

Kutatásaink az önszervezően, sok hasonló sejt kölcsönhatása révén létrejövő biológiai rendszerek, ezen belül elsősorban az embriófejlődés során kialakuló érhálózat és extracelluláris mátrix (ECM) tulajdonságainak vizsgálatára irányulnak. Az elvégzett kutatómunka szerves része volt a sejtek viselkedésének megfigyelését lehetővé tevő mikroszkópos és statisztikai elemzés technikák kidolgozása is. A munkaterv bontása szerint csoportosítva, az OTKA támogatás segítségével az alábbi eredmények születtek:

1. Az érhálózat kialakulását létrehozó sejtmozgások kísérleti jellemzése.

1a. Automatizált mikroszkópia és képanalízis.

Mivel az embrionális szövetek kiterjedt objektumok, és a fejlődő embrió mozog, egyetlen statikus mikroszkóp látómező sokszor nem elégséges a szövetszintű folyamatok vizsgálatához. Ezért, a rendszer automatizált mikroszkópját egy általunk kifejlesztett háromdimenziós pásztázó algoritmussal vezéreljük. Az eredményül kapott több tízezer kép automatikus összeállítását, a fókuszban látszó részletek kiválogatását egy, szintén általunk kidolgozott és folyamatosan továbbfejlesztett, programrendszer végzi. Ez a kísérleti rendszer képezi alapját az alábbiakban ismertett eredmények nagy részének.

Az automatizált mikroszkópos rendszer fejlesztéseként létrehoztunk egy olyan új típusú mikroszkópra rögzíthető inkubátort is, ami egyszerre több párhuzamos sejt- vagy szövettenyészet megfigyelését teszi lehetővé, optimális körülmények között. Jelentős mértékben javítottunk a mikroszkópos rendszert vezérlő szoftveren, illetve a képfeldolgozó programjainkon is. Az inkubátort, illetve az automatizált mikroszkóp szoftverét kollegáink több kutatóhelyen (Kísérleti Orvosi Kutatóintézet; Washington University; University of Kansas; The Stowers Institute for Biomedical Research) is sikerrel alkalmazzák. Számottevő eredményeket sikerült elérnünk a sejt- és szövetmozgás automatikus képfeldolgozáson alapuló jellemzésére. Ahogy a következő pontban részletesen ismertetjük, egy kétlépcsős, prediktor-korrektor keresztkorrelációs algoritmus [6] használatával a képsorozatokból meghatározunk egy időben és térben lassan változó sebességtér komponenst, amellyel a szövetmozgásokat jellemezzük.

1b Sebességterek és trajektóriák meghatározása

Bevezettünk, és madárembriókon végzett kísérletekkel alátámasztottuk a fejlődő szöveteknek egy olyan képét, amelyben a szövet deformációira szuperponálódik a szövetbe ágyazott sejtek aktív (és korrelátlanabb) mozgása [1,6,7,12,13]. A sejtek aktív és passzív mozgásának elkülönítésére kihasználtuk, hogy a szöveti sejtek többségét körülvevő sejtközötti állomány (extracelluláris mátrix, ECM) nem képes aktív mozgásra, és ezért az ECM tetszőleges komponensének nagyskálájú (digitálisan szűrt) elmozdulásai jól definiálják a sejtek környezetét alkotó szövetnek a deformációit [7]. Különböző, immunjelölt ECM fehérjék mozgását digitális szűrőkkel elemezve megállapítottuk, hogy az elmozdulásadatok hosszúhullámú komponense időben rendkívül korrelált és minden általunk vizsgált ECM összetevő esetében hasonló. Ezzel ellentétben, a rövid hullámhosszú komponens időben korrelátlan és ECM fehérje-specifikus.

Az általunk javasolt felbontása az empirikusan észlelhető sejtjelmozdulásoknak egy passzív és aktív komponensre számos eddigi, a sejtek aktív mozgására épülő fejlődésbiológiai képet megváltoztat: Egyes, fluoreszcens festékkel megjelölt sejtek mozgását összehasonlítva az ECM elmozdulásokból számolt szövetmozgásokkal megmutattuk, hogy a madárembriók gasztrulációja során hagyományosan aktív sejtmozgásként értelmezett sejtest elmozdulások jelentős része származtatható az elsőként általunk számszerűsített szövetmozgásokból, azaz valójában nem aktív, hanem passzív (advektív) mozgás [12].

Az érfalat alkotó sejtek az embrionális fejlődés során, még a szív működés kezdete előtt, egy hálózatot hoznak létre [2,13]. Melegvérű gerincesekben ezt a hálózatot gyakran tekintik önszervezőnek: egyrészt az egyes szegmensek elhelyezkedése nagyfokú változatosságot mutat; másrészt nem azonosítottak az egyes szegmensek jelenétével vagy hiányával korreláló géneket.

Fejlődő madárembriók automatizált mikroszkópos megfigyelésével megmutattuk, hogy a kezdeti érálózat -- számos korábbi elképzeléssel ellentétben -- egy, az axonnövekedéshez nagyon hasonló sejtinvázióval történik [2]. A kezdeti, egyenes szegmensekből álló érálózatot ugyanis egy olyan, kollektív sejt migrációs folyamat hozza létre, ami során néhány sejt együttesen, egy hosszú nyúlványt formálva behatol a sejtmentes ECM rostok közé. Molekuláris perturbációs kísérleteink alapján a folyamatban kulcsszerepet játszik egy, a sejt-ECM kapcsolódásért felelős (avb3) integrin [2], és az ECM lebontásáért felelős enzimcsaládok több tagja, így az MMP2 is [18].

A korábbi, nem fejlődő embriókban hanem *in vitro* vizsgálatok alapján felállított elméleti modellek ezzel szemben egy olyan dinamikát mutatnak, amiben a kezdeti egyenletes sejtsűrűségben fokozatosan növekvő "lyukak" (avaszkuláris területek) jelennek meg. Az általunk leírt folyamatot sarjadzó vaszkulogenezisnek (vaszkulogenic sprouting) neveztük el [2,13]. Kísérleti vizsgálataink azt is megmutatták, hogy a nagyskálájú szövetmozgások számottevően hozzájárulnak a korai főerek területén a sejtsűrűség megnöveléséhez [13].

Mesterséges (*in vitro*) körülmények között tenyésztett sejt kultúrákat vizsgálva megmutattuk, hogy számos sejt típus hajlamos a sarjadzó vaszkulogenezis esetén megfigyelt erősen elnyúlt, többsejtű, lineáris szegmensekből álló konfiguráció kialakítására [16]. Ez tehát egy generikus, sokféle sejt típus esetén is megfigyelhető jelenség -- ha a sejtsűrűség elég magas ahhoz, hogy számottevő sejt-sejt kölcsönhatások alakuljanak ki. A sejttenyészetek *in vitro* viselkedésének analizálásával rámutattunk, hogy a lineáris szegmensek kialakításának egyik fontos mozgatóeleme a sejtek megváltozott mozgása erősen anizotróp környezetben. A legfontosabb ilyen anizotróp környezetet elnyúlt alakú, szomszédos sejtek jelentik. Feltételezéseink szerint ez annak köszönhető, hogy az elnyúlt sejtek merevebbek, és számos sejt típus preferálja a merevebb kitapadási felszíneket. Amint arról a 3. pontban részletesebben beszámolunk, ezekre az empirikus megfigyeléseinkre alapozva felállítottuk a vaszkulogenezis egy új elméleti modelljét.

A sejt motilitás egy olyan összetett biofizikai folyamat, aminek kvantitatív

elemzésére felhasználtunk számos, a véletlen bolyongások vizsgálatánál alkalmazott statisztikai fizikai módszert. Mesterséges in vitro körülmények között, egy tenyésztődény alján mozgó sejtekből álló kísérleti rendszerekben meghatározzuk a sebesség autokorrelációk (illetve integráltja, a négyzetes eltávolodás) időfüggését, a mozgás korrelációs (perzisztencia) idejét, valamint esetleges szuperdiffúzív jellegét. Ezek a statisztikai jellemzők jelentős mértékben a környezet, pontosabban a sejtfelszíni receptorok állapotának a függvényei. Ez, a sejtpopulációk mozgását jellemző módszer így lehetővé teszi a sejttenyészetekben bekövetkező, gyakran molekuláris szintű beavatkozások funkcionális hatásainak érzékeny elemzését.

A sejt-ECM kölcsönhatásoknak kiemelkedően fontos szerepük van a sejtek szövetalkotásánál. Ezért, munkánk során megvizsgáltuk számos, a sejt környezetét alkotó ECM fehérje sejtmozgásra gyakorolt hatását. Az ECM fehérjék többségének speciális, sejtmozgást szabályozó funkciója van az embrionális fejlődés különféle szakaszaiban, és így közvetett úton a vándorló szöveti sejtek pozícióit határozzák meg. Egy ECM fehérje különböző sejtfelszíni receptorosztályhoz kötődhet, és ezek nem egyenrangú hatást váltanak ki: Jól elkülönülő receptorfunkciókat azonosítottunk a laminin esetében: a laminin-1 legalább két receptorcsaládhoz is kötődik, az integrinekhez és a disztroglikánhoz [4]. Megmutattuk, hogy bár mindkét receptorcsalád aktiválása növeli a mozgás átlagsebességét, de a mozgás perzisztenciáját a disztroglikán receptor nem változtatja meg [ref]. Az ilyen vizsgálatok egyrészt lehetővé teszik a sejtviselkedés célzott változtatását a sejtfelszíni receptorok specifikus blokkolásával vagy aktiválásával, másrészt segítenek feltérképezni a sejtmozgást szabályzó biokémiai reakcióhálózat működési logikáját.

A sejtek mozgásának statisztikai elemzésére kidolgozott módszereinket sikerrel alkalmaztuk más, az érhálózat kialakulásától különböző, idegtudományi problémák esetén is. Embrionális idegsejtek és asztroglia sejtek tenyészteteit vizsgálva megmutattuk, hogy az idegi differenciációért részben felelős retinsav forrása az idegszövetben jelenlévő asztroglia lehet [3]. Granulasejt tenyésztetekben a sejtmagok mozgásának nyomonkövetésével statisztikusan jellemtük a granulasejtek differenciálódása során bekövetkező változásokat [5], valamint meghatároztuk az NMDA receptorok alegységeinek funkcionális hatását a sejtmag mozgására [17]. Megmutattuk, hogy a differenciálódó idegsejteken végbemenő NMDA receptor alegységeinek cseréje (2B alegységről 2C alegységre) szerepet játszhat az éretlen neuronokra jellemző motilis fenotípus elvesztésében. Ezek az eredmények jól mutatják a sejtszintű fenotípusok (motilitás, perzisztencia, sejt-sejt kapcsolatok stabilitása, stb) újszerű statisztikus elemzésében rejlő lehetőségeket.

## 2. Az embrionális szövet viszkoelasztikus deformációinak vizsgálata.

Az embriófejlődés megértése a természettudományok egyik legrégebbi kihívása. Az anatómiai struktúrák kialakulását kísérő sejt- és szövetmozgások szisztematikus

felderítése az elmúlt évtizedben vált lehetővé, részben a fluoreszcens jelölő molekulák és a számítógépezérelt optikai mikroszkópia technikák (konfokális, pásztázó, time-lapse) elterjedése révén. A sejtek szövetalkotása, azaz a sejt-ECM szerkezet kialakulása nemcsak a fejlődésbiológia egyik klasszikus problémája, hanem a mesterséges szövetek létrehozásának (tissue-engineering) egyik alapvető kérdése is.

A fejlődés korai szakaszában az embrió szerkezete drámai módon átalakul: madárembriók esetében egy, látszólag forgásszimmetrikus körlemezen először egy tengely, a primitív csík alakul ki. Ezzel egyidőben elkezdődik a gasztruláció, a hólyagsíra képzése. A gasztruláció során sejtek vándorolnak a primitív csíkon keresztül az embrió belsejébe, és kialakítják a középső (mezodermális) csíralemezt. Bár a gasztruláció különböző szakaszai már régóta ismertek, a szövetformálódás kinetikájáról és dinamikájáról lényegében nincsenek mérési adatok. Így, a sejtek által kifejtett erők kapcsolata a szövetet formáló erőkkel és a deformált szövetben felhalmozódó mechanikai feszültséggel jórészt ismeretlen.

Az embrionális szövetmozgások feltérképezése koncepcionálisan sem egyszerű, hiszen a szövetet jórészt aktív mozgásra is képes sejtek alkotják. Bár az ECM fehérjék önmagukban nem képesek mozgásra, sejt felszíni receptorokhoz kötődve részt vehetnek a sejt mozgásában. Ezért a szövetmozgást egy olyan, térben és időben lassan változó sebességtérként definiáljuk, aminek az értéke egy adott pontban azonos az ott elhelyezkedő sejten kívüli szövetkomponensek (ECM) átlagos sebességével [7]. Az 1b pontban leírt algoritmus az embriók fejlődés során bekövetkező deformációit határozza meg automatikusan, operátori beavatkozás nélkül [6].

Egy madárembriókon elvégzett kísérletsorozattal feltérképeztük a korai embriogenezist jellemző szövetmozgásokat. Immunjelölt ECM jelzőrészekkel és pásztázó optikai mikroszkópiával megmutattuk, hogy a gasztruláció folyamatát kísérő szövetmozgások jól leírhatók egy olyan tovaterjedő mintázatként, ami az embrió mindkét oldalán egy-egy, ellentétes irányban forgó örvényt tartalmaz [7]. Ezek a szövetáramlások lényeges módon megváltoztathatják a szövet sűrűségét (illetve annak kétdimenziós vetületét), valamint bizonyos helyeken jelentős deformációkhoz vezetnek.

Az ECM szerkezete és összetétele alapvetően befolyásolja a szöveti sejtek működését, továbbá a sejt-ECM kapcsolatnak fontos szerepe van a szövetmozgások meghatározására kidolgozott módszerünkben. Ezért sejt kultúrákkal és fejlődő madárembriókon végzett vizsgálatokkal részletesen tanulmányoztuk az ECM összeállítását, és az ECM szerkezetének valamint a sejtmozgásnak a kapcsolatát. Három közleményben számoltunk be a sejtek kollektív mozgása során kialakított ECM hálózatok önszerveződésének dinamikájáról [8,9,11]. Nagy sejtsűrűségű tenyészetekben megfigyelhető a szekretált ECM fehérjék összeállása egy jellegzetes, kezdetben lineáris szegmensekből felépülő hálózattá. Vizsgálataink alapján ez az önszerveződés egy sejtmozgás által hajtott hierarchikus folyamat. Többféle, nem feltétlenül ugyanabba az ECM szerkezetbe épülő összetevő (fibronektin, elasztin, fibrillin-2 és MAGP) esetén megállapítottuk, hogy nagyfokú korreláció figyelhető meg a sejt felszínén található ECM csomagok, és a közeli sejtszervecskék elmozdulása között. Érdekes módon, a sejtmozgás egyre nagyobb méretű lineáris struktúrákba rendezi össze az ECM alkotóelemeket. Ezek a struktúrák visszahatnak a környező sejtek mozgására, és a közeli sejtek elmozdulásait

rendezetté teszik. Megmutattuk, hogy a vizsgált tenyészetekben a sejtek kollektív, hosszútávon korrelált mozgása együttjár a nagyméretű ECM struktúrák megjelenésével [8]. Így a sejtsebességek térbeli korrelációs hossza együtt nő a fokozatosan kialakuló ECM struktúrák méretével. Feltételezéseink szerint a kollektív (rendezett) mozgás kialakulásának hátterében a sejt-ECM mechanikai kontinuumban ébredő feszültségek és a sejt mozgásirányát kijelölő biokémiai mechanizmus kapcsolata áll. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy számos más esetben is a sejtek kollektív mozgásáért a sejtek között mechanikai kapcsolatot biztosító ECM kialakulása áll.

2004 óta folyamatban van egy, az egyedi sejtek által egy külső vizskoelasztikus közegre ható mechanikai erők mérésére alkalmas módszer megvalósítása is. A kísérletek során a sejteket egy változtatható rugalmas paraméterekkel rendelkező akrilamid gél ECM fehérjékkel bevont felszínére helyezük. A gélbe ágyazott fluoreszcens mikrogöngyök elmozdulásaiból következtetni tudunk a gél felszínén ébredő, a sejtek által kifejtett erők eloszlására. Az erők meghatározását megnehezíti, hogy méréseink szerint a probléma gyakran alkalmazott Bousinesq-féle egyszerűsítése (végtelen rugalmas féltér felületére számolt kapcsolat a kétdimenziós elmozdulás és erőkomponensek között) a gél véges vastagsága, valamint az optika véges mélységélessége miatt nem jól alkalmazható. Ezért egy vak (blind) dekonvolúciós algoritmust fejlesztünk ki, amely az empirikus elmozdulásadatokból egyszerre határozza meg az erők eloszlását és a gél súlyfüggvényét is. A módszeren egy fizikus szakdolgozó hallgató (Nagy Gergely) dolgozott [10], új eredményekkel kibővített szakdolgozata egy készülő publikáció alapjául szolgál.

A gélelmozdulások analízise azonban elegendő volt a következő, a sejtmozgás biofizikai hátterét megalapozó eredmények eléréséhez. (1) Különböző fejt felszíni receptorok (integrinek, disztroglikán) specifikus blokkolásával megmutattuk, hogy nem minden receptor család vesz részt a mechanikai erők közvetítésében. Bár a disztroglikán jelátviteli szerepe összemérhető az integrinékével, a disztroglikán-ECM kapcsolatok megszakításával egyáltalán nem csökken a sejtek által a környezetre kifejtett húzóerő [14]. (2) Elnyújt sejtekben megfigyelhető oszcilláló magmozgást elemezve megmutattuk, hogy a gél elmozdulásai konzisztensek egy olyan mozgató mechanizmussal, ami a sejt elejénél (vezető élnél) kihorgonyozva húzza előre a magot. Ismert motorfehérjék farmakológiai gátlószereit alkalmazva megmutattuk, hogy a mozgató mechanizmusban mind a miozin II, mind a kinezin eg5 változata is részt vesz [20]. A sejten belüli magmozgás tehát egy kompozit motorrendszer eredménye. Kutatásaink folytatásától azt várjuk, hogy hamarosan képesek leszünk meghatározni a fejlődő embrióban megfigyelhető szövetmozgások hajtóerőinek térbeli eloszlását is.

### 3. Sejt-sejt és sejt-extracelluláris mátrix kölcsönhatások modellezése.

Felállítottunk, és szimulációs vizsgálatokkal alátámasztottunk egy hipotézist, mely szerint a hálózatformálás során az érsejtek mozgása a szomszédos sejtek mechanikai állapotával korrelál [6,13]. A modellben a sejtmozgást egy perzisztens véletlen bolyongással írjuk le, amiben a sejt-sejt kölcsönhatások determinisztikus „drift” tagokként jelennek meg. A vonzó kölcsönhatás aszimmetrikus, és a partnerek környezetének aszimmetriájától függ:

minél anizotrópabb a környezet, feltehetően annál elnyújtottabb a sejt, és ezért nagyobb valószínűséggel migrálnak oda a környező sejtek. Ezt a spekulatív modellt numerikusan vizsgáltuk és összehasonlítottuk különféle, hálózatokat képző sejtek tényészeteiben megfigyelhető mintákkal. Megmutattuk, hogy a modellben kialakul egy kvázistacionárius állapot amiben a felületi feszültségből származó durvulás egyensúlyt tart az új ágak keletkezésével. Ebben az állapotban nagyon alacsony, 0.2 körüli a perkolációs küszöb, valamint a struktúrák karakterisztikus mérete (az empirikus morfometriai adatokkal összhangban) csak gyengén függ a sejtsűrűségtől.

Az elnyúlt sejtekhez történő preferált adhézió hipotézisét a fenti részecskemodellen kívül megvizsgáltuk egy aszimmetrikus Potts modellben is, ahol az egyes sejtek alakját a Potts modell egy-egy doménje reprezentálja. Az aszimmetria a modell dinamikájában, a következő módon jelenik meg. Az egyes Monte-Carlo lépésekben egy véletlenszerűen választott spin állapota egy szomszédos rácspontra másolódik. A lépés megtételének valószínűsége függ a szomszédos klaszterek alakjától, és így nem ekvivalens hogy egy új klaszterhatárt melyik klaszter megváltozása hozza létre. Azaz: egy elnyújt "A" klaszter mellé nagy valószínűséggel terjeszkedik egy kevésbé elnyújt "B" klaszter. Ugyanazt az AB klaszterhatárt kisebb valószínűséggel hozza létre az "A" klaszter terjeszkedése. Ahogy azt egy készülő dolgozatban megmutatjuk, ez az új, nemegyensúlyi általánosítása a Potts modellnek megfelelően írja le a kölcsönható sejtek viselkedését egy széles paramétertartományban [19].