

# **Zárójelentés**

**OTKA F49795**

**Projektvezető: Szabó Bálint**

**Budapest, 2008.**

## Összefoglaló

A projekt három éve alatt a következő négy területen értünk el **kutatási eredményeket**:

1. Sejtek kollektív mozgása 2-dimenzióban.
2. Idegi őssejtek és glia sejtek kölcsönhatása.
3. Nyálmirigy sejtek *in vitro* regenerálódása.
4. A sejtmag vándorlása.

A fenti négy témakör közül az első kettőben már megjelentek publikációink a Phys. Rev E-ben és a FASEB J-ben, a harmadik téma eredményei elfogadásra várnak a kézirat kisebb módosításai után a Tissue Engineering c. folyóiratnál (IF: 2.89), a negyedik témában néhány héten belül fogunk publikálni.

Emellett jelentős **műszerfejlesztési** feladatokat oldottunk meg a számítógép-vezérelt fluoreszcens mikroszkópiával kapcsolatban, melyek alkalmasak az ipari hasznosításra is. Így az OTKA pályázat három éve alatt további három pályázatot nyertünk el műszerfejlesztésre. Ezek a következők:

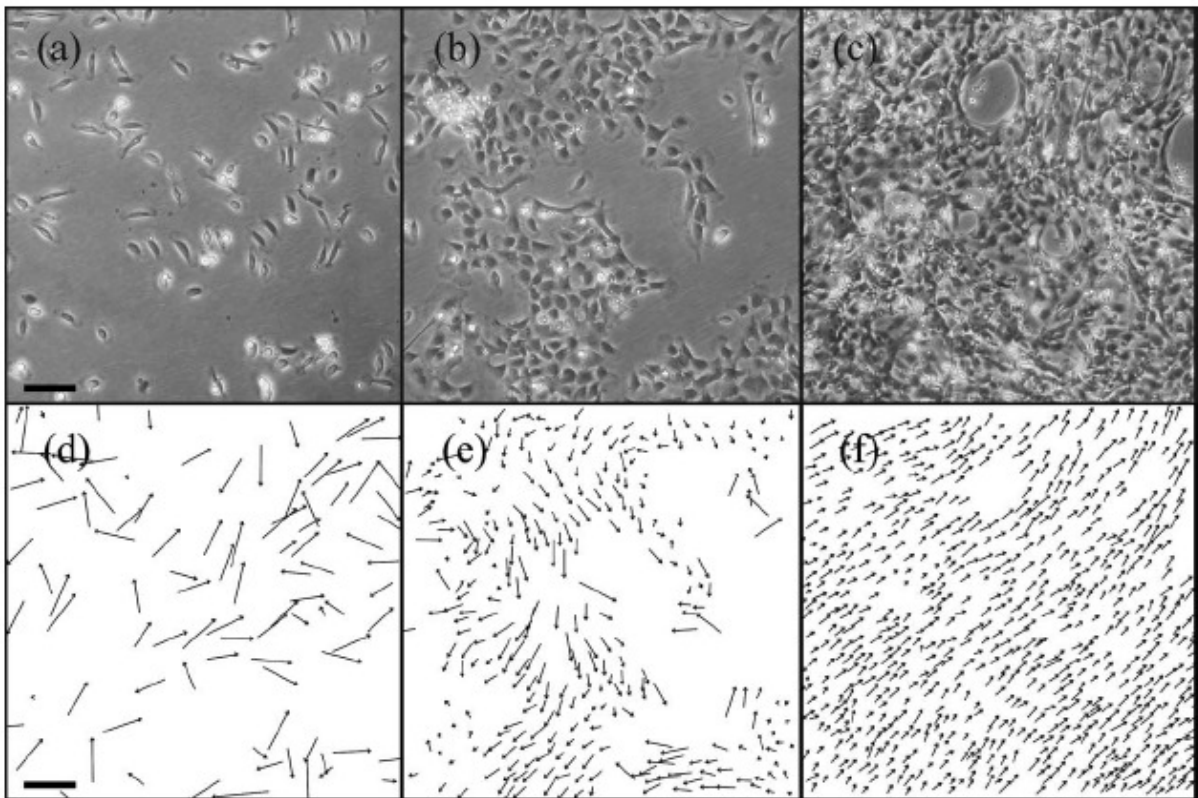
1. GVOP-3.3.1-05/1.-2005-07-0003/3.0: Mikroszkópasztalra szerelhető mini-inkubátorok intelligensen szabályozott prototípusa.
2. ELTE CellKomm Regionális Egyetemi Tudásközpont (RET), 6.1-es projekt: Videomikroszkópos berendezés, szoftver és eljárás fejlesztése.
3. Innocsekk: Mikroszkópasztalra szerelhető számítógép-vezérelt fluoreszcens pásztázó sejtválogató mikropipetta prototípusának kifejlesztése.

A fenti kutatási és fejlesztési eredmények mindegyike a sejtmozgás és proliferáció videomikroszkópos vizsgálatán alapul. Mikromanipulált struktúrákat a sejtek kollektív mozgásának tanulmányozásakor és a sejtmag hosszú távú vándorlásának vizsgálatához alkalmaztunk.

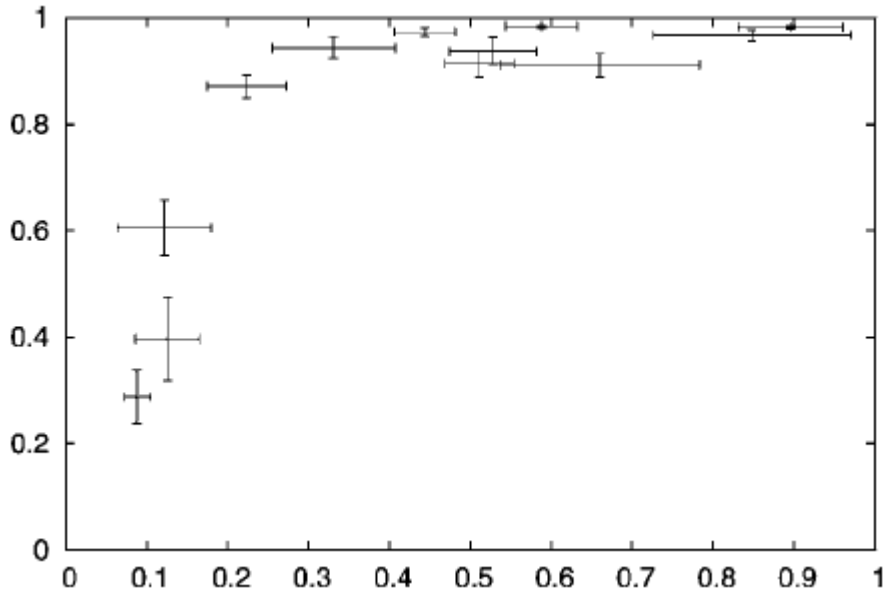
Az alábbiakban részletezzük a négy kutatási téma eredményeit.

## 1. Sejtek kollektív mozgása 2-dimenzióban

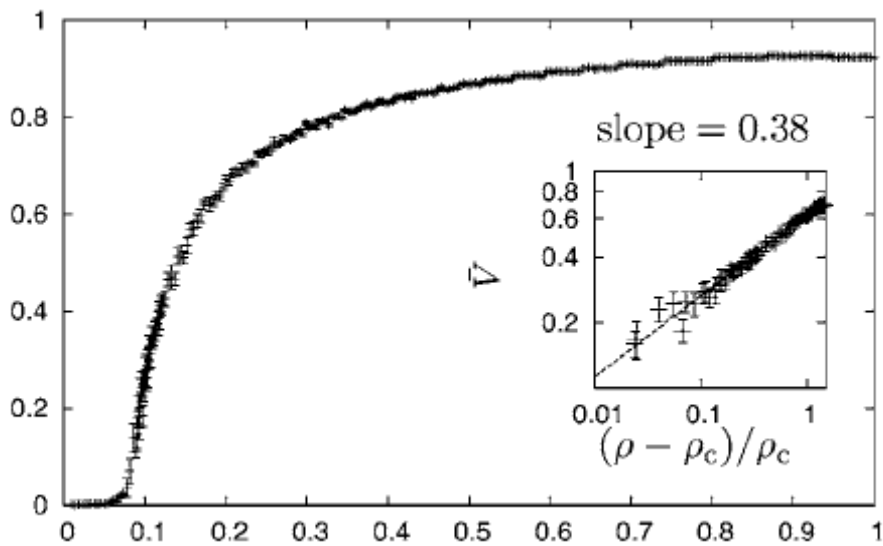
Halpikkelyből preparált bőrsejtek, ún. keratocita sejtek kollektív mozgását vizsgáltuk műanyag Petri csészében és kétdimenziós fizikai mikrostruktúrák (mikro-szobák és folyosók) belsejében. A sejteket hosszú távú videomikroszkópia segítségével figyeltük: rögzítettük mozgásukat 24 órán keresztül 1 perces mintavételi sebességgel. A 2D felületen mozgó egyedi sejtek mozgása véletlenszerű, perzisztens bolyongásra emlékeztet. A sejtek felületi sűrűségének növelésével azonban a mozgás statisztikus rendezettsége nő. A sejtszám emelésével kinetikai fázisátalakulást tudunk indukálni rendezetlenből rendezett fázisba. A kritikus sűrűség közelében komplex viselkedés figyelhető meg, a sejtek kölcsönható klaszterekbe rendeződnek. A kísérleti eredmények új „flocking” modell (kollektív mozgást leíró számítógépes modell) felállítását inspirálták. A modellben csak rövidtávú kölcsönhatást tételeztünk fel, amelyben nincs explicit információ a szomszédos sejtek mozgásának irányáról. Számítógépes szimulációink folytonos fázisátalakulást mutattak. A sejteket mikrofabrikált arénába helyezve érdekes örvénylő kollektív mozgást tapasztaltunk, melyet a szimulációkban reprodukáltunk.



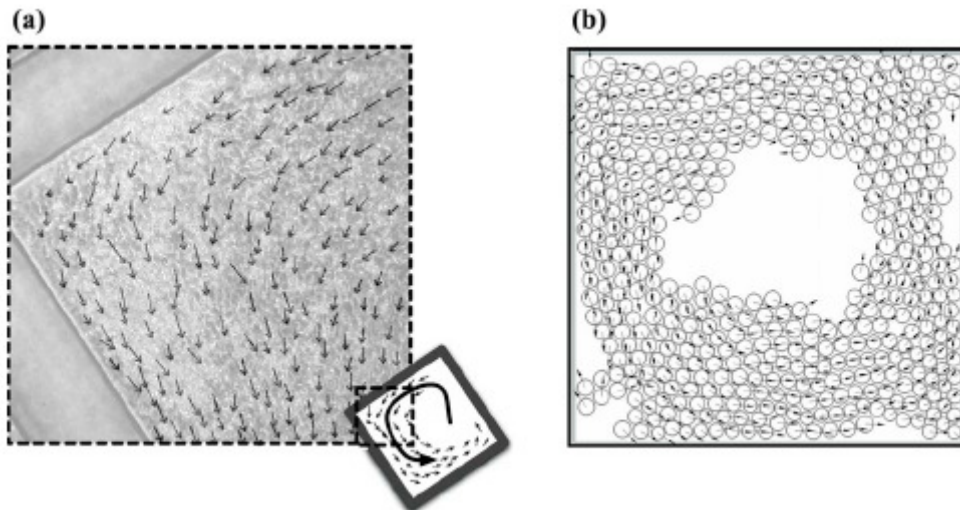
**Fáziskontraszt felvételek a sejtek tipikus viselkedéséről három különböző sűrűség mellett.** (a) 1.8, (b) 5.3, (c) 14.7 cells/100x100  $\mu\text{m}^2$ . Megfigyeltük, hogy a sejtsűrűség növelésével a sejtmozgásban kollektív rendeződés következik be. (Az egyedi sejtek sebessége nagyobb, mint a koherens csoportokban mozgóké.) Skála vonal hossza: 200  $\mu\text{m}$ . (d)–(f) A sejtek sebessége. A skála vonal 50  $\mu\text{m}$ /perces sebességnek felel meg. Kísérleti videók és szimulációk a következő címen találhatóak: <http://angel.elte.hu/~bszabo/collectivecells/>



A kísérleti rendparaméter ( $V$ ) a normált sejtsűrűség ( $\rho^* = \rho/\rho_{max}$ ) függvényében. A  $\rho$  sejtsűrűséget a  $\rho_{max}$  maximális megfigyelt sűrűséggel,  $2.5 \times 10^{-3}$  sejt/ $\mu m^2$ -rel normáltuk, a hibakorlátok a standard hibát mutatják.



A szimulációkból számolt rendparaméter ( $V$ ) átlaga és standard hibája a normált részecskeszámsűrűség ( $\rho^* = \rho/\rho_{max}$ ) függvényében. A görbe minden pontja 1000 részecskével történő, minimum 10 független szimulációs futtatásból származik. A beillesztett kis ábra  $\ln(V)$  változását mutatja  $(\rho - \rho_c)/\rho_c$  függvényében. Az illesztett egyenes meredeksége a  $\delta$  kritikus exponenshez köthető. A skálázási tartomány jelentős mérete valamint az exponens numerikus értékének hasonlósága korábbi modellekkel nyert eredményekhez folytonos fázisátalakulást jelez.

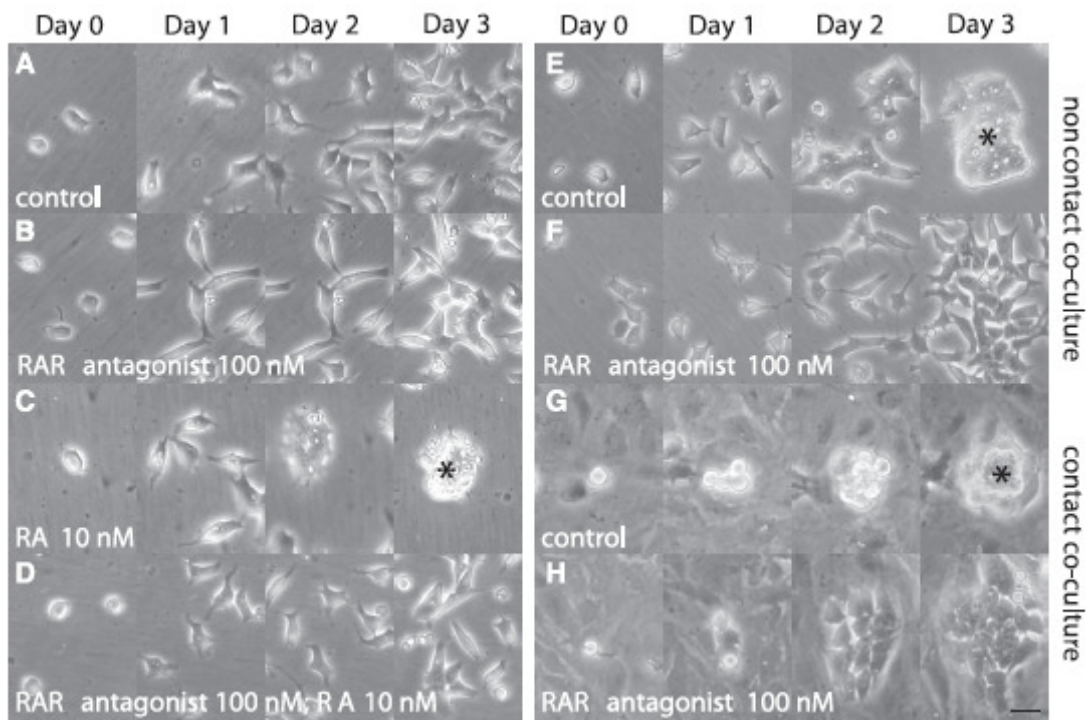


*Mikroszkópos felvétel egy  $2 \times 2 \text{ mm}^2$ -es mikrofabrikált arénában keringő sejtsoptról. A fekete nyilak az egyes sejtek sebességét jelölik. A négyzet alakú arénába szorított modell sejtekkel végzett számítógépes szimulációk keringő mozgást mutatnak a modell paraméterek széles tartományában.*

Kísérleti mikroszkópos videóink és szimulációink a következő címen találhatóak: <http://angel.elte.hu/~bszabo/collectivecells>. Eredményeink részletesebb bemutatása szintén megtalálható itt, ill. a Phys Rev E 74, 061908 (2006) cikkünkben.

## 2. Idegi őssejtek és glia sejtek kölcsönhatása

Az asztroglia (vagy asztrocita) sejtek szerepe döntő fontosságú az idegi sejtek kialakulásakor a központi idegrendszerben. Az újabb eredmények azt mutatják, hogy a posztnatális (születés utáni) neurogenesis kulcsfontosságú regulátorai közé tartoznak. Azt már ugyan bizonyították, hogy az asztrocita sejtek képesek őssejtek az idegsejtté váláshoz vezető úton elindítani, de csak keveset lehet tudni az asztroglia eredetű elkötelező szignálokról. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a transz-retinsav (amely az egyik leghatékonyabb idegsejti elköteleződést szabályozó morfogén molekula) lehet az egyik meghatározó glia eredetű szignál, amely az asztroglia-indukált neurogenezist kiváltja. Egymást kiegészítő és megerősítő eredményeink alapján megmutattuk, hogy az asztrocitákban kifejeződnek a retinsav termeléséhez kulcsfontosságú enzimek mRNS-ei, és aktívan termelnek transz-retinsavat. Azt találtuk, hogy a retinsav hatásának blokkolása az AGN193109-es számú pan-RAR -retinsav receptor-antagonistával megakadályozza az el nem kötelezett őssejtek idegsejtté alakulását glia sejtekkel való indukció esetén. Így erős *in vitro* bizonyítékot találtunk arra, hogy az asztroglia-indukált idegi differenciáció egyik fontos szignálja a retinsav. Eredményeinket a FASEB J. 21(10), 2496-509 (2007)-es cikkben publikáltuk.



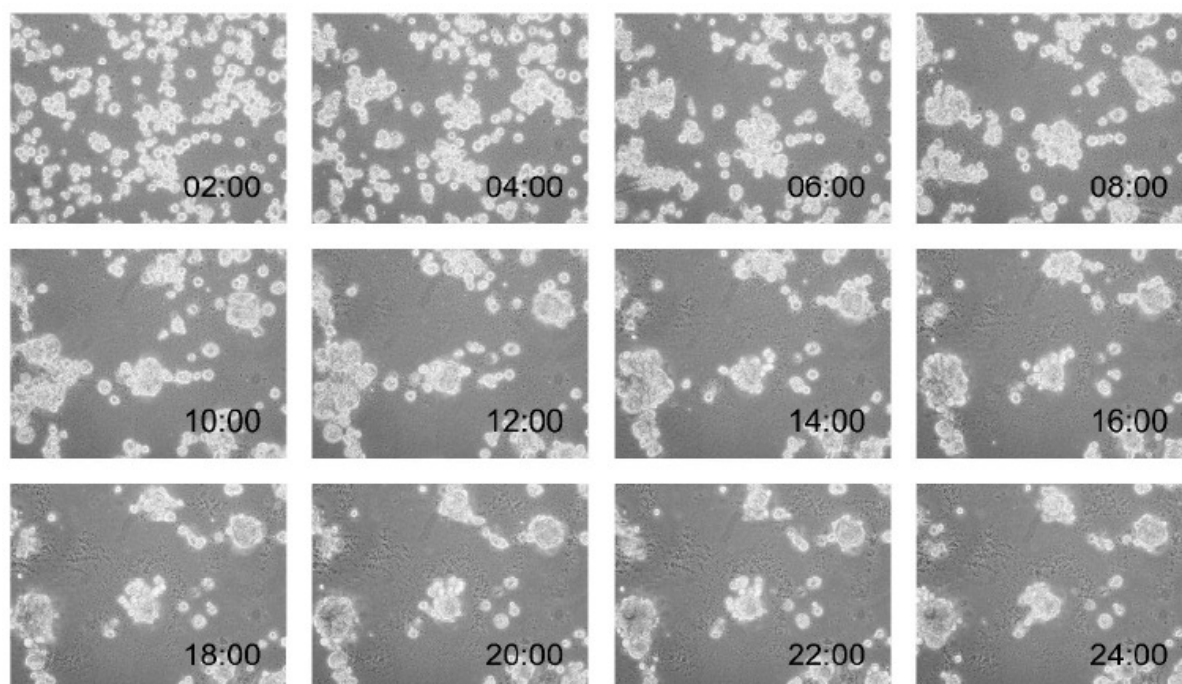
**A retinsav blokkolása megakadályozza az NE-4C neuroektodermális progenitor (idegi őssejtek) sejtek aggregálódását.** A videómikroszkópos felvételek az NE-4C sejtek *in vitro* fejlődését mutatják monokultúrában (A-D) és asztroglia sejtekkel közös, ún. kokultúrában (E-H). (A-D) Monokultúrákban az NE-4C sejtek megtartották osztódási képességüket 3 napig a szérummentes tápban. 10 nM-os retinsav koncentráció mellett a sejtek kompakt aggregátumokat hoztak létre. 100 nM pan-RAR antagonista (a retinsav receptorához kötődő antagonista drog) megakadályozta a retinsav-induált aggregációt a retinsav beadása előtt adagolva. (E-H) Mind a nem kontakt (E-F), mind a kontakt (G-H) asztrocitás tenyészetekben a az NE-4C sejtek sűrű aggregátumokká nőttek hasonlóan a retinsavval kezelt monokultúrákhoz. A pan-RAR antagonista blokkolta a az asztroglia-indukált aggregátumok kialakulását is (F, H). \*: sejt aggregátumok, a skála vonal a jobb alsó sarokban 25  $\mu$ m-t jelöl.



### 3. Nyálmirigy sejtek *in vitro* regenerálódása.

A projektben résztvevő kutatók a kézirat szerzőinek sorrendjében: Szlávik Vanda, Szabó Bálint, Vicsek Tamás, Barabás József, Bogdán Sándor, Gresz Veronika, Varga Gábor, Brian O' Connell, Vág János. A kutatást a Semmelweis Egyetem Orálbiológiai Tanszékével együttműködésben végeztük.

A sejtbiológiai kutatások egyik fontos területe a szövetregeneráció. Kísérleteinkben szájsebészeti műtétek során eltávolított állkapocs-alatti nyálmirigyszövet sejteinek regenerálódási folyamatait vizsgáltuk. A szövetmintából mechanikai aprítás és enzimátikus emésztés során nyert sejteket plasztik aljzatra ültettük, az így kapott ún. primer tenyészetben (PTHSG: Primary Total Human Salivary Gland) a sejtek 1 sejtrétegben (monolayer-ben) nőttek. A PTHSG kultúrákat enzimátikus emésztéssel egyedi sejtekre izoláltuk, majd 3 dimenziós gél (BME: Bazális Membrán Extraktum) aljzatra szélesztettük. Fáziskontraszt videomikroszkópia segítségével 24, 72 és 168 órán keresztül vizsgáltuk a sejtek mozgását. A nyálmirigysejtek a gél aljzaton 24 óra alatt olyan több sejtből álló aggregátumokká szerveződtek, melyek morfológiája és szövettani sajátosságai jellemzőek az intakt nyálmirigyre. A gél felületén újraszerveződött struktúrák sejtosztódási, génexpressziós és fehérje-expressziós sajátosságai is az intakt mirigyre jellemző módon változtak. A PTHSG tenyészet, mint modell valószínűsíti, hogy a felnőtt emberi nyálmirigy regenerációra képes, BME felületén az izolált sejtek újraszervezik korábbi struktúrájukat és az érintetlen mirigy morfológiai és funkcionális sajátosságait mutatják.



*Fáziskontraszt felvételek egy 24 órás filmből, amelyen megfigyelhető az acinotubuláris struktúrák kialakulása a BME (bazális membrán extraktum) felszínén.*

#### 4. A sejtmag vándorlása

**Megjegyzés:** publikáció előtti eredményeinket a sejtmag vándorlásáról bővebben mutatjuk be az alábbiakban, mivel a közlemény csak a későbbiekben lesz hozzáférhető a Szabó, B., Környei, Z., Ünneper, R., Méhes E., Vicsek, T., Czirók, A: „Centrosome positioning and traction force in nucleokinesis: the role of myosin-II” című közleményünkben. {Korábbi cikkünk a témában: B. Szabó, Zs. Környei, J. Zách, D. Selmeczi, G. Csúcs, A. Czirók and T. Vicsek: Auto-reverse nuclear migration in bipolar mammalian cells on micropatterned surfaces, *Cell Motility and the Cytoskeleton* 59(1), 38-49 (2004). <http://angel.elte.hu/cellmot/nuclearmotility/>}

#### Bevezetés

A sejtmag vándorlása, vagyis a nukleokinezis nélkülözhetetlen folyamat sok eukarióta sejtben az élesztőgombától a gerincesekig. A sejtmag vándorol sejsztódáskor az élesztőkben, legyekben és bizonyos esetekben gerincesekben is. A sejtmag vándorlását gátló genetikai mutációk súlyos emlős betegségekben, így pl. lizenkefáliában, azaz kórosan struktúrálatlan sima agyban nyilvánulhatnak meg. A biofizikai szemszögből érdekes, a sejtmagot hajtó erő szerv és sejtípus specifikus lehet. Míg a mikrotubulusok minden vizsgált esetben nélkülözhetetlenek bizonyultak a sejtmag mozgatásában állatokban, egy sor egyéb eredetű mechanizmus is elképzelhetőnek tűnik. Élesztőben és mesterséges model rendszerekben a csillagszerű mikrotubulus rendszer önmagában is képes aktívan pozicionálni a központját és az ehhez csatlakozó sejtmagot. A mikrotubulusokat húzni képes motorfehérjék szintén számos esetben hozzájárulnak a sejtmag mozgatásához pl. a *C. elegans* féregben és a *Drosophila* légyben. Ekkor az aszimmetrikusan eloszló mikrotubulus-motorok húzzák abba az irányba a sejtmagot, amerre többen vannak, és/vagy nagyobb az aktivitásuk. Emlős idegsejtekben a sejtmagot mozgató első számú (mikrotubulus) motor a citoplazmatikus dinein.

Az egyedfejlődésben és a sejtelettani működésben betöltött fontos szerepe ellenére a sejtmagot mozgató mechanizmus kevésbé ismert a gerincesekben. A rovarokban és férgekben szokásos mikrotubulus alapú pozicionáláshoz hasonló mechanizmusok ugyan már sokakban felmerültek, a sejtvándorlással, és az azt kiváltó effektusokkal rokon mozgató motorok is szóba jönnek. A sejtvándorlást elsősorban az aktin-miozin rendszer hajtja, nem pedig a mikrotubulusok, melyek elsődleges szerepe ekkor a sejt biokémiai polarizálása, azaz a sejt elejének és végének meghatározása. A dinein és mizozin által közösen kifejtett húzóerő feltételezése véleményünk szerint egy komplexebb és realisztikusabb modellt eredményezhet.

Az idegsejtek polarizált struktúrája nyilvánvaló a sejtmag vándorlása során. A legtöbb tanulmány szerint ugyan a polarizáció erősen korrelál a centroszóma pozíciójával, azaz a sejtmaghoz képesti helyzetével, friss irodalmi eredmények szerint a mikrotubulus-függő magmozgás független a centroszóma pozíciójától. A csillagszerűen elrendezett (asztrális) mikrotubulusokat rendező központ, a centroszóma fontos szerepet játszik a sejtmag vándorlásában. Ha a sejtet mozgató erőt a mikrotubulusok fejtik ki, akkor a centroszóma pozíciója meghatározza, hogy húzó vagy toló erő hajtja a sejtmagot. Ha a mikrotubulusok szerepe a sejtmozgásban a sejt polarizáció fenntartása, akkor is jelentős információ a centroszóma pozíciója. Ugyanakkor elképzelhető, hogy nincs elsődleges meghatározó

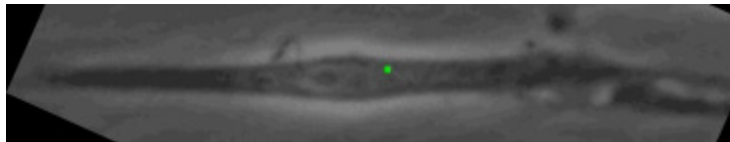


szerepe a centroszóma helyzetének a sejtmag vándorlásakor, ahogy az irányított sejtmozgáskor sem egyértelmű, és pl. a sejt típusától is függ, hogy a centroszóma inkább a a mag előtt vagy mögött halad. Az irodalmi adatok alapján azok a mikrotubulusok is hozzájárulhatnak a sejt polarizálásához, melyek nem a centroszómából erednek.

Egy gerinces sejtvonalon (azaz mutáció során számtalan osztódásra képessé vált sejt típuson), a C6 sejtekben vizsgáltuk a nukleokinezist, amit általában elfogadnak a fejlődő idegrendszerben lezajló ún. interkinetikus magvándorlás in vitro modelljének. Ahogy korábban beszámoltunk róla, az elnyúlt, bipoláris C6 patkány glióma sejtek oszcilláló magmozgást mutatnak miközben a sejt egésze lényegében egy helyben áll. Feltérképeztük a sejtek által kifejtett erőt, és meghatároztuk a centroszóma pozícióját GFP-centrinnel transzfektált sejtekben. Ezen kísérletek alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a sejtmagot magában foglaló sejtestet a sejt eleje felé húzó erő mozgatja, valamint a várakozásokkal ellentétben a centroszóma és a sejtmag relatív helyzete nem határozza meg a sejtmag vándorlásának irányát, viszont hatással van a sebességére. A miozin-II motorfehérjét blokkoló drogok (blebbisztatin, ML-7) segítségével azt találtuk, hogy a sejtmagot két különböző eredetű erő hajtja. Az egyik erő mikrotubulusfüggő, ez a centroszómánál húzza a sejtmagot. A másik erő miozin-II eredetű, és a centroszómától független módon húzza a sejtmagot. Hipotézisünk szerint a centroszóma helyzetét a két erő aránya szabja meg, melynek bizonyításához további kísérletekre lesz szükség.

### Kísérleti eredmények

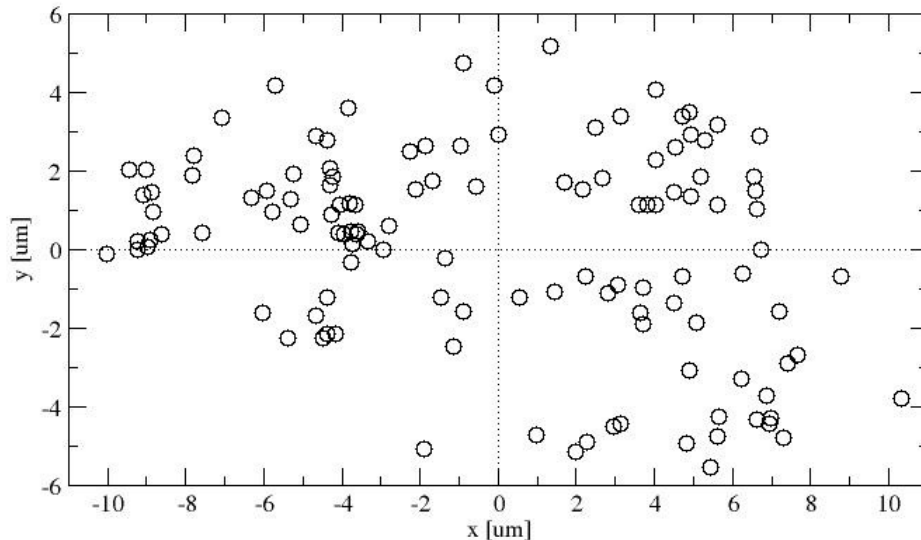
**A centroszóma pozíciója a sejtmag vándorlása során.** A C6 patkány glióma sejteket stabilan transzfektáltuk a GFP-centrin génkonstrukcióval, hogy párhuzamos fáziskontraszt és epifluoreszcens videomikroszkópiával követhessük a centroszómájukat a sejtmag vándorlása során. A parányi centroszómákat jól tudtuk követni napokon keresztül 40x objektív és a saját fejlesztésű CellMovie mikroszkóp-inkubátorunk segítségével. Ahogy korábban beszámoltunk róla, az elnyúlt C6 sejtek oszcilláló magmozgást mutatnak a sejt egészének jelentős vándorlása nélkül. A jelenség indukálható mikromintázatok segítségével: a 20  $\mu\text{m}$  széles fehérje csíkokra szorított sejtek elnyúlt alakot vesznek fel, melynek következménye az aktív sejtmagvándorlás.



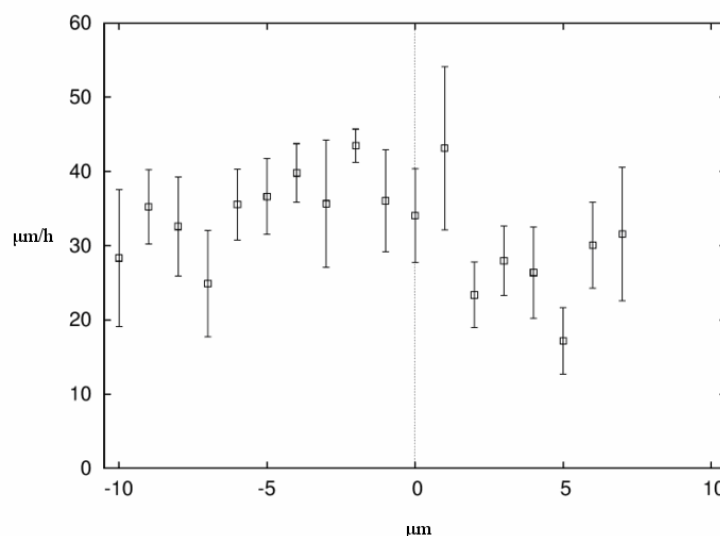
*A GFP-centrin génkonstrukcióval transzfektált C6 sejt fáziskontraszt képe 20  $\mu\text{m}$  széles mikrofabrikált fibronektin csíkon. A fluoreszcens kép ismeretében a centroszómát a fáziskontraszt képen zöld ponttal jelöltük. A sejt magja jobbra mozgott a kép készítésekor, ami azt jelenti, hogy a centroszóma ebben az esetben a sejtmag előtt volt.*

A sejtmag sebessége és a centroszóma helyzete közti összefüggés statisztikus vizsgálatára meghatároztuk a sejtmag és a centroszóma egyidejű pozícióját a fáziskontraszt és a fluoreszcens videomikroszkópos felvételek alapján. 3 független kísérletben kiválasztottunk 10 sejtet, melyekben a sejtmag meggyőző módon vándorolt: sebessége

meghaladta a  $15 \mu\text{m}/\text{órát}$ . Összesen  $n=166$  pontban mértük a 10 sejt magjának és centroszómájának helyzetét, ill. számoltuk ezek sebességét. A centroszómát mindig a sejtmag közelében találtuk, az eloszlás nem mutatott korrelációt a sejtmag mozgásának (azaz a sejt polarizációjának) irányával, ahogy a fenti ábrán látható. 82 esetben volt a centroszóma a sejtmag középpontja előtt, 84-szer mögötte. Az eloszlás két „farka” ugyanakkor aszimmetrikus (Wilcoxon teszt,  $p<0.05$ ): a  $8 \mu\text{m}$ -nél nagyobb távolságok esetén a centroszóma gyakrabban volt a sejtmag mögött, mint előtte. További aszimmetriát mutat a sejtmag sebessége és a centroszóma helyzete közti összefüggés: a sejtmag átlagos sebessége kisebb, amikor a centroszóma a mag előtt helyezkedik el.

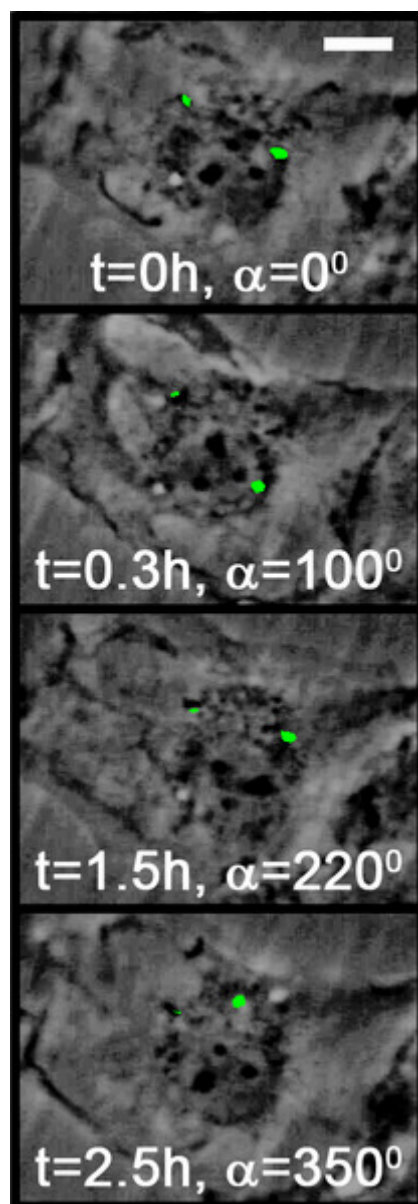


**A centroszóma relatív pozíciója a sejtmag középpontjához képest a sejtmag vándorlása alatt elnyúlt, bipoláris sejtekben.** A koordinátarendszer pozitív  $x$  tengelyét a sejtmag mozgásának irányában, az elnyúlt sejt tengelyével azonos irányban vettük fel. 10 sejtben követtük a sejtmag és a centroszóma pozícióját, melynek eredményeképp szimmetrikus eloszlást kaptunk. Azaz a sejtmag mozgásának (ill. a sejt polarizációjának) iránya a normál C6 glióma sejtekben nem korrelál a centroszóma pozíciójával.

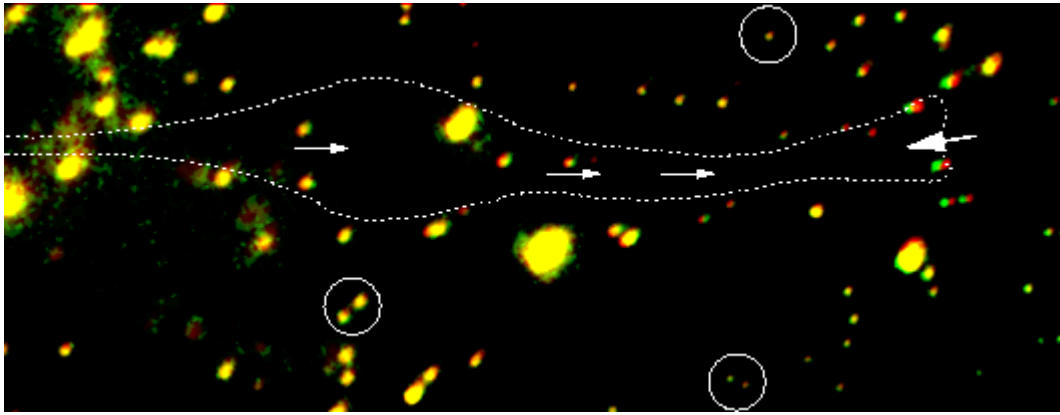


**A sejtmag átlagos sebessége a centroszóma relatív pozíciójának függvényében.** A sejtmag gyorsabban mozog, amikor a centroszóma a sejtagnál hátrébb helyezkedik el. Az eltérés nem túlzottan nagy, de szignifikáns.

**A centroszóma pozíciója a sejtmag forgása során.** A sejtmag forgása a sejtmag vándorlásához hasonlóan megfigyelhető fáziskontraszt videomikroszkópiával, azonban nem az elnyúlt bipoláris sejtekben, hanem lapos, kiterült sejtekben, ahol a sejtmag alakja diszkoszzerű. Azt találtuk az irodalmi adatokkal összhangban, hogy a sejtmag forgása független a centroszómától. A magforgás különösen gyakori a mitotikus sejtosztódás (mitózis) előtt. A sejtek 83%-a ( $n=35$ ) mutatott kifejezett magforgást mitózis előtt, míg az osztódás után a sejtek mindössze 7%-ban forgott a sejtmag ( $n=45$ ). Ahogy az ábra mutatja, 2.5 óra alatt a sejtmag megteheti egy teljes fordulatot anélkül, hogy a centroszóma jelentősen elmozdulna.



**A sejtek által kifejtett mechanikai erő feltérképezése.** A sejteket vékony, átvilágítható gél rétegre ültettük ki, ezt követően a gélbe ültetett fluoreszcens gyöngyök segítségével vizualizáltuk a gél deformációit. Az akrilamid gélen olyan sejtek erőtérképét vettük fel, és követtük az időben, melyek spontán módon elnyúltak, bipolárisak voltak, és mutatták az oszcilláló sejtmagvándorlás jelenségét.

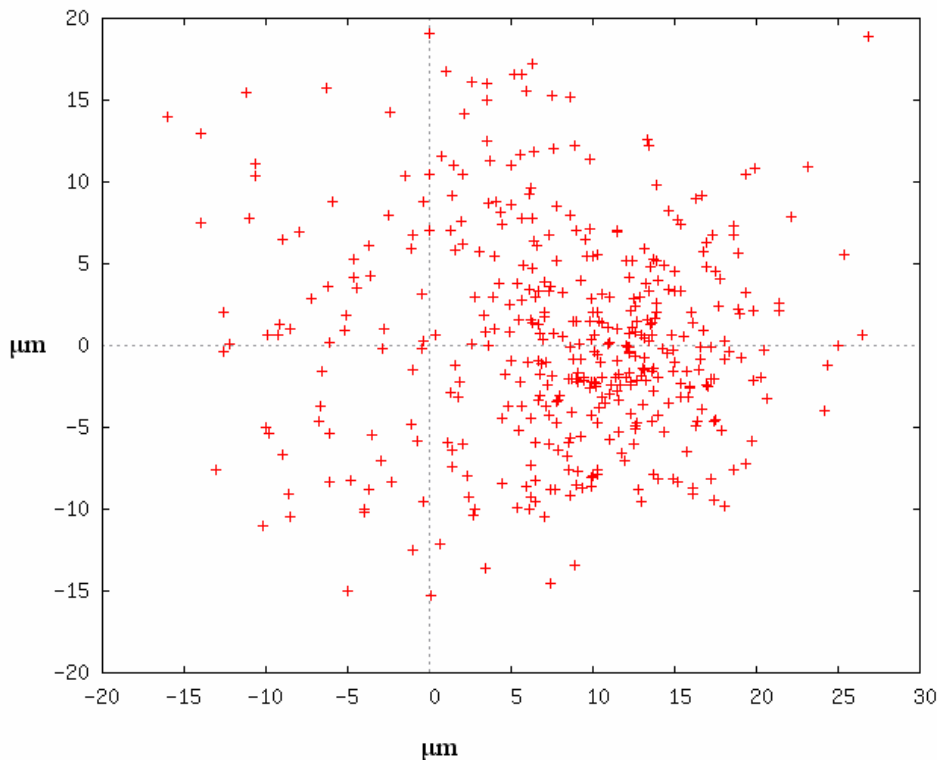


**A hordozó gél deformációját mutató montázs.** Két, időben egymást követő felvétel közül az elsőn pirosra, a másodikikon zöldre színeztük az egyébként pirosan fluoreszkáló gyöngyöket egy elnyúlt sejt alatt. Ezután a két képet egymásra másoltuk. A jobbra mozgó magvú sejt nem látszik a fluoreszcens képen, ezért berajzoltuk fehér szaggatott vonallal a körvonalát a fáziskontraszt kép alapján. A sárga foltok olyan gyöngyöket mutatnak, amelyek nem mozdultak el a két felvétel között. Az egymáshoz közeli piros és zöld pöttyök jelölik az elmozduló gyöngyöket, az elmozdulás irányát nyilakkal jelöltük. A sejtől távoli területeken nem mozdultak el a gyöngyök: bekarikázott pöttyök.

A gél deformációja a sejtmag és a sejt elejének (vezető élének) közelében volt jelentős. A sejtmag alatt lévő gél a legtöbb sejtnél a sejtmag mozgásával azonos irányba húzódtott. A sejt vezető élénél egy nagyobb erő az ellenkező irányban, tehát hátrafelé deformálta a gél. A hordozó időfüggő deformációi fázisban voltak a sejtmag mozgásával.

A bipoláris C6 sejtek lényegesen kisebb erőt fejtettek ki a gél hordozóra, mint az a kötőszöveti vagy izomsejteknel szokásos. Az erős húzóerő hiánya segítette a sejtmag vándorlásából származó gyenge erő detektálását, amely a gél enyhén deformálta.

**A miozin-II fehérjemotor szerepe a sejtmag vándorlásában.** Videomikroszkópos kísérletekkel vizsgáltuk két miozin-II-gátló szer, a blebbisztatin és az ML-7 hatását a sejtmag vándorlására. Mindkét drog erős morfológiaváltozást okozott 20  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban. A normál kiterült morfológia helyett elnyúttakká váltak a sejtek hasonlóan ahhoz, ami a vékony fehérjecsíkokon megszokott. Ha a mikromintázat csíkjain lévő sejteknek adtunk mizon-II-gátló szert, a sejtek még elnyúttabbá váltak. Korábbi kísérleteinkkel összhangban a sejtmagok az elnyútt sejtekben a drogok ellenére mozgékonyak maradtak. Alacsonyabb koncentrációban, 10-20  $\mu\text{M}$  mellett az ML-7 ugyanakkor enyhén csökkentette a mozgó sejtmagok sebességét erős morfológiai hatás nélkül. Blebbisztatinnal nem találtunk ennek megfelelő, a sejtmag mozgását lassító koncentrációtartományt, viszont érdekes módon kiváltotta a sejtmag lemaradását a centroszómához képest. Emellett a gél hordozón mérhető erő csökkenését okozta a blebbisztatin; a sejt vezető élénél egyébként tapasztalható erős húzóerő eltűnt.



**A centroszóma relatív pozíciója a sejtmag középpontjához képest 20  $\mu\text{M}$ -os blebbisztatin kezelés után  $\mu\text{m}$ -es skálán.** A koordináta-rendszer vízszintes tengelyét a sejtmag mozgásának irányában, azaz az elnyúlt sejt tengelyével azonos irányban vettük fel. A blebbisztatin gátolja a miozin-II fehérjemotor működését, melynek hatására a sejtmag lemarad a centroszóma mögött.

## Diszkusszió

Hosszú távú fluoreszcens videomikroszkópia segítségével követtük a sejtmag vándorlását és a GFP-centrinnel jelölt centroszómát elnyúlt, bipoláris C6 patkány glióma sejtekben fehérje mikromintázatokon <sup>1</sup>. A centroszóma vagy a centroszóma pár szinte mindig a sejtmag közelében volt. Korábbi megfigyeléseinkkel ellentétben a centroszóma nem bizonyult kulcsfontosságú faktornak a sejt polaritás meghatározásában. Ugyanakkor a centroszóma pozíciója mutatott bizonyos korrelációt a sejtmag sebességével. A kiterült (nem bipoláris) sejtekben a sejtmag forgása során a centroszóma nem mutatott elfordulást.

Korábban azt találtuk, hogy a sejtmag mozgása erősen mikrotubulusfüggő. Az aktin-miozin rendszerre ható drogok csak enyhén befolyásolták a jelenséget. Újabb eredményeink megerősítik, hogy a miozin-II molekuláris motor gátlása az ML-7 nevű vegyülettel nem blokkolta a sejtmag mozgását még magas koncentrációk mellett sem. Ugyanakkor az alacsony koncentrációban (10-20  $\mu\text{M}$ ) adagolt ML-7 csökkentette a sejtmag sebességét. A szintén miozin-gátló blebbisztatin a sejtmag centroszómához

<sup>1</sup> A centroszóma a mikrotubulusok, és így az egész sejt váz központi szervező egységének tekinthető, az irodalom szerint meghatározó szerepe van a sejtmag mozgásában. GFP: green fluorescent protein, centrin: a centroszómát alkotó egyik fehérje. Glióma: az agyi glia sejtéből származó tumor. *In vitro* kísérletekben gyakran használják az ún. C6 sejteket.

képesti lemaradásához vezetett 20  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban. A blebbisztatin csökkentette a sejt alatti gélen mérhető húzóerőt a mag vándorlásakor. Ezek az effektusok azt valószínűsítik, hogy a miozin hozzájárul a sejtmag mozgásához a sejtmag hosszú távú vándorlása során, de nem nélkülözhetetlen.

Feltérképeztük a sejtek által kifejtett erőt. A sejteket gél hordozóra ültettük, melyben fluoreszcens mikrogöngyöket helyeztünk el. A hordozóra kifejtett erő meghatározható a gél deformációjából, melyet a gyöngyök elmozdulása mutat fluoreszcens mikroszkópban. Azt találtuk, hogy a sejtek által kifejtett erő a sejt eleje (vezető él) és a sejtmag között lokalizálódik a sejtmag vándorlása során. A sejtmag közelében a gél a sejtmag mozgásával megegyező irányban deformálódott, míg ezzel ellentétes irányban a sejtmagtól távol, a vezető élnél.

Eredményeink tükrében azt a konklúziót vonjuk le, hogy a sejtmagot kettős erő hajtja. A mikrotubulusfüggő erő a centroszómánál hat, míg a miozin-II alapú erő a centroszómától függetlenül hat. Hipotézisünk szerint a centroszóma helyzetét ezen két erő aránya szabja meg a sejtmag vándorlásakor.