

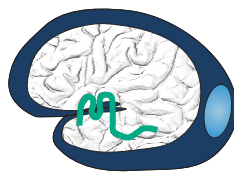
Szegedi Tudományegyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

STRESSZFAKTOROK ÁLTAL AKTIVÁLT JELÁTVITELI UTAK AGYI ENDOTÉLSEJTEKBEN

Ph.D. értekezés tézisei

Wilhelm Imola

Témavezető: Dr. Krizbai István



Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Biofizikai Intézet
Molekuláris Neurobiológiai Csoport

Szeged

-2009-

BEVEZETÉS

Az idegrendszer működéséhez elengedhetetlen az idegsejtek környezetének pontos szabályozása, a homeosztázis megteremtése és fenntartása. Ebben a vér-agy gátnak döntő szerepe van. A vér-agy gát morfológiai alapját az agyi kapillárisokat bélelő endotélsejtek képezik, amelyek szoros együttműködésben a gliasejtekkel és pericitákkal egy szelektív barriert alkotnak a vér és idegszövet között.

Az agyi endotélsejtek számos speciális tulajdonsággal rendelkeznek a perifériás endotélsejtekhez képest. Ezen tulajdonságok biztosítják a vér-agy gát funkció betöltését. Ide tartoznak a folytonosan elhelyezkedő szoros kapcsolatok (tight junction), a vezikulák és fenesztrációk kis száma, az alacsony fokú pinocitózis, a nagyszámú mitokondrium, illetve a transzportrendszerek jelenléte. A sejtek közötti kapcsolatok transzmembrán és intracelluláris fehérjékből épülnek fel, ez utóbbiak az aktin-citoszkeletonhoz kapcsolódnak. A tight junction integrális membránfehérjéi az occludin, a claudinok és a junkcionális adhéziós molekulák, míg az intracelluláris fehérjék közé tartoznak a zonula occludens (ZO) proteinek, a cingulin és a paracingulin. A junkciók közelében számos szignáltranszdukciós molekula található, melyek fontos szerepet játszanak a vér-agy gát működésének szabályozásában.

Az endotélsejtek érzékelik elsőként a keringés felől érkező különböző stresszhatásokat. Ezek közé tartozik például a pH csökkenése vagy emelkedése, az ozmotikus, illetve oxidatív stressz, változások különböző ionok koncentrációjában, stb. Ezek közül a hiperozmózist terápiásan is használják a vér-agy gát reverzibilis megnyitására, bizonyos gyógyszerek agyba való bejuttatására. A stresszfaktorokra adott válaszokat számos jelátviteli út aktiválódása szabályozza.

CÉLKITŰZÉSEK

Az agyi endotéliumot potenciálisan érintő stresszhatások közül kísérleteink során a kalcium ionok megvonása által kiváltott molekuláris változásokat és a hiperozmotikus stressz által aktivált jeltovábbító mechanizmusokat vizsgáltuk meg.

Az extracelluláris kalcium ionoknak fontos szerepe van a junkciók kialakulásában és fenntartásában. Az erre utaló adatok döntő többsége azonban epitélsejtekkel végzett kísérletekből származik, kevesebbet tudunk a kalcium ionok szerepéről agyi endotélsejtekben, illetve az ezen folyamatokat szabályozó mechanizmusokról. Ezért kísérleteinkben a következő kérdésekre kerestük a választ:

1a. Melyek azok a molekuláris mechanizmusok, amelyek a kalcium megvonás, illetve visszaadás okozta morfológiai és citoskeletális változásokat szabályozzák?

1b. Milyen mechanizmusok szabályozzák a kalcium megvonás, illetve visszaadás okozta junkcionális változásokat?

A hiperozmotikus mannitolt sikerrel alkalmazzák intenzív terápiás körülmények között a vér agy-gát átmeneti megnyitására. A hiperozmózis által aktivált jeltovábbító útvonalak azonban még nagyrészt ismeretlenek. Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a mannitol számos fehérje tirozinon történő foszforilációját okozza agyi endotélsejtekben. A foszforiláció további célfehérjéit ellenanyag mátrix segítségével kerestük. Így igazoltuk, hogy a hiperozmózis aktiválja az Axl receptor tirozin kinázt. Kísérleteinkben a következő kérdéseket próbáltuk megválaszolni:

2a. Melyek azok a fehérjék, amelyek ozmotikus stressz hatására foszforilálódnak agyi endotélsejtekben?

2b. Melyek az Axl jelátviteli út további elemei?

2c. Milyen mechanizmus áll a hiperozmózis okozta Axl lebomlás mögött?

2d. Milyen szerepe van az ozmotikus stressz által okozott Axl aktivációnak?

MÓDSZEREK

SEJT TENYÉSZTÉS

A primér patkány agyi endotélsejteket kéthetes patkányokból izoláltuk, puromicinnel szelektáltuk és patkányfarok kollagénnel bevont üveg fedőlemezeken tenyésztettük DMEM/F12 médiumban 20% PDS (plasma derived serum), 1 ng/ml bFGF (basic fibroblast growth factor) és 100 µg/ml heparin jelenlétében. A hCMEC/D3 humán agyi endotélsejteket patkányfarok kollagénnel bevont csészéken, illetve üveg fedőlemezeken tenyésztettük EGM-2 médiumban, 2,5% FBS (fetal bovine serum) jelenlétében. A sejteket 100%-os páratartalmat biztosító inkubátorban növesztettük, 5% CO₂ tartalmú atmoszférában, 37°C-on.

KEZELÉSEK

A kalcium megvonást konfluens tenyészeteken végeztük szérumentes médiumban, alapos mosás után. A következő tápoldatokat használtuk: DMEM/F12 (Sigma, D6421) normál kalcium tartalmú médium, illetve MEM (Sigma, M8167) kalciummentes médium.

Hiperozmotikus stressz kiváltására a konfluens tenyészeteket szérumentes körülmények között 20% mannitollal kezeltük 30 percig, különböző inhibitorok jelenlétében vagy hiányában.

ATOMI ERŐ MIKROSZKÓPOS MÉRÉSEK

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 összehangban, 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.

IMMUNFLUORESZCENCIA ÉS AKTIN FESTÉS

A fedőlemezeken tenyésztett sejteket kezelés után PBS-ben mostuk, majd 10 percig fixáltuk etanol/ecetsav 95/5 arányú keverékével, -20°C -on. Újabb mosás után a fedőlemezeket 1% BSA-val blokkoltuk, ezután az elsődleges, majd a fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk. Az aktin fluoreszcensen jelölt falloidinnel történő festése esetében a következő képpen jártunk el: a sejteket 4% formaldehiddel fixáltuk és acetonnal permeabilizáltuk, majd Alexa488-falloidinnel inkubáltuk (1/100 hígításban a következő pufferben: 60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 140 mM NaCl). Mosás után a fedőlemezeket víz alapú beágyazó géllal rögzítettük a tárgylemezeken. A képeket fluoreszcens mikroszkóphoz kapcsolt digitális kamerával készítettük.

ELLENANYAG MÁTRIX

A mannitol által aktivált (foszforilált) fehérjék detektálására ellenanyag-mátrixot (Hypromatrix) használtunk. Kezelés után a sejteket megmostuk, TritonX-100 tartalmú pufferben lizáltuk. A 60 ellenanyagot tartalmazó mátrixot a sejtlizátummal inkubáltuk, majd mostuk, ezután HRP-vel konjugált anti-foszfotirozin ellenanyaggal inkubáltuk, mostuk, végül kemilumineszcens szubsztrát segítségével hívtuk elő. A foszforilált fehérjéket a mátrixon való pozíciójuk alapján határoztuk meg.

WESTERN-BLOT

A sejteket PBS-sel mostuk, majd lízispufferben homogenizáltuk, melynek összetétele a következő volt: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TritonX-100, 1% deoxikolát, 0,1% SDS, 1 mM Na-vanadát, 10 mM NaF, 1 mM Pefabloc. A vízzoldékony és detergenssel szolubilizálható fehérjék elkülönítésére a következő

lízispuffereket használtuk: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Na-vanadát, 10 mM NaF, 1 mM Pefabloc (vízoldékony fehérjék számára), illetve 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TritonX-100, 1 mM Na-vanadát, 10 mM NaF, 1 mM Pefabloc (detergenssel szolubilizálható fehérjék számára). A mintákat egy órán át jégen inkubáltuk, majd lecentrifugáltuk (10000 x g, 4°C, 10 perc). A fehérje koncentrációt BCA módszerrel határoztuk meg.

Azonos mennyiségű fehérjét tartalmazó mintákat SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választottunk el, majd PVDF vagy nitrocellulóz 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 szubsztrát segítségével hívtuk elő.

IMMUNPRECIPITÁLÁS

A sejtlizátumot 2 µg anti-Axl, illetve 5 µg anti-foszfotirozin ellenanyaggal inkubáltuk 4 órán át. A képződött immunkomplexeket szefaróz gyöngyökhöz kötött G fehérje jelenlétében precipitáltuk, majd mostuk és SDS jelenlétében oldottuk fel. A mintákat ezután Western-blot analízisre használtuk.

GÉNCSENDESÍTÉS

Az Axl gén csendesítésére a következő szekvenciákat használtuk:

5'-CAGGAACTGCATGCTGAATGAGAA-3' és

5'-TTCTCATTTCAGCATGCAGTTCCTGG-3'.

50% konfluenciájú sejteket 10 nM RNS-sel transzfektáltunk Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen) reagenssel 6 órán keresztül, két egymást követő napon. A hiperozmotikus kezelés a második transzfekeció után következett, amikor a tenyészet konfluenssé vált.

REAL-TIME PCR

A sejtekből TRIzol reagens segítségével RNS-t izoláltunk, ezt standard protokoll szerint cDNS-sé írtuk át. Az amplifikáció BioRad iQ5 készüléken történt FastStart SYBR Green Mix (Roche) segítségével, a következő primerekkel:

-Gas6: 5'-TGCTGTCATGAAAATCGCGG-3' és 5'-CATGTAGTCCAGGCTGTAGA-3' ,

-Axl: 5'-GGTGGCTGTGAAGACGATGA-3' és 5'-CTCAGATACTCCATGCCACT-3',

-GAPDH: 5'-GTGAAGGTCGGTGTCAACG-3' és 5'-GTGAAGACGCCAGTAGACTC-3'.

Az eredmények kiértékelése a BioRad szoftverével történt.

AZ APOPTOTIKUS SEJTEK SZÁMÁNAK MEGHATÁROZÁSA

Az Axl gén csendesítése után a sejteket 20% mannitollal kezeltük 3 órán át. Ezután immunfestés következett egy olyan ellenanyaggal, amely a hasított kaszpáz-3 fehérjét ismeri fel. A sejtmagokat Hoechst 33342-vel festettük. 1000 sejtet vizsgáltunk meg fedőlemezenként és megszámoltuk a hasított kaszpáz-3 ellenanyaggal jelölt sejteket.

EREDMÉNYEK

AZ EXTRACELLULÁRIS KÁLCIUM MEGVONÁS, ILLETVE VISSZAADÁS OKOZTA VÁLTOZÁSOK AGYI ENDOTÉLSEJTEKBEN

A RHO-KINÁZ SZEREPE A KÁLCIUM MEGVONÁS ÁLTAL OKOZOTT MORFOLÓGIAI VÁLTOZÁSOK SZABÁLYOZÁSÁBAN

Atomi erő mikroszkóppal követtük a kalcium megvonás és visszaadás által okozott morfológiai változásokat élő agyi endotélsejteken. Konfluens tenyészeteket kalciummentes tápfolyadékba helyeztünk, később a sejtek visszakapták a normál

kálcium tartalmú médiumot.

A tenyészetet 150 percig kálciummentes oldatban tartva a sejtek eltávolodtak egymástól, és láthatóvá vált a tenyésztési felszín. A sejtek lekerekedtek, és a magasságuk a sejtmag felett 1,5 μm -ről 3 μm -re nőtt. A jelenség visszafordítható volt: 1-2 órával a normál kálcium tartalmú médium visszaadása után a morfológiai változások eltűntek. A sejtek fokozatosan betakarták a szabad felszíneket és visszanyerték eredeti magasságukat és alakjukat.

A kálciummentes médiumhoz 10 μm Y27632 Rho-kináz inhibitor adva meg tudtuk akadályozni a morfológiai változások kialakulását. A tenyészet konfluens maradt, megmaradt a sejtek kinyúlt és lapos alakja, és a magasságuk sem nőtt meg.

A RHO-KINÁZ SZEREPE A KÁLCIUM MEGVONÁS ÁLTAL OKOZOTT JUNKCIONÁLIS VÁLTOZÁSOK SZABÁLYOZÁSÁBAN

Immunfestés segítségével tanulmányoztuk a kálcium megvonás és visszaadás által a junkcionális fehérjék lokalizációjában okozott változásokat. Várakozásainknak megfelelően kálcium megvonás hatására csökkent a ZO-1 és claudin-5 tight junction fehérjék mennyisége a sejtmembránban. A folyamat reverzibilis volt: a normál kálcium tartalmú médiumban visszaállt a junkcionális fehérjék folyamatos festődése a sejtmembránban. A Rho-kináz inhibitor azonban megakadályozta a junkciók szétesését a kálcium hiányos környezetben. Az inhibitor nem volt hatással a kontroll sejtek szoros kapcsolataira, illetve a junkciók visszaalakulására sem.

A RHO-KINÁZ SZEREPE A KÁLCIUM MEGVONÁS ÁLTAL OKOZOTT CITOSZKELETÁLIS VÁLTOZÁSOK SZABÁLYOZÁSÁBAN

Mivel a junkcionális fehérjék közvetlenül kapcsolódnak az aktin-citoszkeletonhoz, és a Rho-kináz szerepet játszik az aktin reorganizációjában, megvizsgáltuk az aktin változásait különböző extracelluláris kálcium ion koncentrációk jelenlétében. Fluoreszcensen jelölt falloidin segítségével kimutattuk, hogy a kálcium megvonás nagyfokú változást okoz az aktinszálak elrendeződésében.

Kontroll körülmények között citoplazmikus stressz szálak és perifériás filamentumok voltak jelen, míg kalcium hiányában egy erőteljes aktin gyűrű képződött az egymástól eltávolodott sejtekben, amely részben kolokalizálódott a szétesett junkciókkal. Az Y27632 nevű Rho-kináz inhibitor megakadályozta az aktin reorganizációját.

A citoskeletális változásokat atomi erő mikroszkóppal is követni tudtuk. A kalcium hiányos körülmények között megjelenő perifériás aktin gyűrű jól kivehető volt a magassági képeken.

Mindezen eredményeket összefoglalva, kimutattuk, hogy a Rho-kináz szerepet játszik az extracelluláris kalcium megvonás okozta morfológiai, junkcionális és citoskeletális változások kialakulásában. További kísérletek segítségével lehetne eldönteni, hogy a Rho-kináz közvetlenül foszforilálja-e a junkcionális fehérjét vagy pedig a citoskeletális tenzió növelése által vezet a kapcsolatok széteséséhez.

A HIPEROZMOTIKUS STRESSZ OKOZTA MOLEKULÁRIS VÁLTOZÁSOK AGYI ENDOTÉLSEJTEKBEN

HIPEROZMÓZIS HATÁSÁRA AKTIVÁLÓDIK AZ AXL-AKT ÚTVONAL

Ellenanyag mátrix segítségével olyan fehérjét kerestünk, amelyek ozmotikus stressz hatására foszforilálódnak agyi endotélsejtekben. Ezen módszerrel alátámasztottuk korábbi eredményeinket, melyek szerint a β -catenin és az ERK1 foszforilálódik hiperozmotikus körülmények között agyi endotélsejtekben, illetve azokat az irodalmi adatokat, melyek a p130Cas és a focal adhesion kinase nevű fehérjék aktivációjára utalnak. Ugyanakkor az ozmotikus stressz okozta tirozin foszforiláció egy új célfehérjét is megtaláltuk, amely az Axl receptor tirozin kináz.

Az Axl egy számos sejttípusban expresszálandó fehérje, amely fontos szerepet játszik a sejtek proliferációjában, migrációjában, túlélésében és különböző

stresszfaktorokra adott válaszában. Ozmotikus stressz hatására bekövetkező foszforilációját immunprecipitációs módszerekkel is igazoltuk. Ugyanakkor azt is bebizonyítottuk, hogy az Axl aktivációja az Akt (protein kináz B) foszforilációjához vezet, hiszen az Akt hiperozmózis indukálta foszforilációját megakadályozta az Axl gén csendesítése.

AZ OZMOTIKUS STRESSZ AZ AXL LEBOMLÁSÁHOZ VEZET

Azt is megfigyeltük, hogy a hiperozmotikus mannitol kezelés nemcsak az Axl foszforilációjához, hanem annak lebontásához is vezetett. 20% mannitol hatására egy kettős proteolitikus sáv jelent meg 50-55 kDa magasságban, és ezzel párhuzamosan csökkent a 140 kDa-os Axl mennyisége. Az Axl mRNS mennyisége nem változott, viszont lokalizációjában markáns különbség volt a kontroll és a mannitol-kezelt sejtek között. Izoozmotikus körülmények esetén az Axl diffúz elrendeződést mutatott a sejtekben, míg hiperozmózis hatására egy perinukleáris festődés jelent meg.

Az Axl lebontását nemcsak mannitollal tudtuk kiváltani, hanem hasonló ozmotikus koncentrációban alkalmazott arabinóz vagy NaCl segítségével is. Ezzel ellentétben az urea, amely sejtp permeábilis, és így hiperozmotikus koncentrációban sem vezet a sejtek zsugorodásához, nem okozott Axl hasítást. Kimutattuk, hogy a hipertóniás Axl degradáció nemcsak agyi endotélsejtekre jellemző, hanem epitél és glióma sejtekre is.

A következő lépésben az Axl lebontásának mechanizmusát kerestük. A 140 kDa-os Axl mennyiségének csökkenését és a proteolitikus sávok megjelenését egy metalloproteáz gátló, a GM6001 segítségével tudtuk megakadályozni. Ugyanakkor az MG132 proteaszóma inhibitor meggátolta a kisebb molekulásúlyú degradációs termék megjelenését. Ezen eredmények alapján valószínűsíthető, hogy az Axl lebontása két lépésben zajlik le: a metalloproteáz-függő hasítást egy proteaszomális degradáció követi. Azt is kimutattuk, hogy a nagyobb molekulásúlyú proteolitikus termék – a 140 kDa-os teljes Axl fehérjéhez hasonlóan – csak detergenssekkel szolubilizálható, míg a kisebb móltömegű fragmentum vízdoldékony.

AZ AXL FOSZFORILÁCIÓJA ÉS LEBONTÁSA EGYMÁSTÓL FÜGGETLEN FOLYAMATOK

Az Axl foszforilációja 2 perc kezelés után kezdődött és 15 perc után érte el maximumát, míg a lebomlás 10 perc kezelés után vált nyilvánvalóvá. Azt is észrevettük, hogy a degradációs termékek is foszforiláltak. Kíváncsiak voltunk arra, hogy van-e összefüggés az aktiváció és a lebontás között. Eredményeink alapján nem a foszforiláció okozza a lebomlást, hiszen ha a foszforilációt pervanadáttal, egy nem specifikus foszfatáz inhibitorral váltottuk ki, a degradáció nem következett be. Ugyanerre utal az is, hogy a genisztein nevű tirozin kináz gátló, amely megakadályozta az Axl foszforilációját, nem befolyásolta a lebomlást. Ugyanakkor a metalloproteáz inhibitorral, amellyel a lebomlást gátoltuk, nem tudtuk megakadályozni az Axl-Akt jelátviteli út aktiválódását, vagyis a foszforiláció nem a degradáció következménye.

AZ AXL AKTIVÁCIÓJA GÁTOLJA AZ OZMOTIKUS STRESSZ ÁLTAL INDUKÁLT APOPTÓZIST

Feltételeztük, hogy a hiperozmózis által indukált Axl aktivációnak szerepe van az apoptózis kivédésében. Ennek tisztázására 20% mannitollal kezeltünk vad típusú, illetve olyan sejteket, amelyekben csendesítettük az Axl gént. Hasított kaszpáz-3 immunfestéssel kimutattuk, hogy az Axl csendesítése 40%-kal növelte az apoptotikus sejtek számát az ozmotikus stressznek kitett sejtekben. Ez arra utal, hogy az Axl-nak szerepe van a hiperozmózis okozta sejthalál csökkentésében.

Eredményeinket összefoglalva, kimutattuk, hogy agyi endotélsejtekben ozmotikus stressz hatására aktiválódik az Axl receptor tirozin kináz és ezen keresztül az Akt (protein kináz B). Az Axl-Akt útvonal aktiválódása szerepet játszik az apoptózis kivédésében. Az Axl azonban nemcsak foszforilálódik, hanem el is hasad hiperozmotikus körülmények között, és ez a folyamat metalloproteáz- és proteaszóma-függő.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az agyi endotélsejtek, melyek a vér-agy gát morfológiai alapját képezik, elsődleges célpontjai a vér felől érkező különböző stresszfaktoroknak. Az ezekre adott válaszreakcióik során a sejtek számos jelátviteli utat aktiválhatnak. Kísérleteinkben két szignáltranszdukciós molekulát tanulmányoztunk, a Rho-kinázt és az Axl-t.

A folytonosan elhelyezkedő szoros kapcsolatok jelenléte az agyi endotélsejtek membránjában a vér-agy gát fenotípus egyik alapvető eleme. Ezért igen fontosnak tartjuk a junkciók szabályozásának megismerését. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a Rho-kináz fontos szerepet játszik az interendoteliális kapcsolatok szétesésében alacsony kalcium koncentráció jelenlétében. A Rho-kináz részt vesz a kalcium megvonás okozta citoskeletális átrendeződésben, a junkcionális fehérjék membránból való eltávolításában és a sejtek egymástól való elszakadásában.

Egy másik kísérletsorozatban a hipertóniás stressz hatására bekövetkező változásokat vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy az Axl-Akt szignalizációs útvonal aktiválódása védi a sejteket az ozmotikus stressz okozta programozott sejthaláltól. Ugyanakkor, az Axl foszforilációját egy metalloproteáz- és proteaszóma-függő lebomlás követi. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az ozmotikus stressz úgy pro-, mint anti-apoptotikus mechanizmusokat indukál, és a sejtek túlélése precíz szabályozás alatt áll.

Eredményeinket összefoglalva, megállapítottuk, hogy a Rho-kináz és az Axl két fontos jelátvivő molekula, amelyek különböző folyamatokat szabályoznak agyi endotélsejtekben. A Rho-kináznak a citoskeleton és a junkciók szabályozásában van szerepe, míg az Axl a sejtek túlélésének biztosításában vesz részt.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni Dr. Krizbai Istvánnak az útmutatást, a bátorítást és a sok segítséget, amelyet munkám során tőle kaptam. Tőle tanultam a legtöbbet a tudományról.

Köszönetemet fejezem ki a Molekuláris Neurobiológiai Laboratórium korábbi és jelenlegi vezetőjének, Dr. Párducz Árpádnak és Dr. Siklós Lászlónak, valamint a csoport összes tagjának. Külön köszönet illeti Ngo Thi Khue Dung-ot a sejttenyésztéshez nyújtott segítségével és Dr. Váró Györgyöt és munkatársait az atomi erő mikroszkópos eredményekért.

Nagyon hálás vagyok Farkas E. Attilának, Nagyősi Péternek és Fazakas Csillának a közös munkáért és az együtt eltöltött idő minden percéért. Nélkülük nem születhettek volna meg ezek az eredmények és sokkal kevesebbet nevettem volna.

Szeretettel és hálával gondolok sok-sok barátra, tanárra és kollégára, akiket nem áll módomban név szerint említeni, akik azonban sokat segítettek egyetemi és doktori tanulmányaim során. Köszönöm Istvánnak, hogy mellettem állt a nehéz pillanatokban. Nagy hatással volt rám és sokat jelent számomra a családom, akik nélkül nem jutottam volna ide.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:

I. Wilhelm I, Nagyősz P, Farkas AE, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Fazakas C, Dung NT, Bottka S, Bauer H, Bauer HC, Krizbai IA. Hyperosmotic stress induces Axl activation and cleavage in cerebral endothelial cells. *J Neurochem.* 2008, **107**:116-26. IF₂₀₀₇: 4,451

II. Wilhelm I, Farkas AE, Nagyősz P, Váró G, Bálint Z, Végh GA, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Krizbai IA. Regulation of cerebral endothelial cell morphology by extracellular calcium. *Phys Med Biol.* 2007, **52**:6261-74. IF₂₀₀₇: 2,528

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ SZOROSAN NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK:

1. Vajda S, Bartha K, **Wilhelm I**, Krizbai IA, Ádám-Vizi V. Identification of protease-activated receptor-4 (PAR-4) in puromycin-purified brain capillary endothelial cells cultured on Matrigel. *Neurochem Int.* 2008, **52**:1234-9. IF₂₀₀₇: 2,975

2. Hutamekalin P, Farkas AE, Orbók A, **Wilhelm I**, Nagyősz P, Veszelka S, Deli MA, Buzás K, Hunyadi-Gulyás E, Medzihradzky KF, Meksuriyen D, Krizbai IA. Effect of nicotine and polyaromatic hydrocarbons on cerebral endothelial cells. *Cell Biol Int.* 2008, **32**:198-209. IF₂₀₀₇: 1,547

3. Bálint Z, Krizbai IA, **Wilhelm I**, Farkas AE, Párducz A, Szegletes Z, Váró G. Changes induced by hyperosmotic mannitol in cerebral endothelial cells: an atomic force microscopic study. *Eur Biophys J.* 2007, **36**:113-20. IF₂₀₀₇: 2,238

4. Krizbai IA, Lenzser G, Szatmari E, Farkas AE, **Wilhelm I**, Fekete Z, Erdős B, Bauer H, Bauer HC, Sándor P, Komjáti K. Blood-brain barrier changes during compensated and decompensated hemorrhagic shock. *Shock.* 2005, **24**:428-33. IF₂₀₀₅: 3,122

5. Szabó H, Novák Z, Bauer H, Szatmári E, Farkas A, Wejksza K, Orbók A, **Wilhelm I**, Krizbai IA. Regulation of proteolytic activity induced by inflammatory stimuli in lung epithelial cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2005, **51** Suppl:OL729-35. IF₂₀₀₅: 1,018

6. Farkas A, Szatmari E, Orbók A, **Wilhelm I**, Wejksza K, Nagyősz P, Hutamekalin P, Bauer H, Bauer HC, Traweger A, Krizbai IA. Hyperosmotic mannitol induces Src kinase-dependent phosphorylation of beta-catenin in cerebral endothelial cells. *J Neurosci Res.* 2005, **80**:855-61. IF₂₀₀₅: 3,239