai., 2002). A

ZO-2 szekvenciájának analízise magyarázatul szolgálhat e jelenségre, ugyanis a ZO-2 nukleáris lokalizációs és nukleáris export szignálszekvenciákkal is rendelkezik. Ez magában hordozta annak a lehetőségét, hogy a ZO-2 szignalizációs funkciót is betölt. Előzetes screening kísérletek arra engedtek következtetni, hogy a ZO-2 képes egy magi fehérjéhez, a SAF-B-hez kötődni. Ennek igazolására koimmunoprecipitációs kísérleteket végeztünk. Kísérleteinkhez olyan LLC-PK1 (sertés vese epitél) sejteket használtunk, amelyeket GFP-vel jelölt SAF-B-vel transzfektáltunk (pEGFP-fSAF-B). A sejtekből készített homogenátumot ZO-2 ellenanyaggal precipitáltuk. A ZO-2 koprecipitált a GFP-vel, ami arra utal, hogy a ZO-2 és a SAF-B valóban kapcsolatban állnak egymással (21A. ábra).





Ezt az eredményt támasztották alá a kötési kísérleteink is: az immunprecipitált ZO-1, ZO-2 és occludin közül csak a ZO-2 kötötte a radioaktív kénnel jelölt SAF-B-t, az occludin és a ZO-1 nem (21B. ábra).

A ZO-2 jelenlétét a magban olyan Western-blot vizsgálatokkal is megerősítettük, amelyeket nukleáris extraktumokkal és teljes sejtlizátumokkal végeztünk. A nukleáris frakció tisztaságát a citoplazmatikus tubulinnal és a membránfehérje α3 integrinnel teszteltük, amelyek a várakozásnak megfelelően a nukleáris frakcióból szinte teljesen hiányoztak, míg a teljes sejtlizátumban nagy mennyiségben fordultak elő. A SAF-B csak a nukleáris frakcióban volt jelen, míg a ZO-2 úgy a nukleáris frakcióban, mint a teljes sejtlizátumban megtalálható volt (22A. ábra). Ezen túlmenően, a nukleáris frakcióból precipitált ZO-2 képes volt a SAF-B-hez kötődni (22B. ábra), ami alátámasztja azt a feltevést, hogy a SAF-B - ZO-2 interakció a magban jön létre.



22. ábra. A ZO-2 expressziója a magban

A. Nukleáris extraktumot (N) és teljes sejtlizátumot (T) választottunk szét elektroforetikus és úton. blottoltunk PVDF membránra. Míg a citoplazmatikus tubulin és a membránba lokalizálódó integrin a3 túlnyomó része a teljes sejtlizátumban volt megtalálható, a SAF-B a magi extraktumban expresszálódott elsősorban. Ez jelezte a magból készített preparátum tisztaságát. A ZO-2 mindkét frakcióban jelen volt.

B. Nukleáris extraktumból ZO-2 segítségével precipitáltunk, majd a membránt ³⁵S-jelölt SAF-B-vel

inkubáltuk (1-es sáv). A ³⁵S-jelölt SAF-B nem kötődött a membránhoz (2-es sáv). A precipitátum nagy mennyiségben tartalmazott ZO-2-t (3-as sáv) de a preimmunszérum nem (4-es sáv). A nyilak a ZO-2 helyzetét jelölik.

Annak tisztázására, hogy milyen körülmények között szaporodik fel a magban a ZO-2, az LLC-PK1 sejteket különböző környezeti stressznek tettük ki. Megfigyeltük, hogy ha a sejteket 2 órán át 60 µM CdCl₂-dal kezeltük, vagy ugyanannyi ideig 42°C-nak tettük ki, jelentősen megnőtt a magi ZO-2 mennyisége (23. ábra).





A ZO-2 nemcsak epitélsejtekben, hanem agyi endotélsejtekben is kimutatható a magban. Specifikus ellenanyaggal GP8 sejteken végzett immunfluoreszcens festéseinken jól látható, hogy a ZO-2 elhelyezkedése a magban szemcsézett szerkezetű, és sokkal nagyobb mennyiségben van jelen egyedülálló sejtekben, mint konfluens réteget képező sejtekben (24. ábra).



24. ábra. ZO-2 magi expressziója agyi endotélsejtekben

A. A ZO-2 pontozott festést ad a magban. Különösen erőteljes a festés az egyedülálló sejtekben. B. A ZO-2 festést DAPI festéssel kombináltuk. A nyilak a magi ZO-2 festést jelzik.

A magban levő ZO-2 szerepének feltárása érdekében olyan sejteket használtunk, amelyekben a ZO-2 felhalmozódik a magban. Ezekben a sejtekben a ZO-2-höz három nukleáris lokalizációs szignál szekvencia volt kapcsolva (EGFP-ZO2-nuc), ami a várakozásnak megfelelően elsősorban a magban expresszálódott (25. ábra).



A vad típusú ZO-2-t és a magi ZO-2-t expresszáló sejtek fehérjeexpressziós mintázatának összehasonlítására, és az esetleges expresszióbeli eltérések felderítésére proteomikai analízist végeztünk. Ennek során kiderült, hogy a magban stabilan ZO-2-t kifejező sejtekben egy olyan piruvát kináz izoforma (M2-PK) mennyisége nő meg, amely tumor sejtekben gyakori (26A. és 26B. ábra). Eredményeinket a Western-blot analízis is megerősítette úgy MDCK sejtekben, mint agyi endotélsejtekben (GP8) (26C. ábra).



26. ábra. Megnövekedett M2-PK expresszió ZO-2nuc-kal transzfektált epitél- és endotélsejtekben A ZO-2-t magban expresszáló (A) és vad típusú (B) MDCK sejtekből készített fehérje preparátum 2D elektroforézise (Coomasie festés). A nyíl az M2-PK-ként azonosított pöttyöt jelzi. Western-blot analízis (C), mely a megnövekedett M2-PK expressziót mutatja GP8-ZO2-nuc és MDCK-ZO2-nuc sejtekben az üres vektorral transzfektált sejtekhez képest. A mintafelvitel kontrolljaként a β-aktin szolgált (alsó blottok).

Ez a megfigyelés késztetett minket arra, hogy megvizsgáljuk a ZO-2-t magban túlexpresszáló sejttípus proliferációs tulajdonságait. Timidin inkorporációs kísérleteink azt igazolták, hogy a nukleáris ZO-2-t expresszáló sejtek proliferációs rátája szignifikánsan megnövekedett, 53,4 \pm 16,2 százalékkal az MDCK sejtekben és 22,7 \pm 4,1 százalékkal a GP8 sejtekben.

Ezzel párhuzamosan megvizsgáltuk a magi ZO-2-t expresszáló sejtek szoros kapcsolatainak stabilitását. Kimutattuk, hogy a ZO-2-t magban túlexpresszáló sejtek különösen érzékenyek a Ca²⁺ hiányára, az occludin és claudin-1 Ca²⁺ megvonás után sokkal erőteljesebben delokalizálódott, mint a kontroll sejtekben. A ZO-2-t túlexpresszáló sejtekben a claudin-1 Ca²⁺ hiányában szinte teljesen eltűnt a membránból, ellentétben a kontroll sejtekkel, amelyekben a claudin-1 részben legalább a membránban maradt, egy citoplazmatikus festés megjelenésével párhuzamosan (27. ábra). A szoros kapcsolat egy másik fehérjéje, az occludin lokalizációja már fiziológiás körülmények között is zavart szenvedett a ZO-2-t magban túlexpresszáló sejtekben: a vad típusú sejtekre jellemző

membrán lokalizáció mellett megjelent egy diffúz, citoplazmatikus festés is, ami tovább növekedett Ca²⁺ depléció hatására (27. ábra).



27. ábra. Claudin-1 és occludin immunolokalizációja MDCK sejtekben Ca²⁺-depléciót követően A Ca²⁺-depléció MDCK-ZO-2nuc és MDCK kontroll (K) (üres vektorral transzfektálva) sejtekben 4 órán keresztül tartott (t4). A normál médium Ca²⁺ mentes médiumra való cserélésének pillanata a t0.

A junkcionális fehérjék változásai funkcionális zavarokban is megnyilvánultak. Így a magas transzepiteliális elektromos ellenállás kialakulása, amely a junkcionális integritás egyik fokmérője, jelentősen késett, és nem is érte el a kontroll értékeket a ZO-2-t magban túlexpresszáló sejtekben (28. ábra).

28. ábra. A TEER változása nukleáris ZO-2-t expresszáló sejtekben

A transzepiteliális elektromos ellenállás (TEER) kialakulását filteren tenyésztett MDCK (négyzet) és MDCK-ZO-2 nuc (kör) sejtekben követtük nyomon. Az x tengelyen a sejtek passzálásától eltelt időt jelöltük. Az átlag értékek és a standard deviáció vannak feltüntetve.



5.3. Az agyi endotélsejtek patológiás körülmények között: extracelluláris stresszfaktorok hatása

Mivel az agyi endotélsejtek a keringés és idegrendszer határfelületén helyezkednek el, mindkét irányból érkezhetnek működésüket befolyásoló stresszhatások. Így egyaránt válhatnak központi idegrendszeri és szisztémás kórfolyamatok támadási pontjává. Kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy néhány, in vivo körülmények között is előforduló stresszfaktor milyen molekuláris folyamatokat vált ki agyi endotélsejtekben.

5.3.1. A hipoxia hatása a junkcionális komplexum működésére

Egyre több kísérleti adat utal arra, hogy az agyi endotélsejtek érzékenyek hipoxiára, és fontos szerepet játszanak az iszkémiás agyi megbetegedések patogenézisében. A hipoxia és különösen az azt követő reoxigenáció gyakori kísérője az oxidatív stressz. Kísérleteink során azt vizsgáltuk egér agyi endotélsejtekben, hogy miként reagálnak hipoxia/reoxigenációra, illetve a kémiai úton, DMNQ alkalmazásával kiváltott oxidatív stresszre. Annak érdekében, hogy kizárhassuk, hogy a megfigyelt változások az oxidatív stressz által kiváltott nem specifikus sejtkárosodások eredményei, megmértük a sejtek által felszabadított LDH aktivitását. A tápfolyadék LDH aktivitása nem változott szignifikánsan $(166 \pm 28 \text{ és } 184 \pm 32 \text{ U/ml})$, ami arra utalt, hogy a sejtek életképesek maradtak, a membránjuk megőrizte integritását. A paracelluláris barrier integritását a transzendoteliális elektromos ellenállás (TEER) mérésével követtük nyomon. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a sejtrétegek transzendoteliális elektromos ellenállása már 20 perc oxidatív stressz után a kiindulási érték 50%-ára csökkent, és két óra után a TEER alig 20%-a volt a kiindulási értéknek (29. ábra).





dc 218 11

Mivel a paracelluláris permeabilitás nagymértékben függ az intercelluláris junkciók integritásától, megvizsgáltuk, hogy a szoros és adherens kapcsolatok fehérjéi miként változnak oxidatív stressz hatására. Hipoxiát követő reoxigenáció során a szoros kapcsolatok egyik transzmembrán fehérjéjének, az occludinnak mennyisége jelentősen csökkent. A csökkenés még erőteljesebb volt, ha a sejteket glükóz mentes médiumban tettük ki hipoxia/reoxigenációnak. Az adherens kapcsolatok transzmembrán fehérjéjének, a cadherinnek a csökkenése sokkal enyhébb volt az occludinénál (30. ábra).





A junkcionális komplexum működéséhez nemcsak a fehérjék expressziója, hanem a közöttük lévő kapcsolat épsége is igen fontos. A junkcionális fehérjék interakcióit koimmunoprecipitáció segítségével vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy hipoxia/reoxigenációt követően a β -catenin - cadherin és a β -catenin - α -catenin kapcsolat sérül (31. ábra).



31. ábra. A cadherin, α-catenin és β-catenin interakciója hipoxia/reoxigenáció hatására agyi endotélsejtekben

A β-catenint kontroll körülmények között tenyésztett, vagy hipoxia/reoxigenációnak kitett sejtekből precipitáltuk. A hozzá kapcsolódó cadherint és αcatenint immunoblot segítségével detektáltuk.

А hipoxia/reoxigenáció jeltovábbító útvonalat aktiválhat több is agyi endotélsejtekben. Ezek közül mi figyelmünket a MAP kináz szignalizációra, ezen belül is

az ERK1/2 szerepének vizsgálatára összpontosítottuk. Olyan ellenanyagot használva, amelyik csak az ERK1/2 foszforilált, azaz aktivált formáját ismeri fel, kimutattuk, hogy két órás 10 μM-os DMNQ kezelés aktiválja az ERK1/2-t. Kontroll körülmények között a glükóz hiánya nem befolyásolta az ERK1/2 aktivitását, azonban a glükóz mentes körülmények jelentősen növelték az oxidatív stressz által indukált ERK1/2 aktivitást. Az ERK1/2 aktiváció majdnem teljes egészében gátolható volt U0126-tal (32. ábra).



32. ábra. A glükóz hatása az oxidatív stressz által kiváltott ERK1/2 aktivációra A sejteket 10 μM DMNQ-val kezeltük két órán keresztül glükóz jelenlétében vagy hiányában. Az ERK altiváció gátolható a MEK inhibitor U0126-tal.

5.3.2. A vérzéses sokk által indukált vér-agy gát károsodások

A vérzéses sokk olyan, a klinikai gyakorlatban is gyakran előforduló kórfolyamat, amelyben az agyi kapillárisok endotélsejtjei is érintve lehetnek. A vérzéses sokkot laboratóriumi körülmények között patkányokon zárt rendszerben történő kontrollált véreztetéssel hoztuk létre, amelynek során a vérnyomást állandóan 40 Hgmm-en tartottuk. A dekompenzált fázis kezdetének azt tekintettük, amikor az állatnak a levett vérmennyiség felét vissza kellett vennie annak érdekében, hogy vérnyomását tartani tudja. Az agykérgi vérátáramlás monitorizálása kimutatta, hogy a vérátáramlás alacsonyabb volt a kontroll értéknél úgy a kompenzált, mint a dekompenzált sokkban, és a csökkenés egyre nagyobb lett, ahogy a sokk haladt a dekompenzált fázis felé.

Annak tisztázására, hogy a vérzéses sokkhoz társul-e a vér-agy gát funkciózavara, megvizsgáltuk a vér-agy gát permeabilitását a sokk különböző fázisaiban. A vér-agy gát permeabilitása minden vizsgált agyterületen (mesencephalon, frontális cortex, occipitális cortex, parietális cortex) megnőtt a kis molekulasúlyú fluoreszceinnel szemben (MW = 376 Da) a sokk dekompenzált fázisában, míg a nagy molekulasúlyú albumin (MW = 67 kDa) permeabilitása nem nőtt szignifikáns mértékben (33. ábra).



33. ábra. A kompenzált és dekompenzált vérzéses sokk hatása a vér-agy gát permeabilitására A fluoreszcein (A) és Evans kék albumin (B) permeabilitását vizsgáltuk különböző agyi régiókban. A csillagok a kontrollhoz képest szignifikáns eltéréseket jelölnek (p<0,05) (n = 5).

Mivel a vér-agy gát permeabilitásának szabályozásában kiemelkedő szerepet játszanak a junkcionális komplexum fehérjéi, megvizsgáltuk ezen fehérjék mennyiségének változásait a sokk különböző stádiumai során. A szoros kapcsolatok egyik transzmembrán fehérjéjének, az occludinnak a mennyisége a sokkos állatok agyából izolált kapillárisokban csökkent, a csökkenés sokkal intenzívebb volt a sokk dekompenzált fázisában. Hasonló expresszióváltozás volt megfigyelhető az adherens junkciók transzmembrán fehérjéjének, a cadherinnek az esetében is, míg a β -catenin mennyiségében nem detektáltunk változást (34. ábra). A Western-blot vizsgálatok eredményeit az immunfluoreszcens vizsgálatok is megerősítették. Ezen kísérletek során kimutattuk, hogy az agyi erek endotélsejtjeire jellemző folyamatos occludin festés a sokk dekompenzált stádiumában szakadozottá válik (35. ábra).



34. ábra. Junkcionális fehérjék változásai vérzéses sokk hatására

Az occludin (A), a caherin (B) és a β -catenin (C) expressziója izolált kapillárisokban kompenzált és dekompenzált vérzéses sokk hatására. Reprezentatív ábra négy független kísérletből. Denzitometriás analízis (D): az occludin 78%±15%-ra csökkent a kompenzált és 58%±10%-ra a dekompenzált sokkban a kontrollhoz képest. A cadherin 76%±6%-ra csökkent a kompenzált és 70%±7%-ra a dekompenzált sokkban. A csillagok a kontrollhoz képest szignifikáns eltéréseket jelölnek (p<0,05).



35. ábra. Az occludin lokalizációja dekompenzált vérzéses sokkban A nyilak az occludin festés folytonosságának hiányát jelölik. Mérce = 50 μm.
5.3.3. A vér-agy gát gyulladásos folyamatokban: a TLR2/6 szerepe

A vér-agy gát, és ezen belül az agyi endotélsejtek érintettek lehetnek úgy a központi idegrendszeri, mint az idegrendszeren kívüli gyulladásos folyamatokban. A gyulladásos folyamatokban fontos szerepet játszanak a Toll-szerű receptorok. Egyre több irodalmi adat áll rendelkezésre arra vonatkozólag, hogy a Toll-szerű receptorok nemcsak az immunsejteken fejeződnek ki. Ugyanakkor a mai napig igen keveset tudunk az endotélsejtek, különösen az agyi endotélsejtek Toll-szerű receptorairól. RT-PCR technikával végzett vizsgálataink azt mutatták, hogy a humán agyi endotélsejtek expresszálják a TLR2-t, 3-at, 4-et és 6-ot, míg a patkány sejtek a TLR2-t, 3-at és 6-ot fejezik ki kontroll körülmények között (36. ábra).



36. ábra. A Toll-szerű receptorok kifejeződése humán és patkány agyi endotél sejtekben Humán hCMEC/D3 sejtvonal sejtjeiből (A), illetve primér patkány agyi endotélsejtekből (B) teljes RNS-t izoláltunk, és polimeráz láncreakcióval a TLR mRNS-ek jelenlétét vizsgáltuk. A képek 5 különböző kísérlet reprezentánsai.

Ezzel jelenlegi ismereteink szerint elsőként írtuk le a TLR6 expresszóját agyi endotélsejtekben. Különböző fertőzéses és gyulladásos folyamatok gyakran társulnak oxidatív stresszel, ezért megvizsgáltuk, hogy az oxidatív stressz miként befolyásolja a Toll-szerű receptorok expresszióját. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a 24 órán át tartó 5 μ M koncentrációjú DMNQ kezelés hatására mind a négy Toll-szerű receptor mRNS-ének kifejeződése szignifikáns mértékben növekedett: a TLR2, 3 és 4 transzkripciója a kezeletlen sejtek szintjének több, mint ötszörösére, a TLR6-é pedig tízszeresére emelkedett (37. ábra). Mivel sikerült kimutatnunk úgy a TLR2 mind a TLR6 expresszióját (a TLR2 és TLR6 heterodimert is képesek alkotni), megvizsgáltuk, hogy ezen receptorok specifikus agonistája, a zymosan befolyásolja-e a TLR-ek expresszióját. Zymosan (100 μg/ml) kezelés hatására úgy a TLR2 mint a TLR6 expressziója megemelkedett, öt- illetve hétszeresére (37. ábra). A többi TLR expressziója változatlan maradt. Megvizsgáltuk két klasszikus gyulladást fokozó citokin, a TNF-α és az IL-1β hatását is a TLR expresszióra. Míg az IL-1β nem befolyásolta a TLR expressziót, a TNF-α többszörösére emelte a TLR2 és a TLR3 expresszióját (a TLR2-t mintegy tízszeresére, a

TLR3-at nyolcszorosára) (37. ábra), ami jelzi, hogy a gyulladásos folyamatok jelentősen befolyásolhatják az endotélsejtek TLR ligandumokkal szembeni érzékenységét.



37. ábra. A humán agyi endotél TLR mRNS-ek transzkripciójának indukálása stresszfaktorok által

A konfluens tenyészeteket 5 μ M DMNQ-val, illetve zymosannal (100 μ g/ml) kezeltük 24 órán keresztül. Kontrollként GAPDH-t használtunk, és az mRNS-ek kezeletlen hCMEC/D3 sejtekéhez képesti relatív kifejeződését $\Delta\Delta$ Ct módszerrel számítottuk ki. A grafikonon ábrázolt eredmények három független kísérlet eredményeinek átlag és szórás értékeit mutatják.

További kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a TLR2/TLR6 receptorok aktiválása milyen funkcionális következményekkel jár. Vizsgálataink kimutatták, hogy a zymosan jelentősen megnöveli a vér-agy gát permeabilitását úgy a 376 Da molekulasúlyú fluoreszcein, mint a 67 kDa-os EBA számára (38. ábra). Ez a permeabilitás fokozódás még kifejezettebb volt, ha a zymosan kezelés oxidatív stresszel társult (38. ábra).



38. ábra. A zymosan hatása az agyi endotél tenyészetek permeabilitására A primér patkány agyi endotélsejteket zymosannal (100 μ g/ml) és zymosan + DMNQ (100 μ g/ml és 5 μ M) keverékével kezeltük, majd mértük a nátrium fluoreszcein és az Evans kékalbumin permeabilitásának változását. A zymosan és a zymosan + DMNQ kezelt csoportok, valamint a kezeletlen sejtek permeabilitása közötti statisztikailag szignifikáns eltéréseket (p<0,05) csillaggal jelöltük.

A zymosan permeabilitást fokozó hatása miatt további figyelmünket a junkcionális fehérjék expressziójára összpontosítottuk. Western-blot analíziseink jelentős, koncentráció függő csökkenést mutattak ki zymosan hatására a szoros kapcsolatok két transzmembrán alkotóelemének, az occludinnak és a claudin-5-nek a mennyiségében, igazolva feltevésünket, hogy a permeabilitás fokozódása mögött az interendoteliális kapcsolatok funkciózavara áll. Más junkcionális fehérjék (ZO-1, cadherin, α - és β -catenin) expressziójában nem következett be változás (39. ábra).



39. ábra. A junkcionális fehérjék expressziójának változása zymosan kezelés hatására A hCMEC/D3 tenyészeteket 10, 50 és 100 μ g/ml koncentrációjú zymosannal kezeltük 24 órán keresztül. A bemutatott blottok három független kísérlet reprezentánsai. Minden fehérje sáv intenzitását meghatároztuk denzitometrálással, és a β -aktinhoz normalizáltuk. A grafikon a három független kísérlet kezeletlen sejtekhez viszonyított relatív átlag és szórás értékeit ábrázolja. A statisztikailag szignifikáns különbségeket (p<0,05) csillaggal jelöltük.

Mivel a funkcionális tesztek során az oxidatív stressz fokozta a zymosan permeabilitást fokozó hatását, ezért megvizsgáltuk, hogy vajon e kettős extracelluláris hatás milyen módon befolyásolja a szoros kapcsolatok fehérjéinek expresszióját. Várakozásainknak megfelelően az oxidatív stressz és a zymosan együttes hatására az occludin expressziójának csökkenése még nagyobb volt mint csak zymosan kezelés esetén. A claudin-5 esetében ez a szinergiás hatás nem volt megfigyelhető, a DMNQ nem volt képes tovább csökkenteni a zymosan által okozott igen jelentős csökkenést (40. ábra). A következő lépésben azt is megvizsgáltuk, miképpen befolyásolja a zymosan és a DMNQ az occludin és a claudin-5 lokalizációját. Kontroll körülmények között konfluens tenyészetekben úgy az occludin mind a claudin-5 ellenanyaggal végzett jelölés a junkcionális fehérjékre jellemző folytonos membránfestést adott. Az occludin membránfestése zymosan kezelés hatására elvesztette folytonosságát, és ez a hatás még határozottabban jelentkezett claudin-5 esetében. DMNQ kezelés (5 µM, 24 óra) hatására a festés szintén mindkét fehérje esetében szakadozottá vált. Az occludin elhelyezkedésében azonban a legkifezettebb változásokat a kombinatív kezelésnél tapasztaltuk, ahol a

membránfestés szinte teljes mértékben eltűnt. Ugyanakkor a claudin-5 esetében a kombinált kezelés szinergiás hatása nem volt megfigyelhető (40. ábra).



40. ábra. A junkcionális fehérjék sejten belüli eloszlása és expressziója zymosan és DMNQ kezelések hatására

Az agyi endotél sejtek konfluens tenyészeteit 100 μ g/ml koncentrációjú zymosannal, illetve 5 μ M DMNQval, ezenkívül a két anyag keverékével is kezeltük 24 órán át. A fluoreszcens mikroszkópos felvételek három független kísérlet eredményeinek reprezentánsai (mérce = 50 μ m) (A). A fenti módon kezelt sejtekben Western-blot analízissel vizsgáltuk az occludin és claudin-5 expresszióját. Az ábrán három független kísérlet reprezentatív eredményei láthatóak. (B). A Western-blotok denzitometriás analízise. A kontrollhoz viszonyítottan statisztikailag szignifikáns különbségeket (p<0,05) csillaggal, míg a zymosan kezeléshez képesti különbségeket (p<0,05) kettős kereszttel jelöltük (C).

A TLR2/6 aktiválása által előidézett junkcionális komplexum károsodások mechanizmusát a TLR ismert szignalizációs útvonalainak gátlásával próbáltuk feltérképezni. Kimutattuk, hogy az occludin expressziójának csökkenését a MEK inhibitor U0126 teljes egészében kivédte, míg az NFκB (nukleáris faktor κB) PDTC-vel történő gátlása hatástalannak bizonyult. A claudin-5 mennyiségi csökkenését azonban sem az U0126, sem a PDTC nem volt képes megakadályozni arra utalva, hogy a két junkcionális fehérje eltérő szabályozás alatt áll. Western-blot kísérleteinket az immunfluoreszcens vizsgálatok is alátámasztották

(41. ábra). Az U0126 teljes mértékben kivédte a zymosan által kiváltott változásokat az occludin lokalizációjában, azonban a claudin-5 fehérje elhelyezkedésének megváltozását nem akadályozta meg. Ugyanakkor a ZO-1 fehérje sejten belüli elhelyezkedésére nem volt hatással a zymosan kezelés.



41. ábra. A zymosan junkcionális fehérjékre kifejtett hatásának mechanizmusa

A hCMEC/D3 sejteket zymosannal (100 µg/ml) és zymosan + PDTC (NF κ B gátlószer, 100 µM), illetve zymosan + U0126 (ERK útvonal gátlószere, 10 µM) kombinációjával kezeltük 24 órán át. Az ábra három független Western-blot kísérlet reprezentatív eredményeit mutatja (A). Az egyes fehérje sávok intenzitását denzitometráltuk és β-aktinhoz normalizáltuk (B). A kontrollhoz viszonyítottan statisztikailag szignifikáns különbségeket (p<0,05) csillaggal, míg a zymosan kezeléshez képest tapasztalt szignifikáns eltéréseket (p<0,05) kettős kereszttel jelöltük. A fenti módon kezelt sejtek immunfluoreszcens vizsgálata (C) (mérce = 50 µm).

5.3.4. A dohányfüst egyes összetevőinek hatása a vér-agy gátra

A dohányzás számos káros hatása ismert, azonban a dohányfüst alkotóelemeinek közvetlen hatása az agyi endotélsejtekre még nem kellően tisztázott. A dohányfüst legfontosabb összetevői között vannak a nikotin és a policiklusos aromás szénhidrogének. Mi elsősorban arra kerestük a választ, hogy ezek a vegyületek befolyásolják-e a paracelluláris permeabilitást, illetve az interendoteliális junkciók felépítésében szerepet játszó fehérjék expresszióját az agyi endotélsejtekben. 100 nM - 100 μM koncentrációjú nikotin kezelés 15 percen, valamint 1 és 5 órán át nem okozott változásokat az agyi endotélsejtek occludin expressziójában. Csak 10 μM vagy annál nagyobb koncentációjú, 24 órán át tartó kezelés eredményezett kisfokú occludin csökkenést a Triton X-100 inszolubilis frakcióban (42. ábra).



42. ábra. Az occludin mennyiségi változásai agyi endotélsejtekben nikotin hatására A sejteket 100 nM - 100 μM koncentrációjú nikotinnal kezeltük 24 órán keresztül (A). A 24 órás kezelés eredményeinek denzitometriás analízise (B). A bemutatott képek három független kísérlet reprezentánsai. A grafikonok három független kísérlet kezeletlen sejtekhez viszonyított relatív átlag és szórás értékeit ábrázolják.

Az occludinhoz hasonlóan viselkedett a ZO-1 is: csak nagy koncentrációjú nikotinnal (10 μ M) 5, illetve 24 órán át tartó kezelés eredmenyezett csökkenést. Az adherens kapcsolatok fehérjéi közül a cadherin mennyisége szintén csak 24 órás kezelés után csökkent, a β -catenin szint viszont nem változott (43. ábra).



43. ábra. A ZO-1, a cadherin és a β-catenin mennyiségi változásai nikotin kezelés hatására A sejteket 1 - 10 μM koncentrációjú nikotinnal kezeltük 5 és 24 órán át, majd Western-blottal vizsgáltuk a junkcionális fehérjék mennyiségi változásait. Az ábrán három független Western-blot kísérlet reprezentatív eredményei láthatóak. A grafikon három független kísérlet kezeletlen sejtekhez viszonyított relatív átlag és szórás értékeit ábrázolja. A kontrollhoz viszonyítottan statisztikailag szignifikáns különbségeket (p<0,05) csillaggal jelöltük.

A policiklusos aromás szénhidrogén fenantrén 30 μ M koncentrációban az occludin redisztribúcióját okozta a Triton X-100 inszolubilis frakcióból a Triton X-100 szolubilis frakcióba. Hasonló, de kevésbé kifejezett változásokat tapasztaltunk claudin-5 esetében is, míg az α - és β -catenin, valamint ZO-1 mennyisége nem változott. Az 1-metilantracén esetében nem figyeltünk meg változásokat a junkcionális fehérjék kifejeződését illetően, kivéve a claudin-5 mennyiségének csökkenését a Triton X-100 oldhatatlan frakcióban (44. ábra).





44. ábra. A junkcionális fehérjék mennyiségi változásai fenantrén és 1-metilantracén hatására A konfluens agyi endotél tenyészeteket fenantrénnel (Ph) és 1-metilantracénnel (1-MA) kezeltük (30 μ M, 24 óra). Az ábrán három független Western-blot kísérlet reprezentatív eredményei láthatóak. A grafikon három független kísérlet kezeletlen sejtekhez viszonyított relatív átlag és szórás értékeit ábrázolja. A kontrollhoz viszonyítottan statisztikailag szignifikáns különbségeket (p<0,05) csillaggal jelöltük.

Az adherens junkciók fehérjéinek interakcióit koimmunoprecipitáció segítségével vizsgáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a fenantrén nem károsítja a β -catenin - α -catenin és β -catenin - cadherin kapcsolatokat (45. ábra).





Az immunfluoreszcens vizsgálatok megerősítették a Western-blot vizsgálatok eredményeit. 24 órás nikotin kezelés (10 μ M) a ZO-1 festés intenzitásának csökkenését eredményezte, amelyhez a membránfestés folytonosságának a felszakadása is társult. A ZO-2 és occludin festés kevéssé változott, és egyáltalán nem változott a claudin-5 lokalizációja. 24 órás kezelés 30 μ M fenantrénnal csak kismértékű változásokat okozott a claudin-5, az occludin és a ZO-2 lokalizációjában (46. ábra).

Mivel e vegyületek a dohányosok vérében in vivo körülmények között egyszerre jelennek meg, megvizsgáltuk a nikotin és a policiklusos aromás szénhidrogének együttes hatását is. A junkcionális fehérjék lokalizációja kombinált nikotin és fenantrén kezelés hatására hasonló volt a csak nikotin kezelés után észlelthez: elsősorban a ZO-1 festés intenzitása csökkent és vált szakadozottá, az occludinban és a ZO-2-ben észlelt változások kevesbé voltak hangsúlyosak (46. ábra).



46. ábra. A nikotin és fenantrén hatása a sejt-sejt kapcsolatok alkotóelemeinek sejten belüli elhelyezkedésére

Az agyi endotél sejtek konfluens tenyészeteit 10 μ M nikotinnal és/vagy 30 μ M fenantrénnal kezeltük 24 órán át, és a fixált sejteket occludin, claudin-5, ZO-1, ZO-2 elleni antitesttel festettük. A nyilak azokat a helyeket jelölik, ahol a fehérjék eltűntek a sejtkapcsoló szerkezetek területéről. Mérce = 100 μ m.

A barrier funkcionalitását TEER vizsgálatok segítségével követtük nyomon. E célból az agyi endotélsejteket kollagén IV/fibronektinnel bevont Transwell filtereken tenyésztettük asztrocitákkal kokulturában, és ily módon 200-300 Ohm•cm² ellenállást tudtunk mérni. 10 μM nikotin kezelés nem okozott szignifikáns változást a TEER-ben.

Hasonlóan nem tudtunk szignifikáns változásokat kimutatni policiklusos aromás szénhidrogén származékokkal vagy metilantracén és nikotin kezelés kombinációjával sem.

A cigarettafüst számos oxidáns anyagot tatalmaz, amelyek az alveolusok falán keresztül a keringésbe kerülhetnek (Yamaguchi és mtsai., 2007), ugyanakkor a tartós dohányzás jelentős keringési károsodásokkal is jár, ezért dohányzókban a nikotin hatása oxidatív stresszel társulhat. 24 órás nikotin kezelés DMNQ (10 μM) által indukált oxidatív stresszel társulva fokozta a csak oxidatív stressz által kiváltott TEER csökkenést (47A. ábra). Ehhez hasonlóan a ZO-1 lokalizációjában bekövetkezett változások is erőteljesebbek voltak kombinált kezelés során, mint csak DMNQ vagy csak oxidatív stressz hatására (47B. ábra).



47. ábra. A nikotin és az oxidatív stressz együttes hatása a rezisztenciára és a ZO-1 lokalizációjára Primér agyi endotélsejtek konfluens tenyészeteit kezeltük 10 μM DMNQ-val vagy 10 μM DMNQ-val és 10 μM nikotinnal 24 órán át. Az ábra a transzendoteliális rezisztencia változásait (A) illetve a ZO-1 lokalizációját mutatja (B). Mérce = 100 μm.

A nikotin és policiklusos aromás szénhidrogének által okozott változásokat egyéb fehérjék expressziójában proteomikai analízis segítségével végeztük el. 10 µM nikotinnal, illetve 30 µM fenantrénnal kezelt agyi endotélsejtekből készített homogenátumot vetettünk alá 2D elektroforézisnek, és azokat a fehérjéket, amelyeknek expressziója különbözött a kontrolltól MALDI-MS segítségével azonosítottuk A kapott eredmények a következőképpen foglalhatóak össze. Mindkét hatóanyag változásokat okozott sokk által indukált fehérjékben: a nikotin megnövelte a chaperonin tartalmú TCP alegységek és a Hsp70/Hsp90 organizáló fehérje (Hop) mennyiségét, míg a fenantrén a Hsp90 mennyiségét növelte. Változásokat figyeltünk meg egyes jeltovábbításban szerepet játszó fehérjék mennyiségében is: a nikotin megnövelte a kalcium kötő fehérje 1 mennyiségét, míg a fenantrén csökkentette azt. A nikotin növelte a PICOT fehérje mennyiségét, amely a PKCtéta gátlásán keresztül szabályozhatja a stressz indukálta szignalizációt, a fenantrén pedig a zyxin mennyiségét növelte, amely fokális adhézios plakkokban előforduló fehérje. Úgy a nikotin, mint a fenantrén megemelte néhány replikációban, transzkripcióban és transzlációban szerepet

játszó fehérje mennyiségét, mint amilyen az Elf4A. Ezen túlmenően a nikotin és fenantrén által indukált fehérjék között voltak metabolikus enzimek is.

5.3.5. Az occludin lebontásának mechanizmusa

A junkcionális fehérjék mennyiségének csökkenése patológiás körülmények között előtérbe helyezi ezen fehérjék lebontási mechanizmusainak tanulmányozását is. Az occludinhoz kapcsolódó fehérjék vizsgálatát célzó előzetes élesztő kettős hibrid vizsgálatok azt mutatták, hogy az occludin képes az itch nevű ubiquitin ligázhoz kapcsolódni. Az élesztő kettős hibrid kísérletek eredményeinek igazolásához koimmunprecipitációs vizsgálatokat végeztünk. A precipitálást occludin ellenanyag segítségével végeztük, és azt tapasztaltuk, hogy az occludin képes az itch-hez kapcsolódni. Ezzel szemben további koimmunprecipitációs kísérleteink azt mutatták, hogy a szoros kapcsolatok egy másik transzmembrán fehérjéje, a claudin-1 nem kapcsolódik az itch-hez (48. ábra).





E13 egér embrióból készített homogenátumból immunoprecipitáltunk poliklonális anti-occludin (1-es és 2-es sávok) vagy anti-claudin-1 (5-ös és 6-os sávok) ellenanyaggal. Negatív kontrollként anti-c-Myc ellenanyaggal precipitáltunk (3-as és 7-es sávok), vagy nem adtunk ellenanyagot a mintához (4-es és 8-as sávok). Az immunoprecipitátumokat immunoblot segítségével poliklonális anti-occludin (1-es sáv), vagy anti-claudin-1 (5-ös sáv), vagy anti-claudin-1 (5-ös sáv), vagy anti-claudin-1 (5-ös sáv), vagy anti-itch (2 - 4 és 6 - 8 sávok) alkalmazásával vizsgáltuk. Az endogén itch (~120 kDa) koprecipitált az occludinnal (2-es sáv), de nem koprecipitált claudin-1-gyel (6-os sáv). Az itch nem specifikus kötődése minimális volt (3-as, 4-es, 7-es és 8-as sávok). HC = nehéz lánc; LC = könnyű lánc.

Mivel az itch egy ubiqutin ligáz, megvizsgáltuk, hogy az occludin képes-e ubiquitinálódni. Ehhez hemagglutininnal (HA) jelölt ubiquitint túlexpresszáló HEK sejteket használtunk, amelyekből occludin ellenanyag segítségével precipitáltunk, majd a

precipitátumból készített Western-blottokat anti-HA ellenanyaggal festettük. Kimutattuk, hogy már rövid idejű kezelés az MG-132 proteaszóma inhibitorral jelentősen megnövelte az occludin-ubiquitin konjugátum mennyiségét. Annak kiderítésére, hogy melyik occludin pool ubiquitinálódik, megvizsgáltuk az occludin-ubiquitin konjugátumok mennyiségét a Triton X-100 szolubilis és inszolubilis frakcióban. A legnagyobb mennyiség a Triton X-100 szolubilis frakcióban volt megtalálható, de számottevő mennyiség volt az inszolubilis frakcióban is (49. ábra).



49. ábra. Az occludin in vivo ubiquitinációja

A. HA-jelölt ubiquitint expresszáló HEK 293E sejteket kezeltünk MG-132-vel (50 μ M, 1 h). Az endogén ocludint immunprecipitáltuk a sejtlizátumból, amit immunoblot vizsgálatnak vetettük alá anti-HA ellenanyag alkalmazásával. Negatív kontrollnak nem transzfektált sejteket használtunk. A HA-ubiquitin - occludin konjugátumokat a szögletes zárójel jelzi.

B. HA-jelölt ubiquitint expresszáló HEK 293E Triton X-100 szolubilis és inszolubilis frakciójából precipitáltuk az occludint MG-132 (50 μM, 1 óra) kezelést követően. Az immunoblottot anti-HA ellenanyag segítségével végeztük. A poliubiquitinált occludin a Triton X-100 szolubilis és inszolubilis frakcióban egyaránt megtalálható volt.

Mivel az ubiquitináció általában a fehérjék gyors lebontásával jár együtt, megvizsgáltuk az occludin turnoverét. Az occludin turnoverét "pulse chase" kísérletek segítségével követtük nyomon. Ennek során azt vizsgáltuk, hogy mennyi idő alatt tűnik el a radioaktívan jelölt occludin a teljes occludin mennyiségből. Kísérleteink kimutatták, hogy a teljes occludin mennyiség körülbelül 3 óra alatt lebomlik, és amennyiben a kísérlet során jelen volt az MG-132 proteaszóma inhibitor, az occludin lebomlása mintegy 30%-kal csökkent. Hasonló gátlást proteaszóma inhibitor jelenlétében claudin-1 esetén nem

észleltünk, ami arra utal, hogy az occludin és claudin-1 lebontása különböző mechanizmusok révén történik (50. ábra).



51. ábra. Proteaszómális gátlás hatása MDCK sejtek transzepiteliális elektromos ellenállására (TEER) A. MDCK sejtek konfluens tenyészeteit 12 órán át Ca²⁺ mentes médiumban tartottuk. Ezután a sejtek normál Ca²⁺ tartalmú médiumot kaptak (t = 0) és a TEER értékét mértük 4 órán keresztül MG-132 jelenlétében és hiányában. 50 μ M MG-132 jelenléte jelentősen felgyorsította a TEER növekedését az első órában. A három óránál hosszabb kezelés toxikus volt a sejtek számára.

B. MDCK sejtek konfluens tenyészeteit Ca^{2+} mentes médiumba helyeztük (t = 0) MG-132 jelenlétében és hiányában. 25 µM MG-132 31%-kal csökkentette a TEER csökkenését 150 perc után. Reprezentatív ábra három független kísérletből.

A következőkben arra kerestünk választ, hogy az occludin degradációjának gátlása mennyire befolyásolja a szoros kapcsolatok funkcionális sajátosságait, aminek jellemezésére a transzepiteliális elektromos ellenállást alkalmaztuk. Az első

kísérletsorozatban MDCK sejteket filteren tenyésztettünk, majd a konfluencia elérése után a sejteket 12 órán át Ca²⁺ mentes médiumban tenyésztettük tovább, hogy a meglévő szoros kapcsolatok szétessenek. Ezután a sejtek visszakapták a normál Ca²⁺ koncentrációjú tápfolyadékot, és mértük a transzepiteliális elektromos ellenállást (TEER). MG-132 jelenlétében a TEER emelkedése szignifikánsan gyorsabb volt mint kontroll körülmények között, ami jelzi, hogy a szoros kapcsolatok funkcionalitásának visszaállása az occludin lebomlásának gátlása következtében felgyorsult (51A. ábra). Ugyanakkor a Ca²⁺-megvonás során bekövetkező TEER csökkenés is mintegy 30%-kal csökkenthető volt MG-132 jelenlétében (51B. ábra).

5.3.6. Az oxidatív stressz által okozott cito- és genotoxikus hatások vizsgálata a vér-agy gát sejtjeiben

A hipoxia/reoxigenáció a junkcionális károsodások és a permeabilitás növelése mellett egyéb károsodásokat is kiválthat endotélsejtekben. Kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a hipoxia/reoxigenáció, illetve a kémiai úton indukált oxidatív stressz miként befolyásolja az apoptózist és a mitózist. Ehhez a kísérletsorozathoz sertés agyi endotélsejteket használtunk. Kontroll körülmények között a mitotikus sejtek aránya két százalék körül mozgott, és ebben a nagyságrendben volt az apoptotikus sejtek száma is.

A hipoxia/reoxigenáció, amelyet 24 órás hipoxiát követő 4 órás reoxigenációval váltottunk ki, szignifikánsan megnövelte az apoptotikus sejtek számát. Az apoptotikus sejtek számának növekedése hipoxia/reoxigenáció hatására glükóz mentes környezetben is megfigyelhető volt. Ugyanakkor a hipoxia/reoxigenáció jelentősen csökkentette a sejtek proliferációs rátáját. A glükóz mentes körülmények szintén jelentősen csökkentették az agyi endotélsejtek proliferációját, és ezt a csökkenést a hipoxia/reoxigenáció már nem fokozta tovább (52. ábra).

dc_218_11



52. ábra. A hipoxia/reoxigenáció hatása A9/B12 agyi endotélsejtek apoptózisára és mitózisára (glükóz hiányában és jelenlétében)

A hipoxia/reoxigenációhoz hasonló módon a DMNQ kezelés is idő- és koncentrációfüggő módon növelte az apoptózist és csökkentette a proliferációt. A 10 μM DMNQ segítségével kémiai úton kiváltott oxidatív stressz hatására az apoptózis már 1 óra után emelkedni kezdett, és 24 óra után vált igen erőteljessé, a mitotikus sejtek aránya egy óra után kezdett folyamatosan csökkenni (53. és 54. ábrák).



53. ábra. DMNQ kezelés hatása az apoptotikus és mitotikus sejtek arányára

A DMNQ kezelés 1 órán át tartott 1 μ M-os és 10 μ M-os koncentrációban. Az értékek négy független kísérlet átlagát és szórását képviselik. *p<0,05 a kontrollhoz viszonyítva.

^{*}p<0,05; **p<0,005 a megfelelő kontrollhoz viszonyítva. +p<0,05; ++p<0,005 a megfelelő, glükóz jelenlétében végzett kezeléshez viszonyítva. Az értékek legalább négy független kísérlet átlagát és szórását képviselik.

dc_218_11



54. ábra. Az apoptotikus és mitotikus sejtek százalékarányának időbeni változása 10 μ M DMNQ kezelés hatására



A genotoxikus hatásokat a mikronukleuszos, illetve a kromoszóma aberrációval rendelkező sejtek számának nyomon követésével vizsgáltuk. A mikronukleuszos sejtek aránya kontroll körülmények között 5% körül mozgott, amit a hipoxia/reoxigenáció szignifikánsan megnövelt. A glükóz hiánya önmagában nem befolyásolta a mikronukleuszos sejtek számát, és glükóz mentes környezetben a hipoxia/reoxigenáció sem növelte azt, aminek valószínű magyarázata a glükóz mentes környezetben megfigyelt alacsony proliferációs ráta (55A. ábra).

A hipoxia/reoxigenációhoz hasonlóan az 1 μM-os DMNQ kezelés is megnövelte a mikronukleuszos sejtek számát, a DMNQ koncentráció növelése azonban nem okozott további növekedést, és 100 μM már sejtpusztulást idézett elő (55B. ábra).



55. ábra. Oxidatív stressz hatása a mikronukleuszos sejtek arányára agyi endotélsejtekben A. Hipoxia/reoxigenáció hatása glükózt tartalmazó és glükóz mentes tápfolyadékban. B. A DMNQ koncentrációfüggő hatása glükózt tartalmazó tápfolyadékban. Az értékek %-ban vannak kifejezve, és négy független kísérlet átlagát és szórását képviselik. *p<0,05 a kontrollhoz viszonyítva.

A kromoszómális aberrációk vizsgálatát csak glükózt tartalmazó médiumban végeztük el a glükóz mentes médiumban tapasztalt alacsony mitotikus aktivitás miatt. A hipoxia/reoxigenáció szignifikánsan növelte a kromoszóma aberrációkat (kontroll körülmények között 0,113±0,02%, hipoxia/reoxigenáció után 0,302±0,02%). A leggyakrabban megfigyelt aberrációk a kromoszóma fragmentumok, illetve páros fragmentumok és dicentrikus kromoszómák voltak.

DMNQ hatására megnőtt a p53 fehérje expressziója, ami még tovább fokozódott, ha az oxidatív stresszt glükóz mentes körülmények között végeztük. Ezt a kísérletet GP8 patkány agyi endotélsejt vonalon végeztük, mert az általunk használt p53 ellenanyag nem ismerte fel a sertés p53-at (56. ábra).





Az endotélsejtekhez hasonlóan a hipoxia/reoxigenáció az asztrocitákban is cito- és genotoxikus hatással rendelkezett. A 24 óra hipoxiát követő 3 óra reoxigenáció megnövelte a mikronukleuszos sejtek számát, amihez csökkent proliferáció, és megnövekedett apoptózis társult. Az endotélsejtekkel összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy kontroll körülmények között az asztrocitákban kisebb a mikronukleuszos, apoptózisos és mitotikus sejtek száma. Bár a hipoxia/reoxigenáció fokozta az apoptotikus sejtek számát, ez az érték alacsonyabb volt az endotélsejtekben észleltnél (57. ábra).



57. ábra. Hipoxia/reoxigenáció (24 óra hipoxia, 3 óra reoxigenáció) hatása a mikronukleuszos, mitotikus és apoptotikus sejtek arányára asztrocitákban és agyi endotélsejtekben

Az értékek az átlagot és a szórást képviselik. *p<0,05; **p<0,005 a megfelelő kontrollhoz viszonyítva, +p<0,05; ++p<0,005 az endotélsejtekhez viszonyítva (kétszempontos ANOVA).

A glükóz koncentráció jelentősen befolyásolta az asztrociták hipoxia/reoxigenációra adott válaszát. Míg 1 g/l glükóz koncentráció mellett a hipoxia/reoxigenáció jelentősen megnövelte az apoptotikus sejtek arányát, 4,5 g/l glükóz koncentráció mellett ez nem következett be. A mikronukleuszos sejtek számának növekedését, illetve a nekrózisos sejtek számarányát sem befolyásolta a glükóz koncentráció (58. ábra).



A DMNQ-nak a hipoxia/reoxigenációhoz hasonló hatása volt. 24 órás kezelés 10 μ M-os DMNQ-val szignifikánsan megnövelte a mikronukleuszos és apoptotikus sejtek számát. Magasabb koncentráció már toxikusnak bizonyult, jelentősen megnövelve a nekrotikus sejtek számát és csökkentve a proliferációt. Ami a DMNQ hatásának időbeni lefutását illeti, egy óra kezelés 10 μ M-os DMNQ-val nem növelte szignifikánsan a mikronukleuszos sejtek számát szemben az endotélsejtekkel, ahol a növekedés szignifikáns volt. Az endotélsejtek és asztrociták érzékenysége közötti különbség a mitózis, apoptózis és nekrózis vizsgálata során is szembeötlő volt. Egy órás kezelés után az apoptózis és a nekrózis is alacsonyabb értéket mutatott asztrocitákban, és a különbség 24 óra után is megmaradt (59. ábra).



59. ábra. DMNQ (10 μ M) hatása a mitotikus, apoptotikus, nekrotikus és mikronukleuszoz sejtek arányára asztrocitákban és agyi endotélsejtekben

Az értékek az átlagot és szórást képviselik. *p<0,05; **p<0,005 a kontrollhoz képest, +p<0,05; ++p<0,005 az endotélsejtekhez képest (kétszempontos ANOVA).

A glükóz koncentrációnak jelentős hatása volt a DMNQ indukálta oxidatív stressz által kiváltott cito- és genotoxicitásra. A magasabb glükózkoncentráció (4,5 g/l) szignifikánsan csökkentette a DMNQ által indukált mikronukleuszos sejtek számát. Glükóz hiányában azonban a DMNQ által indukált mikronukleuszos sejtszámnövekedés elmaradt. Ugyanakkor aglikémia és 1 g/l glükóz koncentráció esetén a DMNQ szignifikánsan megnövelte az apoptotikus sejtek arányát, míg 4,5 g/l glükóz koncentráció mellett ez a növekedés nem következett be (60. ábra).



60. ábra. A glükóz koncentráció hatása a DMNQ kezelés (24 óra, 10 μ M) által indukált mikronukleuszos (n = 3) és apoptotikus (n = 4) sejtek arányára asztrocita tenyészetben Az értékek az átlagot ± SD-t képviselik. *p<0,05; **p<0,005 a kontrollhoz viszonyítva; ++p<0,005 az 1 g/l glükózhoz viszonyítva (kétszempontos ANOVA).

5.3.7. A hiperozmotikus mannitol hatása az agyi endotélsejtekre

A vér-agy gát ozmotikus megnyitása intrakarotikusan adagolt mannitollal a klinikai gyakorlatban is alkalmazott módszer, amelynek molekuláris háttere nem teljesen tisztázott. Az bizonyosnak látszott, hogy a hiperozmózis a morfológiai változások mellett (zsugorodás) jeltovábbító útvonalakat is aktivál. A hiperozmózis által indukált változások feltérképezése érdekében az agyi endotélsejteket 20%-os (1,1 M) mannitollal kezeltük. Ebben a koncentrációban alkalmazzák a mannitolt a vér-agy gát reverzíbilis megnyitására.

Elsőként a mannitolnak a sejtek morfológiai és mechanikai tulajdonságaira gyakorolt hatását vizsgáltuk élő sejtekben atomierő mikroszkóp segítségével. Az agyi endotélsejtek relatív nagy szilárdsággal rendelkeznek annak érdekében, hogy ellen tudjanak állni az állandó áramlás okozta mechanikai stressznek. Az agyi endotélsejetek vizsgálata során elsőként azt a kollagénnel bevont felületet jellemeztük, amelyen az endotélsejteket növesztettük. A kollagén egy folyamatos, fibrózus szerkezetű réteget alkot, ami elősegíti a sejtek letapadását. A maximális egyenetlenség, ami a felszín érdességének felel meg, 20 nm volt, ami a sejtek magasságához viszonyítva körülbelül 1%-ot jelent. Az atomierő

mikroszkópos vizsgálat előtt a sejteket fáziskontraszt mikroszkóp segítségével ellenőriztük, majd a termális stabilizáció érdekében a műszerbe helyeztük fél órára. A 40 x 40 µm szkennelt területen 2-3 sejt volt megfigyelhető, a legnagyobb sejtmagasság 2 µm volt. A szkennelést 1 nN erővel végeztük, ami elegendő volt arra, hogy láthatóvá tegyük a citoszkeletális elemeket, de még nem károsította a sejteket. Az ily módon vizualizált citoszkeletális struktúrák lineáris vagy elágazó szerkezetet mutattak, amelyek jellemző vastagsága 50-100 nm között mozgott. Ezt követően a sejtek 10% mannitol tartalmú tápfolyadékot kaptak oly módon, hogy a tenyésztőedény és az AFM feje ne mozduljon el, és így lehető vált ugyanazoknak a sejteknek a vizsgálata.

Mannitol hatására az agyi endotélsejtek jellegzetes morfológiai változásokat mutattak: a sejtek magassága lecsökkent úgy a magi mint a citoplazmatikus régió felett (61. ábra), és a citoplazmatikus régióban a filamentózus struktúra mellett körülbelül 100 nm nagyságú membrán kitüremkedések is megjelentek, melyek az elektronmikroszkópos felvételeken is láthatóak voltak (61. ábra).



61. ábra. A mannitol hatása az agyi endotélsejtek morfológiájára

I. AFM felvétel. A és D magasságkép, C és F deflekciós kép, B és E a két vonalnak megfelelő magasságprofil. A képek mannitol kezelés előtt (A - C), illetve mannitol kezelés után (D - F) készültek. II. Agyi endotélsejtek elektronmikroszkópos képe mannitol kezelés előtt (A) és után (B). A betét egy protrúzió nagy nagyítású képét ábrázolja.

A folyamat reverzíbilitásának vizsgálatához a sejteket előbb mannitollal kezeltük, és azután kezdtük el az atomierő mikroszkópos vizsgálatokat, majd a mannitolos tápfolyadékot normál tápfolyadékra cseréltük, aminek következtében a sejtek magassága megnövekedett és a membrán protrúziók is eltűntek. A sejtek mechanikai tulajdonságainak vizsgálata érdekében meghatároztuk a sejtek rugalmasságát is. Az erőmérésekből számolt Young modulusz 8,04 \pm 0,12 kPa volt kontroll körülmények között, míg mannitol hatására ez az érték 0,93 \pm 0,04 kPa-ra csökkent, ami azt jelenti, hogy a sejtek sokkal lágyabbá váltak.

A mannitol által aktivált jeltovábbító mechanizmusok közül elsőként a tirozin foszforilációt vizsgáltuk meg. Kontroll körülmények között két foszforilációs sáv volt detektálható, 50-60 kDa és 110 kDa körül (62A. ábra). A mannitol egy igen erőteljes tirozin foszforilációt indukált az 50-190 kDa molekulasúlyú fehérjéken. A hiperozmotikus körülmények megszűnte után már 10 perccel jelentősen csökkent a tirozin foszforiláció, és 60 perc után visszatért a kontroll értékekhez (62A. ábra). Különböző jeltovábbító útvonalak inhibitorait alkalmazva egyedül az Src kináz inhibitor PP-1-gyel sikerült a foszforilációt gátolni (62A. és 62B. ábrák).



62. ábra. Tirozin foszforiláció agyi endotélsejtekben mannitol hatására A sejteket 20% (1,1 M) mannitollal kezeltük 30 percen át. A foszforiláció alapállapotba való visszatérését illetve a MEK inhibitor U0126 (10 μ M), a Rho-kináz inhibitor Y27632 (10 μ M), az Src inhibitor PP1 (10 μ M), a tirozin kináz inhibitor genistein (50 μ M) hatását vizsgáltuk (A). Az L-típusú Ca²⁺ csatorna blokkoló verapamil (10 μ M) és EDTA (5 mM) hatását vizsgáltuk a mannitol indukálta tirozin foszforilációra. Reprezentatív ábra négy független kísérletből. (Ma=mannitol)

További kísérleteink során arra a kérdésre kerestünk választ, hogy milyen fehérjék foszforilálódnak tirozinon. Foszfotirozin ellenanyagal történő immunprecipitáció segítségével kiderítettük, hogy a tirozin foszforiláció egyik célfehérjéje a β-catenin, és a

foszforiláció a mannitol hatás megszűnte után már 10 perccel visszatért a kontroll értékre. A β-catenin foszforilációja is csak PP-1-gyel volt gátolható (63. ábra).



63. ábra. A β-catenin tirozin foszforilációja 20% (1,1 M) mannitol kezelés (30 perc) hatására A foszforiláció alapállapotba való visszatérését, illetve az MEK inhibitor U0126 (10 µM), a Rhokináz inhibitor Y27632 (10 µM), az Src inhibitor PP1 (10 µM), a tirozin kináz inhibitor genistein (50 μ M) (A) és az L-típusú Ca²⁺ csatorna blokkoló verapamil (10 µM) (B) hatását vizsgáltuk a mannitol indukálta β-catenin tirozin foszforilációra. Az A ábra alsó blotja a β-catenin összmennyiségét mutatja. Az immunoprecipitálás anti-foszfotirozin ellenanyaggal, a blottok festése anti-\beta-catenin ellenanyaggal történt. Reprezentatív ábrák három független kísérletből. (Ma=mannitol)

Az általános tirozin foszforilációhoz hasonlóan a foszforilált β -catenin is sokkal nagyobb mennyiségben fordult elő a Triton X-100 szolubilis mint a Triton X-100 inszolubilis frakcióban (64. ábra).





Az agyi endotélsejteket 20% (1,1 M) mannitollal kezeltük 30 percig. A. A Triton X-100 szolubilis frakcióban és inszolubilis farkcióban levő fehérjék tirozin foszforilációja. B. A Triton X-100 szolubilis és inszolubilis β -catenin tirozin foszforilációja. Az immunoprecipitálás anti-foszfotirozin ellenanyaggal, a blot festése anti- β -catenin ellenanyaggal történt. C. A β -catenin eloszlása a Triton X-100 szolubilis és inszolubilis frakció között. (Ma=mannitol)

Immunfluoreszcens vizsgálatokkal kimutattuk, hogy mannitol kezelés hatására a βcatenin kontroll körülmények tapasztalható folytonos membránfestése felszakadozott (65. ábra).

65. ábra. A β-catenin redisztribúciója agyi endotélsejtekben 20% mannitol kezelés hatására



30 perces 20% (1,1 M) mannitol kezelés hatására a membránfestés szakadozottá válik. A nyíl a kontroll képen a folyamatos membránfestésre, a mannitolos kezelést bemutató képen a felszakadozott membránfestésre mutat. Mérce = 20 μm.

A β -catenin foszforilációja és redisztribúciója hatással lehet az adherens kapcsolatok integritására. Feltételezéseinket a koimmunoprecipitációs kísérletek támasztották alá, amelyek kimutatták, hogy a β -catenin - cadherin és a β -catenin - α -catenin kapcsolat károsodott (66. ábra).



66. ábra. A mannitol kezelés hatása a β-catenin és αcatenin valamint a β-catenin és cadherin kapcsolatára A sejteket 20% (1,1 M) mannitollal kezeltük 30 percen át. Az immunoprecipitálás anti-β-catenin ellenanyaggal, a blot festése anti-VE-cadherin (A) vagy anti-α-catenin (B) ellenanyaggal történt. Reprezentatív ábra három független kísérletből. (Ma=mannitol)

A tirozin foszforiláció mellett más jeltovábbító útvonalak is aktiválódhatnak hiperozmózis hatására, mint amilyen a MAP kináz útvonal. Ennek tisztázására Westernblot analíziseket végeztünk olyan ellenanyaggokkal, amelyek a MAP kináz foszforilált, és ezáltal aktivált formját ismerik fel. Kísérleteink kimutatták, hogy a mannitol az ERK1/2 foszforilációját indukálta, ami U0126-tal gátolható volt. A p38 aktivációja hasonló kísérleti körülmények között nem volt megfigyelhető (67. ábra).





10% (0,55 M) és 20% (1,1 M) mannitol 10 és 30 perces kezelésének hatása az ERK1/2 (A) és a p38 (B) aktiválására. A teljes ERK1/2 mennyiséget az A ábra alsó blotja mutatja. Pozitív kontroll (B): endotélsejtek fenilarzén oxiddal kezelve. Reprezentatív ábra három független kísérletből. (Ma=mannitol)

foszforiláció további célfehérjéinek azonosítására ellenanyag А mátrixot használtunk. Az ellenanyag mátrixon 24 jelátvivő fehérje elleni antitest volt rögzítve, melyek közül a p130Cas, a fokális adhéziós kináz (FAK) és az Axl bizonyult tirozinon foszforiláltnak (68A. ábra) Az Axl receptor tirozin kináz foszforilációját immunopreciptációs vizsgálatokkal is igazoltuk (68B. és 68C. ábra).



68. ábra. Mannitol által indukált Axl foszforiláció A. Tirozin foszforilált fehérjék detektálása ellenanyag mátrix segítségével. Az agyi endotélsejteket 20%-os mannitollal kezeltük 30 percig. Az ellenanyag mátrixot а sejthomogenátummal inkubáltuk, majd antifoszfotirozin ellenanyaggal festettük meg. Α fehérjéket a membránon elfoglalt pozíció alapján azonosítottuk. B, C. Foszfo-Axl detektálása immunoprecipitáció

segítségével. Az agyi endotélsejteket 20%-os mannitollal kezeltük 30 percig. Az immunoprecipitációt anti-foszfotirozin ellenanyaggal végeztük, а blotokat anti-Axl ellenanyaggal festettük (B), illetve a meg homogenátumokat anti-Axl ellenanyaggal precipitáltuk, a blotokat pedig anti-foszfotirozin ellenanyaggal festettük (C). Reprezentatív ábra három független kísérletből. A nyilak a foszforilált 140 kDa-os Axl helyzetét jelölik. Kontrollként βaktint használtunk.



69. á	bra.	ra. Az Akt			aktiválása			hiperozmotikus			
mannitol hatására agyi endotélsejtekben											
A s	sejteket	t 4	Axl	si	RNS-	sel	tra	nszf	ektál	tuk	
Lipofe	ectamir	ne	se	gítse	égéve	l,	va	gy	c	sak	
Lipofe	ectamir	ne-t	adtu	nk	hozz	ájuk	, m	ajd	20%	-os	
manni	tolal k	kezel	tük 🤅	30 j	percei	n át.	А.	Az	Axl	és	
degrad	lációs	ter	méke	ei	eltűni	nek	а	cse	ndesi	ítés	
hatására. B. A hiperozmotikus mannitol által aktivált											
Axl az Akt foszforiációját indukálja. A blotokat anti-											
foszfo-Akt-tal (felső blot) vagy anti-Akt-tal (alsó											
blot) festettük. Reprezentatív ábra két független											
kísérle	etből.										

Az Axl ozmotikus stressz hatására bekövetkező foszforilációját az Akt (protein kináz B) foszforilációja követte. Amennyiben az Axl gént csendesítettük, az Akt foszforilációja elmaradt, ami azt bizonyítja, hogy az Akt ebben a folyamatban az Axl downstream eleme (69. ábra).

Az ozmotikus nyomás növekedésének következtében az Axl nemcsak aktiválódott, hanem le is bomlott, amely folyamat során két 50-55 kDa-os fehérje fragmentum keletkezett. A hasadás első lépése mátrix metalloproteináz függőnek bizonyult, míg a második lépés proteaszóma segítségével zajlott le (70. ábra). A 140 kDa-os teljes Axl és a metalloproteináz hatására keletkező fragmentum csak detergensekkel volt szolubilizálható, míg a proteaszóma függő degradációt követően vízoldékony termék keletkezett (70C. ábra).





A. A metalloproteináz inhibitor GM6001 meggátolta az Axl lebomlását. Egy reprezentatív blot öt független kísérletből. B. A Western-blotok denzitometriás analízise. Az oszlopok a 140 kDa-os Axl sáv intenzitás százalékát reprezentálják a kontrollhoz képest (átlag ± SD). *p<0,001 a kontrollhoz képest t-tesztet alkalmazva. C. A proteaszóma inhibitor MG-132 (50 µM) hatása az Axl degradációjára. Egy reprezentatív blot öt független kísérletből. Kontrollként β-aktint használtunk.

A két folyamat közül a foszforiláció kezdődött elsőként (2-5 perc után), a lebomlás csak 15 percnél vált láthatóvá (71A. ábra). Emellett, a pervanadát, amelyik egy erős foszfatáz inhibitor, fokozta az Axl foszforilációját, de nem indukálta a degradációt, ami szintén arra utal, hogy nem mutatható ki közvetlen ok-okozati összefüggés a foszforiláció és a hasítás között (71B. ábra). Ezt támsztotta alá az a kísérlet is, amelyben a genistein megakadályozta az Axl foszforilációját, de nem akadályozta meg a degradációját (71B. ábra). Mindezek mellett a metalloproteináz gátlás, ami megakadályozta az Axl lebontását, nem gátolta az Akt aktivációt, ami tekintettel arra, hogy az Akt az Axl alatt helyezkedik el a jeltovábbító kaszkádban, arra utal, hogy az Axl aktív maradt (71C. ábra).



71. ábra. Az Axl degradációja és foszforilációja közötti kapcsolat

A. Az Axl foszforiláció (felső blot) és degradáció (alsó blot) időfüggése. A sejteket 20%-os mannitollal kezeltük a jelölt időkig. Az immunoprecipitáláshoz anti-foszfotirozin ellenanyagot használtunk, az Axl Western-blot analízist sejtlizátumból készült immunprecipitátumból (felső blot) vagy sejtlizátumból (alsó blot) végeztük. B. A degradációs termékek foszforilálása. A sejteket 30 percig kezeltük 20%-os mannitollal, 50 μ M pervanadáttal, 20% mannitollal és 10 μ M GM6001-gyel vagy 20% mannitollal és 100 μ M genisteinnel. Az immunoprecipitáláshoz anti-foszfotirozin ellenanyagot használtunk, amit Axl Western-blot analízis követett. A kettős nyilak a foszforilált degradációs termékeket jelölik. Kontrollként β -aktint használtunk. C. A GM6001 nem befolyásolja az Akt foszforilálását. A sejteket 30 percig kezeltük 20%-os mannitollal 10 μ M GM6001 jelenlétében és hiányában, majd a blotokat anti-foszfo-Akt (felső blot) vagy anti-Akt (alsó blot) ellenanyagokkal festettük.

D. Az Axl kétdimenzionális elektroforézises vizsgálata Western-blottal kombinálva. A sejteket 30 percig kezeltük 20%-os mannitollal. A sejtlizátumokat kétdimenzionális elektroforézis segítségével szétválasztottuk, amit Western-blot analízis követett anti-Axl ellenanyag segítségével. A nyíl a foszforilált degradációs terméket jelöli.

Foszfotirozin ellenanyaggal végzett immunprecipitációs vizsgálataink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a keletkező fragmentumok foszforiláltak maradnak (71B. ábra). Ezt bizonyítja a kétdimenzionális elektroforézis során látható többszörös jel is 50-55 kDa magasságában (71D. ábra).

Mannitol jelenlétében az Axl redisztribúciója is bekövetkezett: a kontroll körülmények között diffúz lokalizációt mutató fehérje hiperozmózis hatására perinukleáris elrendeződést mutatott.

Következő lépésben az Axl foszforiláció szerepét szerettük volna megvizsgálni. Azt találtuk, hogy az Axl aktiválódásának a hiperozmózis okozta programozott sejthalál kivédésében van szerepe, hiszen a mannitol által kiváltott apoptózist tovább fokozta az Axl gén csendesítése (72. ábra).





5.3.8. A melanóma sejtek és agyi endotélsejtek kölcsönhatásának vizsgálata

A különböző rosszindulatú daganatok agyi metasztázisainak kialakulását a központi idegrendszert érintő megbetegedések legsúlyosabbjai között tartják számon. A metasztázisok kialakulásában a vér-agy gátnak is fontos szerepe lehet. Mivel a melanóma képez a legnagyobb százalékban agyi metasztázisokat, célul tűztük ki a melanóma sejtek vér-agy gáton történő transzmigrációjának vizsgálatát a vér-agy gát in vitro modelljén.

Kísérleteinkhez A2058 humán melanóma és B16/F10 egér melanóma sejtvonalakat használtunk.

Első lépésben a melanóma sejtek agyi endotél rétegekhez való kitapadásának sajátosságait vizsgáltuk. A melanóma sejtek már 15 perccel az endotél rétegre való helyezés után elkezdtek kitapadni, és mindkét sejtvonal jobban tapadt a humán agyi endotélsejtekhez (hCMEC/D3), mint a primér patkány agyi endotélsejtekhez, ugyanakkor a B16/F10 sejtek kitapadási aránya magasabb volt, mint az A2058 sejteké (73. ábra).





A fluoreszcensen jelölt melanóma sejteket (A2058, illetve B16/F10) 2,5•10⁴/cm² sűrűségben tettük patkány (RBEC), illetve humán (D3) konfluens agyi endotél tenyészetekre. A sejteket különböző ideig tenyésztettük együtt (15-120 percig), majd a nem letapadt melanóma sejteket lemostuk, és fluoreszcens mikroszkóppal megszámoltuk az adherens sejteket.

A kitapadást követően a melanóma sejtek képesek voltak átvándorolni az endotél rétegen. Először, mintegy 15-30 perccel az endotél rétegre való kihelyezés után, a melanóma sejtek elkezdtek nyúlványokat kibocsátani, majd 1-2 óra elteltével néhány melanóma sejt ellaposodott, és 15-30 perc alatt átvándorolt az endotél rétegen, majd az endotél réteg alatt tovább vándorolt (74. ábra 2-es és 3-as sejt). Ugyanakkor némelyik sejt néhány száz mikron távolságot bejárva sem tudott átjutni az endotél rétegen (74. ábra 1-es sejt).



74. ábra. Melanóma sejtek transmigrációja agyi endotél rétegen keresztül Az A2058 melanóma sejteket konfluens D3 sejtekre helyeztük, majd 5 órán keresztül 5 percenkent lefotóztuk ugyanazt a területet. Az ábra az így készült videóból mutat be jellemző pillanatokat.

Az átvándorlást konfokális mikroszkóppal is sikerült nyomon követnünk. A z síkban készített felvételen jól látszik, hogy az endotélium apikális (luminális) oldalára helyezett melanóma sejt átjutott a bazolaterális (abluminális) oldalra, amit a szoros kapcsolatok

helyzetét jelölő piros színű ZO-1 festés alatt megjelenő zöld melanóma sejt (Oregon Green 488 festett) jelez (75. ábra).



ZO-1 festés (endotélsejt)

vándorlása az agyi endotélsejtek apikális oldaláról bazális a oldalára A primér patkány agyi endotél

tenyészeteket üveg fedőlemezeken konfluenciáig növesztettük, majd fluoreszcensen jelölt A2058 melanóma sejteket (zöld) helyeztünk rájuk. 5 óra után a tenyészeteket megmostuk, fixáltuk, és a szoros kapcsolatokat anti-ZO-1 ellenanyaggal festettük (piros). A mintákat lézer konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk meg. A: xy-síkban készített felvétel a B és C ábrán látható zöld vonalak mentén. B, C: z-síkban készített felvételek az A ábrán látható függőleges és vízszintes vonalak mentén.

A következő lépésben arra a kérdésre kerestünk választ, hogy befolyásolják-e a melanóma sejtek a vér-agy gát barrier tulajdonságait. Mindkét melanóma sejtvonal jelentősen csökkentette a transzendoteliális elektromos ellenállást, azonban míg az A2058 sejtek által okozott csökkenés 24 óra után érte el a 30%-ot, a B16/F10 sejtek már 5 óra együtt tenyésztés után is szignifikánsan csökkentették a transzendoteliális elektromos ellenállást (76. ábra).





Ezek az eredmények arra engedtek következtetni, hogy az agyi endotél sejteket összekapcsoló szoros kapcsolatok károsodtak. Ezt a feltételezést támasztották alá az

occludin, ZO-1 és claudin-5 ellenanyagok segítségével végzett immunfluoreszcens vizsgálataink, amelyek kimutatták, hogy melanóma sejtek jelenlétében ezen fehérjék folytonos membránfestése felszakadozott (77. ábra).



77. ábra. A melanóma sejtek károsítják az endotélsejtek közötti szoros kapcsolatokat

A melanóma sejteket (A, B, C: A2058, D: B16/F10) fluoreszcensen jelöltük (A, B: CellTracker[™] Blue, C, D: Oregon zöld segítségével), majd konfluens primér patkány agyi endotél tenyészetekre helyeztük őket. Két (A), illetve öt (B-D) óra együtt tenyésztés után eltávolítottuk a nem letapadt melanóma sejteket, majd a tenyészeteket fixáltuk és immunfluoreszcens módszerrel megfestettük a claudin-5, a ZO-1, illetve az occludin junkcionális fehérjéket. A nyilak a szétesett junkciókat jelölik. Mérce = 50 μm.

A claudin-5 már 2 óra együtt tenyésztés után eltűnt azokon a helyeken, ahol az agyi endotélsejtek kapcsolatba kerültek a melanóma sejtekkel, és 5 óra után a ZO-1 is eltűnt ezekről a helyekről. Az immunfluoreszcens vizsgálatok eredményét alátámasztották a Western-blot analízisek is: melanóma sejtek jelenlétében a claudin-5 és az occludin mennyisége jelentősen csökkent. A csökkenés kifejezettebb volt B16/F10 sejtek, mint A2058 sejtek jelenlétében (78. ábra). Ezen túlmenően, a melanóma sejtek felülúszója is csökkentette a két junkcionális fehérje mennyiségét, a hatás ez esetben is a B16/F10 sejtek esetén volt erősebb.



A transzmigrációban fontos szerepet játszhatnak proteolitikus folyamatok is. Különös tekintettel arra, hogy elsősorban occludin esetében kifejezett degradációt tapasztaltunk, további kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy az endotél-melanóma kapcsolat milyen módon befolyásolja a sejtek proteolitikus aktivitását. Mindkét melanóma sejtvonal jelentős zselatinolitikus aktivitással rendelkezett, és ez az aktivitás fokozódott akkor, ha a melanóma sejtek agyi endotélsejtekkel kerültek kapcsolatba. A proteolitikus aktivitást sem az EDTA, sem a cisztein proteáz inhibitor E-64 nem volt képes gátolni, csak az irreverzíbilis szerin proteáz gátló Pefabloc volt hatásos. Ez arra utal, hogy a melanóma sejtekben agyi endotélsejtek jelenlétében elsősorban zselatinolitikus szerin proteázok aktiválódnak (79. ábra). A Pefabloc szignifikánsan csökkentette úgy az A2058, mint a B16/F10 sejtek transzmigrációját (79C. és 79D. ábra), ugyanakkor nem befolyásolta e sejtek migrációs kapacitását, ha endotélsejtek nem voltak jelen.



79. ábra. A melanóma sejtek által termelt zselatinbontó szerin proteázok szerepe

A, B. A melanóma sejteket konfluens agyi endotél tenyészetekre vagy üres tenyésztőedényekbe helyeztük szérummentes médiumban E64 vagy Pefabloc[®] hiányában, illetve jelenlétében. Α tápfolyadékokból (A), illetve sejtlizátumokból (B) származó zselatinbontó enzimeknek megfelelő sávokat Coomassie kék festéssel tettük láthatóvá. C, D. A primér patkány agyi endotél tenyészeteket 8 µm pórusméretű filtereken tenyésztettük. Α fluoreszcensen jelölt melanóma sejteket (C: A2058, D: B16/F10) a felső kamrába helyeztük Pefabloc[®] jelenlétében. hiányában vagy 5 óra után megszámoltuk az átvándorolt sejteket. n = 3, *p<0,05 (t-teszt).

További kísérleteink során megpróbáltuk azonosítani, hogy milyen szerin proteázok játszanak szerepet a transzmigrációban. Megfigyeltük, hogy az A2058 sejtek egy 170 kDa molekulasúlyú membránhoz kötött proteázt expresszálnak, ami a mérete alapján megfelelt a szepráznak. A szepráz gén csendesítésével a 170 kDa magasságban levő proteolitikus sáv eltűnt, ugyanakkor a géncsendesítés mintegy 20%-kal csökkentette az endotél rétegen átvándorolt A2058 sejtek számát (80. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a szepráz fontos, de nem kizárólagos szerepet játszik a melanóma sejtek vér-agy gáton történő átvándorlásában.





6. MEGBESZÉLÉS

6.1. A junkcionális fehérjék expressziójának sajátosságai a vér-agy gát sejtjeiben

A junkcionális fehérjék kulcsszerepet játszanak a paracelluláris barrier kialakításában és szabályozásában. Azonban az a megfigyelés, miszerint egyes junkcionális fehérjék olyan sejtekben is expresszálódnak, amelyek jelenlegi ismereteink szerint nem rendelkeznek szoros kapcsolatokkal, felveti annak a lehetőségét, hogy a junkcionális fehérjék egyéb celluláris funkciókat is elláthatnak. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a tight junction egyik transzmembrán fehérjéje, az occludin asztrocitákban is előfordul in vitro körülmények között, és a membránba lokalizálódik. Az occludin jelenléte valószínűleg egy differenciálatlan állapot jellemzője, és az asztrociták differenciálódása során az occludin eltűnik. Erre utal az a megfigyelés, amely szerint a neuroepiteliális sejtek korai embrionális stádiumban expresszálnak occludint, ami az idegi fejlődés során eltűnik (Aaku-Saraste és mtsai., 1996). Ugyanakkor friss megfigyelések szerint Alzheimer kórban számos neuronban és asztrocitában ismét megjelenhet az occludin (Romanitan és mtsai., 2007), a jelenség háttere azonban ismeretlen. A tight junction fehérjék funkciója az asztrocitákban még nem kellőképpen tisztázott. Az occludin mellett ZO-1-et, ZO-2-t és claudin-1-et is sikerült e sejtekben kimutatni (Howarth és mtsai., 1994, Howarth és Stevenson, 1995, Duffy és mtsai., 2000, Mack és Wolburg, 2006). Ezen túlmenően, Alzheimer kórban és vaszkuláris demenciában az occludint expresszáló asztrocitákhoz hasonlóan, a claudin-2-t és -11-et expresszáló asztrociták száma is megnövekszik, sőt, megjelennek claudin-2-t, -5-öt és -12-t expresszáló neuronok is (Romanitan és mtsai., 2010).

Az előzőekben említett patológiás körülmények mellet gyulladásos mediátorok is szabályozhatják az occludin expresszióját asztrocitákban, mint amilyen a TNF- α (Wachtel és mtsai., 2001). Figyelemre méltó megfigyelés, hogy a szintén proinflammatorikus citokin, az IL-1 β képes egy másik tight junction fehérjének, a claudin-1-nek az expresszióját indukálni asztrocitákban, és ezzel ellentétes irányú a gap junction fehérjék regulációja. A különböző junkcionális fehérjék expressziójának IL-1 β általi szabályozása befolyásolhatja az asztrociták közötti konnektivitást a központi idegrendszer gyulladásos folyamataiban (Duffy és mtsai., 2000).

A gyulladásos mediátorok mellett különböző növekedési faktorok is jelentősen befolyásolhatják a sejt-sejt kapcsoló struktúrákat a vér-agy gát sejtjeiben, ami nagy

hatással lehet e sejtek morfológiai és élettani sajátosságaira. Különös jelentősége lehet az ily módon indukált fenotípusos változásoknak agyi endotélsejtekben. Kísérleteink során az ECGF (endothelial cell growth factor) által indukált fiziológiai, biokémiai és molekuláris változásokat vizsgáltuk meg ezekben a sejtekben. Az ECGF jelenlétében és hiányában megfigyelt mindkét fenotípus (I-es és II-es) rendelkezik az endotélsejtekre jellemző markerekkel (Bauer és mtsai., 1990). Figyelemre méltó azonban az α -aktin megjelenése a II-es típusú sejtekben. Kísérleti adatok igazolják, hogy epitélsejtekben az α -aktin megjelenése összefüggésbe hozható az epiteliális-mezenchimális transzdifferenciációval (Nagamoto és mtsai., 2000). Ugyanakkor primér agyi endotélsejtekben és RBE4 patkány agyi endotélsejtekben kontroll körülmények között is kimutatható az α-aktin (Dolman és mtsai., 2005). Az a tény, hogy úgy az I-es, mint a II-es típusú endotélsejtek rendelkeznek endoteliális markerekkel, arra utal, hogy a mi kísérleteinkben a két fenotípus a vaszkuláris endotélium két különböző funkcionális állapotát tükrözi. E funkcionális változások elsősorban a migrációs különbségekben mutatkoznak meg. Ebben fontos szerepe lehet a IIes típusú sejtek magasabb metalloproteináz aktivitásának (van Hinsbergh és Koolwijk, 2008), illetve a csökkent fibronektin expressziónak (Madri és mtsai., 1989, Underwood és Bennett, 1993). A sejt-sejt kapcsolatoknak, ezen belül is az adherens kapcsolatoknak jelentős szerepe van a szöveti integritás megtartásában. Az adherens kapcsolatok legfontosabb transzmembrán fehérjéjének, a cadherinnek a csökkenése összefüggésbe hozható tumorok invázióképességével (Takeichi, 1993). Ezek a kísérleti eredmények egy irányba mutatnak azon megfigyelésünkkel, hogy a csökkent cadherin expresszió fokozott migrációs készséggel jár agyi endotélsejtekben.

Eredményeink igazolták, hogy az ECGF-nek fontos szerepe van az agyi endotélsejtek fenotípusának szabályozásában. Az ECGF egy nyugvó barrier képző állapotot kölcsönöz, amit egy alacsonyabb vándorlási képesség, alacsonyabb metalloproteináz aktivitás és egy magasabb fibronektin és junkcionális fehérje expresszió jellemez. Ezzel szemben ECGF hiányában a sejtek adhezivitása csökken, vándorlási és proteolitikus kapacitása megnövekedik, amit a junkcionális fehérjék mennyiségének csökkenése is követ. A sejtvándorlás, proteolitikus aktivitás, adhezivitás csökkenése az angiogenézis fontos elemei, így az általunk leírt jelenségnek fontos szerepe lehet olyan patológiás folyamatokban, mint a tumor progresszió vagy metasztázis képzés.

6.2. A szignáltranszdukció sajátosságainak vizsgálata agyi endotélsejtekben

Az agyi endotélsejtek a központi idegrendszer homeosztázisának fenntartásában betöltött kiemelkedő szerepüket csak precíz szabályozó mechanizmusok segítségével képesek ellátni. Ehhez egy komplex receptor és szignalizációs rendszer szükséges, amely lehetővé teszi, hogy az agyi endotélsejtek adekvát módon reagáljanak a környezetükből jövő ingerekre. Kísérleteinknek egy jelentős része arra irányult, hogy ezeknek a jeltovábbító rendszereknek a sajátosságait feltérképezzük.

Munkánk első lépésében arra voltunk kíváncsiak, hogy az agyi endotélsejtek milyen módon képesek az idegrendszer felől érkező jelzéseket érzékelni. Tekintettel arra, hogy a glutamát a központi idegrendszer egyik legfontosabb neurotranszmittere, vizsgálataink során egy érdekes megfigyelést tettünk: reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció segítségével kimutattuk, hogy az agyi endotélsejtek ionotróp (NMDA és AMPA), valamint metabotróp glutamát receptorok expressziójára is képesek. Eredményeink azt mutatják, hogy több NMDA receptor alegység is expresszálódik ezekben a sejtekben. Az NMDA receptorok szerepének szempontjából különösen fontos az NR1 alegység expressziója, ugyanis ennek az alegységnek a jelenléte feltétlenül szükséges a funkcionális NMDA receptorok létrejöttéhez (Hollmann és Heinemann, 1994). Kísérleteink megerősítették azt a korábbi, közvetett bizonyítékokon alapuló feltételezést, hogy az agyi endotélsejtek glutamát illetve NMDA receptorokkal rendelkeznek (Koenig és mtsai., 1992). Foszforilációs kísérleteink azt igazolták, hogy ezek a receptorok funkcionálisak. Ismert tény, hogy foszforilált állapotában a CAM-PK II elveszti Ca²⁺ függőségét, és megőrzi aktivitását Ca²⁺ jelenléte nélkül is (Bronstein és mtsai., 1993). Ennek olyan fontos neuronális folyamatokban van szerepe, mint az LTP (Lisman és Goldring, 1988). A CAM-PK II glutamát hatás megszűnése utáni foszforilációja az agyi endotélsejtek hosszantartó megváltozott reakciókészségét okozhatja olyan körülmények esetén, amelyek magas glutamát koncentrációval járnak, mint amilyen az agyi iszkémia. A többféle glutamát receptor jelenléte tovább finomítja az agyi endotélsejtek reakcióját a glutamátra, és a különböző receptorok rész vehetnek az agyi endotélium működésének szabályozásában fiziológiás és patológiás körülmények között. Bár vannak olyan kísérletek, amelyekben nem sikerült a glutamát szerepét kimutatni (Morley és mtsai., 1998, Domoki és mtsai., 2008), egyre több adat utal a glutamát szabályozó szerepére agyi endotélsejtekben. Így például a glutamát NMDA receptoron keresztül képes oxidatív stresszt kiváltani (Sharp és mtsai., 2005), hozzájárulva a barrier diszfunkcióhoz és a leukocita adhézióhoz (Kuhlmann

és mtsai., 2009). Ezen túlmenően az NR1 receptorok szabályozzák a t-PA által indukált agyi endoteliális szignalizációt, és szerepet játszanak a monocita transzmigrációban is (Reijerkerk és mtsai., 2010). A barrier funkciók sérülése a szoros kapcsolatok diszfunkciójával magyarázható, ugyanis kimutatták, hogy a glutamát az NMDA és AMPA/kainát receptorokon keresztül az occludin redisztribúciójához vezet agyi endotélsejtekben. A glutamát az NMDA receptorok mediálásával fokozza az occludin tirozin foszforilációját, rontva a barrier funkciókat, míg az AMPA/kainát receptorokon keresztül az occludin treonin foszforilációját fokozza (András és mtsai., 2007). A glutamát vazoregulációban betöltött szerepére utal az, hogy Parfenova és mtsai. (2003) kimutatták, hogy a glutamát, AMPA és kainát is képes volt a hém oxigenáz által katalizált CO szintézis indukálására izolált agyi mikroerekben és tenyésztett agyi endotélsejtekben egyaránt. A glutamát további szabályozó funkcióit veti fel egy proteomikai analízis, amely számos fehérje expressziójának módosulását mutatta ki glutamát hatására (Minagar és mtsai., 2009).

Az agyi endotélsejtek szerepét a glutamát hatásainak mediálásában az is jelzi, hogy két glutamát transzportert is expresszálnak, az EAAT1-et illetve EAAT2-t. Későbbi kutatások egy harmadik transzporter jelenlétét is kimutatták (EAAT3), és igazolták, hogy ezek a transzporterek funkcionálisak és Na⁺ dependensek. További vizsgálatok kimutatták, hogy mindhárom transzporter az abluminális oldalon helyezkedik el. A három transzporter együttes Km-je 14 μ M, és relatív aktivitásuk 1 : 3 : 6 (EAAT1 : EAAT2 : EAAT3) (O'Kane és mtsai., 1999). Ezek a vér-agy gát szintjén működő transzporterek hozzájárulnak a központi idegrendszer alacsony extracelluláris glutamát koncentrációjának biztosításához, és fontos szerepet tölthetnek be patológiás körülmények között (Smith, 2000, Teichberg és mtsai., 2009).

A glutamát transzporterek mellett kimutattuk, hogy az agyi endotélsejtek szerotonin transzportert is expresszálnak. További vizsgálataink igazolták, hogy e sejtek jelentős szerotonin felvevő kapacitással is rendelkeznek, amelynek mintegy egyharmada gátolható a szelektív 5-HT felvétel blokkoló citaloprammal. Hasonló arányban gátolta a szerotonin felvételt a nátrium ionok hiánya is (Hyttel, 1994), ami arra utal, hogy ezekben a sejtekben Na⁺ függő, funkcionális 5-HT transzporter expresszálódik, amely az uptake mintegy harmadáért felelős.

Ami a transzport affinitását illeti, az agyi endotélsejtek által expresszált szerotonin transzporter hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, mint a klónozott humán 5-HT
transzporter (Agnel és mtsai., 1996), a trombociták vagy a placenta transzportere (Anderson és Horne, 1992, Ramamoorthy és mtsai., 1995). Csak az agyi membrán preparátumokban mutattak ki ennél 5-10-szer magasabb affinitást (Cheng és mtsai., 1993). A mi sejtjeinkben azonban a V_{max} 30-40-szer alacsonyabb volt az agyi membrán preparátumban vagy a JAR humán placenta choriocarcinoma sejtekben mértnél. Eredményeink alátámasztják azt a megfigyelést, miszerint az 5-HT transzport kinetikájának variabilitása elsősorban a maximális sebességet és nem az affinitást érinti (Qian és mtsai., 1997).

Eredményeink ugyanakkor arra is felhívják a figyelmet, hogy – tekintettel arra, hogy a szerotonin felvétel mintegy kétharmada nem volt Na⁺ függő, és citaloprammal sem volt gátolható – a szerotonin transzportjában más transzporterek is jelentős szerepet játszanak. A dopamin vagy norepinefrin transzporter valószínűleg nem vesz részt ebben a folyamatban, mert ezek a transzporterek is Na⁺ függőek, azonban felvetődik annak lehetősége, hogy egy Na⁺ independens kolin transzporter is részt vesz a szerotonin transzportjában. Egy ilyen transzport mechanizmust leírtak már az agyi endotéliumban (Cornford és mtsai., 1978).

A szerotonin transzporter élettani szerepe az agyi endotélsejtekben még nem teljesen tisztázott. Érdemes megjegyezni, hogy az agyi endotélsejtek rendelkeznek monoaminooxidázzal (Maruki és mtsai., 1984), ami a szerotonint metabolizálni képes, így a szerotonin szint szabályozásában és ezáltal az agyi vérátáramlás regulációjában is szerepet játszhat e transzporter. Ezen túlmenően, friss kutatások kimutatták, hogy a szerotonin transzporter részt vesz a szerotonin agyból vér fele tartó transzportjában is (Nakatani és mtsai., 2008).

A különböző receptorok aktiválása számos intracelluláris jeltovábbító folyamatot indít el, és ezek igen fontos elemei a G-fehérjék. Kísérleteink során a G fehérje α alegységeinek expresszióját vizsgáltuk különböző típusú agyi endotélsejtekben. Kimutattuk, hogy az általunk vizsgált alegységek (Gs α , Gi1 α , Gi2 α , Gi3 α , Gq/11 α és G0 α) mind expresszálódnak az agyi endotélsejtekben. Jelenlétük fontos szerepet tölthet be a 7 transzmembrán receptoroknak az intracelluláris jeltovábbító útvonalakhoz való kapcsolásában. Ismeretes, hogy az agyi endotélsejtek számos Gs α -hoz kapcsolt receptort expresszálnak, mint a β -adrenerg receptorok (Durieu-Trautmann és mtsai., 1991), hisztamin H2 receptorok (Karnushina és mtsai., 1980) vagy dopamin D1 receptorok (Bacic és mtsai., 1991). A Gs α alegységek a Gi (gátló) alegységekkel egyetemben az

intracelluláris cAMP szint regulációjában játszanak szerepet, ami a maga során szabályozhatja a vér-agy gát permeabilitását (Rubin és mtsai., 1991). Ezt a megfigyelést támasztják alá saját kísérleti eredményeink is, amelyek irodalmi adatokkal egybecsengően jelentős TEER emelkedést mutattak cAMP kezelés hatására. A cAMP pontos hatásmechanizmusa még nem teljesen tisztázott, de foszforilációs folyamatok és a TJ komplexitásának növekedése állhat a háttérben (Wolburg és mtsai., 1994).

Ezen túlmenően a Gq11 α alegységek fontos szerepet játszhatnak olyan potens vazoaktív anyagok hatásának mediálásában mint a bradikinin (Liao és Homey, 1993), endotelin (Eguchi és mtsai., 1993) vagy trombin (Stasek és Garcia, 1992). Érdekes megfigyelés, hogy Gq11 α mediálta szignalizáció felelős az endoteliális barrier megnyílásáért gyulladásos mediátorok hatására tüdő endotélsejtekben (Korhonen és mtsai., 2009).

A G-fehérjéknek különleges jelentőséget ad, hogy jelenlétüket leírták a junkcionális komplexumban is. Ezen, elsősorban epitélsejteken végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a Gs α frakció egy jelentős része kolokalizálódik a ZO-1 tight junction fehérjével, és aktiválása gyorsítja a TJ kialakulását a kalcium switch esszében (Saha és mtsai., 2001). A transzepiteliális elektromos ellenállás három-négyszeres növekedését sikerült kimutatni AlF₄, egy potens G-fehérje aktivátor hatására is (Saha és mtsai., 1998). Ehhez hasonlóan a Gi2 α is kolokalizálódik a ZO-1-gyel, illetve ZO-2-vel, és kapcsolódni képes a ZO-1 Src homológia 3-as doménjéhez (Meyer és mtsai., 2002). A Gi2 α -nak szerepe lehet a szoros kapcsolatok kialakulásában is. Konstitutívan aktív Gi2 α -val transzfektált MDCK sejtekben sokkal gyorsabban alakult ki magas transzepiteliális elektromos ellenállás a kalcium switch során, mint a kontroll sejtekben. A G0 α , amely megtalálható a szoros kapcsolatok szubapikális régiójában is, szintén hozzájárulhat a TJ biogenéziséhez (Denker és mtsai., 1996).

A jeltovábbítás és interendoteliális junkciók szoros kapcsolatára utal az a kísérletsorozat, amelyben a Rho-kináz szerepét vizsgáltuk a Ca²⁺ hiány által indukált endoteliális diszfunkcióban. Epitélsejtekben és agyi endotélsejtekben a folytonosan elhelyezkedő szoros kapcsolatok kialakulásában fontos szerepet játszik az extracelluláris kalcium (Gonzalez-Mariscal és mtsai., 1990, Pitelka és mtsai., 1983, Rothen-Rutishauser és mtsai., 2002, Ivanov és mtsai., 2004(a)). A kalcium megvonást, illetve meghatározott idő utáni visszaadását kísérletes körülmények között a junkciók biogenézisének tanulmányozására használják, azonban a sejtközötti kapcsolatok szétesésének

mechanizmusai, különösen agyi endotélsejtekben, kevéssé ismertek. Kísérleteink során azt probáltuk tisztázni, hogy ezekben a sejtekben milyen mechanizmus révén károsodnak az interendoteliális junkciók, ha változik a Ca²⁺ koncentráció. A citoszkeletális változások élő sejtekben jól nyomon követhetőek voltak atomierő mikroszkóp segítségével. Kimutattuk, hogy agyi endotélsejtekben a Ca²⁺ megvonás jellegzetes morfológiai és citoszkeletális változásokat okoz (a sejtek egymástól eltávolodnak, magasságuk megnő, kortikális aktin gyűrű jelenik meg), és a junkciók széteséséhez vezet. A citoszkeletális változások falloidin festéssel is jól láthatóak voltak. Ezek az eredmények jól összevethetők epitélsejtekben tett megfigyelésekkel. Bélhámsejtekben kimutatták, hogy extracelluláris Ca²⁺ megvonás hatására a junkcionális fehérjék klatrin mediálta endocitózisa következik be (Ivanov és mtsai., 2004b). Ezzel párhuzamosan az aktin citoszkeleton is átrendeződik, kialakul egy kontraktilis aktingyűrű, amely kolokalizálódik a junkcionális fehérjékkel (Ivanov és mtsai., 2004(a)), ami szintén hozzájárulhat a paracelluláris gát funkcionális hiányosságaihoz. További kísérleteinkben kimutattuk, hogy úgy a morfológiai és citoszkeletális, mint a junkcionális változások Rho-kináz függőek. A kalcium depléció okozta változások reverzíbilisek voltak, azonban a visszarendeződés Rho-kináz independensnek bizonyult.

Az irodalomból ismert, hogy a Rho-kináz kulcsfontosságú szerepet játszik az aktin reorganizációjában, a sejtek motilitásában, adhéziójában és permebilitásában (Hopkins és mtsai., 2007). Az interendoteliális junkciók szabályozásában betöltött szerepe azonban nem teljesen tisztázott. A Rho-kináz a junkciók széteséséhez egyrészt a citoszkeletális tenzió növelése által járulhat hozzá. Erre utal a perifériás aktingyűrű kialakulása, amelyet meg lehet akadályozni Rho-kináz inhibitorral. Másrészt azonban a Rho-kináz közvetlenül is foszforilálhatja a claudin-5 és occludin fehérjéket agyi endotélsejtekben, amely a vér-agy gát megnyílásához vezet (Yamamoto és mtsai., 2008), így saját eredményeink és irodalmi adatok alapján állítható, hogy a Rho-kináz fontos szerepet játszik az aktin citoszkeleton és a szoros kapcsolatok szabályozásában agyi endotélsejtekben.

Az elmúlt évek kutatásai során egyre több adat látott napvilágot arra vonatkozóan, hogy a junkcionális fehérjék, elsősorban azok, amelyek a MAGUK családba tartoznak, nemcsak strukturális szerepet töltenek be a szoros kapcsolatok szintjén, hanem szabályozó funkcióval is rendelkeznek a génexpresszióban és proliferációban. Az első TJ fehérje, amelyiknek a jelenlétét a magban is kimutatták, a ZO-1 volt (Gottardi és mtsai., 1996). Néhány évnek kellett eltelnie ahhoz, hogy Balda és Matter kimutassák, hogy a ZO-1 kapcsolódni képes a ZONAB (ZO-1-associated nucleic acid-binding protein) Y-box

transzkripciós faktorhoz, és az ErbB-2 expressziójának szabályozásában vesz részt (Balda és Matter, 2000).

Saját megfigyelésink és ezzel párhuzamos más laboratóriumokban született eredmények is arra utaltak, hogy a ZO-2 is képes a magba vándorolni (Islas és mtsai., 2002). Azonban a ZO-2 magban betöltött szerepénk tisztázása még ma is a kezdeteknél tart. Kísérleteink során sikerült kimutatnunk, hogy a ZO-2 képes a SAF-B nevű fehérjével kapcsolódni, és ez a kapcsolódás a magban történik. Mivel a SAF-B egy olyan nukleáris fehérje, amely a genomiális DNS olyan régióihoz képes kapcsolódni, amelyek erős transzkripciós aktivitással rendelkeznek (Renz és Fackelmayer, 1996), eredményeink arra engednek következtetni, hogy a ZO-2-nek szerepe lehet a génexpresszió szabályozásában. Ezt a feltételezést erősíti meg, hogy az általunk leírt SAF-B mellett a ZO-2 képes a Fos, Jun és C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) transzkripciós faktorokhoz is hozzákapcsolódni (Betanzos és mtsai., 2004), ami a génexpresszió gátlásához vezethet. A sejtmagban felszaporodó ZO-2 más változásokat is indukál, így például megnövekedik az M2 típusú piruvát kináz mennyisége. A piruvát kinázok kulcsszerepet töltenek be a glikolitikus folyamatokban. Míg az M1 izoformák a vázizomban, a szívben és az agyban expresszálódnak, az M2 izoforma sok szövetféleségben expresszálódik, és nagy mennyiségben fordul elő egyes rosszindulatú daganatokban (Mazurek és mtsai., 2005), illetve embrionális szövetekben (Yamada és mtsai., 2000). A mi kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a megnövekedett M2-PK a ZO-2-t magban expresszáló sejtekben magasabb proliferációs rátával társul, azonban a ZO-2-nek az M2-PK szabályozásában betöltött közvetlen szerepe még tisztázásra vár. A megnövekedett proliferációval párhuzamosan, destabilizálódnak a szoros kapcsolatok, amit a junkcionális fehérjék lokalizációjának változása és a csökkent TEER jelzett. A ZO-2 sejtciklus szabályozásában betöltött szerepét támasztja alá az a megfigyelés, miszerint e fehérje a sejtciklus G1 fázisában képes a magba vándorolni, majd a mitózis során kivándorol onnan, és gátolja a ciklin D1 fehérje expresszióját (Tapia és mtsai., 2009). Ez magyarázatot adhat arra, hogy miért elsősorban a proliferáló, még nem konfluens tenyészetekben figyelhető meg a ZO-2 a magban, és miért tűnik el a magi ZO-2 a nyugvó, konfluens tenyészetekben (Jaramillo és mtsai., 2004).

A ZO-2, elsősorban a PDZ doménjein keresztül, a SAF-B-n kívül más nukleáris fehérjékkel is képes kapcsolódni. Ilyen a YAP2 (Yes kinase-associated protein 2) (Oka és mtsai., 2010), a ZASP (Lechuga és mtsai., 2010) és a TAZ (Remue és mtsai., 2010). A

számos azonosított nukleáris fehérje ellenére, amelyekhez a ZO-2 kapcsolódni képes, a nukleáris ZO-2 pontos élettani szerepe nem kellően ismert még. Kísérleteink során kimutattuk, hogy stressztényezők, mint a magas hőmérséklet vagy a nehézfém ionok is kiválthatják a ZO-2 magba vándorlását, de hipoxia hatására is megnövekedhet a ZO-2 mennyisége a magban (Fischer és mtsai., 2004). Eredményeink egyértelműen kimutatták, hogy a ZO-2 strukturális feladatok ellátása mellett fontos szerepet játszik a sejtműködés más aspektusainak a szabályozásában és a jeltovábbításban is. Talán ezzel is magyarázható, hogy bár a junkcionális fehérjék működése általában redundáns, a ZO-2 hiánya összeegyeztethetetlen az élettel (Xu és mtsai., 2008).

6.3. Az agyi endotélsejtek patológiás körülmények között: extracelluláris stressz faktorok hatása

Mivel a vér-agy gát a központi idegrendszer védvonalának egyik legelső eleme, számos stresszfaktor hatásának van kitéve, ami a vér-agy gát működésének zavarához vezethet, és ez súlyos következményekkel járhat a központi idegrendszer számára. Kísérleteink során arra a kérdésre kerestünk választ, hogy különböző stressztényezők, mint amilyen az oxidatív stressz, a hipovolémiás sokk vagy az ozmotikus stressz miként hatnak az agyi endotélsejtekre. Ezen túlmenően megvizsgáltuk daganatos sejtek és az agyi endotélsejtek közötti kölcsönhatás mechanizmusának néhány elemét is. Mivel a vér-agy gát részletes biokémiai vizsgálata in vivo csak korlátozottan lehetséges, elsősorban in vitro kísérleteket végeztünk, amelyekhez primér agyi endotélsejt tenyészeteket, illetve agyi endotélsejt vonalakat használtunk. Ezek a sejtek tenyészetben is megőrzik in vivo jellegzetességeiket, mint a vonWillebrand faktor expressziója, junkcionális fehérjék expressziója vagy efflux transzporterek expressziója (Greenwood és mtsai., 1996, Weksler és mtsai., 2005).

6.3.1. A hipoxia és az oxidatív stressz hatása a junkcionális komplexum működésére

A hipoxia és reoxigenáció, illetve az ehhez társuló oxidatív stressz az agyi endotélsejteket érő egyik leggyakoribb stresszhatás, melynek következményei a klinikai gyakorlatban is nagy jelentőségűek. Kísérleteink során az alkalmazott oxidatív stressz nem befolyásolta az agyi endotélsejtek életképességét, amit a tápfolyadék változatlan LDH aktivitása igazolt. Hasonló eredményre jutottak Plateel és munkatársai is (1995), akik

szintén nem észleltek LDH aktivitás növekedést hosszantartó hipoxia után sem. Eredményeink arra utalnak, hogy az endoteliális funkciók károsodása még azelőtt bekövetkezik, hogy az endotélsejtek integritása, viabilitása sérülne.

Az általunk megfigyelt occludin csökkenés mellett más junkcionális fehérjék expressziója is változhat hipoxia következtében. Így kimutatták, hogy a ZO-1 mennyisége csökken, amihez a fehérje foszforilációjának növekedése és redisztribúciója társul. Ebben a folyamatban a VEGF-nek lehet fontos szerepe (Fischer és mtsai., 2002). Koto és munkatársai (2007) kimutatták, hogy a hipoxia a claudin-5 expressziójának csökkenéséhez és a transzendoteliális permeabilitás növekedéséhez vezet bEND.3 sejtekben. Bár az irodalmi adatok nagy része arra utal, hogy a hipoxia/reoxigenáció, illetve az oxidatív stressz csökkenti a junkcionális fehérjék mennyiségét, Wittnek és munkatársainak (2003) nem sikerült változást kimutatniuk a claudin-3 expressziójában, sőt, ugyanez a munkacsoport a ZO-1 és occludin növekedését is kimutatta hipoxia/reoxigenáció hatására (Mark és Davis, 2002). Az in vivo kísérleti eredmények is inkább a junkcionális fehérjék mennyiségének csökkenését igazolják hipoxiás körülmények között. Patkányokon végzett vizsgálatok során kimutatható volt az occludin, a claudin-5 és a ZO-1 csökkenése úgy fehérje, mint mRNS szinten. A csökkenés igen gyorsan, már 2-3 órával az iszkémia után jelentkezett, a legerőteljesebb csökkenés 3 órával, illetve 72 órával az iszkémia kezdete után volt a legkifejezettebb (Jiao és mtsai., 2011).

Kísérleteink egyértelműen kimutatták, hogy az oxidatív stressz az endoteliális barrier sérülését okozza, aminek hátterében az occludin mennyiségének csökkenése, illetve az adherens kapcsolatok károsodása állhat. Az occludin szabályozásában igen fontos szerepet játszhat a glükóz is: hiánya jelentősen súlyosbíthatja az oxidatív stressz által kiváltott károsodásokat. A junkcionális fehérjék expressziójának csökkenése oxidatív stressz hatására más endotélsejtekben is megfigyelhető. Így dermális mikrovaszkuláris endotélsejtekben az oxidatív stressz és glükóz hiányának kombinációja az occludin és cadherin downregulációját okozza, amelyet permeabilitás fokozódás kísér (Park és mtsai., 1999). Hasonló körülmények között az occludin proteolitikus degradációját írták le Caco-2 epitélsejtekben is (Rao és mtsai., 2002).

Kísérleteink során a hipoxia/reoxigenáció az ERK1/2 aktiválódását indukálta, ami arra utal, hogy az agyi endotélsejtek más endotélsejtekhez és epitélsejtekhez hasonlóan reagálnak az oxidatív stresszre (Kevil és mtsai., 2000, Lee és mtsai., 2006). A MAP kinázok oxidatív stressz általi aktiválásában fontos szerepet játszik a glükóz. Bár

kísérleteinkben a glükóz depriváció önmagában nem okozott ERK1/2 foszforilációt, glükóz hiányában az oxidatív stressz által okozott aktiválás igen erőteljes volt. Az ERK1/2 szerepe a vér-agy gát permeabilitás szabályozásában még nem kellőképpen tisztázott. Epitélsejtekben és más típusú endotélsejtekben kimutatták, hogy a MAP kináz útvonalak aktiválása az occludin downregulációjához és megnövekedett permeabilitáshoz vezet (Chen és mtsai., 2000), és az ERK1/2 gátlása oxidatív stressz során jelentősen gátolja az occludin mennyiségének csökkenését (Park és mtsai., 1999). Ezen túlmenően ERK1/2 inhibitorral sikerült az oxidatív stressz által kiváltott occludin foszforilációt is gátolni (Kevil és mtsai., 2000). Az ERK1/2 foszforiláció lehetséges célfehérjéi között található a DAP kináz 1 (death-associated protein kinase 1) is, amely a tropomiozin foszforilációján keresztül járul hozzá az citoszkeleton átrendezéséhez (Houle és mtsai., 2007), ami szintén permeabilitás fokozódással járhat. Ugyanakkor olyan kísérleti eredmények is ismertek, amelyek arra mutatnak rá, hogy az ERK1/2 aktivitására szükség van a sérült barrier funkció helyreállításához (Wachtel és mtsai., 2002). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az MAP kináz jeltovábbító rendszernek a junkcionális komplexum állapotától függően más-más szerepe van.

Az oxidatív stressz nemcsak önmagában fordulhat elő, hanem számos más stressz faktorhoz vagy patológiás körülményhez társulhat, mint a vérzéses sokk, gyulladás, dohányzás, amelyek eredményeink alapján szintén károsíthatják az agyi endotélsejtek junkcióit.

6.3.2. A vérzéses sokk által indukált vér-agy gát károsodások

Igen súlyos agyi keringési zavarral jár a hipovolémiás sokk is. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a sokk dekompenzált fázisa során sérül a vér-agy gát integritása, és ez a sérülés az összes általunk vizsgált agyterületet érinti. A permeabilitás elsősorban a kis molekulasúlyú anyagokkal szemben növekedett, ami arra utal, hogy elsősorban a paracelluláris permeabilitás nő meg. Ennek hátterében a junkcionális komplexum sérülése állhat. Ezt a feltételezést támasztja alá az is, hogy a sokk során két transzmembrán junkcionális fehérje, az occludin és cadherin mennyisége is csökken agyi kapillárisokban. Hogy a vérzéses sokk milyen molekuláris mechanizmusok révén vezet e junkcionális fehérjék mennyiségének csökkenéséhez nem ismert, azonban feltételezésünk szerint a sokk következtében fellépő oxigén és tápanyag ellátási zavarnak fontos szerepe lehet. Eredményeink ugyanakkor felhívják a figyelmet arra, hogy a vérzéses sokk terápiája során

érdemes figyelmet fordítani a vér-agy gát működésére, mivel a megnövekedett permeabilitás könnyen felboríthatja a központi idegrendszer hoemosztázisát, és súlyosbíthatja a betegség lefolyását, mint történik az agyi iszkémia (Abbruscato és Davis, 1999), sclerosis multiplex (Rousseau és mtsai., 1999), HIV-1 enkefalitisz (Dallasta és mtsai., 1999), epilepszia (Janigro, 1999) vagy bakteriális meningitisz (Kim és mtsai., 1997) esetén.

6.3.3. A vér agy gát gyulladásos folyamatokban: a TLR2/6 szerepe

A különböző keringési zavarok mellet a központi idegrendszer gyulladásos folyamataiban is aktív szerepet játszik az agyi endotélium. Több korábbi eredmény utal arra, hogy az agyi endotélsejtek különböző TLR-ek expressziójára képesek (Constantin és mtsai., 2004, Ziegler és mtsai., 2007, Veszelka és mtsai., 2007). Kísérleteink során a jelenleg ismert Toll-szerű receptorokat végigtesztelve kimutattuk, hogy az agyi endotélsejtek nyugalmi körülmények köztött elsősorban TLR2-t, TLR3-at, TLR4-et és TLR6-ot expresszálnak. Ami a TLR2 és TLR4 expresszióját illeti, eredményeink alátámasztják azokat a korábbi megfigyeléseket, amelyek alacsony, de indukálható expressziót mutattak ki az endotéliumban (Singh és Jiang, 2004). Ezen túlmenően, a TLR3-at és a TLR4-et humán agyi endotéliumban is kimutatták (Fischer és mtsai., 2009, Aoki és mtsai., 2010), sőt egér eredetű agyi endotélben TLR9 expressziójára utaló eredmények is vannak (Constantin és mtsai., 2004), nekünk azonban ezt nem sikerült alátámasztanunk. Különböző gyulladásos mediátorokat (TNF-a, IL-1β, zymosan) alkalmazva kimutattuk, hogy a TNF-α többszörösére emeli a TLR2 és TLR3 expresszióját, míg a többi TLR expresszióját nem befolyásolja. Az IL-1β hatástalan volt a Toll-szerű receptorok expressziójára, míg a TLR6 agonista zymosan a TLR2 és TLR6 expresszióját fokozta.

Ami a TNF- α által indukált TLR2 expressziót illeti, az agyi endotélsejtek más endotéliumokhoz hasonlóan viselkednek, ugyanis indukáló hatást mutattak ki humán tüdő endotélsejtekben (Winder és mtsai., 2009), illetve humán köldökvéna endotélsejtekben (HUVEC-ben) is (Satta és mtsai., 2008). Ugyanakkor jelentős különbségek is vannak a gyulladásos citokinek által indukált TLR expresszióban, mert míg nekünk nem sikerült indukáló hatást kimutatni IL-1 β hatására, addig HUVEC sejtekben az IL-1 β is jelentősen megnövelte a TLR2 expressziót (Satta és mtsai., 2008). A mi eredményeinkhez hasonlóan a TLR1, TLR4 és TLR6 expresszióját HUVEC-ben sem indukálta a TNF- α vagy az IL-1 β (Satta és mtsai, 2008).

Tudomásunk szerint mi írtuk le elsőként a TLR6 expresszióját az agyi endotéliumban. A TLR6 szorosan kooperál a TLR2-vel, amivel heterodimér alkotására képes (Ozinsky és mtsai., 2000). A TLR2/6 bakteriális antigéneket felismerő receptorként ismeretes, de újabb eredmények alapján ennél szélesebb azon molekulák köre, amelyek aktiválni képesek a TLR2/6-ot, mint akut fázis szérum amiloid A (Cheng és mtsai., 2008), de a vakcínia vírus (Delaloye és mtsai., 2009) és a respiratorikus szinciciális vírus is (Murawski és mtsai., 2010) képes TLR2/6-on keresztül aktiválni a veleszületett immunrendszert. A TLR6 aktiválása jelentősen rontotta a vér-agy gát barrier tulajdonságait, aminek a hátterében a szoros kapcsolatok egy fontos transzmembrán fehérjéjének, az occludinnak a csökkenése és redisztribúciója állhat. A TLR6-hoz hasonlóan vér-agy gát permeabilitást fokozó hatást írtak le TLR4 agonisták esetén is, ami arra utalhat, hogy a Toll-szerű receptorok aktiválása károsan befolyásolja a vér-agy gát funkciókat. További kísérleteink során kiderítettük, hogy az occludin lebomlásához vezető jeltovábbító útvonalak egyike az ERK1/2 lehet, ami oxidatív stressz esetén is fontos szerepet játszik az endoteliális barrierek károsodásában.

Az oxidatív stressz és gyulladásos folyamatok közötti kapcsolatra hívja fel a figyelmet, hogy az oxidatív stressz jelentősen megnövelte a TLR2, a TLR3, a TLR4 és a TLR6 expresszióját. A Toll-szerű receptorok expressziójának fokozódása mellet az oxidatív stressz és a TLR2/6 párhuzamos aktiválása fokozottan rontotta a barrier tulajdonságokat, és fokozottan csökkentette az occludin mennyiségét. Korábbi kutatások már kimutatták, hogy központi idegrendszeri betegségeket tekintve a Toll-szerű receptoroknak lényeges szerepe lehet az agyi iszkémia során bekövetkező patológiás elváltozások közvetítésében: TLR2 és TLR4 hiányos egerek esetében a betegség modellezése során lényegesen kisebb mértékű központi idegrendszeri károsodást tapasztaltak, mint a vad típusú egereknél (Tang és mtsai., 2007). Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a Toll-szerű receptorok az agyi endotélsejtekben is szerepet játszhatnak az oxidatív stressz által kiváltott sejtkárosító hatások közvetítésében.

6.3.4. A dohányfüst egyes összetevőinek hatása a vér-agy gátra

Annak ellenére, hogy a dohányzás számos idegrendszeri és keringési megbetegedéssel hozható összefüggésbe, viszonylag kevés adat áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a dohányfüst alkotóelemei milyen hatással vannak az agyi endotélsejtekre. Vizsgálataink kimutatták, hogy a nikotin csak relatív nagy koncentráció és hosszan tartó kezelés esetén okoz változásokat a junkcionális fehérjék expressziójában,

ami elsősorban a ZO-1, valamint az occludin és cadherin mennyiségének csökkenését jelenti. Hasonló eredményekre vezettek a fenantrénnel végzett kísérleteink is. Az immunfluoreszcens vizsgálatok megerősítették a Western-blot vizsgálatokkal kapott eredményeket, amelyek kimutatták, hogy a nikotinra legérzékenyebb junkcionális fehérje a ZO-1. Ezek a kísérleti eredmények összhangban vannak az Abbruscato és mtsai. (2002), illetve Hawkins és mtsai. (2004) által marha endotélsejteken, illetve nikotinnal kezelt állatokon tett megfigyeléseivel.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy csak relatív magas nikotin koncentráció van hatással a junkcionális komplexum fehérjéinek expressziójára. Ez a koncentráció emberben már toxikus, ugyanakkor krónikus dohányosoknál a nikotin hatása sokkal tartósabban jelentkezik. Azonban az in vitro modell nem alkalmas 24-48 óránál hosszabb megfigyelésre. A junkcionális fehérjék expressziójában bekövetkező változások nem befolyásolták szignifikánsan a TEER-t, hasonlóan a marha endotélen elért adatokhoz (Abbruscato és mtsai., 2002). A paracelluláris permeabilitás különböző aspektusainak vizsgálata során is csak toxikus koncentrációjú nikotin alkalmazása esetén sikerült változást kimutatni (Abbruscato és mtsai., 2002, Schilling és mtsai., 1992). Azonban a nikotin oxidatív stresszel társulva potencírozza az oxidatív stressz által kiváltott változásokat a ZO-1 fehérje expressziójában és lokalizációjában, ami tükröződik a romló barrier tulajdonságokban is.

A nikotin kifejtheti hatását a nikotin típusú acetilkolin receptoron keresztül, melyek alegységeit (α -3, -5, -7, β -2) sikerült agyi endotélsejteken kimutatni (Abbruscato és mtsai., 2002, Hawkins és mtsai., 2005), de nem receptor mediálta mechanizmusok szintén lehetségesek (Tonnessen és mtsai., 2000).

A policiklusos aromás szénhidrogének szintén befolyásolhatják az agyi endotélsejtek működését. Bár agyi endotélsejtekre vonatkozó adatok tudomásunk szerint még nem állnak rendelkezésre, koronária endotélsejtekben kimutatták, hogy a policiklusos aromás szénhidrogének apoptózist és PLA₂ aktivációt idéznek elő (Tithof és mtsai., 2002), aorta endotélben pedig fokozzák az IL-4 illetve IL-8 termelését (Nordskog és mtsai., 2005). A PAH-ok hatásának mediálásában fontos szerepet játszhatnak a PAH receptorok (van Grevenynghe és mtsai., 2006), amelynek expresszióját nekünk is sikerült kimutatnunk agyi endotélsejtekben.

A fehérje expresszióban bekövetkező változásokat proteomikai analízis segítségével követtük nyomon. Korábbi irodalmi adatok arra utaltak, hogy a cigarettafüst komponensei

számos fehérje mennyiségi változását okozzák különböző sejtekben és szövetekben (Piubelli és mtsai., 2005, Raveendran és mtsai., 2005). Ezek között vannak olyanok is, amelyek a jeltovábbításban vagy apoptózisban játszanak szerepet (Yeom és mtsai., 2005). A vizsgálataink során mi is azt találtuk, hogy a cigarettafüst komponensei elsősorban metabolikus enzimek, sokk indukálta fehérjék, illetve szignalizációs fehérjék expresszióját változtatják. Ezen eredmények jelzik, hogy az agyi endotélsejtek a nikotin és policiklusos aromás szénhidrogének célpontjai lehetnek.

Kísérletsorozatunk eredményei arra utalnak, hogy a cigarettafüst komponensei nem okoznak közvetlen, akut változásokat az agyi endotélsejtek működésében, azonban hosszan tartó hatás, különösen oxidatív stresszel társulva jelentős károsodásokat okozhat a vér-agy gát működésében. Munkánk hozzájárul a dohányzással kapcsolatos kockázatok felbecsüléséhez neurológiai megbetegedések, különösen agyi iszkémia esetén.

6.3.5. Az occludin lebontásának mechanizmusa

A vér-agy gát működésére irányuló vizsgálataink során több esetben is kiderült, hogy az occludin mennyisége csökken agyi endotélsejtekben patológiás körülmények között. Mivel az occludin a szoros kapcsolatok egyik fontos transzmembrán fehérjéje, és számos irodalmi adat is arra utal, hogy mennyisége csökkenhet különféle kóros körülmények között, megvizsgáltuk e fehérje szabályozási sajátosságait. Kísérleteink során kimutattuk, hogy az occludinnak relatív gyors turnovere van és lebontásának egyik lehetséges mechanizmusa a proteaszomális degradáció. Ez oly módon jöhet létre, hogy az itch, amely egy HECT domént tartalmazó E3 ubiquitin ligáz, az occludinhoz kapcsolódva ubiquitinálja azt. Az ubiquitináció szignálként szerepel a proteaszóma számára a lebontáshoz. A proteaszómák más junkcionális fehérjék lebontásában is szerepet játszhatnak. Így például a β-catenin felezési ideje is háromszorosára emelkedik proteaszóma inhibitor jelenlétében (Aberle és mtsai., 1997), ugyanakkor a connexin degradációjának proteaszóma inhibitorral történő gátlása stabilizálja a gap-junctionokat (Musil és mtsai., 2000). A proteaszómák szerepét a junkciók szabályozásában alátámasztja az is, hogy az epitélsejtek hepatocita növekedési faktor által indukált disszociációja, és az ezzel társuló occludin, illetve ZO-1 redisztribúció proteaszóma inhibitorokkal gátolható (Tsukamoto és Nigam, 1999). Ehhez hasonlóan proteaszóma inhibitorral gátolható a HIV fertőzött monociták által indukált ZO-1 downreguláció (Huang és mtsai., 2009). A proteaszomális gátlás sejtkapcsolatokat stabilizáló hatásának molekuláris háttere még nem tisztázott. Mivel deubiquitináló enzimek aktívak a junkcióknál (Taya és mtsai., 1998, Taya és mtsai., 1999) elképzelhető, hogy az

ubiquitinált fehérjék, amelyek felhalmozódnak a proteaszómális gátlás következtében, deubiquitinálódás után egy "pool"-ként szolgálhatnak a sejt-sejt kapcsolatokba való reintegrációhoz. Ezen túlmenően az ubiquitináció szignálként szolgálhat а membránfehérjék internalizációjához is (Hicke, 1999, Dinudom és mtsai., 1998, Abriel és mtsai., 2000, Dunn és Hicke, 2001). Az occludin ubiquitinációjának számos patológiás folyamatban is szerepe lehet, mint a VEGF által indukált vaszkuláris permeabilitás fokozódás (Murakami és mtsai., 2009) vagy az irritábilis vastagbél szindróma (Coeffier és mtsai., 2010). Az a tény, hogy a proteaszómális degradáció a permeabilitást is befolyásolhatja, felveti annak lehetőségét, hogy a degradációnak ez a mechanizmusa szerepet játszik olyan patológiás folyamatokban, amelyek permeabilitás fokozódással járnak, mint amilyen az agyi iszkémia vagy sokk. Ennek felderítésére további vizsgálatok szükségesek.

Mindemellett az occludin mennyisége más mechanizmusok révén is csökkenhet a junkciókban. Az occludin célpontja lehet proteolitikus enzimeknek, mint amilyenek a metalloproteinázok. Kimutatták, hogy az MMP-2, MMP-9 és MMP-8 is képes hasítani az occludint (Feng és mtsai., 2011, Schubert-Unkmeir és mtsai., 2010). Az occludin szabályozható különböző szerin/treonin és tirozin foszforilációs mechanizmusokon keresztül, és célpontja számos protein kináznak is, mint amilyen a PKC, a c-Yes, a CK2 (Andreeva és mtsai., 2001, Chen és mtsai., 2002, Smales és mtsai., 2003). Ugyanakkor az occludin internalizálódni is képes (Ivanov és mtsai., 2004b), ami jelzi, hogy e fehérje egy igen komplex rendszer szabályozása alatt áll.

6.3.6. Az oxidatív stressz által okozott cito- és genotoxikus hatások vizsgálata a vér-agy gát sejtjeiben

Kimutattuk, hogy a barrier károsodások mellett a hipoxia/reoxigenáció genotoxikus és citotoxikus hatást is kifejt agyi endotélsejtekben még azelőtt, hogy a sejtek életképessége jelentősen csökkenne. Hasonló hatást sikerült kimutatnunk a DMNQ-val kémiai úton indukált oxidatív stressz esetén is. A hipoxia/reoxigenáció és az oxidatív stressz között igen szoros az összefüggés: általánosan elfogadott, hogy a hipoxia/reoxigenáció során szabad oxigén gyökök keletkeznek, amelyek széleskörű hatással rendelkeznek: lipid peroxidációt okoznak (McCord és Roy, 1982), DNS és fehérje károsodásokat indukálnak.

A genotoxikus hatás egyik megnyilvánulási formája a jelentős növekedés a mikonukleuszos sejtek számában, amit a glükóz mentes tápfolyadék nem befolyásolt.

Mivel a jelenség létrejöttének feltétele a mitózis, glükóz mentes médiumban az alacsony mitotikus index miatt nem növekedett a mikronukleuszos sejtek száma. A hipoxia/reoxigenáció illetve a DMNQ által kiváltott oxidatív stressz megnövelte az apoptózisos sejtek számát, amit a glükóz hiánya még tovább növelt. Ezzel párhuzamosan növekedett a p53 tumorszupresszor gén expressziója is. Ismeretes, hogy a p53 fontos szerepet játszik különböző genomiális stresszfaktorok (kemoterápia, radioaktív sugárzás) által kiváltott apoptózisban (Levine, 1997). Eredményeink összhangban vannak korábbi megfigyelésekkel, amelyek azt mutatták, hogy a p53 túlexpresszáltatása apoptózist képes előidézni (Stempien-Otero és mtsai., 1999). Megnövekedett apoptózist és p53 expressziót találtak ateroszklerotikus plakkokban is (Mercer és mtsai., 2007). A hipoxia által indukált apoptózis egyik lehetséges mechanizmusára a közelmúltban derült fény. Köldökvéna endotélsejtekben kimutatták, hogy a p38 MAP kináz-nak fontos szerepe lehet ebben a folyamatban (Eguchi és mtsai., 2007), ugyanis a p38 gátlása megakadályozta a hipoxia által indukált kromoszómális kondenzációt és nukleáris fragmentációt (Eguchi és mtsai., 2009). A kromoszómális kondenzációhoz és nukleáris fragmentációhoz vezető útvonal egyik fontos eleme lehet a kaszpáz-7 is, ami a p38-alatt helyezkedik el a jeltovábbító kaszkádban. Azon megfigyelésünk, hogy a genotoxikus károsodások megnövekedett apoptózissal társulnak, arra utal, hogy összefüggés lehet a DNS sérülések és azon sejtszabályozó mechanizmusok között, amelyek az apoptózis irányába terelik a sejteket.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy a hipoxia/reoxigenáció vagy kémiai úton (DMNQ-val) indukált oxidatív stressz jelentős genotoxikus hatással rendelkezik asztrocitákban is, melyet apoptózis kísér, de nem befolyásolja az alacsonyfokú passzív nekrózist. Ezen túlmenően jelentős különbségeket mutattunk ki az agyi endotélsejtek és asztrociták oxidatív stresszre adott válaszában, és kimutattuk, hogy e válaszreakcióban moduláló szerepe van a glükóznak. Az agyi endotélsejtekhez viszonyítva az asztrocitákban alacsonyabb az apoptózis és mitózis szintje, valamint a mikronukleuszos sejtek aránya. Ez arra utalhat, az intracelluláris védekező mechanizmusok normoxiás állapotban egy jobb toleranciát kölcsönöznek az asztrocitáknak. A védekező mechanizmusok egyik pillére a glutation redox rendszer lehet, amely igen effektíven működik asztrocitákban (Peuchen és mtsai., 1997). Ugyanakkor az asztrociták nagyobb mennyiségben expresszálják a két antioxidáns enzimet, a mangán szuperoxid diszmutázt és a katalázt, mint az endotélsejtek (Schroeter és mtsai., 1999). Ez a magasabb antioxidáns kapacitás magyarázhatja az asztrocitákban megfigyelt alacsonyabb apoptózis szintet és a mikronukleuszos sejtek

kisebb arányát. Azonban az iszkémia, illetve oxigén és glükóz depriváció csökkenti a védekezési mechanizmust, valószínűleg a glutation mennyiségének csökkenése következtében (Juurlink és mtsai., 1996, Papadopoulos és mtsai., 1998). A mitokondriális glutation depléciója megnöveli az asztrociták érzékenységét nitrogén monoxiddal vagy peroxinitrittel szemben (Muyderman és mtsai., 2004, Sims és mtsai., 2004). Bár kísérleteink során nem vizsgáltuk, a p53 fontos szerepet játszhat az asztrociták oxidatív stressz által indukált apoptózisában is (Kitamura és mtsai., 1999, Bonini és mtsai., 2004). Munkánk során arra is fényt derítettünk, hogy (az agyi endotélsejtekhez hasonlóan) a magasabb glükóz szint jelentősen csökkenti az oxidatív stressz geno- és citotoxikus hatásait asztrocitákban.

Az asztrociták szoros kölcsönhatásban vannak a velük szomszédos sejtekkel, és ennek szerepe lehet a neurovaszkuláris egység oxidatív stresszel szembeni ellenállóképességének kialakításában. Így például kimutatták, hogy az asztrociták javítják az agyi endotélsejtek oxidatív stresszel szembeni védekező képességét (Schroeter és mtsai., 1999, Haseloff és mtsai., 2005), és fontos szerepet játszanak a neuronoknak a védekezéshez szükséges prekurzor molekulákkal való ellátásában, mint amilyenek a glutation prekurzorok (Dringen és mtsai., 2000). Eredményeink alátámasztják az asztroglia jelentős szerepét az agy védekező mechanizmusainak kialakításában.

6.3.7. A hiperozmotikus mannitol hatása az agyi endotélsejtekre

A hiperzmózisos környezet egyik legfontosabb következménye a sejtek zsugorodása, ami az agyi endotélsejtek esetén a vér-agy gát megnyílásához vezethet (Greenwood és mtsai., 1988), azonban ennek mechanizmusa nem kellően tisztázott. Kísérleteink során atomi erő mikroszkóp segítségével élő agyi endotélsejteken nagy felbontásban követtük nyomon a mannitol által indukált morfológiai változásokat, amelyeknek legfontosabb eleme a sejtek magasságának csökkenése és a membránprotrúziók megjelenése volt. A morfológiai változások egyik magyarázata a hiperozmotikus környezet miatti folyadékveszteség, azonban ez nem befolyásolta látható módon a sejt-sejt kapcsolatokat, mivel a sejtek nem távolodtak el egymástól. A sejtek mechanikai tulajdonságainak vizsgálata során számított Young modulusz értéke hasonló volt a más kutatások során kapott értékekhez (Mathur és mtsai., 2001). A mannitol kezelés hatására fellépő nagyfokú csökkenés, ami a sejtek "lágyulását" jelzi, számottevő intracelluláris strukturális változásokra utal. Így feltételezhető, hogy aktív folyamatok szabályozzák a hiperozmózis által megnövelt permeabilitást.

A közelmúlt kutatásai is rávilágítottak arra, hogy a vér-agy gát ozmotikus megnyitása nem egyszerűen a sejtek zsugorodásának következménye, hanem egy aktív folyamat, amelyben számos jeltovábbító útvonal vehet részt. Így például Nagashima és munkatársai (1997) kimutatták, hogy 1,4 M mannitol az intracelluláris Ca²⁺ koncentráció gyors növekedését idézi elő agyi kapilláris endotélsejtekben, amely 10 másodperc után érte el maximumát és 200 másodperc után tért vissza a kontroll értékre. Más kutatók hasonló eredményeket kaptak aorta endotélsejtekben is (Marchenko és Sage., 2000).

Kísérleteink során egy erőteljes és reverzíbilis tirozin foszforilációt figyeltünk meg mannitol hatására agyi endotélsejtekben. Ezek az eredmények egybevágnak más sejttípusokon végzett megfigyelésekkel (Ragette és mtsai., 1997), azonban a foszforilációs mintázat ezekben a sejtekben különbözik az általunk az agyi endotélsejtekben megfigyelt foszforilációs mintázattól. Ezen túlmenően sikerült azonosítanunk a β -catenint, mint a foszforiláció egyik célfehérjéjét. Ennek fontos szerepe lehet a permeabilitás szabályozásában, mivel a β -catenin foszforilációja gyakran társul a cadherin mediálta sejtadhézió károsodásával. Ennek egyik magyarázata az lehet, hogy e foszforiláció, amely leggyakrabban a 86-os és 654-es tirozinon következik be, csökkenti a β -catenin affinitását a cadherin citoszolikus doménjéhez (Roura és mtsai., 1999), ugyanakkor a 142-es tirozinon történő foszforiláció a β -catenin/ α -catenin kapcsolat dezintegrációját okozza (Ozawa és Kemler, 1998, Pai és mtsai., 2004).

A β-catenin foszforilációja Src kináz dependens. Az, hogy az Src kináz pontosan milyen mechanizmusok révén szabályozza vér-agy gát működését, még nagymértékben ismeretlen. Figyelemre méltó, hogy az Src az adherens junkciókban is megtalálható köldökvéna endotélsejtekben (Lambeng és mtsai., 2005), és valószínű, hogy közvetlenül képes foszforilálni a β-catenin mellet más junkcionális fehérjéket is (Kale és mtsai., 2003), amelynek következménye lehet a megnövekedett permeabilitás (Basuroy és mtsai., 2003). Arra, hogy más junkcionális fehérjék is szerepet játszhatnak az endoteliális barrier hiperozmózis hatására bekövetkező permeabilitás változásában, több kísérleti eredmény is utal. Így például a vér-agy gát ozmotikus megnyitása során 30 perccel a kezelés megkezdése után a claudin-5 lokalizációjának változását és expressziójának csökkenését figyelték meg agyi erekben (Dobrogowska és Vorbrodt., 2004). Ehhez hasonlóan, csökkenést mutat a claudin-4 ozmotikus stressz általi regulációja azonban sejttípusonként

változó lehet, mert Lanaspa és munkatársai (2008) e fehérje expressziójának növekedését mutatták ki vese gyűjtőcsatornácskák sejtjeiben.

Az Src mellett egy másik jeltovábbító molekula család, amely aktiválódhat hiperozmózis hatására, a MAP kinázok. Az ERK1/2 az agyi endotélsejtek mellett más sejttípusokban is aktiválódik hiperozmózis hatására, mint amilyenek a marha aorta endotélsejtek (Gatsios és mtsai., 1998, Duzgun és mtsai., 2000) és a vese gyűjtőcsatornácskák sejtjei (Berl és mtsai., 1997). Ezek az eredmények rávilágítanak arra a tényre, hogy a MAP kinázok különböző módon aktiválódnak az egyes sejttípusokban. A hiperozmotikus stressz által aktivált MAP kináz útvonalak még nem teljesen feltérképezettek. A p38-ról kimutatták, hogy szerepet játszik az OREBP/TonEBP (osmosis response element binding protein) aktiválásában, és ily módon részt vehet az ozmoreszponzív gének szabályozásában. Azonban a p38 inhibitora, az SB203580 csak részben gátolta egy ORE (osmotic response element) reporter aktivációját arra utalva, hogy ebben a folyamatban más jeltovábbító molekulák is részt vesznek (Ko és mtsai., 2002). Ezen túlmenően a MAP kinázok mediálhatják a hiperozmózis más hatásait is, mint a megnövekedett leukocita migráció (Schaeffler és mtsai., 2000), L-selectin expresszió (Rizoli és mtsai., 1999), vagy IL-8 termelés (Németh és mtsai., 2002).

A foszforiláció további célmolekuláit ellenanyag mátrix segítségével kerestük, és három fehérjét azonosítottunk: a p130Cas-t, a fokális adhéziós kinázt (FAK) és az Axl-t. Mivel az első két fehérjéről más sejtekben kimutatták, hogy hiperozmotikus körülmények között foszforilálódik, további vizsgálatainkban az Axl-ra fókuszáltunk.

Az Axl (más néven ARK, UFO vagy Tyro7) egy receptor tirozin kináz, melynek ligandja a Gas6. Endotélsejtekben mindkettő kifejeződik. Az Axl anti-apoptotikus (D'Arcangelo és mtsai., 2002, D'Arcangelo és mtsai., 2006, Hasanbasic és mtsai., 2004), proliferációt és migrációt elősegítő (Korshunov és mtsai., 2007), illetve angiogenetikus hatású (Gallichio és mtsai., 2005, Holland és mtsai., 2005), és számos stresszfolyamat során aktiválódik. Az Axl tirozinon történő foszforilációja, - az eddig azonosított foszforilációs helyek között van a Tyr702 és Tyr691 - két intracelluláris jeltovábbító útvonalat is képes indukálni: a PI3K/Akt illetve ERK útvonalakat. Eredményeink azt mutatják, hogy agyi endotélsejtekben az ozmotikus stressz hatására foszforilálódott Axl az Akt-ot aktivája, aminek eredményeképp mérséklődik a hiperozmózis által indukált apoptózis. A hiperozmózis által kiváltott ERK1/2 aktiváció nem az Axl-on keresztül történik.

Ugyanakkor, az ozmotikus stressz nemcsak az Axl aktiválódását, hanem lebontását is okozza, melynek során két 50-55 kDa-os látszólagos mólekulasúlyú C-terminális intracelluláris termék keletkezik. Az Axl-ról korábban már kimutatták, hogy poszttranszlációsan szabályozható proteolízis révén (O'Bryan és mtsai., 1995), melynek során szolubilis Axl fragmentum keletkezik (Costa és mtsai., 1996). Ebben a folyamatban metalloproteinázok is részt vehetnek (Weiniger és mtsai., 2009). A szolubilis Axl szerepe nem tisztázott, de feltételezhető, hogy szabályozza az Axl receptor ligandjának, a Gas6 – nak a hozzáférhetőségét azáltal, hogy megköti a szabad Gas6-ot.

Az általunk megfigyelt, ozmotikus stressz hatására bekövetkező Axl lebomlás két lépésben zajlik le: az első, metalloproteáz dependens hasítást egy proteaszoma függő bontás követi. Kimutattuk, hogy az Axl foszforilációja és lebontása egymástól független folyamatok, és a keletkező C-terminális fragmentumok közül a nagyobb méretű csak detergensekkel szolubilizálható, míg a kisebb méretű vízoldékonynak bizonyult. Eredményeink alapján az Axl fontos szerepet játszik az agyi endotélsejtek ozmotikus stresszre adott válaszában és anti-apoptotikus hatással bír. Annak tisztázására, hogy a junkciók szabályozásában részt vesz-e, további kísérletek szükségesek.

Az ozmotikus stressz által okozott változásokat a 81. ábra összegzi.



81. ábra. Az ozmotikus stressz hatása agyi endotélsejtekre

6.3.8. A melanóma sejtek transzmigrációja

A központi idegrendszer igen gyakori célpontja a melanóma metasztázisainak, ennek okai, mechanizmusai azonban nem kellőképpen tisztázottak. A kérdés vizsgálatát nehezíti, hogy a legelterjedtebb laboratóriumi kísérleti állatokban, mint amilyen az egér vagy patkány, csak nagyon ritkán alakul ki spontán melanóma (Cranmer és mtsai., 2005), ami a rágcsálók és az ember megbetegedésének különbözőségére utal. Ezért kidolgoztunk egy in vitro vér-agy gát modellt, amely humán agyi endotélsejtek tenyésztésén alapul, és amely alkalmasnak bizonyult a transzmigráció vizsgálatára. Ugyanakkor - jobb barrier tulajdonságai miatt - primér agyi endotélsejteket is használtunk, amelyeket patkányból izoláltunk.

A transzmigrációról készített videófelvételek arra engednek következtetni, hogy az endotél rétegen való átvándorlás után a melanóma sejtek tovább vándorolnak a bazolaterális oldalon. Hasonló jelenséget figyeltek meg in vivo emlő karcinóma sejtekkel (Lu és mtsai., 2007), illetve Kienast és munkatársai (2010) leírták, hogy a melanóma és tüdőrák sejtek csak abban az esetben tudtak szaporodni az agyban, ha megőrzik kapcsolatukat az endotélsejtekkel. Ezek az eredmények egyértelműen felhívják a figyelmet az agyi endotélsejtek szerepére az agyi metasztázisok kialakulásában.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a melanóma sejtek hatására megnőtt az endotél réteg permeabilitása, ami arra enged következtetni, hogy a melanóma sejtek károsítják a vér-agy gátat. Mivel a junkcionális fehérjék gyakorlatilag eltűnnek azokról a helyekről, ahol a melanóma sejtek kapcsolatba kerülnek az endotéliummal, feltételezhető, hogy a melanóma sejtek képesek a sejtek között, paracellulárisan átjutni. Ennek során, ellentétben a leukocitákkal, károsítják is az endotéliumot (Strell és Entschladen, 2008). Mindezek mellett nem zárható ki az sem, hogy a melanóma sejtek az egyedi endotélsejtken keresztül (a transzcelluláris útvonalon) is képesek lehetnek átvándorolni.

A sikeres metasztázisképzés egyik kulcslépése az extracelluláris mátrix lebontása, amely fontos úgy a tumorsejtek véráramba való bejutása során, mint az extravazációkor. Ugyanakkor a junkcionális fehérjék is célpontjai lehetnek a proteolízisnek (Reijerkerk és mtsai., 2006). In vitro és in vivo kísérletes adatok utalnak arra, hogy a plazminogén/plazmin rendszernek fontos szerepe van a melanóma sejtek agyi endotéliumon való átjutásában (Perides és mtsai., 2006). A melanóma sejtek számos proteázt képesek expresszálni, mint az uPA (Artym és mtsai., 2002), szepráz (Monsky és mtsai., 1994, Piñeiro-Sánchez és mtsai., 1997) és mátrix metalloproteinázok (Hofmann és

mtsai., 1999, Sounni és mtsai., 2002, Tsung és mtsai., 2008), amelyek elősegítik invazivitásukat.

Eredményeink azt mutatják, hogy a transzendoteliális migráció során a melanóma sejtek nagy mennyiségű zselatinbontó enzimet expresszálnak és szabadítanak fel, amelyek azonban nem mátrix metalloproteinázok, hiszen EDTA rezisztensnek bizonyultak, hanem Pefabloc érzékeny szerin proteázok. Ezen zselatinolitikus szerin proteázok fontos szerepet játszanak a transzendoteliális migrációban, hiszen Pefabloc jelenlétében szignifikánsan csökkent az endotél rétegen átjutó tumorsejtek száma.

A számos proteolítikus aktivitású fehérje közül sikerült azonosítanunk a szeprázt (seprase = surface expressed protease vagy FAP α = fibroblast activation protein α). Ez egy 2-es típusú transzmembrán glikoprotein, melyet először LOX melanóma sejtekben írtak le (Piñeiro-Sánchez és mtsai., 1997), és fontos szerepet játszik melanóma és karcinóma sejtek invazivitásában (összefoglalva: O'Brien és O'Connor, 2008). Homológja, a DPPIV (= dipeptidyl peptidase IV) normál melanocitákban, epitél és más sejtekben expresszálódik, míg a szepráz tumor sejtekben és mezenchimális sejtekben van jelen (Wesley és mtsai., 1999, Gilmore és mtsai., 2006). Ezzel összhangban, amint polimeráz láncreakcióval kimutattuk, a D3 sejtek expresszálnak DPPIV-et, viszont nem expresszálnak szeprázt, az A2058 sejtek pedig ez utóbbit fejezik ki, DPPIV-et pedig nem. A2058 sejtekben a szepráz a csökkenés azonban kisebb mértékű volt, mint amikor Pefabloc segítségével az összes szerin proteázt gátoltuk.

Összefoglalva, in vitro eredményeink alapján a melanóma sejtek az agyi endotél rétegen való átjutásuk során károsítják a vér-agy gát integritását azáltal, hogy apoptózist indukálnak az endotélsejtekben, illetve megbontják a szoros kapcsolatok folytonosságát. Ezáltal a tumor sejtek képesek átvándorolni a paracelluláris útvonalon. Ezen folyamat során a melanóma sejtek zselatinolitikus szerin proteázokat termelnek, többek között szeprázt, amelyeknek gátlása szignifikánsan csökkenti az agyi endotél rétegen átjutó tumor sejtek számát.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Azáltal, hogy meghatározó szerepet tölt be a keringés és a központi idegrendszer közötti anyagtranszport szabályozásában, a vér-agy gát fontos szerepet játszik az agyi homeosztázis fenntartásában. Jelentős tényező az idegrendszeri megbetegedések során is: egyrészt számos patológiás folyamat társul permeabilitásának fokozódásával, másrészt épp a vér-agy gát akadályozza meg azt, hogy egyes gyógyszermolekulák terápiás koncentrációt érjenek el az agyban. Tekintettel gyakorlati jelentőségére, kísérleteink során arra kerestünk választ, hogy milyen molekuláris mechanizmusok játszanak szerepet a vér-agy gát működésében fiziológiás és patológiás körülmények között. Kísérleteinket elsősorban agyi endotélsejt tenyészeteken, illetve a vér-agy gát in vitro modelljein végeztük.

A junkcionális fehérjék expressziójának sajátosságai a vér-agy gát sejtjeiben

Munkánk során kimutattuk, hogy az endotélsejtek mellett a vér-agy gát felépítésében fontos szerepet játszó asztrociták is képesek occludint expresszálni, aminek jelenléte valószínűleg összefügg e sejtek differenciáltsági fokával. Bár az occludin asztrocitákban is elsősorban a membránban helyezkedik el, a szolubilitás vizsgálatok azt mutatták, hogy a membránhoz való kötöttségük nem azonos az endoteliális occludinéval. Bár később más munkák is igazolták illetve kiegészítették megfigyeléseinket, az occludin asztrocitákban betöltött szerepe még tisztázásra vár.

Kimutattuk továbbá, hogy az endoteliális növekedési faktor jelentős fenotípus változást képes indukálni agyi endotélsejtekben. ECGF hiányában a sejtek orsószerű alakot vesznek fel, amely mögött az aktin filamentumok átrendeződése áll. Ezen túlmenően csökken ezen sejtek fibronektin termelése, hasonlóképpen csökken a junkcionális fehérjék expressziója, és megnövekedik a sejtek metalloproteináz aktivitása. A morfológiai változásoknak funkcionális következményei is vannak: ECGF hiányában a sejtek alacsonyabb proliferációs aktivitással, viszont magasabb migrációs potenciállal rendelkeznek. Ezen változásoknak olyan fontos fiziológiás és patológiás folyamatokban lehet fontos szerepe, mint a vaszkulogenézis vagy tumor progresszió.

A szignáltranszdukció sajátosságainak vizsgálata agyi endotélsejtekben

Az endoteliális szignalizáció vizsgálata során kimutattuk, hogy az agyi endotélsejtek funkcionális NMDA receptorokat expresszálnak, amelyek aktiválása a CAM-PK II foszforilációjához vezet. E folyamatnak olyan megnövekedett extracelluláris glutamát koncentrációval járó folyamatokban lehet szerepe, mint amilyen az agyi iszkémia.

Felismertük, hogy a glutamát receptorok mellett az agyi endotélsejtek glutamát transzportereket is képesek expresszálni, ami arra utal, hogy e sejtek fontos szerepet tölthetnek be az extracelluláris glutamát koncentráció szabályozásában. Kimutattuk továbbá, hogy az agyi endotélium aktív szerotonin transzporterrel is rendelkezik.

Megvizsgáltuk azt is, hogy az agyi endotélsejtek milyen G-fehérjéket expresszálnak. Kísérleteink rávilágítottak, hogy a klasszikus G-fehérjék mellett, az endoteliális szabályozásban fontos szerepet játszhat a Rho is. Kimutattuk, hogy az alacsony Ca²⁺ koncentráció által indukált junkcionális károsodás mediálásában fontos szerepet játszik a Rho-kináz.

Munkánknak az egyik legmeglepőbb fordulatot hozó része a ZO-2 fehérjének a vizsgálata volt. A ZO-2 a szoros kapcsolatok egyik klasszikus alkotóeleme, amelyről úgy gondolták, hogy elsősorban strukturális feladatokat lát el. Munkánk során kimutattuk, hogy a ZO-2 képes a magba vándorolni, és ott kapcsolódni a SAF-B nevű nukleáris fehérjével. A ZO-2 magban való felszaporodását elősegíthetik olyan stressz faktorok, mint a magas hőmérséklet vagy nehézfémek (kadmium). A nukleáris ZO-2 szerepének vizsgálatára olyan sejtvonalat hoztunk létre, amelyben megnövekszik a magokban levő ZO-2 mennyisége. A ZO-2 magban történő expresszáltatása következtében megnövekedik az M2 típusú piruvát kináz mennyisége, amely a piruvát kináznak egy olyan izoformája, amelyik nagy mennyiségben fordul elő daganatos sejtekben. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a megnövekedett M2-PK a ZO-2-t magban expresszáló sejtekben magasabb proliferációs rátával társult, azonban a ZO-2-nek az M2-PK szabályozásában betöltött közvetlen szerepe még tisztázásra vár. A megnövekedett proliferációval párhuzamosan, destabilizálódtak a szoros kapcsolatok, amit a junkcionális fehérjék lokalizációjának változása és a csökkent TEER jelzett. Eredményeink egyértelműen kimutatták, hogy a ZO-2 strukturális feladatok ellátása mellett fontos szerepet játszik a jeltovábbításban is.

A vér-agy gát patológiás körülmények között

Munkánk során megvizsgáltuk a hipoxia/reoxigenáció, illetve az oxidatív stressz agyi endotélsejtekre gyakorolt hatásának különböző aspektusait. Kísérleteink során fény derült arra, hogy az oxidatív stressz által okozott permeabilitás növekedés molekuláris hátterében az interendoteliális kapcsolatokat alkotó fehérjék változásai állnak: csökken az occludin mennyisége, és károsodnak a junkcionális fehérjék közötti kapcsolatok is, mint amilyen a cadherin-catenin kapcsolat. A változások még kifejezettebbek, ha az oxidatív

stressz alacsony glükóz szinttel társul. Kimutattuk, hogy a hipoxia által aktivált jeltovábbító útvonalak között szerepel az ERK1/2.

In vivo kísérleteinkkel bebizonyítottuk, hogy hipoxia/reoxigenációhoz hasonlóan a hipovolémiás sokk is a vér-agy gát permeabilitásának fokozódásához vezet, elsősorban annak dekompenzált stádiumában. Eredményeink azt mutatják, hogy a folyamat hátterében itt is az occludin interendoteliális junkciókból való eltűnése áll.

A Toll-szerű receptorok expressziójának vizsgálata során kimutattuk, hogy az agyi endotélsejtek elsősorban TLR2-t, TLR3-at, TLR4-et, TLR6-ot expresszálnak. Az oxidatív stressz és a gyulladásos folyamatok közötti szoros kapcsolatra mutat rá megfigyelésünk, miszerint az oxidatív stressz növeli a TLR2, TLR3, TLR4 és TLR6 expresszióját. Ezen túlmenően kimutattuk, hogy a TLR2/6 agonista zymosan képes saját receptorainak expresszióját fokozni. A TLR2/6 receptorok aktiválása növeli az endotél rétegek permeabilitását is. E jelenséget magyarázhatja a zymosan sejt-sejt kapcsolatokra kifejtett hatása: a kezelés eredményeképpen a szoros kapcsolatok két transzmembrán alkotóelemének, az occludinnak és a claudin-5-nek a mennyisége is csökken a sejtekben, és a fehérjék számos helyen eltűnnek a sejtkapcsoló szerkezetek területéről. Az occludin esetében bekövetkezett változásokat kivédi az U0126 nevezetű MEK gátlószer, míg a claudin-5 eltűnését NF-κB gátlószerrel (PDTC) és U0126-tal sem sikerült megakadályozni. Oxidatív stresszel kombinálva a zymosan még kifejezettebb változásokat okoz: a kettős kezelés hatására fokozódott az occludin mennyiségi csökkenése és a fehérje teljes mértékben eltűnt a szoros kapcsolatok területéről.

Összefüggést mutattunk ki az oxidatív stressz és a dohányfüst egyes alkotóelemeinek hatása között is. Önmagában úgy a nikotin, mint a policiklusos aromás szénhidrogének csak nagy koncentrációban és hosszan tartó kezelés esetén károsítják az interendoteliális junkciókat, ám ez a károsító hatás fokozottabb, ha dohányfüst fő alkotóelemei mellett a sejtek oxidatív stressznek is ki vannak téve.

Igen érdekes megfigyelésekhez vezetett az occludin lebontási mechanizmusainak a vizsgálata: kimutattuk, hogy az occludin kötődni képes az itch nevű ubiquitin ligázhoz, amelynek következtében az occludin ubiquitinálódhat – ami a proteaszóma számára egy lebontási szignált jelent. Az occludin turnovere is igen gyorsnak bizonyult egy transzmembrán fehérjéhez képest: a teljes occludin mennyiség kicserélődik mintegy 3 óra alatt.

130

A junkcionális károsodások mellett a hipoxia/oxidatív stressz genotoxikus károsodásokat is okozhat, még mielőtt a sejtek viabilitása csökkenne: szignifikánsan megnő a mikronukleuszok, a kromoszómális aberrációk és az apoptotikus sejtek száma és csökken az endotélsejtek proliferációs rátája. Ha az oxidatív stresszhez glükóz hiánya is társul, az apoptotikus sejtszám növekedése még kifejezettebbé válik. Kimutattuk, hogy oxidatív stressz hatására megnő a p53 fehérje expressziója, ami még tovább fokozódik, ha az oxidatív stresszt glükóz mentes körülmények között alkalmazzuk.

Az asztrociták is érzékenyek hipoxia/reoxigenációra, de endotélsejtekkel összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy kontroll körülmények között az asztrocitákban kisebb a mikronukleuszos, apoptózisos és mitotikus sejtek száma. Bár a hipoxia/reoxigenáció fokozta az apoptotikus és mikronukleuszos sejtek számát, ez az érték alacsonyabb maradt az endotélsejtekben hasonló körülmények között észleltnél.

Megvizsgáltuk a hiperozmotikus stressz hatását is. Eredményeink alapján a mannitollal kiváltott hiperozmotikus stressz igen erőteljes tirozin foszforilációt indukál agyi endotélsejtekben. A foszforiláció általunk azonosított célfehérjéi a β-catenin, illetve az Axl receptor tirozin kináz. A β-catenin tirozin foszforilációja a cadherintől való disszociációjához és redisztribúciójához vezet. A folyamat egyik mediátora kísérleteink eredményei alapján az Src-kináz. Mivel a β-catenin a junkcionális komplexum egyik fontos alkotóeleme, Src mediálta foszforilációja szerepet játszhat a mannitol indukálta reverzíbilis vér-agy gát megnyílásban. Hiperozmotikus mannitol hatására tirozin foszforilálódik és ezáltal aktiválódik az Axl is. Kimutattuk, hogy az Axl az Akt-on keresztül fejti ki hatását, és szerepe van az agyi endotélsejtek apoptózisának szabályozásában. Aktiválódás mellett azonban az Axl le is bomlik, amelynek révén két 50-55 kDa C-terminális peptid keletkezik. Kimutattuk, hogy a lebomlás két lépcsőben megy végbe, az első lépésben metalloproteinázok hasítják az Axl, amit egy proteaszóma függő lépés követ.

A vér-agy gát – tekintettel arra, hogy a központi idegrendszer nem rendelkezik nyirokkeringéssel – meghatározó szerepet játszik rosszindulatú daganatok agyi metasztázisainak kialakulásában. Mivel a daganatos sejtek transzmigrációjára vonatkozóan kevés adat áll rendelkezésre, megvizsgáltuk, hogy az egyik legnagyobb százalékban agyi metasztázist képző daganat, a melanóma sejtjei miként vándorolnak át a vér-agy gáton. Kimutattuk, hogy az adhéziót követően a melanóma sejtek képesek átvándorolni az agyi endotélsejt rétegeken, és ezen vándorlás során az interendoteliális kapcsolatok sérülnek.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a vándorlás paracellulárisan, az endotélsejtek között (is) történhet. A transzmigráció során a melanóma sejtek jelentős mennyiségű proteázt szabadítanak fel, amelyek közül nekünk a szepráz nevű szerin-proteázt sikerült azonosítanunk.

Munkánkkal erősíteni szerettük volna azt a felismerést, hogy a vér-agy gát fontos szerepet játszik különböző megbetegedések patomechanizmusában és terápiájában egyaránt. Az általunk feltárt mechanizmusok értékes adatokat szolgáltathatnak potenciálisan új terápiás célpontok meghatározásához.

8. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA

Munkánk elsősorban alapkutatási jellegű volt, amelynek fő célja a vér-agy gát működésének molekuláris szintű megértése volt. Kísérleteink tervezésénél azonban fontos szempont volt, hogy a kísérleti körülmények valamilyen in vivo folyamatot tükrözzenek, mint amilyen az agyi hipoxia vagy gyulladásos megbetegedések. Így, ha nem is várható eredményeinknek azonnali klinikai hasznosítása, a feltárt mechanizmusok alapjául szolgálhatnak új terápiás stratégiák kidolgozásához.

A junkcionális fehérjék szabályozása egy sikerrel kecsegtető célpont lehet. Az occludin fokozott proteaszomális lebontása például jelentős szerepet játszik az irritábilis colon szindróma kialakulásában, így célszerűnek tűnik a folyamat gátlásának megkísérlése ebben a kórképpben. Eredményeink ugyanakkor rámutatnak, hogy vérzéses sokkban, vagy a központi idegrendszer gyulladásos megbetegedéseinek terápiája során is érdemes figyelmet szentelni a vér-agy gát integritásának védelmére. Különösen érdekes lehet az Axl mint terápiás célpont, hiszen olyan fontos celluláris folyamatokban vesz részt, mint a sejtmigráció. Ezen a területen gyógyszerfejlesztő céggel együttműködve teszteljük az Axl inhibitorok lehetséges alkalmazását.

Reményeink szerint a melanóma agyi metasztázisai kialakulásának gátlásában lehet hasznosítani az általunk feltárt proteolitikus mechanizmusokat, különös tekintettel a szeprázra. Specifikus szepráz inhibitorok – amelyek fejlesztése irodalmi ismereteink szerint folyamatban van – szükségesek az elképzelések alátámasztásához.

A vér-agy gátat érintő különböző patológiás folyamatok vizsgálatára adaptált in vitro vér-agy gát modell a gyógyszeripar érdeklődésére is számot tarthat. A modell alkalmas különböző farmakonok és a vér-agy interakcióinak vizsgálatára, ilyenek például: gyógyszerjelöltek permeabilitást befolyásoló hatása, illetve a vér-agy gáton való átjutásának közepes áteresztőképességű tesztelése, efflux transzporterekkel való kölcsönhatása, és az agyi metasztázisképzés, illetve daganatos sejtek endoteliális adhéziójának vizsgálata. Ezeken a területeken aktív együttműködést is folytatunk biotechnológiai cégekkel.

133

9. IRODALOMJEGYZÉK

Aaku-Saraste E, Hellwig A, Huttner WB Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. Dev Biol. 1996 Dec 15;180(2):664-79.

Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nat Rev Neurosci. 2006 Jan;7(1):41-53.

Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. Neurobiol Dis. 2010 Jan;37(1):13-25

Abbruscato TJ, Davis TP. Combination of hypoxia/aglycemia compromises in vitro blood-brain barrier integrity. J Pharmacol Exp Ther. 1999 May;289(2):668-75.

Abbruscato TJ, Lopez SP, Mark KS, Hawkins BT, Davis TP. Nicotine and cotinine modulate cerebral microvascular permeability and protein expression of ZO-1 through nicotinic acetylcholine receptors expressed on brain endothelial cells. J Pharm Sci. 2002 Dec;91(12):2525-38.

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitinproteasome pathway. EMBO J. 1997 Jul 1;16(13):3797-804.

Abriel H, Kamynina E, Horisberger JD, Staub O. Regulation of the cardiac voltage-gated Na+ channel (H1) by the ubiquitin-protein ligase Nedd4. FEBS Lett. 2000 Jan 28;466(2-3):377-80.380.

Agnel M, Esnaud H, Langer SZ, Graham D. Pharmacological characterization of the cloned human 5-hydroxytryptamine transporter. Biochem Pharmacol. 1996 May 3;51(9):1145-51.

Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. Immunol Lett. 2003 Jan 22;85(2):85-95.

Albrecht-Buehler G. The phagokinetic tracks of 3T3 cells. Cell. 1977 Jun;11(2):395-404.

Anderson GM, Horne WC. Activators of protein kinase C decrease serotonin transport in human platelets. Biochim Biophys Acta. 1992 Nov 17;1137(3):331-7.

András IE, Pu H, Tian J, Deli MA, Nath A, Hennig B, Toborek M. Signaling mechanisms of HIV-1 Tat-induced alterations of claudin-5 expression in brain endothelial cells. J Cereb Blood Flow Metab. 2005 Sep;25(9):1159-70.

András IE, Deli MA, Veszelka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. J Cereb Blood Flow Metab. 2007 Aug;27(8):1431-43.

Andreeva AY, Krause E, Muller EC, Blasig IE, Utepbergenov DI. Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. J Biol Chem. 2001 Oct 19;276(42):38480-6.

Aoki T, Nishimura M, Ishibashi R, Kataoka H, Takagi Y, Hashimoto N. Toll-like receptor 4 expression during cerebral aneurysm formation. Laboratory investigation. J Neurosurg. 2010 Oct;113(4):851-8.

Argaw AT, Gurfein BT, Zhang Y, Zameer A, John GR. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Feb 10;106(6):1977-82.

Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C. Pericytes regulate the blood-brain barrier. Nature. 2010 Nov 25;468(7323):557-61.

Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. J Neurosci. 1994 Sep;14(9):5559-69.

Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Apr 15;94(8):4155-60.

Artym VV, Kindzelskii AL, Chen WT, Petty HR. Molecular proximity of seprase and the urokinase-type plasminogen activator receptor on malignant melanoma cell membranes: dependence on beta1 integrins and the cytoskeleton. Carcinogenesis. 2002 Oct;23(10):1593-601.

Atkinson KJ, Rao RK. Role of protein tyrosine phosphorylation in acetaldehyde-induced disruption of epithelial tight junctions. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001 Jun;280(6):G1280-8.

Aurrand-Lions M, Johnson-Leger C, Wong C, Du Pasquier L, Imhof BA. Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. Blood. 2001 Dec 15;98(13):3699-707.

Bacic F, Uematsu S, McCarron RM, Spatz M. Dopaminergic receptors linked to adenylate cyclase in human cerebromicrovascular endothelium. J Neurochem. 1991 Nov;57(5):1774-80.

Badaut J, Moro V, Seylaz J, Lasbennes F. Distribution of muscarinic receptors on the endothelium of cortical vessels in the rat brain. Brain Res. 1997 Dec 5;778(1):25-33.

Balda MS, Anderson JM, Matter K. The SH3 domain of the tight junction protein ZO-1 binds to a serine protein kinase that phosphorylates a region C-terminal to this domain. FEBS Lett. 1996 Dec 16;399(3):326-32.

Balda MS, Matter K. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. EMBO J. 2000 May 2;19(9):2024-33.

Banks WA. Mouse models of neurological disorders: a view from the blood-brain barrier. Biochim Biophys Acta. 2010 Oct;1802(10):881-8.

Basuroy S, Sheth P, Kuppuswamy D, Balasubramanian S, Ray RM, Rao RK. Expression of kinaseinactive c-Src delays oxidative stress-induced disassembly and accelerates calcium-mediated reassembly of tight junctions in the Caco-2 cell monolayer. J Biol Chem. 2003 Apr 4;278(14):11916-24.

Bauer HC, Tontsch U. Glial-conditioned medium and attachment to ConA are essential for long-term culture of cortical neurons. Int J Dev Neurosci. 1990;8(2):151-8.

Bauer HC, Tontsch U, Amberger A, Bauer H. Gamma-glutamyl-transpeptidase (GGTP) and NA+K(+)-ATPase activities in different subpopulations of cloned cerebral endothelial cells: responses to glial stimulation. Biochem Biophys Res Commun. 1990 Apr 16;168(1):358-63.

Bauer HC, Traweger A, Zweimueller-Mayer J, Lehner C, Tempfer H, Krizbai I, Wilhelm I, Bauer H. New aspects of the molecular constituents of tissue barriers. J Neural Transm. 2011 Jan;118(1):7-21.

Beatch M, Jesaitis LA, Gallin WJ, Goodenough DA, Stevenson BR. The tight junction protein ZO-2 contains three PDZ (PSD-95/Discs-Large/ZO-1) domains and an alternatively spliced region. J Biol Chem. 1996 Oct 18;271(42):25723-6.

Benarroch EE. Glutamate transporters: diversity, function, and involvement in neurologic disease. Neurology. 2010 Jan 19;74(3):259-64.

Berl T, Siriwardana G, Ao L, Butterfield LM, Heasley LE. Multiple mitogen-activated protein kinases are regulated by hyperosmolality in mouse IMCD cells. Am J Physiol. 1997 Mar;272(3 Pt 2):F305-11.

Betanzos A, Huerta M, Lopez-Bayghen E, Azuara E, Amerena J, González-Mariscal L. The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. Exp Cell Res. 2004 Jan 1;292(1):51-66.

Blakely RD, Berson HE, Fremeau RT Jr, Caron MG, Peek MM, Prince HK, Bradley CC. Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. Nature. 1991 Nov 7;354(6348):66-70.

Bonini P, Cicconi S, Cardinale A, Vitale C, Serafino AL, Ciotti MT, Marlier LN. Oxidative stress induces p53-mediated apoptosis in glia: p53 transcription-independent way to die. J Neurosci Res. 2004 Jan 1;75(1):83-95.

Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, Minn AJ, van de Vijver MJ, Gerald WL, Foekens JA, Massagué J. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. Nature. 2009 Jun 18;459(7249):1005-9.

Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. J Cell Biol. 1969 Mar;40(3):648-77.

Brillault J, Berezowski V, Cecchelli R, Dehouck MP. Intercommunications between brain capillary endothelial cells and glial cells increase the transcellular permeability of the blood-brain barrier during ischaemia. J Neurochem. 2002 Nov;83(4):807-17.

Bronstein JM, Farber DB, Wasterlain CG. Regulation of type-II calmodulin kinase: functional implications. Brain Res Brain Res Rev. 1993 Jan-Apr;18(1):135-47.

Brown RC, Mark KS, Egleton RD, Davis TP. Protection against hypoxia-induced blood-brain barrier disruption: changes in intracellular calcium. Am J Physiol Cell Physiol. 2004 May;286(5):C1045-52.

Brust P, Bergmann R, Johannsen B. Specific binding of [3H]imipramine indicates the presence of a specific serotonin transport system on endothelial cells of porcine brain. Neurosci Lett. 1995 Jul 14;194(1-2):21-4.

Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. Cellular response to hyperosmotic stresses. Physiol Rev. 2007 Oct;87(4):1441-74.

Butt AM, Jones HC, Abbott NJ. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. J Physiol. 1990 Oct;429:47-62.

Cattelino A, Liebner S, Gallini R, Zanetti A, Balconi G, Corsi A, Bianco P, Wolburg H, Moore R, Oreda B, Kemler R, Dejana E. The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. J Cell Biol. 2003 Sep 15;162(6):1111-22.

Chaudhuri A, Yang B, Gendelman HE, Persidsky Y, Kanmogne GD. STAT1 signaling modulates HIV-1-induced inflammatory responses and leukocyte transmigration across the blood-brain barrier. Blood. 2008 Feb 15;111(4):2062-72.

Chen Y, Lu Q, Schneeberger EE, Goodenough DA. Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in rastransformed Madin-Darby canine kidney cells. Mol Biol Cell. 2000 Mar;11(3):849-62.

Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, Jeansonne B. Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. Mol Biol Cell. 2002 Apr;13(4):1227-37.

Cheng CH, Costall B, Naylor RJ, Rudd JA. The effect of 5-HT receptor ligands on the uptake of [3H]5-hydroxytryptamine into rat cortical synaptosomes. Eur J Pharmacol. 1993 Aug 3;239(1-3):211-4.

Cheng N, He R, Tian J, Ye PP, Ye RD. Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. J Immunol. 2008 Jul 1;181(1):22-6.

Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. Neuron. 1988 Oct;1(8):623-34.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987 Apr;162(1):156-9.

Citi S, Sabanay H, Jakes R, Geiger B, Kendrick-Jones J. Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. Nature. 1988 May 19;333(6170):272-6.

Citi S, Sabanay H, Kendrick-Jones J, Geiger B. Cingulin: characterization and localization. J Cell Sci. 1989 May;93 (Pt 1):107-22.

Coëffier M, Gloro R, Boukhettala N, Aziz M, Lecleire S, Vandaele N, Antonietti M, Savoye G, Bôle-Feysot C, Déchelotte P, Reimund JM, Ducrotté P. Increased proteasome-mediated degradation of occludin in irritable bowel syndrome. Am J Gastroenterol. 2010 May;105(5):1181-8.

Cohen Z, Bouchelet I, Olivier A, Villemure JG, Ball R, Stanimirovic DB, Hamel E. Multiple microvascular and astroglial 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in human brain: molecular and pharmacologic characterization. J Cereb Blood Flow Metab. 1999 Aug;19(8):908-17.

Cohen Z, Molinatti G, Hamel E. Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. J Cereb Blood Flow Metab. 1997 Aug;17(8):894-904.

Conklin BS, Zhao W, Zhong DS, Chen C. Nicotine and cotinine up-regulate vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells. Am J Pathol. 2002 Feb;160(2):413-8.

Constantin D, Cordenier A, Robinson K, Ala'Aldeen DA, Murphy S. Neisseria meningitidisinduced death of cerebrovascular endothelium: mechanisms triggering transcriptional activation of inducible nitric oxide synthase. J Neurochem. 2004 Jun;89(5):1166-74.

Cornford EM, Braun LD, Oldendorf WH. Carrier mediated blood-brain barrier transport of choline and certain choline analogs. J Neurochem. 1978 Feb;30(2):299-308.

Costa M, Bellosta P, Basilico C. Cleavage and release of a soluble form of the receptor tyrosine kinase ARK in vitro and in vivo. J Cell Physiol. 1996 Sep;168(3):737-44.

Cranmer LD, Trevor KT, Bandlamuri S, Hersh EM. Rodent models of brain metastasis in melanoma. Melanoma Res. 2005 Oct;15(5):325-56.

Crone C, Christensen O. Electrical resistance of a capillary endothelium. J Gen Physiol. 1981 Apr;77(4):349-71.

Cucina A, Sapienza P, Borrelli V, Corvino V, Foresi G, Randone B, Cavallaro A, Santoro-D'Angelo L. Nicotine reorganizes cytoskeleton of vascular endothelial cell through platelet-derived growth factor BB. J Surg Res. 2000 Aug;92(2):233-8.

Cuevas P, Gutierrez-Diaz JA, Reimers D, Dujovny M, Diaz FG, Ausman JI. Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries. Anat Embryol (Berl). 1984;170(2):155-9.

Dallasta LM, Pisarov LA, Esplen JE, Werley JV, Moses AV, Nelson JA, Achim CL. Blood-brain barrier tight junction disruption in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. Am J Pathol. 1999 Dec;155(6):1915-27.

D'Arcangelo D, Ambrosino V, Giannuzzo M, Gaetano C, Capogrossi MC. Axl receptor activation mediates laminar shear stress anti-apoptotic effects in human endothelial cells. Cardiovasc Res. 2006 Sep 1;71(4):754-63.

D'Arcangelo D, Gaetano C, Capogrossi MC. Acidification prevents endothelial cell apoptosis by Axl activation. Circ Res. 2002 Oct 4;91(7):e4-12.

DeBault LE, Cancilla PA. gamma-Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. Science. 1980 Feb 8;207(4431):653-5.

Delaloye J, Roger T, Steiner-Tardivel QG, Le Roy D, Knaup Reymond M, Akira S, Petrilli V, Gomez CE, Perdiguero B, Tschopp J, Pantaleo G, Esteban M, Calandra T. Innate immune sensing

of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome. PLoS Pathog. 2009 Jun;5(6):e1000480.

Deli MA, Joó F, Krizbai I, Lengyel I, Nunzi MG, Wolff JR. Calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II is present in primary cultures of cerebral endothelial cells. J Neurochem. 1993 May;60(5):1960-3.

Deli MA, Dehouck MP, Abrahám CS, Cecchelli R, Joó F. Penetration of small molecular weight substances through cultured bovine brain capillary endothelial cell monolayers: the early effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. Exp Physiol. 1995 Jul;80(4):675-8.

Denker BM, Saha C, Khawaja S, Nigam SK. Involvement of a heterotrimeric G protein alpha subunit in tight junction biogenesis. J Biol Chem. 1996 Oct 18;271(42):25750-3.

Di Ciano C, Nie Z, Szászi K, Lewis A, Uruno T, Zhan X, Rotstein OD, Mak A, Kapus A. Osmotic stress-induced remodeling of the cortical cytoskeleton. Am J Physiol Cell Physiol. 2002 Sep;283(3):C850-65.

Di Ciano-Oliveira C, Sirokmány G, Szászi K, Arthur WT, Masszi A, Peterson M, Rotstein OD, Kapus A. Hyperosmotic stress activates Rho: differential involvement in Rho kinase-dependent MLC phosphorylation and NKCC activation. Am J Physiol Cell Physiol. 2003 Sep;285(3):C555-66.

Dingledine R, McBain CJ, McNamara JO. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. Trends Pharmacol Sci. 1990 Aug;11(8):334-8.

Dinudom A, Harvey KF, Komwatana P, Young JA, Kumar S, Cook DI. Nedd4 mediates control of an epithelial Na+ channel in salivary duct cells by cytosolic Na+. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jun 9;95(12):7169-73.

Djuricic B, Röhn G, Paschen W, Hossmann KA. Protein synthesis in the hippocampal slice: transient inhibition by glutamate and lasting inhibition by ischemia. Metab Brain Dis. 1994 Sep;9(3):235-47.

Dobrogowska DH, Vorbrodt AW. Immunogold localization of tight junctional proteins in normal and osmotically-affected rat blood-brain barrier. J Mol Histol. 2004 Jun;35(5):529-39.

Dolman D, Drndarski S, Abbott NJ, Rattray M. Induction of aquaporin 1 but not aquaporin 4 messenger RNA in rat primary brain microvessel endothelial cells in culture. J Neurochem. 2005 May;93(4):825-33.

Domoki F, Kis B, Gáspár T, Bari F, Busija DW. Cerebromicrovascular endothelial cells are resistant to L-glutamate. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008 Oct;295(4):R1099-108.

Drewes LR, Conway WP, Gilboe DD. Net amino acid transport between plasma and erythrocytes and perfused dog brain. Am J Physiol. 1977 Oct;233(4):E320-5.

Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. Eur J Biochem. 2000 Aug;267(16):4912-6.

Duffy HS, John GR, Lee SC, Brosnan CF, Spray DC. Reciprocal regulation of the junctional proteins claudin-1 and connexin43 by interleukin-1beta in primary human fetal astrocytes. J Neurosci. 2000 Dec 1;20(23):RC114)

Dunn R, Hicke L. Domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase required for receptor-mediated and fluid-phase endocytosis. Mol Biol Cell. 2001 Feb;12(2):421-35.

Durieu-Trautmann O, Foignant N, Strosberg AD, Couraud PO. Coexpression of beta 1- and beta 2adrenergic receptors on bovine brain capillary endothelial cells in culture. J Neurochem. 1991 Mar;56(3):775-81.

Duvernoy H, Delon S, Vannson JL. The vascularization of the human cerebellar cortex. Brain Res Bull. 1983 Oct;11(4):419-80.

Dux E, Joó F. Effects of histamine on brain capillaries. Fine structural and immunohistochemical studies after intracarotid infusion. Exp Brain Res. 1982;47(2):252-8.

Duzgun SA, Rasque H, Kito H, Azuma N, Li W, Basson MD, Gahtan V, Dudrick SJ, Sumpio BE. Mitogen-activated protein phosphorylation in endothelial cells exposed to hyperosmolar conditions. J Cell Biochem. 2000 Jan;76(4):567-71.

Ebnet K, Schulz CU, Meyer Zu Brickwedde MK, Pendl GG, Vestweber D. Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. J Biol Chem. 2000 Sep 8;275(36):27979-88.

Eguchi S, Hirata Y, Imai T, Marumo F. Endothelin receptor subtypes are coupled to adenylate cyclase via different guanyl nucleotide-binding proteins in vasculature. Endocrinology. 1993 Feb;132(2):524-9.

Eguchi R, Suzuki A, Miyakaze S, Kaji K, Ohta T. Hypoxia induces apoptosis of HUVECs in an in vitro capillary model by activating proapoptotic signal p38 through suppression of ERK1/2. Cell Signal. 2007 Jun;19(6):1121-31.

Eguchi R, Toné S, Suzuki A, Fujimori Y, Nakano T, Kaji K, Ohta T. Possible involvement of caspase-6 and -7 but not caspase-3 in the regulation of hypoxia-induced apoptosis in tube-forming endothelial cells. Exp Cell Res. 2009 Jan 15;315(2):327-35.

Ehrlich, P. Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus, Eine Farbenanalytische Studie. Habilitation thesis, Berlin 1885.

Ekström-Jodal B, Larsson LE. Effects of dopamine of cerebral circulation and oxygen metabolism in endotoxic shock: an experimental study in dogs. Crit Care Med. 1982 Jun;10(6):375-7.

Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. Nature. 1995 Jun 15;375(6532):599-603.

Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. J Biol Chem. 1998 Nov 6;273(45):29745-53.

Farrell CL, Shivers RR. Capillary junctions of the rat are not affected by osmotic opening of the blood-brain barrier. Acta Neuropathol. 1984;63(3):179-89.

Feng S, Cen J, Huang Y, Shen H, Yao L, Wang Y, Chen Z. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins. PLoS One. 2011;6(8):e20599.

Findley MK, Koval M. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. IUBMB Life. 2009 Apr;61(4):431-7.

Fischer S, Wobben M, Marti HH, Renz D, Schaper W. Hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1. Microvasc Res. 2002 Jan;63(1):70-80.

Fischer S, Wiesnet M, Marti HH, Renz D, Schaper W. Simultaneous activation of several second messengers in hypoxia-induced hyperpermeability of brain derived endothelial cells. J Cell Physiol. 2004 Mar;198(3):359-69.

Fischer S, Nishio M, Peters SC, Tschernatsch M, Walberer M, Weidemann S, Heidenreich R, Couraud PO, Weksler BB, Romero IA, Gerriets T, Preissner KT. Signaling mechanism of extracellular RNA in endothelial cells. FASEB J. 2009 Jul;23(7):2100-9.

Förster C, Burek M, Romero IA, Weksler B, Couraud PO, Drenckhahn D. Differential effects of hydrocortisone and TNFalpha on tight junction proteins in an in vitro model of the human bloodbrain barrier. J Physiol. 2008 Apr 1;586(7):1937-49.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. J Cell Biol. 1993 Dec;123(6 Pt 2):1777-88.

Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. J Cell Biol. 1998 Jun 29;141(7):1539-50.

Gallicchio M, Mitola S, Valdembri D, Fantozzi R, Varnum B, Avanzi GC, Bussolino F. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated endothelial cell activation by Axl tyrosine kinase receptor. Blood. 2005 Mar 1;105(5):1970-6.

Garfinkel S, Hu X, Prudovsky IA, McMahon GA, Kapnik EM, McDowell SD, Maciag T. FGF-1dependent proliferative and migratory responses are impaired in senescent human umbilical vein endothelial cells and correlate with the inability to signal tyrosine phosphorylation of fibroblast growth factor receptor-1 substrates. J Cell Biol. 1996 Aug;134(3):783-91.

Gatsios P, Terstegen L, Schliess F, Häussinger D, Kerr IM, Heinrich PC, Graeve L. Activation of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway by osmotic shock. J Biol Chem. 1998 Sep 4;273(36):22962-8.

Gavard J, Gutkind JS. VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango. Nat Cell Biol. 2008 Aug;10(8):883-5.

Ghassemifar MR, Sheth B, Papenbrock T, Leese HJ, Houghton FD, Fleming TP. Occludin TM4(-): an isoform of the tight junction protein present in primates lacking the fourth transmembrane domain. J Cell Sci. 2002 Aug 1;115(Pt 15):3171-80.

Giepmans BN, Moolenaar WH. The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. Curr Biol. 1998 Jul 30-Aug 13;8(16):931-4.

Gilmore BF, Lynas JF, Scott CJ, McGoohan C, Martin L, Walker B. Dipeptide proline diphenyl phosphonates are potent, irreversible inhibitors of seprase (FAPalpha). Biochem Biophys Res Commun. 2006 Jul 28;346(2):436-46.

Gobbel GT, Chan TY, Gregory GA, Chan PH. Response of cerebral endothelial cells to hypoxia: modification by fructose-1,6-bisphosphate but not glutamate receptor antagonists. Brain Res. 1994 Aug 8;653(1-2):23-30.

Gonzalez-Mariscal L, Contreras RG, Bolívar JJ, Ponce A, Chávez De Ramirez B, Cereijido M. Role of calcium in tight junction formation between epithelial cells. Am J Physiol. 1990 Dec;259(6 Pt 1):C978-86.

González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. Biochim Biophys Acta. 2008 Mar;1778(3):729-56.

Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS, Louvard D. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 1;93(20):10779-84.

Greenwood J, Luthert PJ, Pratt OE, Lantos PL. Hyperosmolar opening of the blood-brain barrier in the energy-depleted rat brain. Part 1. Permeability studies. J Cereb Blood Flow Metab. 1988 Feb;8(1):9-15.

Greenwood J, Pryce G, Devine L, Male DK, dos Santos WL, Calder VL, Adamson P. SV40 large T immortalised cell lines of the rat blood-brain and blood-retinal barriers retain their phenotypic and immunological characteristics. J Neuroimmunol. 1996 Dec;71(1-2):51-63.

Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Apr 15;88(8):3460-4.

Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. J Biol Chem. 2002 Jan 4;277(1):455-61.

Haorah J, Knipe B, Leibhart J, Ghorpade A, Persidsky Y. Alcohol-induced oxidative stress in brain endothelial cells causes blood-brain barrier dysfunction. J Leukoc Biol. 2005 Dec;78(6):1223-32.

Hasanbasic I, Cuerquis J, Varnum B, Blostein MD. Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Ax1-mediated survival of endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Sep;287(3):H1207-13.

Haseloff RF, Blasig IE, Bauer HC, Bauer H. In search of the astrocytic factor(s) modulating bloodbrain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. Cell Mol Neurobiol. 2005 Feb;25(1):25-39.

Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. J Cell Biol. 1998 Apr 6;141(1):199-208.

Hawkins BT, Abbruscato TJ, Egleton RD, Brown RC, Huber JD, Campos CR, Davis TP. Nicotine increases in vivo blood-brain barrier permeability and alters cerebral microvascular tight junction protein distribution. Brain Res. 2004 Nov 19;1027(1-2):48-58.

Hawkins BT, Egleton RD, Davis TP. Modulation of cerebral microvascular permeability by endothelial nicotinic acetylcholine receptors. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Jul;289(1):H212-9.

Hawkins RA, Mans AM. in Handbook of Neurochemistry (Lajtha A., ed), Plenum Publishing Corp., New York, 1983, Vol. 3, p. 259-294.

Hedley-Whyte ET, Lorenzo AV, Hsu DW. Protein transport across cerebral vessels during metrazole-induced convulsions. Am J Physiol. 1977 Sep;233(3):C74-85.

Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. J Cell Biol. 2001 Apr 30;153(3):543-53.

Hernandez S, Chavez Munguia B, Gonzalez-Mariscal L. ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture. Exp Cell Res. 2007 May 1;313(8):1533-47.

Herron GS, Banda MJ, Clark EJ, Gavrilovic J, Werb Z. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. J Biol Chem. 1986 Feb 25;261(6):2814-8.

Hess DC, Bhutwala T, Sheppard JC, Zhao W, Smith J. ICAM-1 expression on human brain microvascular endothelial cells. Neurosci Lett. 1994 Feb 28;168(1-2):201-4.

Hicke L. Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. Trends Cell Biol. 1999 Mar;9(3):107-12.

Hoffman BJ, Mezey E, Brownstein MJ. Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants. Science. 1991 Oct 25;254(5031):579-80.

Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Zendman AJ, Cornelissen IM, Ruiter DJ, van Muijen GN. Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. Br J Cancer. 1999 Nov;81(5):774-82.

Hoheisel D, Nitz T, Franke H, Wegener J, Hakvoort A, Tilling T, Galla HJ. Hydrocortisone reinforces the blood-brain properties in a serum free cell culture system. Biochem Biophys Res Commun. 1998 Jun 18;247(2):312-5.

Holland SJ, Powell MJ, Franci C, Chan EW, Friera AM, Atchison RE, McLaughlin J, Swift SE, Pali ES, Yam G, Wong S, Lasaga J, Shen MR, Yu S, Xu W, Hitoshi Y, Bogenberger J, Nör JE, Payan DG, Lorens JB. Multiple roles for the receptor tyrosine kinase axl in tumor formation. Cancer Res. 2005 Oct 15;65(20):9294-303.

Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. Annu Rev Neurosci. 1994;17:31-108.

Hopkins AM, Walsh SV, Verkade P, Boquet P, Nusrat A. Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. J Cell Sci. 2003 Feb 15;116(Pt 4):725-42.

Hopkins AM, Pineda AA, Winfree LM, Brown GT, Laukoetter MG, Nusrat A. Organized migration of epithelial cells requires control of adhesion and protrusion through Rho kinase effectors. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007 Mar;292(3):G806-17.

Houle F, Poirier A, Dumaresq J, Huot J. DAP kinase mediates the phosphorylation of tropomyosin-1 downstream of the ERK pathway, which regulates the formation of stress fibers in response to oxidative stress. J Cell Sci. 2007 Oct 15;120(Pt 20):3666-77.

Howarth AG., Hughes MR., Stevenson BR. Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. Am. J. Physiol. 1992; 262:C461–C469.

Howarth AG, Singer KL, Stevenson BR Analysis of the distribution and phosphorylation state of ZO-1 in MDCK and nonepithelial cells. J Membr Biol. 1994 Feb;137(3):261-70.

Howarth AG, Stevenson BR. Molecular environment of ZO-1 in epithelial and non-epithelial cells. Cell Motil Cytoskeleton. 1995;31(4):323-32.

Huang W, Eum SY, András IE, Hennig B, Toborek M. PPARalpha and PPARgamma attenuate HIV-induced dysregulation of tight junction proteins by modulations of matrix metalloproteinase and proteasome activities. FASEB J. 2009 May;23(5):1596-606.

Hung TJ, Kemphues KJ. PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in Caenorhabditis elegans embryos. Development. 1999 Jan;126(1):127-35.

Hutchison HT, Eisenberg HM, Haber B. High-affinity transport of glutamate in rat brain microvessels. Exp Neurol. 1985 Feb;87(2):260-9.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell. 1992 Apr 3;69(1):11-25.

Hyttel J. Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). Int Clin Psychopharmacol. 1994 Mar;9 Suppl 1:19-26.

Ide N, Hata Y, Nishioka H, Hirao K, Yao I, Deguchi M, Mizoguchi A, Nishimori H, Tokino T, Nakamura Y, Takai Y. Localization of membrane-associated guanylate kinase (MAGI)-1/BAI-associated protein (BAP) 1 at tight junctions of epithelial cells. Oncogene. 1999 Dec 16;18(54):7810-5.

Igarashi Y, Utsumi H, Chiba H, Yamada-Sasamori Y, Tobioka H, Kamimura Y, Furuuchi K, Kokai Y, Nakagawa T, Mori M, Sawada N. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Jul 22;261(1):108-12.

Ikeda W, Nakanishi H, Miyoshi J, Mandai K, Ishizaki H, Tanaka M, Togawa A, Takahashi K, Nishioka H, Yoshida H, Mizoguchi A, Nishikawa S, Takai Y. Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. J Cell Biol. 1999 Sep 6;146(5):1117-32.

Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epitheliummesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. J Cell Sci. 2003 May 15;116(Pt 10):1959-67.

Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. J Cell Biol. 2005 Dec 19;171(6):939-45.

Inoko A, Itoh M, Tamura A, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. Expression and distribution of ZO-3, a tight junction MAGUK protein, in mouse tissues. Genes Cells. 2003 Nov;8(11):837-45.

Ishizaki T, Chiba H, Kojima T, Fujibe M, Soma T, Miyajima H, Nagasawa K, Wada I, Sawada N. Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways. Exp Cell Res. 2003 Nov 1;290(2):275-88.

Islas S, Vega J, Ponce L, González-Mariscal L. Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. Exp Cell Res. 2002 Mar 10;274(1):138-48.

Itoh M, Morita K, Tsukita S. Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. J Biol Chem. 1999 Feb 26;274(9):5981-6. (a)

Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junctionassociated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. J Cell Biol. 1999 Dec 13;147(6):1351-63. (b)

Ivanov DB, Philippova MP, Tkachuk VA. Structure and functions of classical cadherins. Biochemistry (Mosc). 2001 Oct;66(10):1174-86.

Ivanov AI, McCall IC, Parkos CA, Nusrat A. Role for actin filament turnover and a myosin II motor in cytoskeleton-driven disassembly of the epithelial apical junctional complex. Mol Biol Cell. 2004 Jun;15(6):2639-51. (a)

Ivanov AI, Nusrat A, Parkos CA. Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrinmediated pathway into a unique storage compartment. Mol Biol Cell. 2004 Jan;15(1):176-88. (b)

Ivey NS, Renner NA, Moroney-Rasmussen T, Mohan M, Redmann RK, Didier PJ, Alvarez X, Lackner AA, MacLean AG. Association of FAK activation with lentivirus-induced disruption of blood-brain barrier tight junction-associated ZO-1 protein organization. J Neurovirol. 2009;15(4):312-23.

Izumi Y, Hirose T, Tamai Y, Hirai S, Nagashima Y, Fujimoto T, Tabuse Y, Kemphues KJ, Ohno S. An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of Caenorhabditis elegans polarity protein PAR-3. J Cell Biol. 1998 Oct 5;143(1):95-106.

Janigro D. Blood-brain barrier, ion homeostatis and epilepsy: possible implications towards the understanding of ketogenic diet mechanisms. Epilepsy Res. 1999 Dec;37(3):223-32.

Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. Nature. 1987 Jan 15-21;325(6101):253-7.

Jaramillo BE, Ponce A, Moreno J, Betanzos A, Huerta M, Lopez-Bayghen E, Gonzalez-Mariscal L. Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells. Exp Cell Res. 2004 Jul 1;297(1):247-58.

Jepson MA. Disruption of epithelial barrier function by H2O2: distinct responses of Caco-2 and Madin-Darby canine kidney (MDCK) strains. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2003 Feb;49(1):101-12.

Jesaitis LA, Goodenough DA. Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. J Cell Biol. 1994 Mar;124(6):949-61.

Jiao H, Wang Z, Liu Y, Wang P, Xue Y. Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult. J Mol Neurosci. 2011 Jun;44(2):130-9.

Jin T, George Fantus I, Sun J. Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. Cell Signal. 2008 Oct;20(10):1697-704.

Juurlink BH, Schültke E, Hertz L. Glutathione release and catabolism during energy substrate restriction in astrocytes. Brain Res. 1996 Feb 26;710(1-2):229-33.

Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. Glia. 1998 May;23(1):1-10.

Kago T, Takagi N, Date I, Takenaga Y, Takagi K, Takeo S. Cerebral ischemia enhances tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Jan 27;339(4):1197-203.

Kalaria RN, Harik SI. Blood-brain barrier monoamine oxidase: enzyme characterization in cerebral microvessels and other tissues from six mammalian species, including human. J Neurochem. 1987 Sep;49(3):856-64.

Kale G, Naren AP, Sheth P, Rao RK. Tyrosine phosphorylation of occludin attenuates its interactions with ZO-1, ZO-2, and ZO-3. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Mar 7;302(2):324-9.

Kanai Y, Hediger MA. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. Nature. 1992 Dec 3;360(6403):467-71.

Kapus A, Szászi K, Sun J, Rizoli S, Rotstein OD. Cell shrinkage regulates Src kinases and induces tyrosine phosphorylation of cortactin, independent of the osmotic regulation of Na+/H+ exchangers. J Biol Chem. 1999 Mar 19;274(12):8093-102.

Karlhuber GM, Bauer HC, Eckl PM. Cytotoxic and genotoxic effects of 4-hydroxynonenal in cerebral endothelial cells. Mutat Res. 1997 Nov 28;381(2):209-16.

Karnushina IL, Palacios JM, Barbin G, Dux E, Joó F, Schwartz JC. Studies on a capillary-rich fraction isolated from brain: histaminic components and characterization of the histamine receptors linked to adenylate cyclase. J Neurochem. 1980 May;34(5):1201-8.

Kato S, Nakamura H. Ultrastructural and ultracytochemical studies on the blood-brain barrier in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. Acta Neuropathol. 1989;77(5):455-64.

Katsube T, Takahisa M, Ueda R, Hashimoto N, Kobayashi M, Togashi S. Cortactin associates with the cell-cell junction protein ZO-1 in both Drosophila and mouse. J Biol Chem. 1998 Nov 6;273(45):29672-7.

Katsuno T, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M, Takeuchi K, Fujimori T, Nabeshima Y, Noda T, Tsukita S, Tsukita S. Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. Mol Biol Cell. 2008 Jun;19(6):2465-75.

Kevil CG, Oshima T, Alexander B, Coe LL, Alexander JS. H(2)O(2)-mediated permeability: role of MAPK and occludin. Am J Physiol Cell Physiol. 2000 Jul;279(1):C21-30.

Kevil CG, Oshima T, Alexander JS. The role of p38 MAP kinase in hydrogen peroxide mediated endothelial solute permeability. Endothelium. 2001;8(2):107-16.

Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Klinkert WE, Goldbrunner R, Herms J, Winkler F. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. Nat Med. 2010 Jan;16(1):116-22.

Kilic E, Kilic U, Wang Y, Bassetti CL, Marti HH, Hermann DM. The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. FASEB J. 2006 Jun;20(8):1185-7.
Kim KS, Wass CA, Cross AS. Blood-brain barrier permeability during the development of experimental bacterial meningitis in the rat. Exp Neurol. 1997 May;145(1):253-7.

Kitamura Y, Ota T, Matsuoka Y, Tooyama I, Kimura H, Shimohama S, Nomura Y, Gebicke-Haerter PJ, Taniguchi T. Hydrogen peroxide-induced apoptosis mediated by p53 protein in glial cells. Glia. 1999 Jan 15;25(2):154-64.

Klein A, Olendrowitz C, Schmutzler R, Hampl J, Schlag PM, Maass N, Arnold N, Wessel R, Ramser J, Meindl A, Scherneck S, Seitz S. Identification of brain- and bone-specific breast cancer metastasis genes. Cancer Lett. 2009 Apr 18;276(2):212-20.

Ko BC, Lam AK, Kapus A, Fan L, Chung SK, Chung SS. Fyn and p38 signaling are both required for maximal hypertonic activation of the osmotic response element-binding protein/tonicity-responsive enhancer-binding protein (OREBP/TonEBP). J Biol Chem. 2002 Nov 29;277(48):46085-92.

Koenig H, Trout JJ, Goldstone AD, Lu CY. Capillary NMDA receptors regulate blood-brain barrier function and breakdown. Brain Res. 1992 Aug 21;588(2):297-303.

Koff JL, Shao MX, Ueki IF, Nadel JA. Multiple TLRs activate EGFR via a signaling cascade to produce innate immune responses in airway epithelium. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008 Jun;294(6):L1068-75.

Kolev K, Skopál J, Simon L, Csonka E, Machovich R, Nagy Z. Matrix metalloproteinase-9 expression in post-hypoxic human brain capillary endothelial cells: H2O2 as a trigger and NF-kappaB as a signal transducer. Thromb Haemost. 2003 Sep;90(3):528-37.

Korhonen H, Fisslthaler B, Moers A, Wirth A, Habermehl D, Wieland T, Schütz G, Wettschureck N, Fleming I, Offermanns S. Anaphylactic shock depends on endothelial Gq/G11. J Exp Med. 2009 Feb 16;206(2):411-20.

Korshunov VA, Daul M, Massett MP, Berk BC. Axl mediates vascular remodeling induced by deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. Hypertension. 2007 Dec;50(6):1057-62.

Koto T, Takubo K, Ishida S, Shinoda H, Inoue M, Tsubota K, Okada Y, Ikeda E.Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells. Am J Pathol. 2007 Apr;170(4):1389-97.

Krizbai IA, Deli MA. Signalling pathways regulating the tight junction permeability in the bloodbrain barrier. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2003 Feb;49(1):23-31.

Kroll RA, Neuwelt EA. Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. Neurosurgery. 1998 May;42(5):1083-99.

Kubota H, Chiba H, Takakuwa Y, Osanai M, Tobioka H, Kohama G, Mori M, Sawada N. Retinoid X receptor alpha and retinoic acid receptor gamma mediate expression of genes encoding tightjunction proteins and barrier function in F9 cells during visceral endodermal differentiation. Exp Cell Res. 2001 Feb 1;263(1):163-72.

Kuhlmann CR, Gerigk M, Bender B, Closhen D, Lessmann V, Luhmann HJ. Fluvastatin prevents glutamate-induced blood-brain-barrier disruption in vitro. Life Sci. 2008 Jun 20;82(25-26):1281-7.

Kuhlmann CR, Zehendner CM, Gerigk M, Closhen D, Bender B, Friedl P, Luhmann HJ. MK801 blocks hypoxic blood-brain-barrier disruption and leukocyte adhesion. Neurosci Lett. 2009 Jan 16;449(3):168-72.

Kumar R, Yoneda J, Bucana CD, Fidler IJ. Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. Int J Oncol. 1998 Apr;12(4):749-57.

Lacaz-Vieira F, Jaeger MM, Farshori P, Kachar B. Small synthetic peptides homologous to segments of the first external loop of occludin impair tight junction resealing. J Membr Biol. 1999 Apr 1;168(3):289-97.

Lagrange P, Romero IA, Minn A, Revest PA. Transendothelial permeability changes induced by free radicals in an in vitro model of the blood-brain barrier. Free Radic Biol Med. 1999 Sep;27(5-6):667-72.

Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, Cand F, Christé G, Gulino-Debrac D, Vilgrain I, Huber P. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. Circ Res. 2005 Feb 18;96(3):384-91.

Lanaspa MA, Andres-Hernando A, Rivard CJ, Dai Y, Berl T. Hypertonic stress increases claudin-4 expression and tight junction integrity in association with MUPP1 in IMCD3 cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Oct 14;105(41):15797-802.

Lechuga S, Alarcón L, Solano J, Huerta M, Lopez-Bayghen E, González-Mariscal L. Identification of ZASP, a novel protein associated to Zona occludens-2. Exp Cell Res. 2010 Nov 15;316(19):3124-39.

Lee JS, Kim SY, Kwon CH, Kim YK. EGFR-dependent ERK activation triggers hydrogen peroxide-induced apoptosis in OK renal epithelial cells. Arch Toxicol. 2006 Jun;80(6):337-46.

Lehner C, Gehwolf R, Tempfer H, Krizbai I, Hennig B, Bauer HC, Bauer H. Oxidative stress and blood-brain barrier dysfunction under particular consideration of matrix metalloproteinases. Antioxid Redox Signal. 2011 Sep 1;15(5):1305-23.

Lekieffre D, Callebert J, Plotkine M, Boulu RG. Concomitant increases in the extracellular concentrations of excitatory and inhibitory amino acids in the rat hippocampus during forebrain ischemia. Neurosci Lett. 1992 Mar 16;137(1):78-82.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell. 1997 Feb 7;88(3):323-31.

Lewis A, Di Ciano C, Rotstein OD, Kapus A. Osmotic stress activates Rac and Cdc42 in neutrophils: role in hypertonicity-induced actin polymerization. Am J Physiol Cell Physiol. 2002 Feb;282(2):C271-9.

Li B, Zhao WD, Tan ZM, Fang WG, Zhu L, Chen YH. Involvement of Rho/ROCK signalling in small cell lung cancer migration through human brain microvascular endothelial cells. FEBS Lett. 2006 Jul 24;580(17):4252-60.

Liang S, Dong C. Integrin VLA-4 enhances sialyl-Lewisx/a-negative melanoma adhesion to and extravasation through the endothelium under low flow conditions. Am J Physiol Cell Physiol. 2008 Sep;295(3):C701-7.

Liao JK, Homey CJ. The release of endothelium-derived relaxing factor via alpha 2-adrenergic receptor activation is specifically mediated by Gi alpha 2. J Biol Chem. 1993 Sep 15;268(26):19528-33.

Liebner S, Fischmann A, Rascher G, Duffner F, Grote EH, Kalbacher H, Wolburg H. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. Acta Neuropathol. 2000 Sep;100(3):323-31.

Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine CS. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. Neuron. 1996 Oct;17(4):607-15.

Lisman JE, Goldring MA. Feasibility of long-term storage of graded information by the Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase molecules of the postsynaptic density. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Jul;85(14):5320-4.

Liu LB, Xue YX, Liu YH, Wang YB. Bradykinin increases blood-tumor barrier permeability by down-regulating the expression levels of ZO-1, occludin, and claudin-5 and rearranging actin cytoskeleton. J Neurosci Res. 2008 Apr;86(5):1153-68.

Lok J, Sardi SP, Guo S, Besancon E, Ha DM, Rosell A, Kim WJ, Corfas G, Lo EH. Neuregulin-1 signaling in brain endothelial cells. J Cereb Blood Flow Metab. 2009 Jan;29(1):39-43.

Loos T, Dekeyzer L, Struyf S, Schutyser E, Gijsbers K, Gouwy M, Fraeyman A, Put W, Ronsse I, Grillet B, Opdenakker G, Van Damme J, Proost P. TLR ligands and cytokines induce CXCR3 ligands in endothelial cells: enhanced CXCL9 in autoimmune arthritis. Lab Invest. 2006 Sep;86(9):902-16.

Löscher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. Prog Neurobiol. 2005 May;76(1):22-76.

Lossinsky AS, Song MJ, Wisniewski HM. High voltage electron microscopic studies of endothelial cell tubular structures in the mouse blood-brain barrier following brain trauma. Acta Neuropathol. 1989;77(5):480-8.

Lu W, Bucana CD, Schroit AJ. Pathogenesis and vascular integrity of breast cancer brain metastasis. Int J Cancer. 2007 Mar 1;120(5):1023-6.

Lunn JA, Rozengurt E. Hyperosmotic stress induces rapid focal adhesion kinase phosphorylation at tyrosines 397 and 577. Role of Src family kinases and Rho family GTPases. J Biol Chem. 2004 Oct 22;279(43):45266-78.

Mack AF, Wolburg H. Growing axons in fish optic nerve are accompanied by astrocytes interconnected by tight junctions. Brain Res. 2006 Aug 4;1103(1):25-31.

Mackie K, Lai Y, Nairn AC, Greengard P, Pitt BR, Lazo JS. Protein phosphorylation in cultured endothelial cells. J Cell Physiol. 1986 Sep;128(3):367-74.

Madri JA, Reidy MA, Kocher O, Bell L. Endothelial cell behavior after denudation injury is modulated by transforming growth factor-beta1 and fibronectin. Lab Invest. 1989 Jun;60(6):755-65.

Mahajan SD, Aalinkeel R, Sykes DE, Reynolds JL, Bindukumar B, Adal A, Qi M, Toh J, Xu G, Prasad PN, Schwartz SA. Methamphetamine alters blood brain barrier permeability via the modulation of tight junction expression: Implication for HIV-1 neuropathogenesis in the context of drug abuse. Brain Res. 2008 Apr 8;1203:133-48.

Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M, Schulzke JD. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. J Cell Sci. 2000 Jun;113 (Pt 11):2085-90.

Mankertz J, Waller JS, Hillenbrand B, Tavalali S, Florian P, Schöneberg T, Fromm M, Schulzke JD. Gene expression of the tight junction protein occludin includes differential splicing and alternative promoter usage. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Nov 15;298(5):657-66.

Marchenko SM, Sage SO. Hyperosmotic but not hyposmotic stress evokes a rise in cytosolic Ca2+ concentration in endothelium of intact rat aorta. Exp Physiol. 2000 Mar;85(2):151-7.

Mark KS, Davis TP. Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Apr;282(4):H1485-94.

Martìn-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. J Cell Biol. 1998 Jul 13;142(1):117-27.

Maruki C, Spatz M, Ueki Y, Nagatsu I, Bembry J. Cerebrovascular endothelial cell culture: metabolism and synthesis of 5-hydroxytryptamine. J Neurochem. 1984 Aug;43(2):316-9.

Mathews MT, Berk BC. PARP-1 inhibition prevents oxidative and nitrosative stress-induced endothelial cell death via transactivation of the VEGF receptor 2. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 Apr;28(4):711-7.

Mathur AB, Collinsworth AM, Reichert WM, Kraus WE, Truskey GA. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. J Biomech. 2001 Dec;34(12):1545-53.

Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. Bioessays. 1992 Jul;14(7):455-63.

Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. Semin Cancer Biol. 2005 Aug;15(4):300-8.

Mazzon E, Cuzzocrea S. Role of TNF-alpha in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. Respir Res. 2007 Oct 30;8:75.

McCord JM, Roy RS. The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. Can J Physiol Pharmacol. 1982 Nov;60(11):1346-52.

McKenzie JA, Riento K, Ridley AJ. Casein kinase I epsilon associates with and phosphorylates the tight junction protein occludin. FEBS Lett. 2006 Apr 17;580(9):2388-94.

McNeil E, Capaldo CT, Macara IG. Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. Mol Biol Cell. 2006 Apr;17(4):1922-32.

Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. Trends Pharmacol Sci. 1990 Sep;11(9):379-87.

Mercer J, Mahmoudi M, Bennett M. DNA damage, p53, apoptosis and vascular disease. Mutat Res. 2007 Aug 1;621(1-2):75-86.

Meyer TN, Schwesinger C, Ye J, Denker BM, Nigam SK. Reassembly of the tight junction after oxidative stress depends on tyrosine kinase activity. J Biol Chem. 2001 Jun 22;276(25):22048-55.

Meyer TN, Schwesinger C, Denker BM. Zonula occludens-1 is a scaffolding protein for signaling molecules. Galpha(12) directly binds to the Src homology 3 domain and regulates paracellular permeability in epithelial cells. J Biol Chem. 2002 Jul 12;277(28):24855-8.

Minagar A, Alexander JS, Kelley RE, Harper M, Jennings MH. Proteomic analysis of human cerebral endothelial cells activated by glutamate/MK-801: significance in ischemic stroke injury. J Mol Neurosci. 2009 Jun;38(2):182-92.

Monsky WL, Lin CY, Aoyama A, Kelly T, Akiyama SK, Mueller SC, Chen WT. A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. Cancer Res. 1994 Nov 1;54(21):5702-10.

Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. J Cell Biol. 1999 Oct 4;147(1):185-94.

Morley P, Small DL, Murray CL, Mealing GA, Poulter MO, Durkin JP, Stanimirovic DB. Evidence that functional glutamate receptors are not expressed on rat or human cerebromicrovascular endothelial cells. J Cereb Blood Flow Metab. 1998 Apr;18(4):396-406.

Mrsulja BB, Stanimirović D, Mićić DV, Spatz M. Excitatory amino acid receptors, oxido-reductive processes and brain oedema following transient ischaemia in gerbils. Acta Neurochir Suppl (Wien). 1990;51:180-2.

Müller SL, Portwich M, Schmidt A, Utepbergenov DI, Huber O, Blasig IE, Krause G. The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. J Biol Chem. 2005 Feb 4;280(5):3747-56.

Murakami T, Felinski EA, Antonetti DA. Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. J Biol Chem. 2009 Jul 31;284(31):21036-46.

Murawski MR, McGinnes LW, Finberg RW, Kurt-Jones EA, Massare MJ, Smith G, Heaton PM, Fraire AE, Morrison TG. Newcastle disease virus-like particles containing respiratory syncytial virus G protein induced protection in BALB/c mice, with no evidence of immunopathology. J Virol. 2010 Jan;84(2):1110-23.

Muresan Z, Paul DL, Goodenough DA. Occludin 1B, a variant of the tight junction protein occludin. Mol Biol Cell. 2000 Feb;11(2):627-34.

Musil LS, Le AC, VanSlyke JK, Roberts LM. Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. J Biol Chem. 2000 Aug 18;275(33):25207-15

Muyderman H, Nilsson M, Sims NR. Highly selective and prolonged depletion of mitochondrial glutathione in astrocytes markedly increases sensitivity to peroxynitrite. J Neurosci. 2004 Sep 15;24(37):8019-28.

Nag S, Robertson DM, Dinsdale HB. Cerebral cortical changes in acute experimental hypertension: An ultrastructural study. Lab Invest. 1977 Feb;36(2):150-61.

Nag S. Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels. In: The Blood-Brain Barrier. Biology and Research Protocols. (Ed. Nag S.), Humana Press, Totowa, New Jersey, 2003, p. 3-36.

Nagamoto T, Eguchi G, Beebe DC. Alpha-smooth muscle actin expression in cultured lens epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000 Apr;41(5):1122-9.

Nagashima T, Ikeda K, Wu S, Kondo T, Yamaguchi M, Tamaki N. The mechanism of reversible osmotic opening of the blood-brain barrier: role of intracellular calcium ion in capillary endothelial cells. Acta Neurochir Suppl. 1997;70:231-3.

Nagy Z, Pappius HM, Mathieson G, Hüttner I. Opening of tight junctions in cerebral endothelium. I. Effect of hyperosmolar mannitol infused through the internal carotid artery. J Comp Neurol. 1979 Jun 1;185(3):569-78.

Nagy Z, Goehlert UG, Wolfe LS, Hüttner I. Ca2+ depletion-induced disconnection of tight junctions in isolated rat brain microvessels. Acta Neuropathol. 1985;68(1):48-52.

Nakatani Y, Sato-Suzuki I, Tsujino N, Nakasato A, Seki Y, Fumoto M, Arita H. Augmented brain 5-HT crosses the blood-brain barrier through the 5-HT transporter in rat. Eur J Neurosci. 2008 May;27(9):2466-72.

Nasdala I, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Kuhn A, Ebnet K, Brachtendorf G, Samulowitz U, Kuster B, Engelhardt B, Vestweber D, Butz S. A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. J Biol Chem. 2002 May 3;277(18):16294-303.

Navarro P, Ruco L, Dejana E. Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. J Cell Biol. 1998 Mar 23;140(6):1475-84.

Németh ZH, Deitch EA, Szabó C, Haskó G. Hyperosmotic stress induces nuclear factor-kappaB activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells. Am J Pathol. 2002 Sep;161(3):987-96.

Niedzielski AS, Wenthold RJ. Expression of AMPA, kainate, and NMDA receptor subunits in cochlear and vestibular ganglia. J Neurosci. 1995 Mar;15(3 Pt 2):2338-53.

Nilsson H, Dragomir A, Ahlander A, Johannesson M, Roomans GM. Effects of hyperosmotic stress on cultured airway epithelial cells. Cell Tissue Res. 2007 Nov;330(2):257-69.

Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. J Cell Biol. 2003 May 12;161(3):653-60.

Nordskog BK, Fields WR, Hellmann GM. Kinetic analysis of cytokine response to cigarette smoke condensate by human endothelial and monocytic cells. Toxicology. 2005 Sep 1;212(2-3):87-97.

North AJ, Brannon TS, Wells LB, Campbell WB, Shaul PW. Hypoxia stimulates prostacyclin synthesis in newborn pulmonary artery endothelium by increasing cyclooxygenase-1 protein. Circ Res. 1994 Jul;75(1):33-40.

Nusrat A, Parkos CA, Verkade P, Foley CS, Liang TW, Innis-Whitehouse W, Eastburn KK, Madara JL.Tight junctions are membrane microdomains. J Cell Sci. 2000 May;113 (Pt 10):1771-81.

O'Brien P, O'Connor BF. Seprase: an overview of an important matrix serine protease. Biochim Biophys Acta. 2008 Sep;1784(9):1130-45.

O'Bryan JP, Fridell YW, Koski R, Varnum B, Liu ET. The transforming receptor tyrosine kinase, Axl, is post-translationally regulated by proteolytic cleavage. J Biol Chem. 1995 Jan 13;270(2):551-7.

Ohnishi H, Nakahara T, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S, Furuse M. JACOP, a novel plaque protein localizing at the apical junctional complex with sequence similarity to cingulin. J Biol Chem. 2004 Oct 29;279(44):46014-22.

Ohtsuki S, Yamaguchi H, Katsukura Y, Asashima T, Terasaki T. mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. J Neurochem. 2008 Jan;104(1):147-54.

Oka T, Remue E, Meerschaert K, Vanloo B, Boucherie C, Gfeller D, Bader GD, Sidhu SS, Vandekerckhove J, Gettemans J, Sudol M. Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. Biochem J. 2010 Nov 25;432(3):461-72.

Okamoto N, Hori S, Akazawa C, Hayashi Y, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular characterization of a new metabotropic glutamate receptor mGluR7 coupled to inhibitory cyclic AMP signal transduction. J Biol Chem. 1994 Jan 14;269(2):1231-6.

Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF 3rd.The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. J Biol Chem. 2001 Mar 30;276(13):10229-33.

O'Kane RL, Martínez-López I, DeJoseph MR, Viña JR, Hawkins RA. Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. J Biol Chem. 1999 Nov 5;274(45):31891-5.

Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. Ann Neurol. 1977 May;1(5):409-17.

Olesen SP, Crone C. Substances that rapidly augment ionic conductance of endothelium in cerebral venules. Acta Physiol Scand. 1986 Jun;127(2):233-41.

Olesen SP. A calcium-dependent reversible permeability increase in microvessels in frog brain, induced by serotonin. J Physiol. 1985 Apr;361:103-13.

Ozawa M, Kemler R. Altered cell adhesion activity by pervanadate due to the dissociation of alpha-catenin from the E-cadherin.catenin complex. J Biol Chem. 1998 Mar 13;273(11):6166-70.

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Dec 5;97(25):13766-71.

Pai R, Tarnawski AS, Tran T. Deoxycholic acid activates beta-catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness. Mol Biol Cell. 2004 May;15(5):2156-63.

Palade GE. The microvascular endothelium revisited. In: Endothelial Cell Biology, (N.Simionescu and M. Simionescu, eds.), Plenum Publisching Corporation, New York, 1988, p. 3-22.

Papadopoulos MC, Koumenis IL, Yuan TY, Giffard RG. Increasing vulnerability of astrocytes to oxidative injury with age despite constant antioxidant defenses. Neuroscience. 1998 Feb;82(3):915-25.

Pardridge WM. Blood-brain barrier biology and methodology. J Neurovirol. 1999 Dec;5(6):556-69.

Parfenova H, Fedinec A, Leffler CW. Ionotropic glutamate receptors in cerebral microvascular endothelium are functionally linked to heme oxygenase. J Cereb Blood Flow Metab. 2003 Feb;23(2):190-7.

Park JH, Okayama N, Gute D, Krsmanovic A, Battarbee H, Alexander JS. Hypoxia/aglycemia increases endothelial permeability: role of second messengers and cytoskeleton. Am J Physiol. 1999 Dec;277(6 Pt 1):C1066-74.

Paspalas CD, Papadopoulos GC. Ultrastructural relationships between noradrenergic nerve fibers and non-neuronal elements in the rat cerebral cortex. Glia. 1996 Jun;17(2):133-46.

Patrick D, Betts J, Frey EA, Prameya R, Dorovini-Zis K, Finlay BB. Haemophilus influenzae lipopolysaccharide disrupts confluent monolayers of bovine brain endothelial cells via a serum-dependent cytotoxic pathway. J Infect Dis. 1992 May;165(5):865-72.

Pekny M, Stanness KA, Eliasson C, Betsholtz C, Janigro D. Impaired induction of blood-brain barrier properties in aortic endothelial cells by astrocytes from GFAP-deficient mice. Glia. 1998 Apr;22(4):390-400.

Perides G, Zhuge Y, Lin T, Stins MF, Bronson RT, Wu JK. The fibrinolytic system facilitates tumor cell migration across the blood-brain barrier in experimental melanoma brain metastasis. BMC Cancer. 2006 Mar 9;6:56.

Persidsky Y, Heilman D, Haorah J, Zelivyanskaya M, Persidsky R, Weber GA, Shimokawa H, Kaibuchi K, Ikezu T. Rho-mediated regulation of tight junctions during monocyte migration across the blood-brain barrier in HIV-1 encephalitis (HIVE). Blood. 2006 Jun 15;107(12):4770-80.

Peuchen S, Bolaños JP, Heales SJ, Almeida A, Duchen MR, Clark JB. Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. Prog Neurobiol. 1997 Jul;52(4):261-81.

Piñeiro-Sánchez ML, Goldstein LA, Dodt J, Howard L, Yeh Y, Tran H, Argraves WS, Chen WT. Identification of the 170-kDa melanoma membrane-bound gelatinase (seprase) as a serine integral membrane protease. J Biol Chem. 1997 Mar 21;272(12):7595-601.

Pines G, Danbolt NC, Bjørås M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. Nature. 1992 Dec 3;360(6403):464-7.

Piontek J, Winkler L, Wolburg H, Müller SL, Zuleger N, Piehl C, Wiesner B, Krause G, Blasig IE. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. FASEB J. 2008 Jan;22(1):146-58.

Pitelka DR, Taggart BN, Hamamoto ST. Effects of extracellular calcium depletion on membrane topography and occluding junctions of mammary epithelial cells in culture. J Cell Biol. 1983 Mar;96(3):613-24.

Piubelli C, Cecconi D, Astner H, Caldara F, Tessari M, Carboni L, Hamdan M, Righetti PG, Domenici E. Proteomic changes in rat serum, polymorphonuclear and mononuclear leukocytes after chronic nicotine administration. Proteomics. 2005 Apr;5(5):1382-94.

Plateel M, Dehouck MP, Torpier G, Cecchelli R, Teissier E. Hypoxia increases the susceptibility to oxidant stress and the permeability of the blood-brain barrier endothelial cell monolayer. J Neurochem. 1995 Nov;65(5):2138-45.

Plateel M, Teissier E, Cecchelli R. Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. J Neurochem. 1997 Feb;68(2):874-7.

Pohorecki R, Becker GL, Reilly PJ, Landers DF. Ischemic brain injury in vitro: protective effects of NMDA receptor antagonists and calmidazolium. Brain Res. 1990 Sep 24;528(1):133-7.

Povlishock JT, Becker DP, Sullivan HG, Miller JD. Vascular permeability alterations to horseradish peroxidase in experimental brain injury. Brain Res. 1978 Sep 22;153(2):223-39.

Pryshchep O, Ma-Krupa W, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. Vessel-specific Toll-like receptor profiles in human medium and large arteries. Circulation. 2008 Sep 16;118(12):1276-84.

Pu H, Tian J, Andras IE, Hayashi K, Flora G, Hennig B, Toborek M. HIV-1 Tat protein-induced alterations of ZO-1 expression are mediated by redox-regulated ERK 1/2 activation. J Cereb Blood Flow Metab. 2005 Oct;25(10):1325-35.

Qi J, Wang J, Romanyuk O, Siu CH. Involvement of Src family kinases in N-cadherin phosphorylation and beta-catenin dissociation during transendothelial migration of melanoma cells. Mol Biol Cell. 2006 Mar;17(3):1261-72.

Qian Y, Galli A, Ramamoorthy S, Risso S, DeFelice LJ, Blakely RD. Protein kinase C activation regulates human serotonin transporters in HEK-293 cells via altered cell surface expression. J Neurosci. 1997 Jan 1;17(1):45-57.

Ragette R, Fu C, Bhattacharya J. Barrier effects of hyperosmolar signaling in microvascular endothelium of rat lung. J Clin Invest. 1997 Aug 1;100(3):685-92.

Ramamoorthy JD, Ramamoorthy S, Leibach FH, Ganapathy V. Human placental monoamine transporters as targets for amphetamines. Am J Obstet Gynecol. 1995 Dec;173(6):1782-7.

Ramirez SH, Heilman D, Morsey B, Potula R, Haorah J, Persidsky Y. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) suppresses Rho GTPases in human brain microvascular endothelial cells and inhibits adhesion and transendothelial migration of HIV-1 infected monocytes. J Immunol. 2008 Feb 1;180(3):1854-65.

Ramirez SH, Potula R, Fan S, Eidem T, Papugani A, Reichenbach N, Dykstra H, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, Persidsky Y. Methamphetamine disrupts blood-brain barrier function by induction of oxidative stress in brain endothelial cells. J Cereb Blood Flow Metab. 2009 Dec;29(12):1933-45.

Rao R. Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. Ann N Y Acad Sci. 2009 May;1165:62-8.

Rao RK, Basuroy S, Rao VU, Karnaky Jr KJ, Gupta A. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. Biochem J. 2002 Dec 1;368(Pt 2):471-81.

Rapoport SI. Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. Cell Mol Neurobiol. 2000 Apr;20(2):217-30.

Raschperger E, Thyberg J, Pettersson S, Philipson L, Fuxe J, Pettersson RF. The coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis. Exp Cell Res. 2006 May 15;312(9):1566-80.

Raveendran M, Senthil D, Utama B, Shen Y, Wang J, Zhang Y, Wang XL. Effect of water-soluble fraction of cigarette smoke on human aortic endothelial cells--a proteomic approach. Cell Biol Toxicol. 2005 Jan;21(1):27-40.

Raymond JJ, Robertson DM, Dinsdale HB. Pharmacological modification of bradykinin induced breakdown of the blood-brain barrier. Can J Neurol Sci. 1986 Aug;13(3):214-20.

Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. J Cell Biol. 1967 Jul;34(1):207-17.

Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SM, Khazen S, Dijkstra CD, de Vries HE. Diapedesis of monocytes is associated with MMP-mediated occludin disappearance in brain endothelial cells. FASEB J. 2006 Dec;20(14):2550-2.

Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SM, Leyen T, Lakeman K, van Het Hof B, Vivien D, de Vries HE. The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier. J Neurochem. 2010 Apr;113(2):447-53.

Remue E, Meerschaert K, Oka T, Boucherie C, Vandekerckhove J, Sudol M, Gettemans J. TAZ interacts with zonula occludens-1 and -2 proteins in a PDZ-1 dependent manner. FEBS Lett. 2010 Oct 8;584(19):4175-80.

Renz A, Fackelmayer FO. Purification and molecular cloning of the scaffold attachment factor B (SAF-B), a novel human nuclear protein that specifically binds to S/MAR-DNA. Nucleic Acids Res. 1996 Mar 1;24(5):843-9.

Rizoli SB, Rotstein OD, Kapus A. Cell volume-dependent regulation of L-selectin shedding in neutrophils. A role for p38 mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem. 1999 Jul 30;274(31):22072-80.

Rolland Y, Demeule M, Fenart L, Béliveau R. Inhibition of melanoma brain metastasis by targeting melanotransferrin at the cell surface. Pigment Cell Melanoma Res. 2009 Feb;22(1):86-98.

Romanitan MO, Popescu BO, Winblad B, Bajenaru OA, Bogdanovic N Occludin is overexpressed in Alzheimer's disease and vascular dementia. J Cell Mol Med. 2007 May-Jun;11(3):569-79.

Romanitan MO, Popescu BO, Spulber S, Băjenaru O, Popescu LM, Winblad B, Bogdanovic N. Altered expression of claudin family proteins in Alzheimer's disease and vascular dementia brains. J Cell Mol Med. 2010 May;14(5):1088-100.

Rothen-Rutishauser B, Riesen FK, Braun A, Günthert M, Wunderli-Allenspach H. Dynamics of tight and adherens junctions under EGTA treatment. J Membr Biol. 2002 Jul 15;188(2):151-62.

Roura S, Miravet S, Piedra J, García de Herreros A, Duñach M. Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. J Biol Chem. 1999 Dec 17;274(51):36734-40.

Rousseau V, Denizot B, Le Jeune JJ, Jallet P. Early detection of liposome brain localization in rat experimental allergic encephalomyelitis. Exp Brain Res. 1999 Apr;125(3):255-64.

Roux F, Durieu-Trautmann O, Chaverot N, Claire M, Mailly P, Bourre JM, Strosberg AD, Couraud PO. Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. J Cell Physiol. 1994 Apr;159(1):101-13.

Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, Janatpour M, Liaw CW, Manning K, Morales J, Tanner LI, Tomaselli KJ, Bard F. A cell culture model of the blood-brain barrier. J Cell Biol. 1991 Dec;115(6):1725-35.

Rupnick MA, Carey A, Williams SK. Phenotypic diversity in cultured cerebral microvascular endothelial cells. In Vitro Cell Dev Biol. 1988 May;24(5):435-44.

Sade H, Holloway K, Romero IA, Male D. Transcriptional control of occludin expression in vascular endothelia: regulation by Sp3 and YY1. Biochim Biophys Acta. 2009 Mar;1789(3):175-84.

Saha C, Nigam SK, Denker BM. Involvement of Galphai2 in the maintenance and biogenesis of epithelial cell tight junctions. J Biol Chem. 1998 Aug 21;273(34):21629-33.

Saha C, Nigam SK, Denker BM. Expanding role of G proteins in tight junction regulation: Galpha(s) stimulates TJ assembly. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Jul 13;285(2):250-6.

Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. J Cell Biol. 1998 Apr 20;141(2):397-408.

Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. Mol Biol Cell. 2000 Dec;11(12):4131-42.

Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. J Cell Biol. 1997 Jun 16;137(6):1393-401.

Sato Y, Rifkin DB. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. J Cell Biol. 1989 Jul;109(1):309-15.

Satta N, Kruithof EK, Reber G, de Moerloose P. Induction of TLR2 expression by inflammatory stimuli is required for endothelial cell responses to lipopeptides. Mol Immunol. 2008 Nov;46(1):145-57.

Savettieri G, Di Liegro I, Catania C, Licata L, Pitarresi GL, D'Agostino S, Schiera G, De Caro V, Giandalia G, Giannola LI, Cestelli A. Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells. Neuroreport. 2000 Apr 7;11(5):1081-4.

Schäffler A, Arndt H, Schölmerich J, Palitzsch KD. Amelioration of hyperglycemic and hyperosmotic induced vascular dysfunction by in vivo inhibition of protein kinase C and p38 MAP kinase pathway in the rat mesenteric microcirculation. Eur J Clin Invest. 2000 Jul;30(7):586-93.

Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, Fenton MJ, Powell JD, Horton MR. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. J Immunol. 2006 Jul 15;177(2):1272-81.

Schilling L, Bultmann A, Wahl M. Lack of effect of topically applied nicotine on pial arteriole diameter and blood-brain barrier integrity in the cat. Clin Investig. 1992 Mar-Apr;70(3-4):210-7.

Schousboe A, Belhage B, Frandsen A. Role of Ca+2 and other second messengers in excitatory amino acid receptor mediated neurodegeneration: clinical perspectives. Clin Neurosci. 1997;4(4):194-8.

Schreibelt G, Kooij G, Reijerkerk A, van Doorn R, Gringhuis SI, van der Pol S, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO, Piontek J, Blasig IE, Dijkstra CD, Ronken E, de Vries HE. Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. FASEB J. 2007 Nov;21(13):3666-76.

Schroeter ML, Mertsch K, Giese H, Müller S, Sporbert A, Hickel B, Blasig IE. Astrocytes enhance radical defence in capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier. FEBS Lett. 1999 Apr 23;449(2-3):241-4.

Schubert-Unkmeir A, Konrad C, Slanina H, Czapek F, Hebling S, Frosch M. Neisseria meningitidis induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for MMP-8. PLoS Pathog. 2010 Apr 29;6(4):e1000874.

Seth A, Sheth P, Elias BC, Rao R. Protein phosphatases 2A and 1 interact with occludin and negatively regulate the assembly of tight junctions in the CACO-2 cell monolayer. J Biol Chem. 2007 Apr 13;282(15):11487-98.

Sharma HS, Olsson Y, Dey PK. Changes in blood-brain barrier and cerebral blood flow following elevation of circulating serotonin level in anesthetized rats. Brain Res. 1990 May 28;517(1-2):215-23.

Sharma HS, Westman J, Navarro JC, Dey PK, Nyberg F. Probable involvement of serotonin in the increased permeability of the blood-brain barrier by forced swimming. An experimental study using Evans blue and 131I-sodium tracers in the rat. Behav Brain Res. 1995 Dec 14;72(1-2):189-96.

Sharp CD, Houghton J, Elrod JW, Warren A, Jackson TH 4th, Jawahar A, Nanda A, Minagar A, Alexander JS. N-methyl-D-aspartate receptor activation in human cerebral endothelium promotes intracellular oxidant stress. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Apr;288(4):H1893-9.

Shen Y, Rattan V, Sultana C, Kalra VK. Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes. Am J Physiol. 1996 May;270(5 Pt 2):H1624-33.

Shivers RR, Harris RJ. Opening of the blood-brain barrier in Anolis carolinensis. A high voltage electron microscope protein tracer study. Neuropathol Appl Neurobiol. 1984 Sep-Oct;10(5):343-56.

Siegal T, Rubinstein R, Bokstein F, Schwartz A, Lossos A, Shalom E, Chisin R, Gomori JM. In vivo assessment of the window of barrier opening after osmotic blood-brain barrier disruption in humans. J Neurosurg. 2000 Apr;92(4):599-605.

Sims DE. Recent advances in pericyte biology--implications for health and disease. Can J Cardiol. 1991 Dec;7(10):431-43.

Sims NR, Nilsson M, Muyderman H. Mitochondrial glutathione: a modulator of brain cell death. J Bioenerg Biomembr. 2004 Aug;36(4):329-33.

Singh AK, Jiang Y, Gupta S, Benlhabib E. Effects of chronic ethanol drinking on the blood brain barrier and ensuing neuronal toxicity in alcohol-preferring rats subjected to intraperitoneal LPS injection. Alcohol Alcohol. 2007 Sep-Oct;42(5):385-99. (a)

Singh AK, Jiang Y, Gupta S. Effects of bacterial toxins on endothelial tight junction in vitro: a mechanism-based investigation. Toxicol Mech Methods. 2007;17(6):331-47. (b)

Singh AK, Jiang Y. How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats? Toxicology. 2004 Sep 1;201(1-3):197-207.

Sipos H, Törocsik B, Tretter L, Adam-Vizi V. Impaired regulation of pH homeostasis by oxidative stress in rat brain capillary endothelial cells. Cell Mol Neurobiol. 2005 Feb;25(1):141-51.

Siu ER, Wong EW, Mruk DD, Porto CS, Cheng CY. Focal adhesion kinase is a blood-testis barrier regulator. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jun 9;106(23):9298-303.

Smales C, Ellis M, Baumber R, Hussain N, Desmond H, Staddon JM. Occludin phosphorylation: identification of an occludin kinase in brain and cell extracts as CK2. FEBS Lett. 2003 Jun 19;545(2-3):161-6.

Smith QR. Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. J Nutr. 2000 Apr;130(4S Suppl):1016S-22S.

Snajdar RM, Busuttil SJ, Averbook A, Graham DJ. Inhibition of endothelial cell migration by cigarette smoke condensate. J Surg Res. 2001 Mar;96(1):10-6.

Sobue K, Yamamoto N, Yoneda K, Hodgson ME, Yamashiro K, Tsuruoka N, Tsuda T, Katsuya H, Miura Y, Asai K, Kato T. Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. Neurosci Res. 1999 Nov;35(2):155-64.

Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, Cantley LC. Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. Science. 1997 Jan 3;275(5296):73-7.

Sounni NE, Baramova EN, Munaut C, Maquoi E, Frankenne F, Foidart JM, Noël A. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in A2058 melanoma cells is associated with MMP-2 activation and increased tumor growth and vascularization. Int J Cancer. 2002 Mar 1;98(1):23-8.

Staddon JM, Herrenknecht K, Smales C, Rubin LL. Evidence that tyrosine phosphorylation may increase tight junction permeability. J Cell Sci. 1995 Feb;108 (Pt 2):609-19.

Stamatovic SM, Keep RF, Kunkel SL, Andjelkovic AV. Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase. J Cell Sci. 2003 Nov 15;116(Pt 22):4615-28.

Stamatovic SM, Dimitrijevic OB, Keep RF, Andjelkovic AV. Protein kinase Calpha-RhoA crosstalk in CCL2-induced alterations in brain endothelial permeability. J Biol Chem. 2006 Mar 31;281(13):8379-88.

Stasek JE Jr, Garcia JG. The role of protein kinase C in alpha-thrombin-mediated endothelial cell activation. Semin Thromb Hemost. 1992 Jan;18(1):117-25.

Steed E, Rodrigues NT, Balda MS, Matter K. Identification of MarvelD3 as a tight junctionassociated transmembrane protein of the occludin family. BMC Cell Biol. 2009 Dec 22;10:95.

Stempien-Otero A, Karsan A, Cornejo CJ, Xiang H, Eunson T, Morrison RS, Kay M, Winn R, Harlan J. Mechanisms of hypoxia-induced endothelial cell death. Role of p53 in apoptosis. J Biol Chem. 1999 Mar 19;274(12):8039-45.

Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. J Cell Biol. 1986 Sep;103(3):755-66.

Strell C, Entschladen F. Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. Cell Commun Signal. 2008 Dec 4;6:10.

Sun D, Lytle C, O'Donnell ME. IL-6 secreted by astroglial cells regulates Na-K-Cl cotransport in brain microvessel endothelial cells. Am J Physiol. 1997 Jun;272(6 Pt 1):C1829-35.

Suzuki T, Elias BC, Seth A, Shen L, Turner JR, Giorgianni F, Desiderio D, Guntaka R, Rao R. PKC eta regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jan 6;106(1):61-6.

Suzuma K, Takagi H, Otani A, Honda Y. Hypoxia and vascular endothelial growth factor stimulate angiogenic integrin expression in bovine retinal microvascular endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1998 May;39(6):1028-35.

Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. Curr Opin Cell Biol. 1993 Oct;5(5):806-11.

Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, Lathia JD, Siler DA, Chigurupati S, Ouyang X, Magnus T, Camandola S, Mattson MP. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Aug 21;104(34):13798-803.

Tao-Cheng JH, Nagy Z, Brightman MW. Tight junctions of brain endothelium in vitro are enhanced by astroglia. J Neurosci. 1987 Oct;7(10):3293-9.

Tapia R, Huerta M, Islas S, Avila-Flores A, Lopez-Bayghen E, Weiske J, Huber O, González-Mariscal L. Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle. Mol Biol Cell. 2009 Feb;20(3):1102-17.

Taya S, Yamamoto T, Kano K, Kawano Y, Iwamatsu A, Tsuchiya T, Tanaka K, Kanai-Azuma M, Wood SA, Mattick JS, Kaibuchi K. The Ras target AF-6 is a substrate of the fam deubiquitinating enzyme. J Cell Biol. 1998 Aug 24;142(4):1053-62.

Taya S, Yamamoto T, Kanai-Azuma M, Wood SA, Kaibuchi K. The deubiquitinating enzyme Fam interacts with and stabilizes beta-catenin. Genes Cells. 1999 Dec;4(12):757-67.

Teichberg VI, Cohen-Kashi-Malina K, Cooper I, Zlotnik A. Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies. Neuroscience. 2009 Jan 12;158(1):301-8.

Terranova VP, DiFlorio R, Lyall RM, Hic S, Friesel R, Maciag T. Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. J Cell Biol. 1985 Dec;101(6):2330-4.

Tilling T, Engelbertz C, Decker S, Korte D, Hüwel S, Galla HJ. Expression and adhesive properties of basement membrane proteins in cerebral capillary endothelial cell cultures. Cell Tissue Res. 2002 Oct;310(1):19-29.

Tithof PK, Elgayyar M, Cho Y, Guan W, Fisher AB, Peters-Golden M. Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause endothelial cell apoptosis by a phospholipase A2-dependent mechanism. FASEB J. 2002 Sep;16(11):1463-4.

Toborek M, Lee YW, Pu H, Malecki A, Flora G, Garrido R, Hennig B, Bauer HC, Nath A. HIV-Tat protein induces oxidative and inflammatory pathways in brain endothelium. J Neurochem. 2003 Jan;84(1):169-79.

Tonnessen BH, Severson SR, Hurt RD, Miller VM. Modulation of nitric-oxide synthase by nicotine. J Pharmacol Exp Ther. 2000 Nov;295(2):601-6.

Tontsch U, Bauer HC. Isolation, characterization, and long-term cultivation of porcine and murine cerebral capillary endothelial cells. Microvasc Res. 1989 Mar;37(2):148-61.

Tossman U, Jonsson G, Ungerstedt U. Regional distribution and extracellular levels of amino acids in rat central nervous system. Acta Physiol Scand. 1986 Aug;127(4):533-45.

Tran ND, Correale J, Schreiber SS, Fisher M. Transforming growth factor-beta mediates astrocytespecific regulation of brain endothelial anticoagulant factors. Stroke. 1999 Aug;30(8):1671-8.

Tsang MC, Lo AC, Cheung PT, Chung SS, Chung SK. Perinatal hypoxia-/ischemia-induced endothelin-1 mRNA in astrocyte-like and endothelial cells. Neuroreport. 2001 Jul 20;12(10):2265-70.

Tsapara A, Matter K, Balda MS. The heat-shock protein Apg-2 binds to the tight junction protein ZO-1 and regulates transcriptional activity of ZONAB. Mol Biol Cell. 2006 Mar;17(3):1322-30.

Tsukamoto T, Nigam SK. Cell-cell dissociation upon epithelial cell scattering requires a step mediated by the proteasome. J Biol Chem. 1999 Aug 27;274(35):24579-84.

Tsung AJ, Kargiotis O, Chetty C, Lakka SS, Gujrati M, Spomar DG, Dinh DH, Rao JS. Downregulation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) utilizing adenovirus-mediated transfer of small interfering RNA (siRNA) in a novel spinal metastatic melanoma model. Int J Oncol. 2008 Mar;32(3):557-64.

Umeda K, Matsui T, Nakayama M, Furuse K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S.Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. J Biol Chem. 2004 Oct 22;279(43):44785-94.

Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. Cell. 2006 Aug 25;126(4):741-54.

Underwood PA, Bennett FA. The effect of extracellular matrix molecules on the in vitro behavior of bovine endothelial cells. Exp Cell Res. 1993 Apr;205(2):311-9.

Unterluggauer H, Hampel B, Zwerschke W, Jansen-Dürr P. Senescence-associated cell death of human endothelial cells: the role of oxidative stress. Exp Gerontol. 2003 Oct;38(10):1149-60.

Utepbergenov DI, Fanning AS, Anderson JM. Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain. J Biol Chem. 2006 Aug 25;281(34):24671-7.

Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Häcker H, Wagner H. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. J Biol Chem. 2001 Aug 17;276(33):31332-9.

van Grevenynghe J, Monteiro P, Gilot D, Fest T, Fardel O. Human endothelial progenitors constitute targets for environmental atherogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Mar 17;341(3):763-9.

van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. Cardiovasc Res. 2008 May 1;78(2):203-12.

Veszelka S, Urbányi Z, Pázmány T, Németh L, Obál I, Dung NT, Abrahám CS, Szabó G, Deli MA. Human serum amyloid P component attenuates the bacterial lipopolysaccharide-induced increase in blood-brain barrier permeability in mice. Neurosci Lett. 2003 Nov 27;352(1):57-60.

Veszelka S, Pásztói M, Farkas AE, Krizbai I, Ngo TK, Niwa M, Abrahám CS, Deli MA. Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages. Neurochem Int. 2007 Jan;50(1):219-28.

Vogel C, Bauer A, Wiesnet M, Preissner KT, Schaper W, Marti HH, Fischer S. Flt-1, but not Flk-1 mediates hyperpermeability through activation of the PI3-K/Akt pathway. J Cell Physiol. 2007 Jul;212(1):236-43.

Wachtel M, Bolliger MF, Ishihara H, Frei K, Bluethmann H, Gloor SM. Down-regulation of occludin expression in astrocytes by tumour necrosis factor (TNF) is mediated via TNF type-1 receptor and nuclear factor-kappaB activation. J Neurochem. 2001 Jul;78(1):155-62.

Wachtel M, Frei K, Ehler E, Bauer C, Gassmann M, Gloor SM. Extracellular signal-regulated protein kinase activation during reoxygenation is required to restore ischaemia-induced endothelial barrier failure. Biochem J. 2002 Nov 1;367(Pt 3):873-9.

Walsh TG, Murphy RP, Fitzpatrick P, Rochfort KD, Guinan AF, Murphy A, Cummins PM. Stabilization of Brain Microvascular Endothelial Barrier Function by Shear Stress Involves VE-cadherin Signaling Leading to Modulation of pTyr-Occludin Levels. J Cell Physiol. 2011 Feb 1. doi: 10.1002/jcp.22655.

Wang L, McComb JG, Weiss MH, McDonough AA, Zlokovic BV. Nicotine downregulates alpha 2 isoform of Na,K-ATPase at the blood-brain barrier and brain in rats. Biochem Biophys Res Commun. 1994 Mar 30;199(3):1422-7.

Wang L, Tran ND, Kittaka M, Fisher MJ, Schreiber SS, Zlokovic BV. Thrombomodulin expression in bovine brain capillaries. Anticoagulant function of the blood-brain barrier, regional differences, and regulatory mechanisms. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997 Nov;17(11):3139-46.

Weinger JG, Omari KM, Marsden K, Raine CS, Shafit-Zagardo B. Up-regulation of soluble Axl and Mer receptor tyrosine kinases negatively correlates with Gas6 in established multiple sclerosis lesions. Am J Pathol. 2009 Jul;175(1):283-93.

Weis WI, Nelson WJ. Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. J Biol Chem. 2006 Nov 24;281(47):35593-7.

Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. FASEB J. 2005 Nov;19(13):1872-4.

Wesley UV, Albino AP, Tiwari S, Houghton AN. A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells. J Exp Med. 1999 Aug 2;190(3):311-22.

Westergaard E, van Deurs B, Brondsted HE. Increased vesicular transfer of horseradish peroxidase across cerebral endothelium, evoked by acute hypertension. Acta Neuropathol. 1977 Feb 28;37(2):141-52.

Westergren I, Nyström B, Hamberger A, Johansson BB. Amino acids in extracellular fluid in vasogenic brain edema. Acta Neurochir Suppl (Wien). 1994;60:124-7.

Wilhelm I, Fazakas C, Krizbai IA. In vitro models of the blood-brain barrier. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2011;71(1):113-28.

Williams MR, Kataoka N, Sakurai Y, Powers CM, Eskin SG, McIntire LV. Gene expression of endothelial cells due to interleukin-1 beta stimulation and neutrophil transmigration. Endothelium. 2008 Jan-Feb;15(1):73-165.

Winder AA, Wohlford-Lenane C, Scheetz TE, Nardy BN, Manzel LJ, Look DC, McCray PB Jr. Differential effects of cytokines and corticosteroids on toll-like receptor 2 expression and activity in human airway epithelia. Respir Res. 2009 Oct 16;10:96-107.

Witt KA, Mark KS, Hom S, Davis TP. Effects of hypoxia-reoxygenation on rat blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Dec;285(6):H2820-31.

Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, Krauss B, Schmid EM, Ocalan M, Farrell C, Risau W. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. J Cell Sci. 1994 May;107 (Pt 5):1347-57.

Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, Duffner F, Grote EH, Risau W, Engelhardt B. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. Acta Neuropathol. 2003 Jun;105(6):586-92

Wong V, Gumbiner BM. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. J Cell Biol. 1997 Jan 27;136(2):399-409.

Wong V. Phosphorylation of occludin correlates with occludin localization and function at the tight junction. Am J Physiol. 1997 Dec;273(6 Pt 1):C1859-67.

Wu S, Tamaki N, Nagashima T, Yamaguchi M. Reactive oxygen species in reoxygenation injury of rat brain capillary endothelial cells. Neurosurgery. 1998 Sep;43(3):577-83

Wu X, Hepner K, Castelino-Prabhu S, Do D, Kaye MB, Yuan XJ, Wood J, Ross C, Sawyers CL, Whang YE. Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Apr 11;97(8):4233-8. (a)

Wu Y, Dowbenko D, Spencer S, Laura R, Lee J, Gu Q, Lasky LA. Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase. J Biol Chem. 2000 Jul 14;275(28):21477-85. (b)

Xu J, He L, Ahmed SH, Chen SW, Goldberg MP, Beckman JS, Hsu CY. Oxygen-glucose deprivation induces inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in cerebral endothelial cells. Stroke. 2000 Jul;31(7):1744-51.

Xu J, Kausalya PJ, Phua DC, Ali SM, Hossain Z, Hunziker W. Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. Mol Cell Biol. 2008 Mar;28(5):1669-78

Yamada K, Tanaka T, Miyamoto K, Noguchi T. Sp family members and nuclear factor-Y cooperatively stimulate transcription from the rat pyruvate kinase M gene distal promoter region via their direct interactions. J Biol Chem. 2000 Jun 16;275(24):18129-37.

Yamaguchi Y, Nasu F, Harada A, Kunitomo M. Oxidants in the gas phase of cigarette smoke pass through the lung alveolar wall and raise systemic oxidative stress. J Pharmacol Sci. 2007 Mar;103(3):275-82.

Yamamoto K, de Waard V, Fearns C, Loskutoff DJ. Tissue distribution and regulation of murine von Willebrand factor gene expression in vivo. Blood. 1998 Oct 15;92(8):2791-801.

Yamamoto M, Ramirez SH, Sato S, Kiyota T, Cerny RL, Kaibuchi K, Persidsky Y, Ikezu T. Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells. Am J Pathol. 2008 Feb;172(2):521-33.

Yeom M, Shim I, Lee HJ, Hahm DH. Proteomic analysis of nicotine-associated protein expression in the striatum of repeated nicotine-treated rats. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Jan 14;326(2):321-8.

Zhang Y, Park TS, Gidday JM. Hypoxic preconditioning protects human brain endothelium from ischemic apoptosis by Akt-dependent survivin activation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007 Jun;292(6):H2573-81.

Zhao H, Miller M, Pfeiffer K, Buras JA, Stahl GL. Anoxia and reoxygenation of human endothelial cells decrease ceramide glucosyltransferase expression and activates caspases. FASEB J. 2003 Apr;17(6):723-4.

Zhong Y, Saitoh T, Minase T, Sawada N, Enomoto K, Mori M. Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. J Cell Biol. 1993 Jan;120(2):477-83.

Zidovetzki R, Chen P, Fisher M, Hofman FM, Faraci FM. Nicotine increases plasminogen activator inhibitor-1 production by human brain endothelial cells via protein kinase C-associated pathway. Stroke. 1999 Mar;30(3):651-5.

Ziegler G, Harhausen D, Schepers C, Hoffmann O, Röhr C, Prinz V, König J, Lehrach H, Nietfeld W, Trendelenburg G. TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Aug 3;359(3):574-9.

10. FÜGGELÉK

A dolgozatban felhasznált közlemények

1. Fabian G, Szabo CA, Bozo B, Greenwood J, Adamson P, Deli MA, Joo F, <u>Krizbai IA</u>, Szucs M. Expression of G-protein subtypes in cultured cerebral endothelial cells. NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL 33:(2) pp. 179-185. (1998) IF1998: 1,781 Független idéző: 12 Függő idéző: 8 Összesen: 20

2. <u>Krizbai IA</u>, Deli MA, Pestenacz A, Siklos L, Szabo CA, Andras I, Joo F. Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH 54:(6) pp. 814-819. (1998) IF1998: 2,874 Független idéző: 78 Függő idéző: 2 Összesen: 80

3. Bauer H, Stelzhammer W, Fuchs R, Weiger TM, Danninger C, Probst G, <u>Krizbai IA</u>. Astrocytes and neurons express the tight junction-specific protein occludin in vitro. EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 250:(2) pp. 434-438. (1999) IF1999: 3,256 Független idéző: 24 Függő idéző: 1 Összesen: 25

4. Brust P, Friedrich A, <u>Krizbai IA</u>, Bergmann R, Roux F, Ganapathy V, Johannsen B. Functional expression of the serotonin transporter in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY 74:(3) pp. 1241-1248. (2000) IF2000: 4,900 Független idéző: 21 Függő idéző: 4 Összesen: 25

5. <u>Krizbai IA</u>, Bauer H, Amberger A, Hennig B, Szabo H, Fuchs R, Bauer HC. Growth factor-induced morphological, physiological and molecular characteristics in cerebral endothelial cells. EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY 79:(9) pp. 594-600. (2000)

IF2000: 2,801 Független idéző: 16 Függő idéző: 3 Összesen: 19

6. Traweger A, Fang D, Liu YC, Stelzhammer W, <u>Krizbai IA</u>, Fresser F, Bauer HC, Bauer H. The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitinprotein ligase itch. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 277:(12) pp. 10201-10208. (2002)

IF2002: 6,696 Független idéző: 79 Függő idéző: 5 Összesen: 84

7. Bresgen N, Karlhuber G, <u>Krizbai I</u>, Bauer H, Bauer HC, Eckl PM. Oxidative stress in cultured cerebral endothelial cells induces chromosomal aberrations, micronuclei, and apoptosis. JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH 72:(3) pp. 327-333. (2003) IF2003: 3,374 Független idéző: 21 Függő idéző: 6 Összesen: 27

8. <u>Krizbai IA</u>, Deli MA. Signalling pathways regulating the tight junction permeability in the blood-brain barrier. CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY 49:(1) pp. 23-31. (2003)

IF2003: 1,153 Független idéző: 23 Függő idéző: 10 Összesen: 33

9. Traweger A, Fuchs R, <u>Krizbai IA</u>, Weiger TM, Bauer HC, Bauer H. The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear

ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 278:(4) pp. 2692-2700. (2003) IF2003: 6,482 Független idéző: 69 Függő idéző: 4 Összesen: 73

10. Farkas A, Szatmari E, Orbok A, Wilhelm I, Wejksza K, Nagyoszi P, Hutamekalin P, Bauer H, Bauer HC, Traweger A,<u>Krizbai IA.</u> Hyperosmotic mannitol induces Src kinasedependent phosphorylation of beta-catenin in cerebral endothelial cells. JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH 80:(6) pp. 855-861. (2005) IF2005: 3,239 Független idéző: 7 Függő idéző: 3 Összesen: 10

11. <u>Krizbai IA</u>, Lenzser G, Szatmari E, Farkas AE, Wilhelm I, Fekete Z, Erdos B, Bauer H, Bauer HC, Sandor P, Komjati K. Blood-brain barrier changes during compensated and decompensated hemorrhagic shock. SHOCK 24:(5) pp. 428-433. (2005) IF2005: 3,122 Független idéző: 9 Függő idéző: 1 Összesen: 10

12. <u>Krizbai IA</u>, Bauer H, Bresgen N, Eckl PM, Farkas A, Szatmari E, Traweger A, Wejksza K, Bauer HC. Effect of oxidative stress on the junctional proteins of cultured cerebral endothelial cells. CELLULAR AND MOLECULAR NEUROBIOLOGY 25:(1) pp. 129-139. (2005)

IF2005: 2,022 Független idéző: 41 Függő idéző: 5 Összesen: 46

13. Bresgen N, Jaksch H, Bauer HC, Eckl P, <u>Krizbai I</u>, Tempfer H. Astrocytes are more resistant than cerebral endothelial cells toward geno- and cytotoxicity mediated by short-term oxidative stress. JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH 84:(8) pp. 1821-1828. (2006)

IF2006: 3,476 Független idéző: 1 Összesen: 1

14. Balint Z, <u>Krizbai IA</u>, Wilhelm I, Farkas AE, Parducz A, Szegletes Z, Varo G. Changes induced by hyperosmotic mannitol in cerebral endothelial cells: an atomic force microscopic study. EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL WITH BIOPHYSICS LETTERS 36:(2) pp. 113-120. (2007)

IF2007: 2,238 Független idéző: 3 Függő idéző: 4 Összesen: 7

15. Wilhelm I, Farkas AE, Nagyoszi P, Varo G, Balint Z, Vegh GA, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, <u>Krizbai IA</u>. Regulation of cerebral endothelial cell morphology by extracellular calcium. PHYSICS IN MEDICINE AND BIOLOGY 52:(20) pp. 6261-6274. (2007)

IF2007: 2,528 Független idéző: 3 Függő idéző: 6 Összesen: 9

16. Hutamekalin P, Farkas AE, Orbok A, Wilhelm I, Nagyoszi P, Veszelka S, Deli MA, Buzas K, Hunyadi-Gulyas E, Medzihradszky KF, Meksuriyen D, <u>Krizbai IA</u>. Effect of nicotine and polyaromtic hydrocarbons on cerebral endothelial cells. CELL BIOLOGY INTERNATIONAL 32:(2) pp. 198-209. (2008)

IF2008: 1,619 Független idéző: 5 Függő idéző: 4 Összesen: 9

17. Traweger A, Lehner C, Farkas A, <u>Krizbai IA</u>, Tempfer H, Klement E, Guenther B, Bauer HC, Bauer H. Nuclear Zonula occludens-2 alters gene expression and junctional stability in epithelial and endothelial cells. DIFFERENTIATION 76:(1) pp. 99-106. (2008) IF2008: 3,180 Független idéző: 13 Függő idéző: 2 Összesen: 15

18. Wilhelm I, Nagyoszi P, Farkas AE, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Fazakas C, Dung NTK, Bottka S, Bauer H, Bauer HC, <u>Krizbai IA</u>. Hyperosmotic stress induces Axl activation and cleavage in cerebral endothelial cells. JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY 107:(1) pp. 116-126. (2008) IF2008: 4,500 Független idéző: 2 Függő idéző: 3 Összesen: 5

19. Nagyoszi P, Wilhelm I, Farkas AE, Fazakas C, Dung NTK, Hasko J, <u>Krizbai IA.</u> Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL 57:(5) pp. 556-564. (2010)

IF2010: 3,601 Független idéző: 1 Függő idéző: 2 Összesen: 3

20. Bauer HC, Traweger A, Zweimueller-Mayer J, Lehner C, Tempfer H, <u>Krizbai I</u>, Wilhelm I, Bauer H. New aspects of the molecular constituents of tissue barriers. JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION 118:(1) pp. 7-21. (2011) IF2010: 2,597 Független idéző: 2 Függő idéző: 2 Összesen: 4

21. Fazakas C, Wilhelm I, Nagyoszi P, Farkas AE, Hasko J, Molnar J, Bauer H, Bauer HC, Ayaydin F, Dung NTK, Siklos L, <u>Krizbai IA</u>. Transmigration of melanoma cells through the blood-brain barrier: role of endothelial tight junctions and melanoma-released serine proteases. PLOS ONE 6:(6) Paper e20758. (2011) IF2010: 4,411

22. Lehner C, Gehwolf R, Tempfer H, <u>Krizbai I</u>, Hennig B, Bauer HC, Bauer H. Oxidative stress and blood-brain barrier dysfunction under particular consideration of matrix metalloproteinases. ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING 15:(5) pp. 1-19. (2011) IF2010: 8,209 Független idéző: 7 Függő idéző: - Összesen: 7

23. Wilhelm I, Fazakas C, <u>Krizbai IA</u>. In vitro models of the blood-brain barrier. ACTA NEUROBIOLOGIAE EXPERIMENTALIS 71:(1) pp. 113-128. (2011) IF2010: 1,533

Σ IF = 79,592

A témához kapcsolódó, a dolgozatban fel nem használt közlemények

1. Deli MA, Joo F, <u>Krizbai I</u>, Lengyel I, Nunzi MG, Wolff JR. Calmodulin/calmodulinstimulated protein kinase II is present in primary cultures of cerebral endothelial cells. JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY 60: pp. 1960-1963. (1993) IF1993: 4,223 Független idéző: 12 Függő idéző: 18 Összesen: 30

2. <u>Krizbai I</u>, Deli MA, Lengyel I, Maderspach K, Pakaski M, Joo F, Wolff JR. In situ hybridization with digoxigenin labelled oligonucleotide probes: detection of CAMK-II gene expression in primary cultures of cerebral endothelial cells. NEUROBIOLOGY 1: pp. 235-240. (1993)

Független idéző: 3 Összesen: 3

3. <u>Krizbai I</u>, Szabó G, Deli M, Maderspach K, Lehel C, Oláh Z, Wolff JR, Joó F. Expression of protein kinase C family members in the cerebral endothelial cells. JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY 65: pp. 459-462. (1995) IF1995: 4,852 Független idéző: 25 Függő idéző: 7 Összesen: 32

4. Szabo CA, <u>Krizbai I</u>, Deli MA, Abraham CS, Joo F. Receptor-mediated regulation by histamine of the acid phosphatase activity in cultured cerebral endothelial cells. INFLAMMATION RESEARCH 45:(Suppl. 1) pp. S60-S61. (1996) IF1996: 2,231 Függő idéző: 4 Összesen: 4

5. Szabo CA, <u>Krizbai I</u>, Deli MA, Abraham CS, Joo F. Effects of histamine on the acid phosphatase activity of cultured cerebral endothelial cells. In: COURAUD PO, SCHERMAN D (szerk.) BIOLOGY AND PHYSIOLOGY OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER: TRANSPORT, CELLULAR INTERACTIONS, AND BRAIN PATHOLOGIES. New York ; London: Plenum Press, 1996. pp. 241-243. (ISBN:978-0306453625)

6. Kis B, Szabó CA, Pataricza J, <u>Krizbai IA</u>, Mezei Zs, Gecse Á, Telegdy Gy, Papp JGy, Deli MA. Vasoactive Substances Produced by Cultured Rat Brain Endothelial Cells. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY 368:(1) pp. 35-42. (1999) IF1999: 2,047 Független idéző: 12 Függő idéző: 18 Összesen: 30

7. Veszelka S, Pásztói M, Farkas AE, <u>Krizbai I</u>, Ngo TK, Niwa M, Abrahám CS, Deli MA. Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharideinduced damages. NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL 50:(1) pp. 219-228. (2007) IF2007: 2,975 Független idéző: 18 Függő idéző: 8 Összesen: 26

8. Vajda S, Bartha K, Wilhelm I, <u>Krizbai IA</u>, Adam-Vizi V. Identification of proteaseactivated receptor-4 (PAR-4) in puromycin-purified brain capillary endothelial cells cultured on Matrigel. NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL 52:(6) pp. 1234-1239. (2008)

IF2008: 3,228 Független idéző: 2 Összesen: 2

9. Vegh AG, Fazakas C, Nagy K, Wilhelm I, <u>Krizbai IA</u>, Nagyoszi P, Szegletes Z, Varo G. Spatial and temporal dependence of the cerebral endothelial cells elasticity. JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION 24:(3 (Sp. Iss. SI)) pp. 422-428. (2011) IF2010: 2,286

10. Sziraki I, Erdo F, Beery E, Molnar PM, Fazakas C, Wilhelm I, Makai I, Kis E, Heredi-Szabo K, Abonyi T, <u>Krizbai I</u>, Toth GK, Krajcsi P. Quinidine as an ABCB1 Probe for Testing Drug Interactions at the Blood-Brain Barrier: An In Vitro In Vivo Correlation Study. J BIOMOL SCREEN.;16:(8) pp. 886-94. (2011) IF2010: 2,500

11. Glavinas H, von Richter O, Vojnits K, Mehn D, Wilhelm I, Nagy T, Janossy J, <u>Krizbai</u> <u>I</u>, Couraud P, Krajcsi P. Calcein assay: a high-throughput method to assess P-gp inhibition. XENOBIOTICA 41:(8) pp.:712-9. (2011) IF2010: 2,707

Egyéb közlemények

1. Pestean A, <u>Krizbai I</u>, Bottcher H, Párducz Á, Joó F, Wolff JR. Identification of the Ulex europaeus agglutinin-I-binding protein as a unique glycoform of the neural cell adhesion molecule in the olfactory sensory axons of adult rats. NEUROSCIENCE LETTERS 195:(2) pp. 117-120. (1995)

IF: 2,318 Független idéző: 16 Függő idéző: 2 Összesen: 18

2. <u>Krizbai I</u>, Joo F, Pestean A, Preil J, Botcher H, Wolff JR. Localization and biochemical characterization of acid phosphatase isoforms in the olfactory system of adult rats. NEUROSCIENCE 76:(3) pp. 799-807. (1997) IF1997: 3,594 Független idéző: 5 Összesen: 5

3. Nemeth L, Szabo CA, Deli MA, Kovacs J, <u>Krizbai IA</u>, Abraham CS, Joo F. Intracarotid histamine administration results in dose-dependent vasogenic brain oedema formation in new-born pigs. INFLAMMATION RESEARCH 46:(Suppl. 1) pp. S45-S46. (1997) IF1997: 1,773 Függő idéző: 4 Összesen: 4

4. Szabo CA, Deli MA, Nemeth L, <u>Krizbai I</u>, Kovacs J, Abraham CS, Joo F. Histamineinduced vasogenic brain oedema formation in newborn pigs: a role for endothelial acid phosphatase? In: TELKEEN AW, KORF J (szerk.) NEUROCHEMISTRY: CELLULAR, MOLECULAR AND CLINICAL ASPECTS. New York: Plenum Publishing Corporation, 1997. pp. 479-483. (ISBN:978-0306457050)

5. Nemeth L, Szabo CA, Deli MA, Kovacs J, <u>Krizbai IA</u>, Abraham CS. Cerebral microvascular acid phosphatase isoenzymes may contribute to the histamine-induced changes in the blood-brain barrier permeability. NEUROSCIENCE RESEARCH COMMUNICATIONS 24:(3) pp. 125-133. (1999) IF1999: 0,989 Függő idéző: 2 Összesen: 2

6. Wolff JR, Liu WL, Bottcher H, <u>Krizbai I</u>, Joó F, Saftig P, Párducz Á. Non-conventional role of lysosomal acid phosphatase in olfactory receptor axons: colocalization with growth-associated phosphoprotein-43. NEUROSCIENCE 79:(3) pp. 887-891. (1997) IF1997: 3,594 Független idéző: 3 Összesen: 3

7. <u>Krizbai IA</u>, Katarova Z, Szabó G, Párducz Á, Wolff JR. Modulation of the truncated GAD25 by estrogen in the olfactory bulb of adult rats. NEUROREPORT 11: pp. 791-794. (2000)

IF2000: 2,696 Független idéző: 4 Függő idéző: 1 Összesen: 5

8. Pardutz A, <u>Krizbai IA</u>, Multon S, Vecsei L, Schoenen J. Systemic nitroglycerin increases nNOS levels in rat trigeminal nucleus caudalis. NEUROREPORT 11:(14) pp. 3071-3075. (2000)

IF2000: 2,696 Független idéző: 53 Függő idéző: 15 Összesen: 68

9. Webersinke G, Bauer HC, Danninger C, <u>Krizbai IA</u>, Schittny JC, Thalhamer J, Bauer H. Use of genetically modified glial cells overexpressing laminin alpha 1-chain peptides in

neurite outgrowth studies. CELLULAR AND MOLECULAR NEUROBIOLOGY 20:(6) pp. 605-621. (2000) IF2000: 2,093 Független idéző: 1 Összesen: 1

10. Letoha T, Somlai C, Takacs T, Szabolcs A, Jarmay K, Rakonczay Jr Z, Hegyi P, Varga I, Kaszaki J, <u>Krizbai I</u>, Boros I, Duda E, Kusz E, Penke B. A nuclear import inhibitory peptide ameliorates the severity of cholecystokinin-induced acute pancreatitis. WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY 11:(7) pp. 990-999. (2005) Független idéző: 16 Függő idéző: 8 Összesen: 24

11. Szabo H, Novak Z, Farkas A, <u>Krizbai I</u>. Gyulladasos mediatorok indukalta proteolitikus aktivitas szabalyozasa leguti epitelsejtekben. ALLERGOLOGIA ES KLINIKAI IMMUNOLOGIA 8: pp.192-196 (2005)

12. Szabo H, Novak Z, Bauer H, Szatmari E, Farkas A, Wejksza K, Orbok A, Wilhelm I, <u>Krizbai IA</u>. Regulation of proteolytic activity induced by inflammatory stimuli in lung epithelial cells. CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY 51:(Suppl. S) pp. OL729-OL735. (2005)

IF2005: 1,018 Független idéző: 3 Összesen: 3

Össz IF: 127,412 Független idézetek: 610

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A tudományos kutatás ma már alapvetően csapatmunka, ezért ezúton is szeretném kifejezni köszönetemet és hálámat minden kollégának, akivel kutatómunkám során együtt dolgoztam.

Köszönettel tartozom egykori tanáraimnak, elsősorban dr. Módy Jenő professzornak, aki diákkörös koromban a természettudományos gondolkodással, és a megismerés örömével megismertetett.

Szerencsésnek mondhatom magam, hogy a néhai Dr. Joó Ferenc irányítása alatt kezdhettem meg kutatómunkámat, aki a vér-agy gát rejtelmei mellett betekintést engedett a tudományos élet kulisszatitkaiba is.

Szeretném megköszönni a szakmai és sokszor emberi segítséget közvetlen munkatársaimnak, elsősorban Dr. Deli Máriának, NTK Dungnak, Dr. Farkas Attilának, Dr. Wilhelm Imolának, Dr. Nagyőszi Péternek, Fazakas Csillának, Haskó Jánosnak, Molnár Juditnak.

Köszönettel tartozom Dr. Ormos Pál akadémikusnak, aki a Biofizikai Intézet igazgatójaként támogatta a neurobiológusok, és ezáltal az én munkámat is, valamint Dr. Párducz Árpádnak és Dr. Siklós Lászlónak.

Hálás vagyok Dr. Joachim Wolff professzornak, aki mindig nagyvonalúan támogatta tudományos törekvéseimet, valamint Dr. Hans-Christian Bauer professzornak és Dr. Hannelore Bauernak, akik laboratóriumában töltöttem posztdoktori éveimet, és akikhez a mai napig szoros szakmai és baráti kötelékek fűznek.

Szeretném megköszönni családom minden tagjának a szeretetet és a támogatást, hogy megértően viselték a kutatómunkával járó távolléteket. Nélkülük ez a munka aligha jöhetett volna létre.

167