

Endotél sejtek hálózatképzése

Tudományos Diákköri Dolgozat

Kósa Edina

Témavezető: Czirók András

ELTE Biológiai Fizika Tanszék

2008

Bevezetés

Melegvérű gerincesekben a korai embrionális érhalózatot még a szívműködés megindulása előtt több száz, nagyjából azonos sejt kollektív viselkedése alakítja ki¹². A folyamat során a mezodermből véletlenszerű helyeken differenciálódott endotél sejtek előbb aggregátumokba szerveződnek, majd nyúlványaik segítségével hálózatot képeznek. A mechanizmus önszervező jellegére a következő tapasztalatok utalnak: egyrészt, az egyes érszegmensek elhelyezkedése nagyfokú egyedi változatosságot mutat, és kialakulása során a hálózat topológiája többször átalakul^{2,15}. Másrészt, izolált érsejtek hasonló hálózatokat hoznak létre olyan mesterséges körülmények között, ahol nincs jelen a feltételezhetően pozicionális irányítást adó természetes szöveti környezet³.

Már jelenleg is számos terápiás kísérlet próbálja az érhalózat növekedését stimulálni, illetve gátolni^{10,13}. Az érfalakat felépítő sejtek önszervező viselkedésének megértése számottevően segítheti ezeket a próbálkozásokat, valamint megkerülhetetlen része a szövetek mesterséges előállítására tett erőfeszítéseknek is²¹.

Az érhalózat döntő részben embrionális korban végbemenő kialakulása különösen jól vizsgálható madárembriók fejlődésének fénymikroszkópos nyomkövetésével¹. Az embrió a tojás sárgájának felszínén, egy kísérleti vizsgálatok számára könnyen hozzáférhető felületen kerül el. A fürjekre (*Coturnix coturnix japonica*) jellemző, jól észlelhető endotél specifikus sejtfelszíni molekuláris marker (QH1) lehetővé teszi az endotél sejtek és struktúrák azonosítását és vizualizációját az élő és fejlődő embriókban¹¹.

Madárembriókban a mezodermből differenciálódó kisebb sejtaggregátumok, az ún. vérszigetek jelentik a keringési rendszer első felismerhető elemeit, melyek a tényleges embrióon kívüli, extraembrionális szövetben jelennek meg¹². A vérszigetek perifériáján az endotél sejtek, míg közepén a hemopoietikus sejtek prekursor sejtjeit találjuk. Előbbiek (angioblasztok) hozzák létre az elsődleges érhalózatot, a primer plexust, utóbbiakból pedig az elsődleges vér funkcióit ellátó szövet alakul ki. Az intraembrionális szövet területén vérszigetek helyett csupán egyedülálló angioblasztok figyelhetők meg, melyek vagy helyben hoznak létre egy eret, vagy elvándorolnak és összeolvadnak más angioblasztokkal, illetve már meglévő ágakkal. A két terület hamar összeköttetésbe kerül, és néhány óra után megindul a vérkeringés. Az angioblasztok differenciálódását, osztódását, illetve a poligonális hálózatot formáló, az aortát és a főbb ereket tartalmazó elsődleges plexus kialakulásának folyamatát vaszkulogenezisnek nevezzük. Ezt követően az angiogenezis során a kialakult elsődleges érhalózat tovább formálódik, egyes ágak visszafejlődnek, míg más szegmensek egyesülésével

nagyobb erek jönnek létre, illetve új erek is megjelenhetnek. Az érfalak stabilizációjával létrejön a kifejtett szervezetre jellemző mintázat, ami a későbbiekben is képes a környezeti hatásokhoz alkalmazkodni¹⁸.

Amint azt a vaszkulogenezis folyamatáról készült hosszútávú fénymikroszkópos megfigyelések megmutatták, az érhálózat-képzés folyamán a mezodermális eredetű prekursor sejtekből differenciálódott egyéni, illetve kisebb aggregátumokba szerveződött endotél sejtek kezdetben különálló klasztereket alkotnak¹⁵. Az idő előrehaladtával ezek a csoportok összekapcsolódnak, és lineáris sejtláncokat képeznek. A lineáris szegmensek jellemzően egy ún. "csírázási" (sprouting) mechanizmussal jönnek létre. A csoport egy sejtje egy vékony nyúlványt bocsát a környező sejtközötti állományba, melynek mentén további sejtek vándorolnak ki, miközben egymással és az eredeti aggregátummal is kapcsolatban maradnak. Az így létrehozott lánchoz a szomszédos helyekről még további sejtek csatlakozhatnak, újabb összeköttetéseket és csomópontokat teremtve a mintázatban, mígnem a lineáris szegmensek egymással is összekapcsolódnak. A folyamat eredménye egy karakterisztikus poligonális szerkezetű, sejtmentes területet körülölelő hálózat lesz. A következő lépésben az egyes lineáris szegmenseket alkotó néhány sejt lumeneket formál és csöveket hoz létre, melyek aztán nagyobb átmérőjű erekké olvadhatnak össze¹⁴.

A szöveti sejtek számára dinamikusan változó környezetet jelentő extracelluláris mátrix (ECM) egyik gyakori komponense a fibronectin, mely szerepet játszik a sejtek kitapadásában, és így közvetve a sejtek migrációjában, differenciációjában és osztódásában is⁹. A fejlődő erek bazális oldalát beborító alaphártya is fibronectinben gazdag⁵, és a fibronectin nélkülözhetetlen szerepet játszik a vaszkulogenezis folyamatában: azok a géniütött egérembriók, amelyekből hiányzik a fibronectin gén vagy a fibronectin fő receptorának, az $\alpha 5 \beta 1$ integrinnek az egyik összetevője, életképtelenek, érhálózatuk fejlődése súlyos rendellenességekkel történik⁶. Nem ismert azonban, hogy a fibronectin hiánya milyen módon akadályozza meg a vaszkulogenezis folyamatát. Egyes feltételezések szerint az endotél sejtek migrációjuk során bizonyos jól definiált, az ECM-ben "előrejelzett" útvonalat követnek²⁰ - a fibronectin-tartalmú ECM rostok különösen alkalmasak lehetnek erre a szerepre.

Célkitűzések

A bemutatott munkám célkitűzése kettős. Egyrészt, in vitro modellek segítségével tanulmányozzuk a sejtek többsejtű "csírázását", azaz azt a folyamatot amikor több sejt együttes mozgása egy lineáris struktúrát eredményez. Másrészt, részben az in vitro modellek,

részben fejlődő madárembriók hosszútávú (time-lapse) mikroszkópos felvételeinek kiértékelésével behatároljuk a fibronectin vaszkulogenezis során betöltött lehetséges szerepét. A nemrég létrehozott BCE endotél sejtvonal¹⁹ egy sokkal egyszerűbb in vitro endotél modell lehetőségét ígéri, mint a hagyományos primer (HUVEC, BAEC) sejtek. Megvizsgáljuk, hogy kialakíthatóak-e olyan tenyésztési körülmények, amelyekben a kollagén-I gélbe ágyazott BCE sejtek is hálózatokba kapcsolódnak össze. A háromdimenziós tenyészetek hosszútávú mikroszkópos megfigyelésével meghatározzuk, hogyan jönnek létre a sejhálózatok. Ismeretes, hogy bizonyos nem-endotél sejtek kétdimenziós tenyészteteiben is lineáris struktúrák képződnek. Mivel a kétdimenziós tenyésztőfelület lehetővé teszi az egyes sejtek és sejtalakok megkülönböztetését, az egyes sejtek trajektóriáinak elemzésével meghatározzuk a sejtmozgások és a kialakuló mintázat kapcsolatát.

Fixált embriók immunjelölésével, részletes időfelbontással feltérképezzük a fibronectin eloszlását a vaszkulogenezis különböző fázisaiban, különös tekintettel az érhálózat lehetséges ECM előmintázatára. Egy, a fibronectin polimerizációját gátló fibronectin fragmenst felhasználva megvizsgáljuk a fibronectin szerepét a háromdimenziós in vitro modellrendszerekben. Mikroinjektált ellenanyagokkal pulzus-immunjelölt embriók fejlődéséről készült képsorozatokot elemezve megvizsgáljuk az ereket burkoló alaphártya fibronectin komponensének összeállítását, illetve az endotél sejtek mozgásának és a fibronectin rostoknak a kapcsolatát.

Anyagok és Módszerek

Immunjelölés

A különböző inkubálási időknél megfelelően eltérő fejlődési stádiumban lévő fűrj embriókat (*Coturnix coturnix japonica*, Ozark Egg Co., Stover, MO) egy, a szikhártyához tapadt papírgyűrű segítségével tettük hozzáférhetővé a manipulációk elvégzéséhez. Az embriókat EPBS-sel (embryonic phosphate buffered saline) mostuk.

A fixálást 3%-os paraformaldehidben végeztük szobahőmérsékleten 45 percig. A szikmembrán eltávolítása után az embriókat abszolút metanolban permeabilizáltuk (4°C, 1 óra), és egyre csökkenő koncentrációjú etanol-víz oldatban rehidráltuk, majd 0,01 % azidot tartalmazó PBS-ben többször megmostuk. A fixált embriókat először 3%-os BSA-ban (bovine serum albumin) inkubáltuk (4°C, 12-18 óra), majd nyúl anti-TAL1 (Dr. C. Drake, Medical Univ. of South Carolina) és egér monoklonális B3D6 (Developmental Studies Hybridoma Bank) elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk (4°C, 12-18 óra, hígítás TAL1 1:500, B3D6

1:8000). Többszöri PBS-ben történő mosás után ismét 3 %-os BSA-ban blokkoltuk az embriókat, végül alkalmas fluorokrómmal ellátott másodlagos antitestekkel (TAL1: poliklonális szamár anti-nyúl + Alexa-555, 1:1000; B3D6: poliklonális kecske anti egér + Alexa-647, 1:1000), illetve az endotél sejtek kimutatására szolgáló direkt konjugált (Alexa-488) monoklonális QH1 (Developmental Studies Hybridoma Bank) ellenanyaggal inkubáltuk őket (4°C, 12-18 óra, hígítás 1:1000).

A mikroinjektálásra szánt embriókat a tojásból történő eltávolítás és megtisztítás után 5 % agar felületre helyeztük ventrális oldalukkal felfelé. A Cy3 fluoroflórral konjugált QH1 és B3D6+Alexa-488 ellenanyagokat 1 ng/nl koncentrációban, 25 nl-es adagokban a szomitáktól laterálisan, mindkét oldalon injektáltuk, oldalanként 2-4 pozícióban. A művelethez használt 18 µm belső átmérőjű injektáló tűt az endoderma és a splanchnikus mezoderma közé, az érhalózat-képződés aktívan zajló területére vezettük be. A tű pozicionálása egy mechanikus mikromanipulátorral (Narishige) történt.

Sejttenyészetek

A háromdimenziós kollagén gélbe kevert in vitro kultúrákhoz kapilláris (BCE, bovine capillary endothelial cell line) és köldökzsínór (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells) endotél sejteket használtunk. A primer HUVEC sejteket (Invitrogen) 2 % főtális borjúsavót (FCS, Gibco) tartalmazó ECGM-ben (endothelial cell growth medium, Promocell), a BCE sejteket 10 % FCS-sel és 3 ng/ml bFGF növekedési faktorral kiegészített DMEM-ben (Dulbecco`s modified essential medium, Sigma) tartottuk fenn. A sejteket 35 mm-es csészékben 37 fokos, 5 %-os széndioxiddal dúsított levegőjű inkubátorban tenyésztettük.

3D kollagén gél

A mesterséges háromdimenziós környezetet patkányfarkok kollagén-I gélben (Becton-Dickinson) hoztuk létre, melynek pH-ját 10X PBS-sel és 1 M NaOH-dal állítottuk be, majd belekevertük a sejteket 10^5 - 10^6 sejt/ml sűrűségben. Tapasztalataink szerint ennél alacsonyabb sejtsűrűség esetén nem alakul ki mintázat a szétszórt sejtekből, nagyobb sűrűségnél pedig a sejtek összehúzzák a gél, mely így leválik a tenyésztőedény faláról. Az elkészült sejt-gél keveréket 24, ill. 96 lyukú sejttenyésztő tálcákba helyeztük, előbbibe 250/500 µl, utóbbiba 80 µl térfogatot téve, majd fél óráig inkubáltuk 37 C fokon. A kultúrákhoz (végső koncentrációt tekintve) 40 ng/ml bFGF (basic fibroblast growth factor, Invitrogen), 40 ng/ml VEGF (vascular endothelial growth factor, Sigma-Aldrich), 50 ng/ml PMA (phorbol myristate acetate, Sigma-Aldrich) és 50 µg/ml aszkorbinsav adalékokat tartalmazó tápoldatot adtunk, melyet háromnaponta cseréltünk. Ahol jelöltük, 75 µg/ml 70 kDa fibronektin fragmenst

tartalmazott a tápoldat. A preparátumokat 3-5 %-os paraformaldehiddel fixáltuk 30 percig szobahőmérsékleten, és toluidinkékkel festettük meg.

Videomikroszkópia

Sejtkultúrák hosszú távú mikroszkópos megfigyeléséhez az ELTE Biológiai Fizika Tanszékén működő, Leica DMIRB inverz mikroszkópra és Olympus Dp70 kamerára épített automatizált rendszert használtuk. A rendszerben egy mini-inkubátor biztosítja a sejtek fenntartásához szükséges hőmérsékletet és léggört. A tárgyasztal mozgásával egyszerre több látótér nyomkövetése is lehetséges több fókusz síkban. A képsorozatok 10X nagyítású objektívvel készítettük minden tíz percben.

Az embrionális érhalózat időbeli fejlődését a University of Kansas Medical Center Anatómiai és Sejtbiológiai Tanszékén működő videomikroszkópos rendszerrel vizsgáltuk¹.

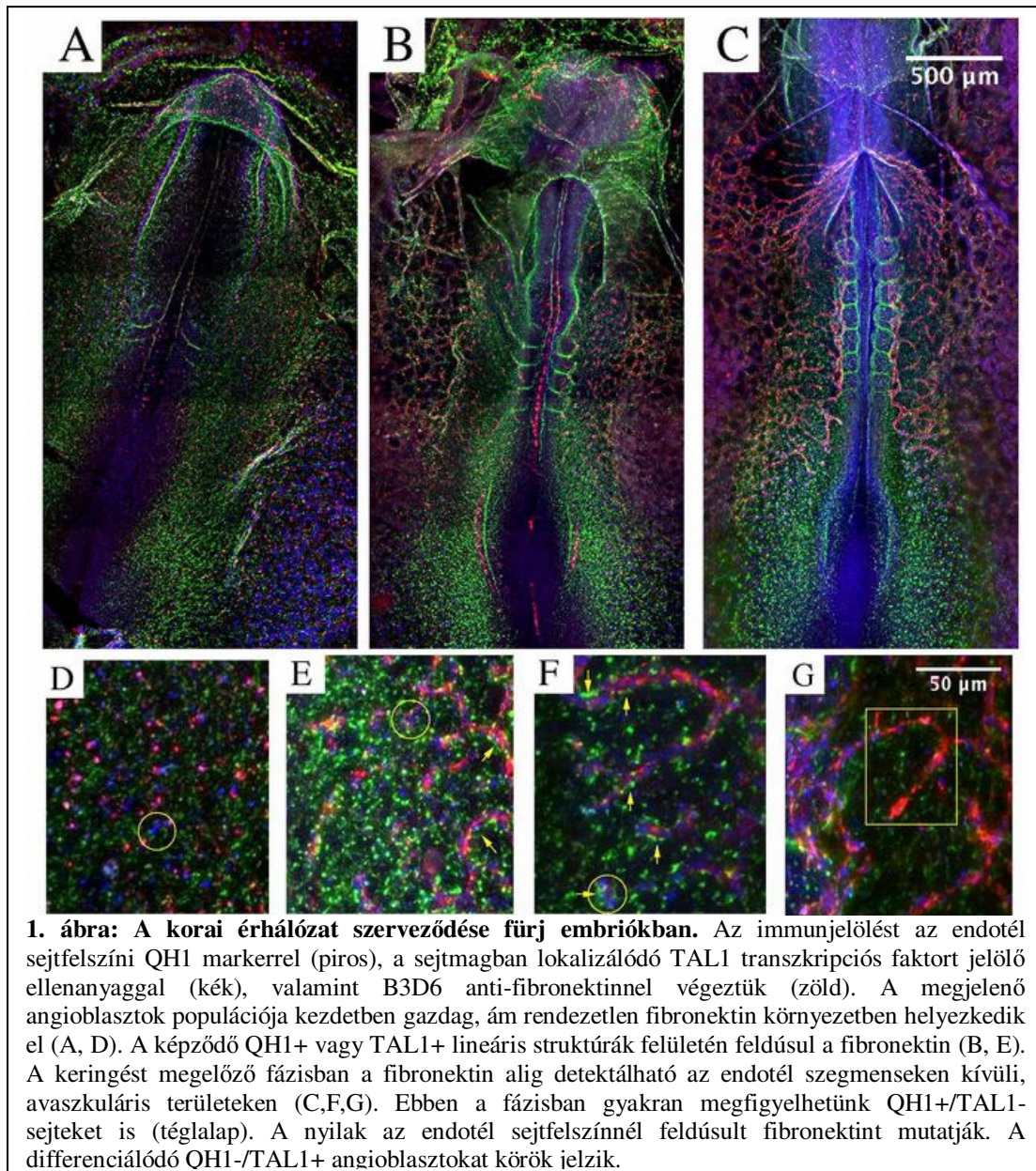
Eredmények

Érhalózat morfológiája és immunjelölése a vaszkulogenezis során

Fixált embriók immunfluoreszcens jelölésével nyomkövethető az elsődleges érhalózat morfológiájának kialakulása. Az 1. ábra mutatja három, az embrionális fejlődés különböző stádiumaiban lévő egyed immunjelölését háromféle ellenanyaggal: (i) a QH1 egy fűrj-specifikus antitest, a felismert epitóp az endotél sejtek felszínén található¹¹; (ii) a TAL1 transzkripciós faktort az irodalom az endotél sejtek differenciációjakor a sejtmagban hamar kimutatható markerként tartja számon⁴; (iii) a B3D6 anti-fibronectin az endotél sejtek ECM környezetét vizualizálja.

A fejlődés kezdeti szakaszában (HH6⁸) az elsőként megjelenő endotél prekursor sejtek (angioblastok) struktúrátlan fibronectin környezetben helyezkednek el, azaz nem látható fibronectin előmintázat (1A és 1D ábrák). A következő fázisban (HH 7-8) az endotél sejtek lineáris szegmenseket képeznek, amelyek egy részét már fibronectin burkolja be (1B és 1E ábrák). A vaszkulogenezis utolsó fázisában, a keringés megindulása előtt (HH9) az érhalózat anterior részén az endotél sejtek már csöveket alkotnak, a fibronectin pedig jórészt az érfalakban található - az avaszkuláris területeken alig kimutatható (1C, 1F és 1G ábrák). A fibronectin tehát nagyon hamar, sokszor még a QH1 marker megjelenése előtt feldúsul az endotél sejtek felszínén, előmintázatot azonban nem alkot.

Az irodalom szerint a lineáris sejtláncok hálózattá szerveződése egyrészt a fej-farok tengely mentén halad posterior irányba, másrészt laterálisan az extraembrionális szövetből az intraembrionális szövet irányába⁴. Ennek megfelelően, a hálózat anterior részén a TAL1 mintázat korrelál a QH1 jelöléssel, míg a posterior régióban, ahol az érhalózat-képződés



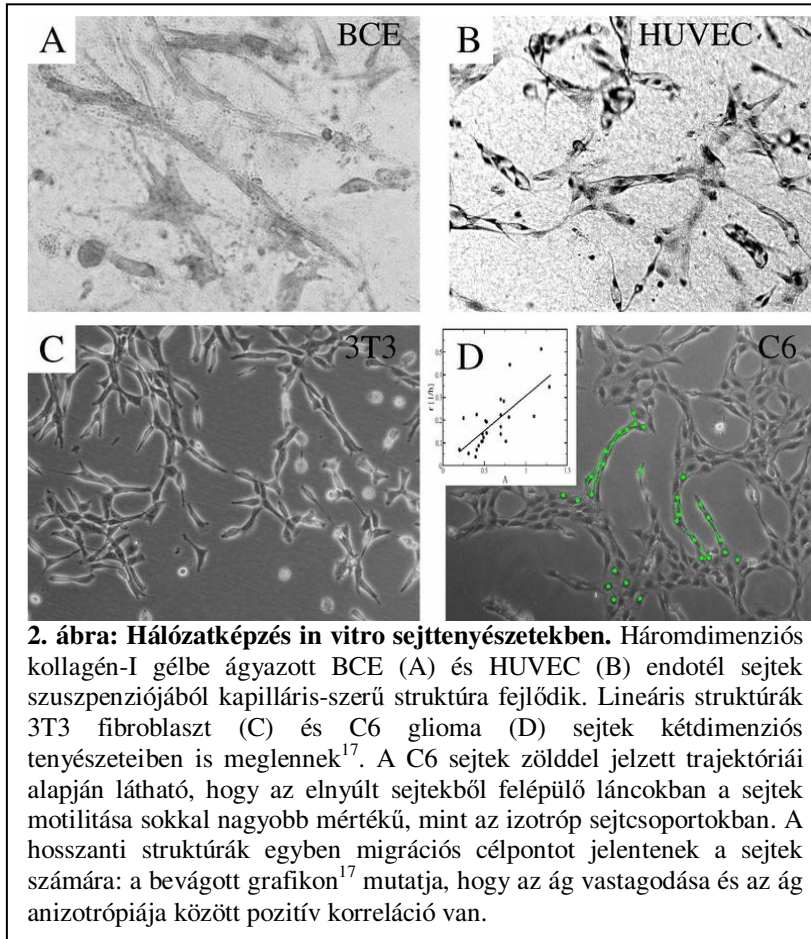
később történik meg, jellemzően TAL1+/QH1- sejteket azonosíthatunk. Meglepő módon azonban TAL1-/QH1+ sejtcsoportokat is azonosítottunk HH 7-8 embriókban - a TAL1 transzkripciós faktor tehát bizonyos endotél sejt magokban nem, vagy csak nagyon rövid ideig (legfeljebb 1 óráig) található meg. Ezek a sejtek jellemzően a dorzális aortáktól laterálisan találhatóak, egy olyan területen, ahonnan az elsődleges érhalózat visszahúzódik.

Sejthálózatok in vitro tenyészetekben

A korai embrionális érhalózatot jellemző mintázathoz nagy mértékben hasonló, lineáris szegmensékből álló struktúrák létrehozására természetes szöveti környezetükből kiragadott endotél sejtek is képesek. Egy, a köldökzsínór endotél sejtekre (HUVEC) kidolgozott tenyésztési módszert módosítva megmutatjuk, hogy a nemrég létrehozott kapilláris (BCE)

vonala¹⁹ sejtjei is összekapcsolódó, lineáris sejláncokat és kapilláris-szerű struktúrákat alakítanak ki homogén, háromdimenziós kollagén-I gél környezetben (2. ábra).

Bár a mintázat morfológiája és kialakulásának időskálája eltérő a két sejt típus esetében, a kollagén gélbe kevert sejtek struktúrája ECM-előmintázat nélkül - megfelelő sejtsűrűség és



növekedési faktor keverék jelenléte esetén - a sok hasonló sejt önszerveződésével alakul ki.

Többsejtű, lineáris szegmensekből álló hálózatot ráadásul nem csak endothél sejtek hoznak létre in vitro. Amint a 2C és 2D ábrák mutatják, erre több más sejt vonal is képes: a C6 glióma és a 3T3 fibroblaszt vonalak sejtjei is hálózatos szerkezetbe rendeződnek a szokásos merev tenyésztési felületen. Bár a morfológia kevésbé emlékeztet az elsődleges érhálózatra, statisztikai

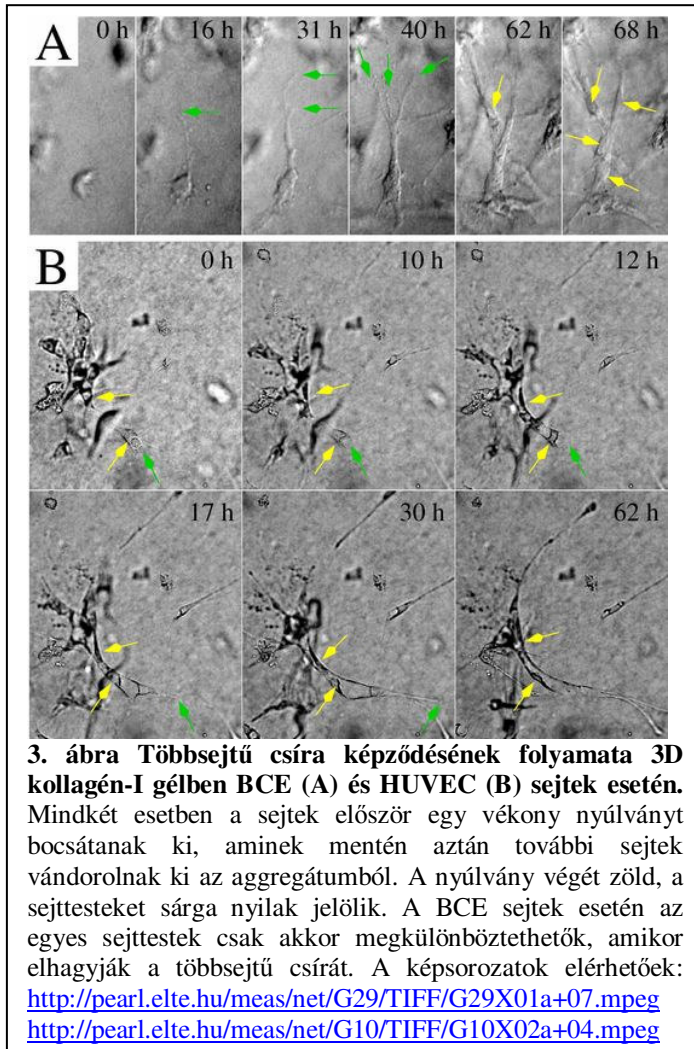
vizsgálataink alapján a sejtek eloszlása nem véletlenszerű, és szubkonfluens sejtsűrűségek esetén a lineáris alakzatokat preferálják¹⁷.

A többsejtű in vitro hálózatok kialakulásának dinamikája

Mint azt korábbi, hosszútávú automatizált mikroszkópos vizsgálatok megmutatták, az elsődleges érhálózat kialakulása jellemzően többsejtű "csírázással" (sprouting) történik¹⁵. A folyamat során egy aggregátumból több sejt egyidejűleg kiáramlik ugyanazon az útvonalon miközben egymással sejt-sejt kontaktust tartanak.

A 3. ábrán megmutatjuk, hogy a háromdimenziós kollagén-I gélben kialakuló endothél hálózatok is hasonló módon, csírázással jönnek létre. A csírázás során egy különálló, illetve kisebb aggregátumban jelenlévő sejt megnyúlt formát vesz fel, és kibocsát egy vagy több vékony nyúlványt, mellyel kapcsolatot teremthet a környező aggregátumok sejtjeivel. Ez a nyúlvány egyfajta migrációs ösvényt biztosít az aggregátum többi sejtje számára, amely

mentén mozogva hamarosan többsejtű ágat hoznak létre. Felvételeink szerint a képződő csíra a kezdeti csoportosulásból kivándorló, illetve a szomszédos területekről csatlakozó sejtek valamint osztódások által is növekszik. Megfelelő sejtsűrűség esetén néhány nap (HUVEC) illetve egy hét (BCE) elteltével a több sejtből álló lineáris struktúrák hálózatba kapcsolódnak.



A mintázatképződési folyamat különösen jól követhető a két-dimenziós tenyésztőfelületen lineáris szegmenseket képző sejtvonalak esetén, ahol az egyes sejtek alakja és mozgása könnyen azonosítható (2D ábra). Sejttrajektóriák statisztikai elemzésével megmutatható, hogy a sejtek morfológiája jelentősen befolyásolja a sejtek migrációját. Elnyújtott sejtek, valamint a belőlük összeálló lineáris struktúrák mentén a sejtek mozgékonyabbak, mint a jól kiterült sejtek szomszédságában (2D ábra¹⁷). A csírák egyben migrációs célpontok is: a sejtek bevándorlásából adódóan a csírák területének és szélességének növekedése lényegesen meghaladja a jól kiterült sejtek

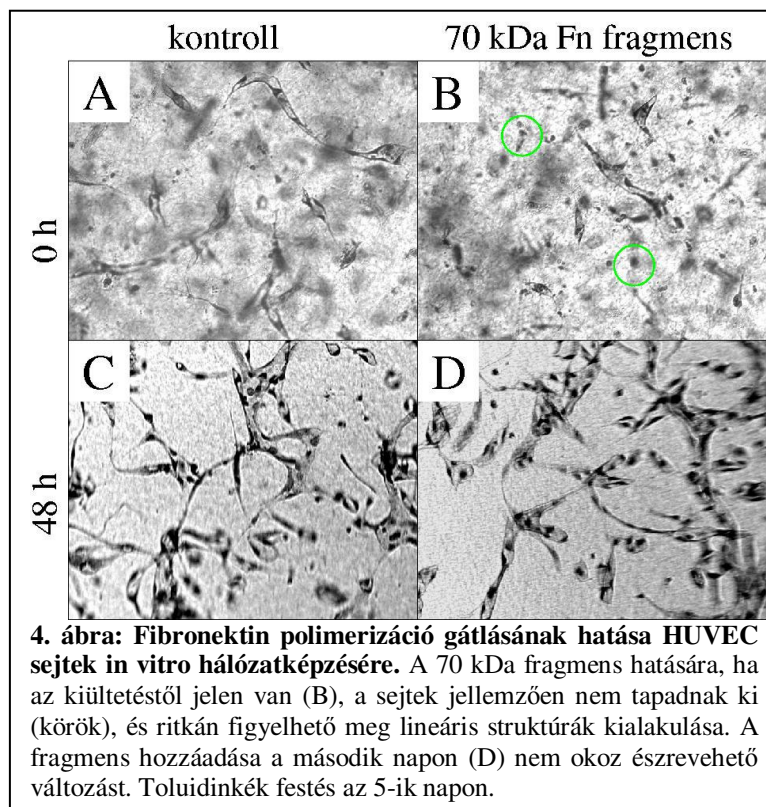
csoportjának növekedését. A sejtek beáramlása így addig növeli a csíra hosszát, míg az össze nem kapcsolódik más hasonló struktúrával. Megfelelően alacsony sejtsűrűség esetén a kialakuló szegmensek sejtmentes területeket vesznek körül.

A kísérleti megfigyeléseink tehát mind az in vivo mind az in vitro rendszerekben arra engednek következtetni, hogy a lineáris láncokból felépülő hálózatos mintázat egy hasonló, többsejtű csírázási mechanizmus eredménye. A csírákat képző sejtek alakja szembetűnően megnyúlt az in vivo és in vitro kísérletekben egyaránt. A jól analizálható kétdimenziós tenyészetekben a sejtek nagyobb valószínűséggel migrálnak elnyújtott szomszédaik, mint jól kiterült szimmetrikus társaik irányába. Ez az anizotrópia kutatócsoportunk hipotézise szerint egy meghatározó, alapvető tulajdonság a lineáris szegmensekből felépülő mintázatok képződésében: a hosszán elnyújtott sejtek indítják be és irányítják a folyamatot¹⁶. A sejtalak

érzékelését esetleg az teszi lehetővé, hogy az elnyúlt alakú sejtek mechanikai feszültség alatt vannak, és ezért sejtvázuk merevebb. Számos megfigyelés utal arra, hogy a sejtek érzékelik a környezet mechanikai paramétereit, és általában jobban kedvelik a merev környezetet⁷. Ezt a képet támasztja alá az a kísérletünk is, amikor a miozin II gátló blebbistatin hatására a C6 sejtek alakja ugyan tovább nyúlt, de a hálózatformáló képességük megszűnt (be nem mutatott adatok).

A fibronektin szerepe

Háromdimenziós kollagén-I gélbe ágyazott HUVEC tenyészeteket a fibronektin dimerek polimerizációját akadályozó 70 kDa fibronektin fragmenssel kezeltünk. A fragmenst vagy



kiültetéskor, vagy 48 óra elteltével adtuk a tenyészetekhez. A fixált mintázatokat a tenyésztés 5. napján kiértékelve jelentős hatás látható, ha a fragmens a kiültetéstől kezdve jelen volt a kulturákban (4A és 4B ábrák).

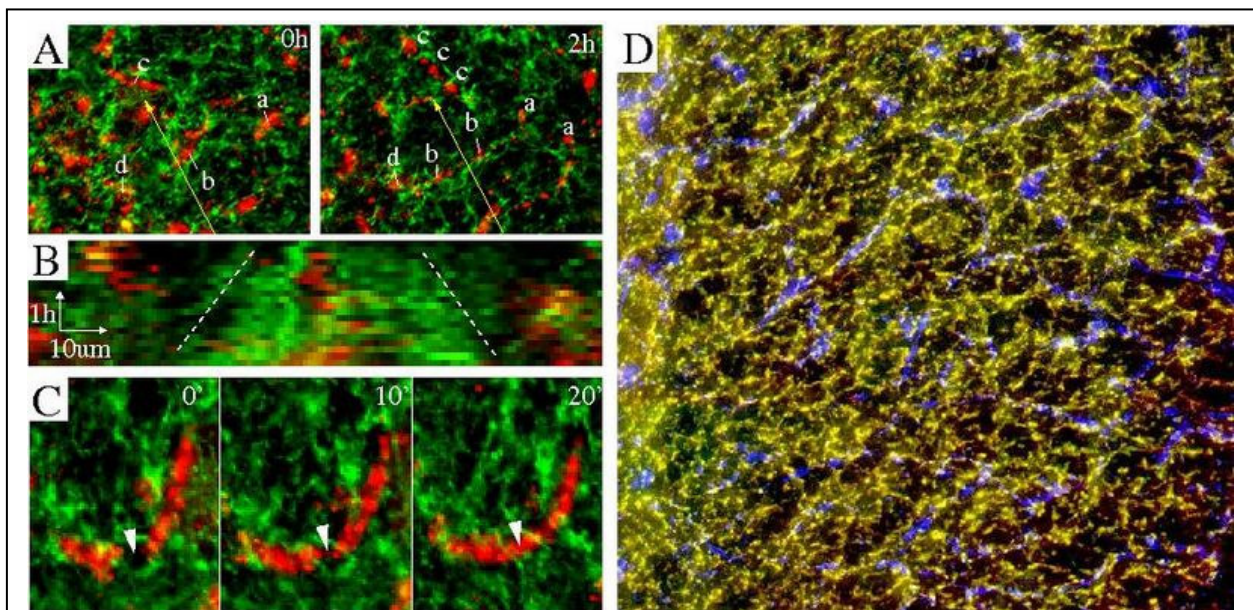
A sejtek sokszor megtartották a kiültetésre jellemző gömbölyű alakjukat, és csak néhány esetben figyeltünk meg lumen/vakuólum képződést vagy lineáris szegmensek kialakulását. Ezzel szemben nem

tapasztaltunk hatást sem a sejtek alakjában, számában, sem pedig a képződő struktúrák jellegében, ha a kezelés 48 óra után történt (4C és 4D ábrák), amikor az elnyúlt struktúrák jelentős része már kialakult. A fibronektin polimerizációjának tehát az in vitro modell rendszerben is fontos szerepe van az endotél hálózatok kialakulásánál. A rendszer így alkalmas lesz annak vizsgálatára, hogy a fibronektin gátolt polimerizációja milyen hatással van az egyedi endotél sejtek mozgására.

A fibronektint és az endotél sejteket mikroinjektált QH1-Alexa-647 valamint B3D6-Alexa-488 ellenanyagokkal vizualizálva az élő embriók fénymikroszkópos megfigyelésével nyomon követhető az a folyamat, amely a kezdeti struktúrátlan fibronektin és endotél sejt eloszlásból létrehozza az elsődleges érhálózatot a fibronektinben gazdag alaphártyával (1. ábra). Amint az

5A. ábra mutatja, a differenciálódó angioblasztokat kezdetben fibronektinben gazdag környezet veszi körül. A fibronektin rendezetlen eloszlású gombolyagok formájában figyelhető meg. Két óra eltelte alatt a pulzus-jelölt endotél sejtcsoportok szétvándorolnak, a fibronektin gombolyagok pedig kisebb aggregátumok összeállásával fokozatosan egyre strukturáltabb, lineáris rostokká formálódnak. Amint azt egy érszegmensre merőleges egyenes mentén felvett fluoreszcencia intenzitásprofil időbeli változása (5B. ábra) mutatja, a fibronektin rostok az erek mellé húzódnak, a "poligonális" elsődleges érhalózat avaszkuláris területeiről pedig eltűnnek. A szálak szerkezetű fibronektin sem vezeti az endotél sejtek mozgását (5C ábra), a sejtek elmozdulása és a szálak iránya korrelálatlan.

Az első pulzusjelölést négy óra múlva a fixált mintán egy második, B3D6-Alexa-555 fibronektin immunjelöléssel összevetve megállapítható, hogy a két jelölés teljesen kolokalizált



5. ábra: Pulzus-jelölt fibronektin és endotél sejtek átrendeződése az embrionális érhalózat fejlődése során. (A): Strukturálatlan fibronektin (zöld) környezetben szétszórt sejtcsoportokból (piros) két óra alatt a sejtek kivándorolnak, és lineáris alakzatokba rendeződnek. Az a-d betűk az egyes csoportokból kivándorolt sejteket jelzik. Ezalatt az idő alatt a fibronektin gombolyagok rostokká szerveződnek, és az érszegmensek köré húzódnak. (B): A fibronektin mozgását az A ábrán sárga nyíljal jelölt, az egyik szegmensre merőleges egyenes mentén felvett fluoreszcencia intenzitásprofilok időbeli alakulása mutatja. Szaggatott egyenesek jelölik a fibronektin ráhúzódását az ábra közepén elhelyezkedő érszegmensre. (C): A lineáris struktúrák kialakulásánál az endotél sejtek (nyílhegy) elmozdulása nem a fibronektin szálak mentén történik. (D): A mikroinjektált B3D6-Alexa488 (zöld) és a négy órával később fixált embrión végzett második B3D6-Alexa-455 fibronektin jelölés (piros) teljes egyezést mutat -- az elsődleges érhalózat láncai körül (kék) nem jönnek létre új fibronektin rostok.

(5D. ábra). Ez figyelemreméltó, hiszen (i) bizonyítja, hogy a mikroinjektált immunjelölés és a hagyományos fixált preparátumon történő immunjelölés ugyanazokat az epitópokat ismeri fel, valamint (ii) arra utal, hogy a vizsgált időszakban nem keletkeztek olyan fibronektin szálak, amelyek pótolnák az avaszkuláris területekről begyűjtött fibronektint. Ezen vizsgálatok alapján az elsődleges érhalózatot beburkoló, fibronektinben gazdag ECM tehát a mezoderma körülvevő, a gasztruláció során kialakuló mátrixfehérjék átrendezéséből származik.

Irodalom

1. Czirok, A., Rupp, P. A., Rongish, B. J., Little, C. D., 2002. Multi-field 3D scanning light microscopy of early embryogenesis. *J. Microsc.* 206:209-217.
2. Czirok, A., Zamir, E. A., Szabo, A., Little, C. D., 2008. Multicellular sprouting during vasculogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 81:269-89.
3. Davis, G. E., Black, S. M., Bayless, K. J., 2000. Capillary morphogenesis during human endothelial cell invasion of three-dimensional collagen matrices. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 36:513-519.
4. Drake, C. J., Brandt, S. J., Trusk, T. C., Little, C. D., 1997. TAL1/SCL is expressed in endothelial progenitor cells/angioblasts and defines a dorsal-to-ventral gradient of vasculogenesis. *Dev. Biol.* 192:17-30.
5. Ffrench-Constant, C., Hynes, R.O., 1988. Pattern of fibronectin gene expression and splicing during cell migration in chicken embryos. *Development* 104:369-382.
6. George, E., L., Georges-Labouesse, E. N., Patel-King, R. S., Rayburn, H., Hynes, R. O., 1993. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119:1079-1091.
7. Gray, D., Tien, J., Chen, C., 2003. Repositioning of cells by mechanotaxis on surfaces with micropatterned Young's modulus. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 66:605-614.
8. Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88:49-92.
9. Hynes, R., O., 1992. Integrins, versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.
10. Murphy, E. A., Majeti, B. K., Barnes, L. A., Makale, M., Weis, S. M., Lutu-Fuga, K., Wrasidlo, W., Cheresch, D. A., 2008. Nanoparticle-mediated drug delivery to tumor vasculature suppresses metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:9343-9348.
11. Pardanaud, L., Altmann, C., Kitos, P., Dieterlen-Lievre, F., Buck, C. A., 1987. Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development* 100:339-349.
12. Risau, W., Flamme, I., 1995. Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:73-91.
13. Rumpold, H., Wolf, D., Koeck, R., Gunsilius, E., 2004. Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis? *J. Cell. Mol. Med.* 8:509-518.
14. Rupp, P. A., Czirok, A., Little, C. D., 2003. Novel approaches for the study of vascular assembly and morphogenesis in avian embryos. *Trends Cardiovasc. Med.* 13:283-288.

15. Rupp, P. A., Czirok, A., Little, C. D., 2004. $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin-dependent endothelial cell dynamics in vivo. *Development* 131:2887-2897.
16. Szabo, A., Perryn, E. D., Czirok, A., 2007. Network formation of tissue cells via preferential attraction to elongated structures. *Phys. Rev. Lett.* 98:038102.
17. Szabo, A., Mehes, E., Kosa, E., Czirok, A., 2008. Multicellular sprouting in vitro. *Biophys. J.* 95:2702-2710.
18. Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., Holash, J., 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407:242-248.
19. Veitonmäki, N., Fuxe, J., Hultdin, M., Roos, G., Pettersson, R. F., Cao, Y., 2003. Immortalization of bovine capillary endothelial cells by hTERT alone involves inactivation of endogenous p16INK4A/pRb. *FASEB J.* 17:764-766.
20. Vernon, R. B., Lara, S. L., Drake, C. J., Iruela-Arispe, M. L., Angello, J. C., Little, C. D., Wight, T. N., Sage, E. H., 1995. Organized type I collagen influences endothelial patterns during "spontaneous angiogenesis in vitro": planar cultures as models of vascular development. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 31:120-131.
21. Wu, X., Rabkin-Aikawa, E., Guleserian, K. J., Perry, T. E., Masuda, Y., Sutherland, F. W. H., Schoen, F. J., Mayer, J. E. J., Bischoff, J., 2004. Tissueengineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287:H480-7.