

XXXII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia (OTDK)

Kolozsvár, 2015. április 15–18.

Antigén – Antitest kölcsönhatás tanulmányozása atomerő mikroszkóppal

Szerző:

Varga Béla

Babeş–Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, Fizika Kar,
Biofizika és Orvosi fizika szak, mesterképzés, II. év

Témavezető:

Dr. Váró György, tudományos tanácsadó

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Szeged, Biofizika intézet

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS	1
1.1. PÁSZTÁZÓ TŰSZONDÁS MIKROSZKÓPIA	2
1.2. AZ ATOMERŐ MIKROSZKÓPIA	3
<i>Mérési módok.....</i>	4
<i>A mintahordozó.....</i>	5
<i>A szonda</i>	5
<i>Detektálás</i>	6
1.3. AZ ATOMERŐ SPEKTROSZKÓPIA	7
<i>Az erőgörbe.....</i>	7
<i>Molekuláris felismerő folyamatok.....</i>	8
1.4. AZ ANTIGÉN ÉS AZ ANTITEST BEMUTATÁSA	10
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	11
2.1 A KÍSÉRLETI ESZKÖZÖK BEMUTATÁSA.....	11
<i>Antigén és antitest.....</i>	11
<i>AFM</i>	11
2.2 A KÍSÉRLET MENETE	12
<i>A mintakészítés.....</i>	12
<i>Az erőmérések mente.....</i>	13
<i>Adatfeldolgozás.....</i>	14
3. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK.....	15
<i>Az erők eloszlása.....</i>	16
<i>A kölcsönhatás paraméterei.....</i>	18
<i>A specifikusság bizonyítása.....</i>	18
<i>Az erőmérés jellege</i>	20
4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS KITEKINTÉS	22
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	22
HIVATKOZÁSOK.....	23

1. Bevezetés

Minden a kapcsolatokon múlik. Ez alól a biológiai szervezetek sem kivételek. Működésükért szervek, szövetek és sejtek összehangolt rendszere felel, melyek alapelemei molekuláris szintű kapcsolatokig vezethető vissza. A molekulák különböző kapcsolódásaikon keresztül szabályozzák és vezérlik a teljes szervezetet. Rengeteg molekula (fehérjék, lipidek, DNS, RNS) pontos kapcsolódásához van szükség a genetikai állomány megkettőződéséhez, a fehérje molekulák szintetizálódásához, jelátvitelhez, a sejtek alakjának megtartásához, az immunválaszhoz stb. A szervezetünkbe bejutó különböző idegen anyagok, objektumok (antigének) kiszűréséért az immunrendszer felel. Az antitestek a szervezet által termelt receptorok, melyek feladata az antigének befogása és semlegesítése. Kísérleteink során a szervezetünk védelmi vonalát képező immunrendszer egyik fontos pontját vizsgáltuk, egy specifikusan kötődő antigén-antitest molekulapár kapcsolódását. Két hasonló molekula közti kapcsolódási erő nN-nál kisebb erők skáláján mozog, melyek mérésére napjaink egyik hatékony eszköze az atomerő mikroszkóp.

Az 1980-as évek elején két neves fizikus, G. Binnig és H. Rohrer kifejlesztették a pásztázó alagút mikroszkópot (STM) [1]. Egy nagyon hegyes vezető tulajdonságú tűvel az alagút effektus jelenségét kihasználva, olyan felülettapogató készüléket készítettek, ami felülmúlta az optikai mikroszkópok felbontóképességét. Felfedezésükkel egy új mikroszkóp-család kibontakozását tették lehetővé, melynek egyik tagja az atomerő mikroszkóp (AFM) [2]. A készülék mindamellett, hogy szub-molekuláris felbontású háromdimenziós képek készítésére alkalmas, széles körben elterjedt biológiai minták és azok molekuláris szintű kapcsolatainak vizsgálatában. Felépítéséből adódóan nagy érzékenységgű erőméréseket tesz lehetővé, akár a pN-ok tartományában, ezáltal új kapukat nyitva a biológia valamint az anyagtudomány különböző területein. Az atomerő mikroszkópia erőmérésekre vonatkozó ágát atomerő spektroszkópiának (AFS) nevezik.

Kísérleteink során a mikroszkópnak ezt a tulajdonságát használtuk fel arra, hogy pontos erőméréseket végezzünk egy specifikus antigén-antitest kötési erejének vizsgálatára. Ezek a molekulák régóta kutatott területei a tudomány több különböző ágának, kötési erejük vizsgálata alapvető fontosságú az élettudományok területén.

Célunk az volt, hogy erőméréseket végezzünk a molekulapárt összetartó erők pN-os skáláján és meghatározzuk a molekulapárra jellemző kötési erők mérettartományát. Az erők nagyságát az elhúzási sebesség függvényében tanulmányozva, amely a szakirodalomban egy elfogadott módszer, meghatározzuk a kölcsönhatásra jellemző paramétereket. A mért erők

specifikusságának alátámasztása érdekében további erőméréseket folytatattunk antigént nem tartalmazó tű és antitestet nem tartalmazó felület között, valamint olyan antitesteket tartalmazó felületen, amelyet előzőleg antigénekkal blokkoltunk. További célunk volt, hogy megvizsgáljuk a kötések kialakulásának a molekulák térbeli helyzetétől való függését.

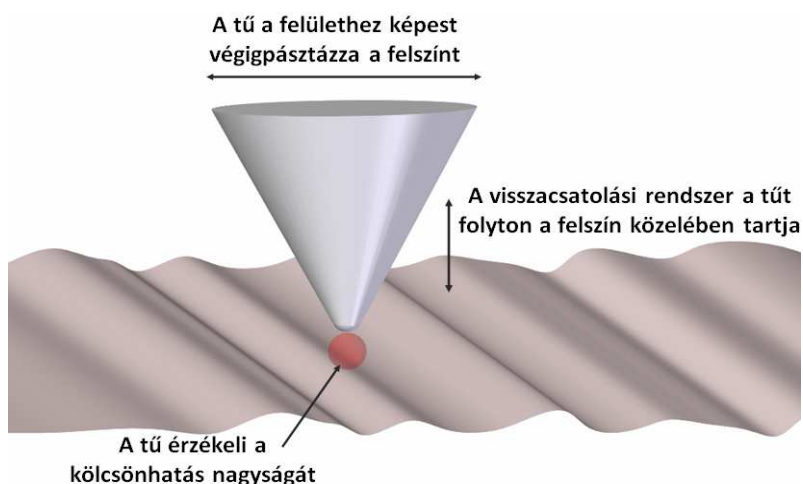
1.1. Pásztázó tűszondás mikroszkópia

Az 1980-as évek elején G. Binnig, H. Rohrer és munkatársaik [1], kifejlesztettek egy mikroszkópot, melynek felbontása vetekedett az elektron mikroszkópéval. A készüléket pásztázó alagút mikroszkópnak (STM) nevezték el. Az eszköz, melyről kiderült, hogy szilárd testek atomi felbontású vizsgálatát teszi lehetővé forradalmasította a mikroszkópiát és a felületi analízist. Felfedezésük egy teljesen új mikroszkóp család kibontakozását segítette elő, melyet pásztázó tűszondás mikroszkópiának (SPM) neveznek.

A pásztázó tűszondás mikroszkóp két fontos sajátossága a pásztázás és a közeli-mezőben (near-field) való működés (1. ábra). A pásztázás régóta használt a mikroszkópiában, viszont a közeli mezőben való működés újnak számított. Szükségessé teszi, hogy a szonda folyamatosan a minta közvetlen közelében maradjon. A pásztázó tűszondás mikroszkópia nem csupán egy módszer, ahol a szonda letapogatás útján pontosan leképezi a minta felületét, vagy morfológiáját, hanem a vizsgált objektummal való minden egyes találkozási pontjában elvégez egy lokális „kísérletet”. A végső kép az egyes „kísérletek” eredményéből és a szonda pozíciójából áll össze. A kapott kép tehát az általunk előre beállított kísérleti paraméterek szemszögéből láttatja a mintát. Következésképpen különböző paramétereket megadva teljesen más információkat kaphatunk ugyanarról a mintáról.

Egy a csúcán néhány atomból álló szondát közelítve egy felület felszínéhez, pár nanométeres közelségben van der Waals típusú vonzóerőt érzékelünk. Ha a rendszerre elektromos potenciál különbség van kapcsolva, elektrosztatikus erők is közrejátszanak (EFM).

Abban az esetben, ha a minta



1. ábra A pásztázó tűszondás mikroszkóp működési elve

és a szonda is ferromágneses tulajdonságokkal rendelkezik, ez mágneses erők kölcsönhatását eredményezi (MFM). A felület és a szonda közti távolságot 1 nm alá csökkentve, az

alagúteffektus tartományába lépünk (STM). Egyes szondák alkalmasak mechanikai kölcsönhatások észlelésére, amelyek a felület topográfiája mellett információt adnak annak tribológiai, rugalmassági vagy akár adhéziós tulajdonságairól. Ennek lehetőségét az atomerő mikroszkóp (AFM) valósítja meg.

Az optikai mikroszkópok előnye, hogy a mintát saját környezetében képesek vizsgálni, viszont felbontóképességük a használt sugárzás hullámhosszától függ, melynek a diffrakció szab határt. Az így elérhető legnagyobb felbontás 200 nm körüli. Az elektron mikroszkópok felbontóképessége jóval nagyobb, viszont a minta bonyolult előkészítést igényel és a képalkotáshoz magas vákuumra van szükség. A pásztázó tűszondás mikroszkópia a két mikroszkóp előnyeit ötvözi. Képes elérni az elektronmikroszkópok felbontóképességét, miközben molekuláris folyamatok vizsgálatát teszi lehetővé a maguk saját környezetében.

1.2. Az atomerő mikroszkópia

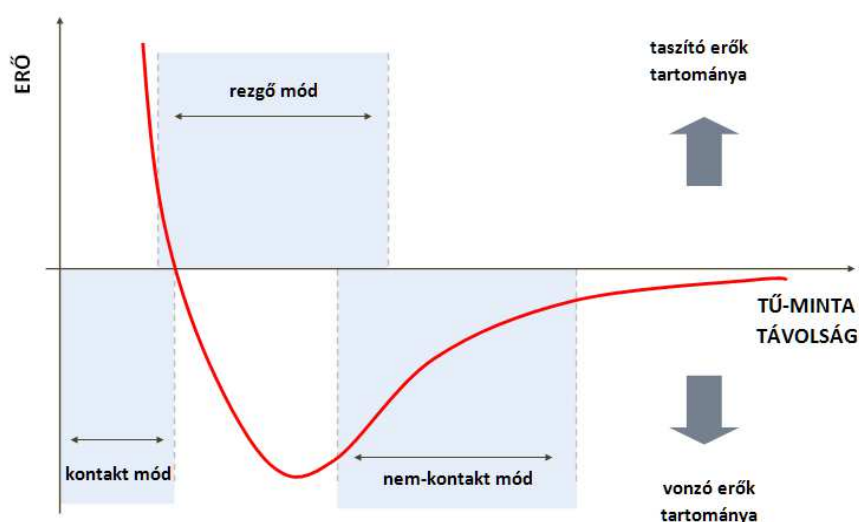
1986-ban G. Binning és munkatársai bejelentették az atomerő mikroszkóp (AFM) kifejlesztését [2], amely talán a legsokoldalúbb tagja a pásztázó tűszondás mikroszkópok (SPM) széles skálájának. Az AFM szondája egy rugólapka, vagy konzol végén található hegyes tű, amely végigpásztázva a felületet kölcsön hat annak felszínével. A kölcsönhatás következtében a rugólapka elhajlik. Ezt az elhajlást egy nagy érzékenységű optikai rendszer detektálja. Az elhajlás értékeiből áll össze a felületről alkotott háromdimenziós kép. A biofizikusok hamar felismerték azt a rengeteg előnyt, amit a mikroszkóp felépítéséből és működési elvéből adódóan nyújt. Egy olyan egyedülálló mérési technológia, ami lehetővé teszi különböző felszínek struktúrájának molekuláris szintű vizsgálatát. A felület domborzatának pontos meghatározásával valódi háromdimenziós kép készítésére alkalmas. Bepillantást nyerhetünk akár különálló molekulák szerkezetébe, vagy különböző felszínek atomi szintű struktúrájába is. Felbontóképessége azonos az elektronmikroszkópéval, de nem igényel bonyolult és invazív minta előkészítést. A mérési módszer mindamelllett, hogy lehetővé tesz ultra magas vákuumban vagy rendkívül alacsony hőmérsékleten folyó kísérleteket, alapvetően nem igényel különleges körülményeket. Folyadékban való mérésre is alkalmas, ennél fogva lehetővé teszi, hogy biológiai mintákat saját környezetükben vizsgáljuk.

Az atomerő mikroszkópia mára nélkülözhetetlen eszközzé vált a mikrobiológiai rendszerek vizsgálatában. Lehetővé tette a sejt, membránján keresztüli, környezet-felismerésének a tanulmányozását, membránfehérjék közvetlen vizsgálatát [3], felületi fehérjéken végzett kísérletekkel a sejtek közti kölcsönhatások tanulmányozását [4]. Makromolekulák megjelölés

nélküli vizsgálata válik lehetővé, valamint fehérje komplexek méreteiről és formájáról, konformáció változásokról kaphatunk információt [5].

Mérési módok

A mikroszkóp szondája a felület közvetlen közelében (közeli-mezejében) ható erőknek van kitéve (Lennard-Jones potenciál), melyek lehetnek vonzó vagy taszító jellegűek (2. ábra). A tű a felülethez közeledve, pár nanométeres távolságban először egy vonzó hatást érzékel, amely a van der Waals erők következménye. Csökkentve a távolságot egy semleges tartományba ér, ahol a vonzó és taszító erők kiegyenlítik egymást. Végül a felület közvetlen közelében a tű és a felület atomjainak elektronfelhői elkezdnek összefésülni, melynek egy hirtelen növekvő taszítás a következménye.



2. ábra. A közeli-mezőben ható erők (Lennard-Jones potenciál) és az egyes tartományokban működő mérési módok

A fenti erők taszítási, illetve vonzási jellegét kihasználva több mérési módot különböztetünk meg. A három legelterjedtebb a kontakt, nem-kontakt illetve a rezgő („AC” vagy „tapping”) mód.

A kontaktmód a taszító erők tartományában működik (2. ábra). Mérés során a tű közvetlenül érintkezik a felülettel, amely taszító erővel hatva rá elhajlítja a rugólapkát. A műszer a rugólapka elhajlását érzékeli és visszacsatolás segítségével úgy vezérli a tű függőleges helyzetét, hogy az elhajlást folyamatosan egy bizonyos előre beállított értéken tartsa. Ez a mérési mód nagy felbontású képek készítésére alkalmas, hátránya azonban, hogy puhább minták esetében károsíthatja azok felszínét.

A nem-kontaktmód a vonzó erők tartományát használja ki (2. ábra). A mérés menete nagyon hasonló a kontakt módéhoz, azzal a különbséggel, hogy a rugólapka ellentétes irányban hajlik meg. Előnye, hogy mivel a mérés során a tű nem éri el a felszínt, nem károsítja a minta felületét. Hátránya, hogy nem szolgáltat olyan részletes képet, amire a kontakt mód képes.

A rezgő (vagy tapping) **mód** a két előzőnek az előnyeit hivatott egyesíteni (2. ábra). Ha a rugólapkát egy a saját frekvenciájához nagyon közeli gerjesztő frekvenciával rezgetjük, viszonylag kicsi energia befektetéssel elérhető, hogy a rugólapka egy bizonyos előre beállított amplitúdón folyamatosan rezegjen. Az így kialakított mérési rendszer előnye, hogy képes a vonzó és a taszító erők tartományában együttesen működni megtartva a kontaktmód felbontóképességét, ugyanakkor nem tesz kárt a mintában.

A mintahordozó

Az AFM felépítése és működése megköveteli, hogy a vizsgált minta magasságprofilja ne haladjon meg néhány mikrométeres tartományt. A vizsgált objektumot minden esetben egy sima felszínre kell rögzíteni. Erre a célra több anyag is alkalmas. Használhatunk nagy tisztaságú grafitot (HOPG), szilícium lemezt, csillám (muszkovit) kristályt, üveget vagy akár petri csészét is. Az optikailag sima üveg érdessége nanométeres nagyságrendű, ami nagyobb objektumok (pl. sejtek) esetében használható. A csillám számos előnyeinek egyike, hogy egyszerű ragasztószalaggal rétegeire bontva, a szabaddá vált felület teljesen szennyeződésmentes, mivel rétegrácsos kálium-alumínium szilikát. Így könnyen tiszta felületet nyerhetünk. Anyaga áttetsző, érdessége pedig nm alatti. A felülete negatívan töltött, ami a biológiai objektumok számára méréshez előnyös tapadást eredményez.

A szonda

A mikroszkóp felbontóképességét két fontos paraméter határozza meg: a tű (szonda) hegyessége és annak precíz pozicionálása. A tű hegyességét, csúcsának görbületi sugarával és a kúpszöggel jellemezzük. A kép a minta felületének, a tű görbületi sugarának és kúpszögének a konvolúciójából alakul ki. Egy hegyesebb tű kisebb résekbe képes behatolni, így részletgazdagabb kép készíthető. A legtöbb tű hegyének görbületi sugara 10 nm körüli. Vannak ennél sokkal hegyesebb ún. ultra hegyes tűk is, vagy akár olyanok, ahol a tű végén egyetlen szén nanocső található. A tűk anyaga leggyakrabban szilíciumnitrid (Si_3N_4), melyek utólag különböző fémrétegekkel (Au, Al) is bevonhatóak. Alakjuk leginkább kúp vagy piramis formájú. A jó felbontóképesség eléréséhez nem elegendő, hogy a tű atomilag hegyes legyen, hanem azt a lehető legpontosabban kell pozicionálni a felülethez képest és függőleges irányban folyamatosan a közeli-mezőben kell tartani. Ennek elérése érdekében az AFM nagy precizitású piezoelektromos kristályokat használ.

A nN nagyságrendű erők detektálására nagyon érzékeny szenzorra van szükség. Egy elegáns megoldás, ha a kölcsönhatási erőt egy rugó meghajlásával mérjük, ami Hooke törvénye szerint:

$$\Delta z = \frac{F}{k} \quad (1)$$

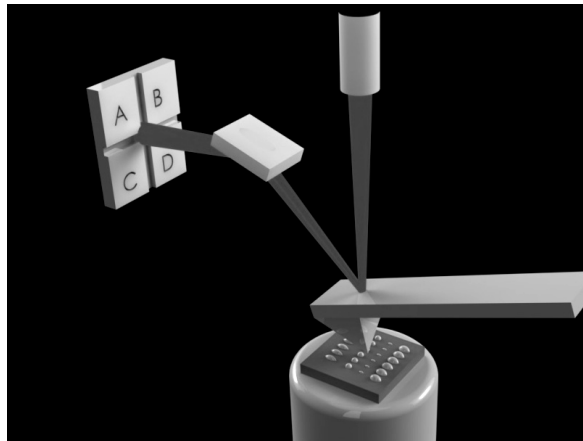
Itt Δz az elhajlást, F az erő nagyságát és k a rugóállandót jelöli. Az atomerő mikroszkóp esetében erre a célra egy rugólapkát használnak, melynek a végén található a tű. A lapkák rugóállandója néhány pN/nm-től egészen több száz nN/nm-ig változik. Egyesek inkább folyadékos mérésekre alkalmazhatóak, mások száraz mérésekre esetleg litográfiára. Egy rugó saját rezgési frekvenciáját a következő egyenlet adja meg:

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (2)$$

Itt ω_0 a rezgési frekvencia, k a rugóállandó és m a rugólapka effektív tömege. Az (1) egyenletből kiderül, hogy az érzékenység növelése érdekében a rugólapka rugóállandója minél kisebb kell legyen. Ennek azonban határt szab a termikus rezgésekre való minimális érzékenység és a nagy pásztázási sebesség, ami nagy rezgési frekvenciát, tehát nagyobb rugóállandót követel.

Detektálás

A mikroszkóp jó felbontóképessége megköveteli a rugólapka angström nagyságrendű elhajlásainak detektálását, melyre több különböző koncepció létezik [6-8]. A legelterjedtebb a lézerfény alapú elhajlás detektálási mód (3. ábra) [9-11].



3. ábra. Az AFM felépítésének sematikus ábrája. A lézernyaláb a rugólapkáról visszaverődve, egy tükrön keresztül a négybe osztott fotodiódára esik, amely meghatározza a lézerfolt helyzetét.

Itt az elhajlás mértékét egy a rugólapka hátoldaláról, egy négybe osztott fotodiódára visszaverődő lézersugár relatív helyzete határozza meg (3. ábra). A lézersugár függőleges helyzetét a felső kettő, illetve alsó két szegmens által érzékelt feszültségből (vagy áramerősségből) lehet kiszámolni a következő egyszerű egyenlet szerint.

$$\Delta V_{\text{függőleges}} = (V_A + V_B) - (V_C + V_D) \quad (3)$$

1.3. Az erőmérő spektroszkópia

Az erő spektroszkópia viszonylag szerteágazó tudományterület, amely sokféle kísérleti eljárást, módszert és vizsgálható objektumot foglal magába. A készülék lehetővé teszi a tű és a vizsgált minta közti erők pontos meghatározását. Egyik előnye, hogy direkt módon érintkezve a vizsgált anyaggal, képes nyomó vagy húzóerőt kifejteni arra, ezáltal akár módosítani vagy deformálni azt.

Az erőgörbe

Az erőmérések alkalmával a tű felülethez viszonyított pozíciója az xy síkban rögzített, miközben függőleges irányban közeledik vagy távolodik a felszínhez képest. Ennek eredményeként egy erőgörbét kapunk, mely a tű és a minta közti kölcsönhatás távolságfüggéséről nyújt információt (4. ábra).

Az erőmérés során miközben a tű közeledik a felszínhez a műszer a rugólapka elhajlásának értékét rögzíti, melyből az elhajlási erőt Hooke törvényéből számolhatjuk ki (1). Az erő kiszámításához azonban előbb szükségünk van a pontos elhajlás és rugóállandó értékére. A műszer a rugólapka elhajlását egy optikai rendszeren keresztül indirekt módon érzékeli. A tényleges elhajlás értékének meghatározásához meg kell adnunk a mért mennyiség (feszültség vagy áramerősség) és az elhajlás mértékének az arányát, melyet *InvOLS*-nek (inverse optical lever sensitivity) neveznek.

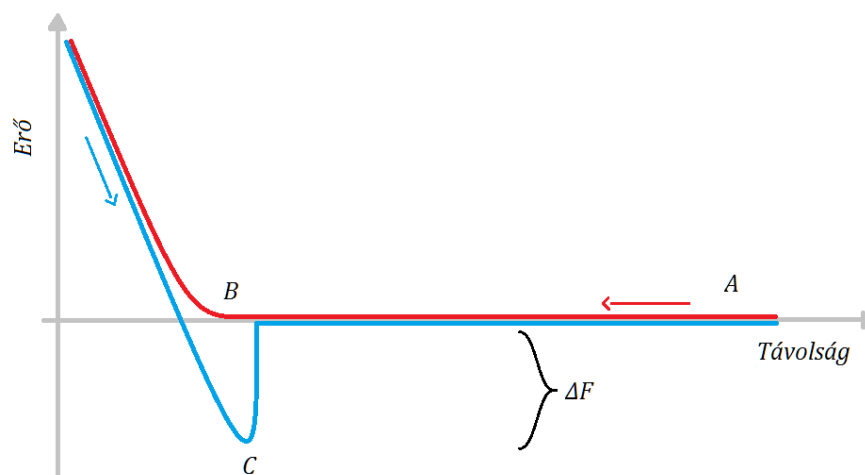
$$InvOLS = \Delta V / \Delta z \quad (4)$$

Ezt a viszonyszámot egy kemény felzínen mért erőgörbe segítségével kapjuk meg, ahol egy a tű és a felület érintkezését (4. ábra, B pont) követő egyenes szakaszt választunk ki, ami megadja egy jól meghatározott (z -piezo által mért) magasság különbségen (Δz) a kvadráns fotodióda által mért feszültség változását (ΔV). Ezek után a lézernyaláb útvonalán nem változtathatunk.

A rugóállandó pontos meghatározására a legelterjedtebb módszer a termális kalibrálás [12]. Az optikai rendszer annyira érzékeny, hogy képes detektálni a rugólapka hő mozgás által keltett rezgéseit. Az így kapott sajátfrekvenciából (ω_0), valamint az *InvOLS* értékéből kiszámítható a rugólapka rugóállandója [13].

A 4. ábra egy átlagos erőgörbét mutat be, mely a kölcsönhatási erőt a tű-minta távolság függvényében ábrázolja. A piros a közeledő, a kék pedig távolodó szakasz. A ciklus az A pontból indul, ahol a tű még távol van a felszíntől, így nem érzékel erőt. A felülethez közeledve a tű a B pontban éri el a felszínt, aminek következtében a rugólapka elkezd elhajolni. Ezt követően a rugólapka a közeledéssel lineárisan növekvő erővel hat a felületre, egészen egy előre meghatározott maximum értékig. Ezen a ponton az mozgásirány megfordul,

a nyomóerő csökken, majd a tű a felülettől eltávolodva visszaér a kezdeti helyzetébe. Kapcsolódási erő jelenléte esetén a távolodó ágban egy negatív csúcs jelenik meg (C), melynek mélysége megadja az adhéziós erő mértékét (ΔF).



4. ábra Egy átlagos erőgörbe ábrázolása. A piros görbe a közeledő tű útvonalát jelöli. A távolodó tű útvonalán (kék) levő minimum (C) az adhéziós erőt (ΔF) ábrázolja.

Molekuláris felismerő folyamatok

Az utóbbi idők során az erőmérések nagy hányada foglalkozott felületre rögzített molekulák mechanikai tulajdonságainak mérésével. Ezekből a kísérletekből az inter- és intra-molekuláris erők pontos meghatározásával molekuláris szintű információt kaphatunk a sejtek vagy egyéb objektumok közti kölcsönhatásokról. Azt a folyamatot, amikor egy biomolekula egy másikat odavonzva kötődik ahhoz, biomolekuláris felismerésnek nevezzük [14]. Ezen specifikus felismerő folyamatok során a biomolekulák reverzibilis vagy irreverzibilis aggregátumokat, komplexeket képezhetnek, melyeknek sokféle szerepük van: a sejtadhéziók, sejtmozgások során; sejtek alakjának kialakulásában; a sejtek környezetének felismerő folyamataiban; genom megkettőződésben és átírásban; jelátvitel, immunválaszok során stb. A molekulák felismerő folyamatokban való részvételét molekuláris szintű erők vezérlik, melyek különböző nem-kovalens kölcsönhatások következményei (van der Waals, hidrogénkötés, hidrofób kölcsönhatás). A molekulapárokon végzett erőmérési technikák repertoárja gyorsan fejlődik, magába foglalja többek közt az optikai csipeszeket, lamináris folyadék kamrákat, biomembrán erőszondákat (BFP) és az atomi erő-spektroszkópiát (AFS) [14,15].

Az atomi erőspektroszkópiás kísérletek során a molekulapár egyik tagja a tű hegyére a másik pedig egy felületre kovalens kötésekkel van rögzítve. A tűt a felülethez közelítve a molekulapár összekapcsolódhat feltéve, ha elég rugalmasak és jól orientálódhatnak. A tűt távolítva a felülettől a molekulapárra kifejtett erő következtében a kötés hirtelen elszakad. Ezt

az erőküszöböt nevezzük „kötési” azaz pontosabban „szakadási” erőnek. Az AFS mérések azon kívül, hogy nagy érzékenységgel (pN tartomány), jó oldalirányú felbontással (0,1 nm körüli), és néhány molekulát igénybe vevő kontaktfelülettel (10 nm²) rendelkeznek, lehetővé teszik a molekulák közti felismerő folyamatok valós időben, fiziológias környezetben és jelölés nélküli vizsgálatát.

Külső erők hatására egy egyensúlyi rendszer energiaállapota perturbálódik, tehát az AFS mérések nem egyensúlyi körülmények között történnek. Az egyensúlyt jellemző paraméterek a nem-egyensúlyi kísérletekből különböző elméleti modelleken keresztül kaphatók meg. A molekulapárok közti szakadási erők tanulmányozása George Bell elméleti cikkével kezdődött [16], melyben a széthúzó erő (F) és a disszociációs ráta közti kapcsolatot a következő egyenlettel írta le:

$$k_{off}(F) = k_{off} \exp(Fx_\beta/k_B T) \quad (5)$$

Itt k_{off} az egyensúlyra jellemző disszociációs ráta ($k_{off} = k_{off}(0)$), x_β a reakció koordináta, ami a kötés és az átmeneti állapot közti távolságot jelöli, k_B a Boltzmann állandó és T a hőmérséklet. A disszociációs ráta a kapcsolódás időtartamát jellemzi, miszerint:

$$\tau_{off}(F) = 1/k_{off}(F) \quad (6)$$

Az egyensúlyi állapotot jellemző kapcsolódás időtartama, tehát a húzási erő függvényében csökken. Később Evans és Ritchie, Bell feltevéséből kiindulva, megadtak egy tárgyalási módot, amely a szakadási erőt, ami a rendszert átkényszeríti egy potenciál falon, az idő függvényének veszi. Így a szakadási erőt a terhelés függvényeként tárgyalja [16,17]. Ezt nevezik Bell-Evans modellnek [18], ami feltételezi, hogy a potenciálfal magassága az alkalmazott erő függvényében csökken és a legvalószínűbb szakadási erőt (F^*) a következő egyenlettel írja le:

$$F^* = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \left(\frac{r x_\beta}{k_{off} k_B T} \right) \quad (7)$$

Itt az r a terhelést jelöli, ami alatt az erő időegységre vett változását értjük:

$$r = dF/dt = k dx/dt = kv \quad (8)$$

A fenti egyenletben k a rugóállandót, v pedig a húzási sebességet jelöli. Több különböző terhelésen mért szakadási erők ismeretében a 7. egyenlet segítségével kiszámítható a rendszer disszociációs rátája (k_{off}) és reakció koordinátája (x_β). Azt a módszert, amely során az AFS mérések alkalmával a terhelést változtatjuk dinamikai erő spektroszkópiának (DFS) nevezik.

A DFS kísérletek egyik célja, a kölcsönhatási folyamatok kísérleti adataiból, valamint ezek elméleti tárgyalásának segítségével következtetni a kölcsönható biomolekulák szerkezeti felépítésére. Ismerve sok molekula pontos szerkezetét megjósolhatóvá válhat fontosabb

molekulák kölcsönhatásának kimenetele, de akár olyan molekulapárok tervezése is lehetséges, amelyek kölcsönhatásai előre meghatározhatóak. Ennek elérését nehezíti, hogy a receptorok és ligandumok felismerő részei nem mutatnak univerzális alakzatokat. A kötésben több különböző nem-kovalens kölcsönhatás (van der Waals, elektrosztatikus kölcsönhatás, hidrogénkötés, hidrofób kölcsönhatás) játszik szerepet, ugyanakkor a kötési struktúrák dinamikusak, melyek a kötés kialakulása során több köztes lépésen mennek keresztül. Tehát a kapcsolódás több fázisos reakcióként viselkedik [19].

1.4. Az antigén és az antitest bemutatása

Testünk bonyolult szervezet mely dinamikus egyensúlyt tart fenn környezetével. Szervezetünkben tízszer annyi idegen sejt található, mint a saját sejtjeink száma, melyek egy része a szervezetet segítő baktérium, nagy hányada viszont ellenség. Az immunrendszerre a szervezet védelmezőjeként az a feladat hárul, hogy elhárítson minden nemű támadást, amely a szervezet egészségét veszélyeztetné. A védelmező mechanizmusok folyamata és kapcsolata igen bonyolult, melyeket az immunológia tudománya tanulmányoz. Kísérleteink e komplex folyamatok egyik elemi részét hivatottak vizsgálni, az antigén és antitest kapcsolódását.

Az antitestek vagy ellenanyagok viszonylag nagy, Y alakú, az immunglobulinok családjába tartozó fehérje molekulák, melyeket a szervezet az idegen anyagok (antigének) felismerésére és megkötésére termel. Antigénnek nevezünk minden olyan anyagot, ami a gerincesek szervezete idegennak ismer fel és antitest termelését váltja ki. Az antitesteket különböző állatokba bejuttatott antigének segítségével termelik. Az antitestek csúcsain antigén kötő részek (paratópok) találhatóak, melyek egy adott antigén kötőhelyeire (epitópjaira) specifikusak. Az antigének felismerő képessége szinte határtalan: megkötnék fehérjéket, lipideket, nukleinsavakat, szénhidrátokat, de akár mesterségesen előállított anyagokat is [14]. Az antitestek magas affinitással (10^{10} - 10^{12} M⁻¹) képesek megkötni az antigént, specifikusságuk pedig csupán egy aminosavban eltérő anyagokat is megkülönböztet [14]. Egyes antitestek több féle antigént képesek felismerni, léteznek azonban olyan antitestek, amelyek csupán egy féle antigénre vannak specializálódva (monoklonálisak). Molekuláris felismerések tanulmányozására a monoklonális antitestek a legmegfelelőbbek, mivel ezek mindegyike ugyanazt az epitópot ismeri fel közel ugyanakkora affinitással.

2. Anyagok és módszerek

2.1 A kísérleti eszközök bemutatása

Antigén és antitest

Kísérleteinket egy olyan antigén-antitest páron végeztük, melyek specifikusan kapcsolódnak egymáshoz. Antigénnek egy 11.6 kDa nagyságú emberi vizeletből kinyert „ β -2 microglobulin” (β 2m) fehérjemolekulát használtunk, amely szinte az egész szervezetben megtalálható. Antitestnek egy egérben termelt monoklonális „anti-human β -2 microglobulin” fehérjét használtunk, amely specifikusan kötődik a β 2m antigénhez. Az antigént és az antitestet a Sigma Aldrich cégtől szereztük be.

AFM

A rendelkezésünkre álló műszer egy Asylum Research MFP-3D atomerő mikroszkóp, amelyet biológiai minták mérésére fejlesztettek ki. A mintaasztalka teljes tárgylemez vagy akár kisebb petri csészék ráhelyezését is megengedi, ellentétben a szilárdtest fizikában használt atomerő mikroszkópokkal, amelyek nagyon kicsi minták vizsgálatára alkalmasak. A mikroszkóp tű pozicionáló rendszere két részre van osztva. Az alsó rész az x és y irányú piezokristályokat tartalmazza, melyek a középén elhelyezett mintaasztalka síkban való mozgatásáért felelnek. A mikroszkóp szíve egy az asztalka fölött stabilan elhelyezkedő háromlábú kompakt egységből áll. Ez tartalmazza a tű rögzítésére szolgáló alegységet, a detektorrendszert és a pontos függőleges pozicionálást lehetővé tevő z irányú piezokristályt. A rugólapka elhajlását az 1.2 alfejezetben leírt lézeres optikai rendszer rögzíti. A mikroszkóp vízszintes síkban legnagyobb $90 \times 90 \mu\text{m}^2$ tartományt képes leképezni, függőleges irányban pedig maximálisan $10 \mu\text{m}$ vastag minták vizsgálatára alkalmas. A kettéosztott piezokristályos rendszer nagyon érzékeny a külső mechanikai rezgésekre. Ezek kiszűrése jelentősen növeli a mérés pontosságát. A berendezés része egy fordított mikroszkóp, amely élő képet adva segíti a tű mintához való pozicionálását, valamint a mérés folyamatának a megfigyelését.

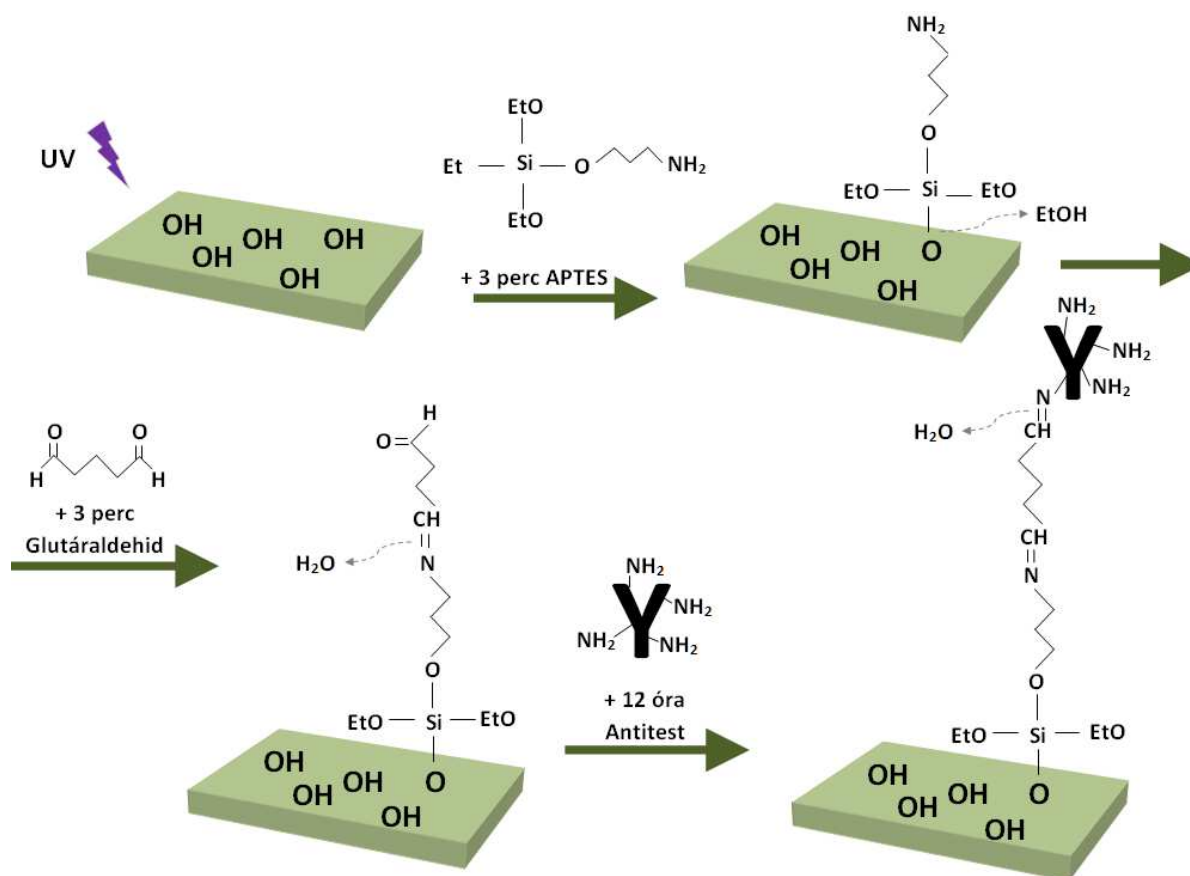
A mérésekhez OMCL-RC800-as típusú szilíciumnitrid (Si_3N_4) rugólapkákat használtunk. Nominális rugóállandójuk 50 pN/nm , saját rezgési frekvenciájuk levegőben 18 kHz , a tűk hegyének görbületi sugara 20 nm -nél kisebb. A rugólapkákat minden mérés előtt az 1.2 alfejezetben is leírt termális módszer alapján kalibráltuk [12], [20], [21].

A rendszer vezérlését és irányítását egy IGOR Pro (6.2-es verzió, Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) szoftverben készült MFP-3D Xop program teszi lehetővé, amely az adatok utólagos kiértékelésére is alkalmas.

2.2 A kísérlet menete

A mintakészítés

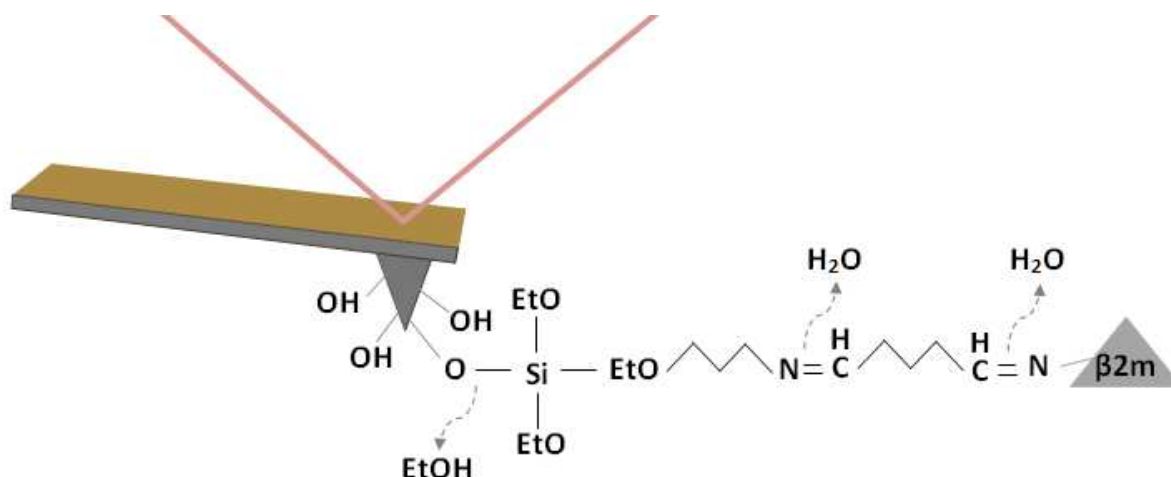
A minták rögzítése során létrejött kötések erősebbek kell legyenek a vizsgált molekulapár közti kölcsönhatásoknál. Ennek érdekében a molekulákat kovalens kötésekkel rögzítettük a felületekhez. A mintakészítés lépéseit az 5. ábra szemlélteti. Hordozó felületnek nagy simaságú üveget használtunk. Ezeket először oxigén plazma segítségével megtisztítottuk, 400 milli torr nyomású, tiszta oxigént tartalmazó vákuumtérben, 1-1.5 percig tartó, mikrohullámmal előállított, plazma segítségével. Ezek után 5 percig acetonnal áztattuk őket, majd nitrogén gázzal szárítottuk meg. Ezt követően 30 percen keresztül erős ultraibolya sugárzás alá tettük, amely előhívja a felületre a hidroxyl csoportokat. Ezután 3 percen keresztül inkubáltuk a felületeket egy 0.3 M 3-aminopropiltriethoxilán (APTES) kloroform oldatban, szoba hőmérsékleten, majd háromszor kloroformmal lemostuk és nitrogéngázzal megszáritottuk őket. Ezt követően a mintákat 1%-os glutáraldehid vizes oldatában, szoba hőmérsékleten, 3 percig inkubáltuk, majd desztillált vízzel lemostuk és nitrogéngázzal megszáritottuk.



5. ábra Az antitestek rögzítése az üvegfelületekhez, APTES és glutáraldehid segítségével

Ezután következett az antitestek rögzítése a felületekre, melyekre 50 μ l, 10 μ M antitestet (anti- β 2m) tartalmazó 10 mM-os, pH=7.4, foszfát puffer (PBS) oldatot cseppentettünk, majd egy teljes éjszakán (12 óra) keresztül inkubáltuk őket. Ezután óvatosan PBS oldattal lemostuk, majd nagyon rövid időre etanolaminba merítettük, hogy a még szabadon maradt karbonil csoportokat blokkoljuk. Felhasználásukig PBS oldatban 4°C-on tároltuk.

A tű antigénnel való kezelése nagyon hasonló a felületekéhez, lépéseit a 6. ábra szemlélteti. Az acetonos kezelés itt 10 percre tartott, melyet hasonló módon egy 30 perces ultraibolya sugárkezelés követett. A tűket ezek után 3 órán keresztül áztattuk 2%-os APTES kloroformos oldatában szobahőmérsékleten, majd háromszor kloroformmal lemosva nitrogén gázzal szárítottuk meg. Ezt követően 1%-os glutáraldehid desztillált vizes oldatában 4 percre inkubáltuk szoba hőmérsékleten, amit szintén egy desztillált vízzel való öblítés követett. A tűket ezek után egy teljes éjszakára (12 óra) inkubáltuk 10 μ M antigént tartalmazó 50 mM pH=7,4 foszfát puffer (PBS) oldatban, 4 °C-on. Másnap rövid időre etanolaminba mártottuk őket, majd óvatos öblítést követően 5xPBS-ben tároltuk.



6. ábra Az antigének rögzítése a tűkhöz, APTES és glutáraldehid segítségével.

Az erőmérések mente

A tűket minden alkalommal óvatosan közelítettük a mérendő felszínhez, hogy ne roncsoljuk a felszínükre rögzített antigéneket. A nyomóerőt nem engedtuk 0.7 nN érték fölé. A közeledő és a távolodó ág között 2 másodperces várakozási időt állítottunk be. A maximálisan 0.7 nN-os nyomóerő 2 másodperces várakozási idővel bőven elegendő ahhoz, hogy a molekulapár összekapcsolódjon. A a tű és felület közti maximális távolságot 200 és 500 nm között választottuk meg. A közelítő sebességet folyamatosan 100 nm/s értéken tartottuk, a széthúzási sebességet azonban $v = 50, 100, 200, 500, 1000$ és 2000 nm/s értékek között változtattuk, így a kötést több különböző terhelés függvényében vizsgáltuk. A 8. egyenlet szerint a tűk nominális

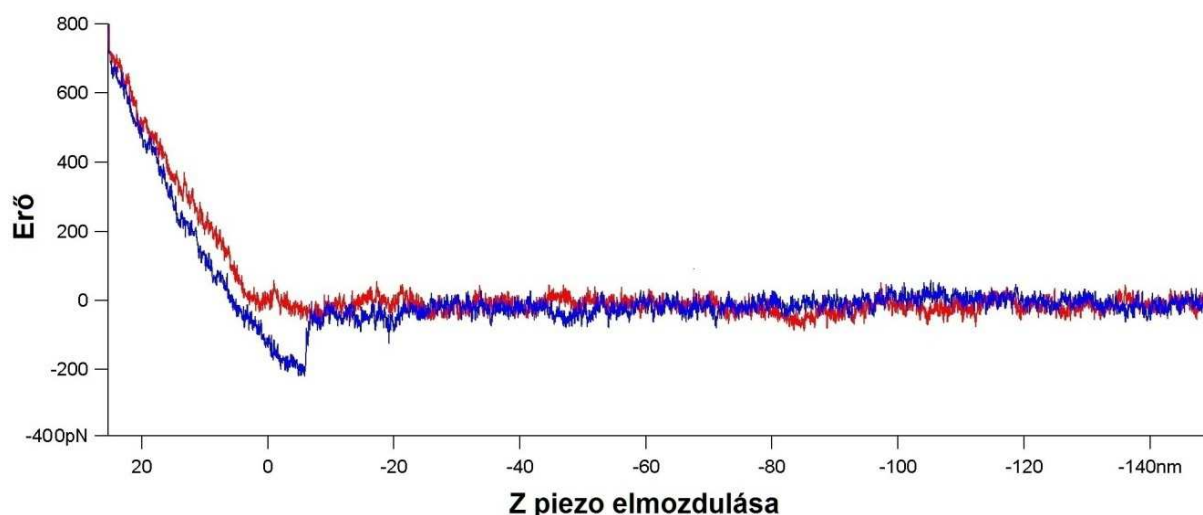
rugóállandójával számolva ($k = 50 \text{ pN/nm}$) az általunk vizsgált terhelési értékek: $r = 2.5, 5, 10, 25$ és 50 nN/s . Átlagosan 200 erőgörbét készítettünk minden egyes beállított paraméter esetén. A méréseket folyadékban, az előre összeállított fiziológias oldatban (PBS) végeztük. A 200 görbe egyenkénti elkészítése több mint fél órát vett igénybe. A mérések során folyamatosan pótoltuk az elpárolgott folyadékot.

Adatfeldolgozás

Az adatfeldolgozást a műszert vezérlő programban (IGOR Pro, 6.2-es verzió, Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA), valamint Matlab-ban (The MathWorks, Inc., 7.6.0 verzió) végeztük.

3. Eredmények és kiértékelésük

A 7. ábra egy általunk készített reprezentatív erőgörbét mutat be, amely az 1.3 alfejezetben tárgyalt általánosított erőgörbe valós megfelelője, ahol a rugólapkára ható erő a tű és a felület közti távolság függvényében van ábrázolva.



7. ábra Egy általunk készített reprezentatív erőgörbe.

Az ábrán a piros a közelítő, a kék pedig a tű távolodó útvonalát jelöli. A tű és a felület találkozási pontja ($x=0, y=0$) a közeledő ág emelkedését megelőző pontban van meghatározva. Az adhéziós erőt a távolodó ág minimum pontja és a görbe végső rövid szakaszának átlaga közt állapítottuk meg.

A felületre rögzített antitestek, viszonylag nagy molekulák, melyek nem meghatározott irányítással helyezkednek el a felületen, hanem teljesen véletlenszerűen, akárcsak a tűre rögzített antigének. Mivel a kialakuló kapcsolódás valószínűsége a kapcsolatban töltött idővel növekszik, érdemes a tűt egy bizonyos ideig a felületen tartani. Ezt egy a közelítő és távolodó ágak közti várakozási idővel szabályozhatjuk, amikor a nyomóerő eléri a maximális értékét. A kezdeti mérések során az adhéziós erők nagyságát a várakozási időfüggvényében vizsgáltuk. A tű felületen való tartózkodási idejét 2 másodpercre határoztunk meg. Minden mérési ciklus végén pedig 1 másodperces várakozási időt állítottunk be. A további mérések során ezt a két paramétert nem változtattuk. Üvegen és csillámon is elvégezve ugyanazon kísérleteket nem tapasztaltunk lényeges különbséget. Ezt követően a további kísérleteinkben üveg felületet használtunk.

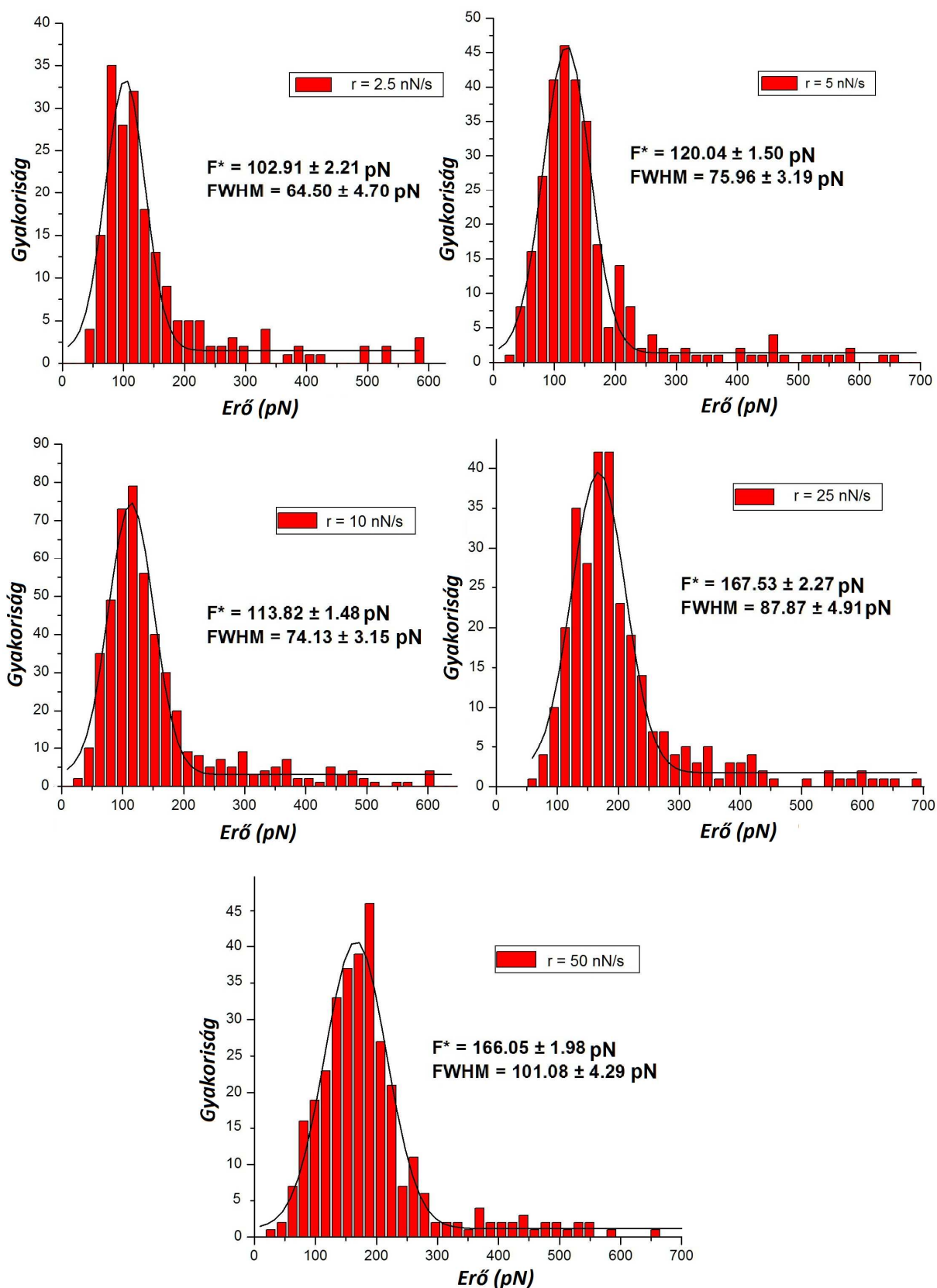
A mért szakadási erők és a kötés jellege közt nem állítható fel direkt összefüggés, így a biomolekulák közti kölcsönhatások jellege nehezen meghatározható. Irodalmi adatok szerint

legalább 17 féle kölcsönhatás játszik szerepet a biomolekulák közti kötések kialakulásában [22]. A főbb típusok az elektrosztatikus erők, a hidrogén hidak, van der Waals erők és hidrofób kölcsönhatások. A kapcsolódás fő eleme valószínűsíthetően a hidrofób kölcsönhatás, amely egy $800 - 16000 \text{ angström}^2$ hozzáférhető felületvesztés következtében, az egyes molekulák 10-30 oldalláncának részvételével jön léte és akár a kötési energia 75%-át is képezheti [23]. A kötés jellegét azért is nehéz meghatározni, mivel a fehérjék felismerő részei nem statikus, hanem dinamikus szerkezetűek. A kötés, kialakulása során, több különböző kapcsolódási fázison megy keresztül, amelyben különböző kölcsönhatási erők játszanak szerepet [19]. A fentiekből kifolyólag kísérleteink során célunk nem az erők jellegének megítélése volt, inkább azok nagyságának meghatározása.

Az erők eloszlása

A kötések nem egyensúlyi állapotukban vizsgáljuk, hanem egy külső erő hatására. A szakadás pillanatában ható húzóerő függ az egységnyi időre eső erőnövekedéstől, az ún. terheléstől (8. egyenlet). Mivel a terhelés és a húzási sebesség csupán egy állandóval való szorzásban különbözik egymástól (k), kísérleteink során a kölcsönhatási erőket az elhúzási sebesség (v) függvényében vizsgáltuk. Minden sebesség érték esetében 200 erőgörbét készítettünk, melyeket egy rögzített pontban vettünk fel. A kapott adhézión erők eloszlását hisztogramok formájában ábrázoltuk (8. ábra). Az egyes hisztogramokra gauss görbéket illesztettünk, melyek maximumpontjaiban határoztuk meg az egyes paraméterekre kapott legvalószínűbb kapcsolódási erőt. Az antigének és antitestek közötti kölcsönhatások az elhúzási sebességtől való függését a 8. ábra szemlélteti. Látható, hogy a terhelés növelésével a legvalószínűbb szakadási erő növekszik, melyek nagysága az egyes húzási sebességekre 103-167 pN közti tartományba esett. A legkisebb terhelés esetén ($r = 2,5 \text{ nN/s}$) legvalószínűbb szakadási erőnek 103 pN értéket kaptunk. Az erők a nagyobb terhelésekre egészen 167.53 pN értékig növekedtek.

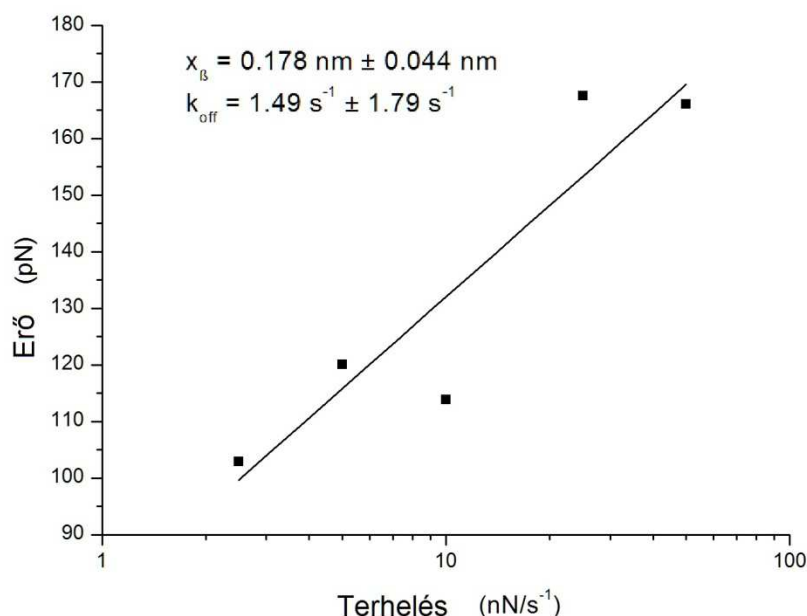
A kezdetekben ozmotikusan gömbformára felpuffasztott és antitesttel bevont vörösvértestek közt mérték a szakadási erőket, melyeket 60 és 197 pN között állapítottak meg [24,25]. Az első atomerő mikroszkópos kísérletek biotin-avidin molekulapáron végezték [26,27]. A kapott erőkből a 160 pN-os erők többszöröseit figyelték meg, ami az egyedüli kötéseknek tulajdonítható. Az utóbbi években számos kísérlet során vizsgálták a receptor-ligandum párok közti kötések, folyadék kamra, atomerő mikroszkóp és optikai csipesz segítségével [28,29]. Az antigén-antitest párokon végzett kísérletek során 120-244 pN közti erőket mértek [15,30,31]. Az általunk mért erők tartománya nagyságrendileg megfelel a mások által kapott szakadási erők mértékével.



8. ábra Az egyes hisztogramok a $r = 2.5; 5; 10; 25; 50$ nN/s terhelési értékekre mért szakadási erők eloszlását ábrázolják.

A kölcsönhatás paraméterei

Az elméleti számítások szerint a legvalószínűbb kötési erő (7) a terhelés logaritmusaival lineárisan növekszik. Az alábbi grafikonon (9. ábra) az általunk kapott erőértékeket a terhelés logaritmusaiban a függvényében ábrázoltuk, majd egy egyenest illesztettünk rájuk. Az egyenes meredekségéből kiszámítható a reakció koordináta (x_β), a tengelymetszetéből pedig a disszociációs ráta (k_{off}). Az általunk számolt reakció koordináta $x_\beta = 0.178 \text{ nm}$, a disszociációs ráta értéke pedig $k_{off} = 1.49 \text{ s}^{-1}$, ami nagyságrendileg megfelel a hasonló kísérletek eredményeinek [15]. A szakirodalomban a disszociációs rátára vonatkozó adatok tág határok közt mozognak, 10^{-6} és 150 s^{-1} között [15], ami azt mutatja, hogy a kapcsolódások kinetikai paraméterei egyedülálló molekulák szintjén nagyon változó.

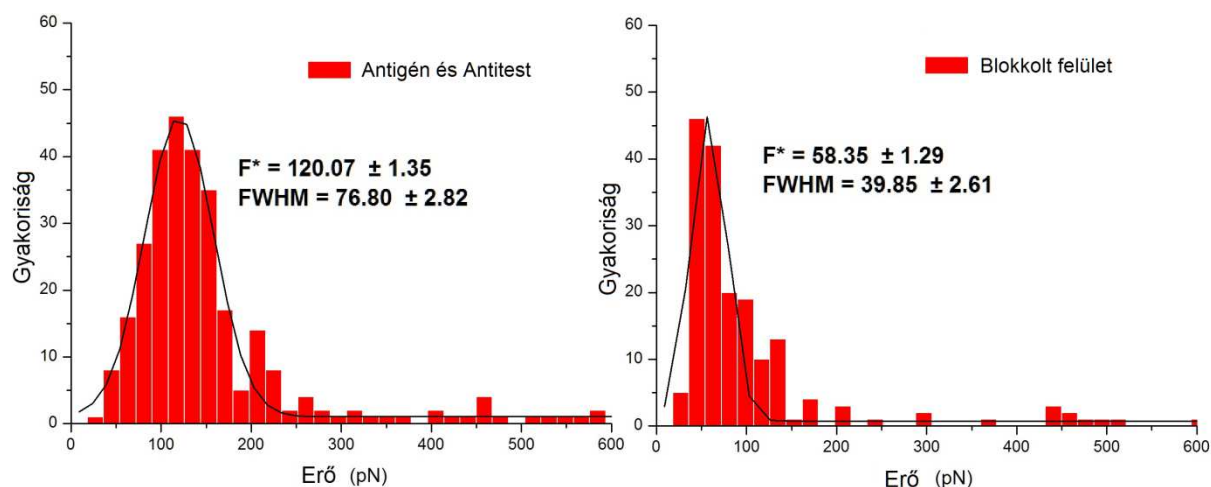


9. ábra A legvalószínűbb szakadási erők a terhelés logaritmusaival való lineáris függésének ábrázolása.

A specifikusság bizonyítása

A tű és a felület közti adhéziós erő jellegét nem minden esetben az antigén és az antitest kölcsönhatása jellemzi. Ebben az esetben nem-specifikus erőket mérünk. Hogy megbizonyosodjunk, hogy a méréseink során kapott adhéziós erők főként az antitest és az antigén közt jöttek létre, tehát jellemzően specifikusak, az antigénnel bevont felületet 5 órán keresztül $20 \mu\text{M}$ -os antigént tartalmazó PBS-ben inkubáltuk. Így a felületen az antitesteket antigénekkal kapcsoltuk össze, melyek további antigének megkötésére már nem alkalmasak. A módosított felületen hasonló módon végeztük el az erőméréseket. Az alábbi hisztogramok (10. ábra) ugyanazon paraméterekkel, 5 nN/s terhelés alatt készített erőgörbékből számolt

adhéziós erők eloszlását ábrázolják. Az ábrán látható, hogy a blokkolt felület esetén kapott eloszlásnál a legvalószínűbb kapcsolódási erő a 60 pN alatti tartományba süllyedt, tehát sokkal kevesebb valós eseményt regisztráltunk. Ez az érték közelíti a mérőberendezés zajszintjét.

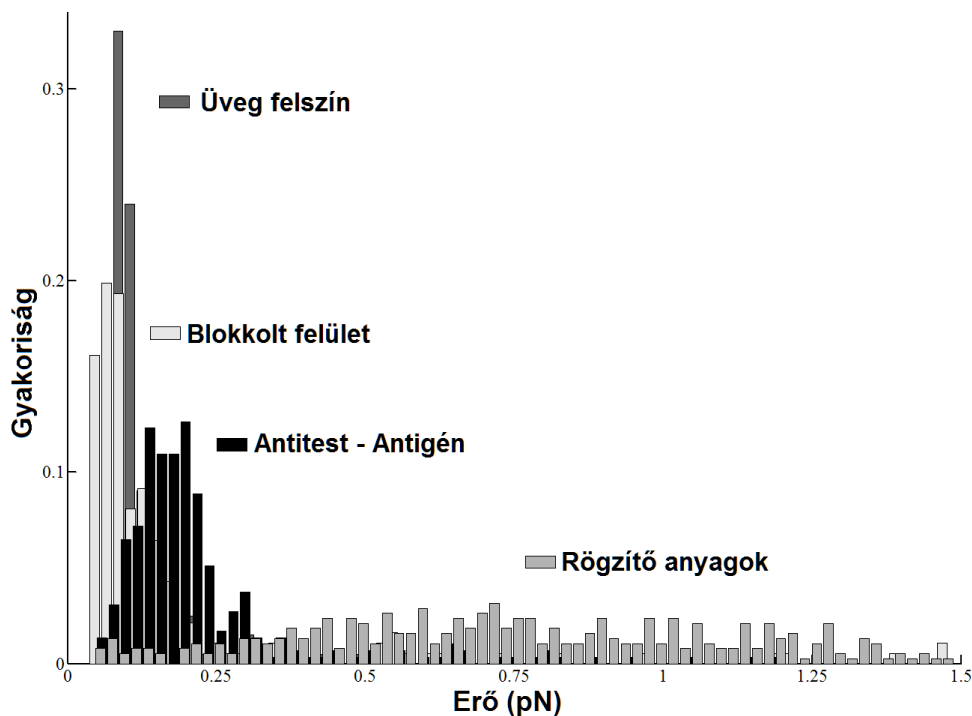


10. ábra Nem blokkol és blokkolt felületeken mért erők összehasonlítása.

Ezt követően azt is megvizsgáltuk, hogy a rögzítéshez használt felületek kölcsönhatása következtében mekkora adhéziós erők jönnek létre. Olyan felületeket alkalmaztunk, melyek mintakészítési folyamatánál kihagytuk az antigénnel és antitesttel való inkubálási lépést, így a molekulák rögzítésére szolgáló felületek közti adhéziós erőket tudtuk mérni. Kíváncsiak voltunk, hogy ezek a nem specifikus adhéziós erők milyen tartományba esnek. Méréseinkből viszonylag nagy értékeket kaptunk, melyek széles erőtartományban oszlanak szét (0 – 1500 pN között). A gauss görbéből számolt legvalószínűbb szakadási erő 700 pN körüli értéket adott (11. ábra).

További méréseket végeztünk sima üveg és tiszta tű között is, szintén azzal a céllal, hogy megfigyeljük a köztük levő erők nagyságának eloszlását. A eredmények hasonlóak voltak a blokkolt felület esetén kapott adatokhoz (11. ábra).

A 11. ábra a négy különböző esetben kapott eredményeket szemlélteti. Az erőgörbéket ugyanazon paraméterekkel, 5 nN/s terhelés alatt mértük. Megfigyelhető, hogy a blokkolt felület esetében, illetve a tiszta felület és tiszta tű kölcsönhatásának esetében (üveg felszín) a legvalószínűbb kapcsolódási erő jóval 100 pN alatt van. A rögzítő anyagokat tartalmazó felület, illetve tű között mért erők a 250 pN fölötti tartományba esnek, melyek a valós esetben is ritkán megjelenő nagyobb erőket magyarázhatják.

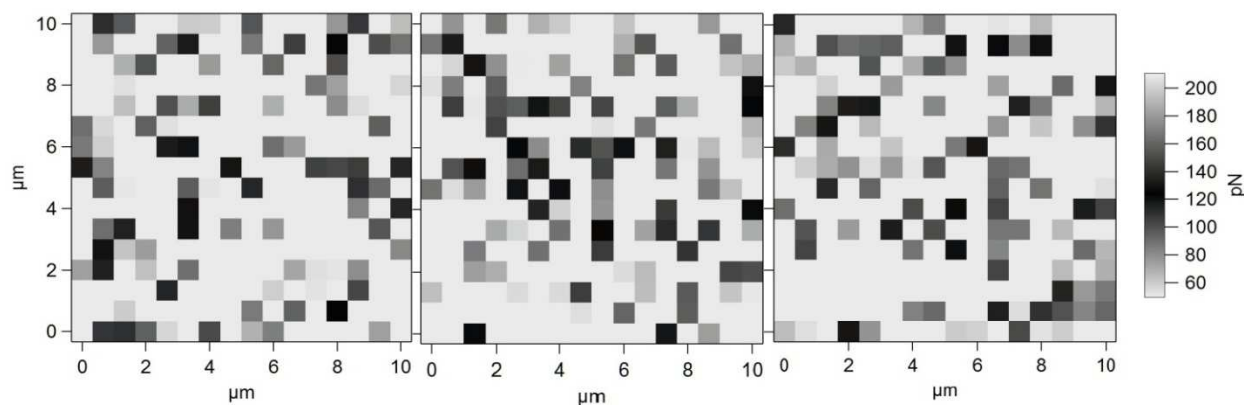


11. ábra A specifikusság igazolására végzett kísérletek erőeloszlásai

Látható, hogy a specifikusság bizonyítására végzett kísérletek erőértékei, vagy a 100 pN alatti, vagy a 250 pN feletti tartományba esnek. A fenti kísérletekkel megbizonyosodhattunk arról, hogy az antigén és antitest közt mért erők eloszlása jól elkülönül a referenciamérésektől, tehát valós képet mutat, ahol a kötés erőssége a terhelés függvényében 103-167 pN között változik.

Az erőmérés jellege

További kísérleteinkben a kialakuló kötések térbeli eloszlását tanulmányoztuk. A felület egy kiválasztott térrészéről erőterképeket készítettünk. Az eljárás hasonló a domborzati képek készítéséhez. A tű pásztázza a felületet és az egyes pontokban erőméréseket végez. Esetünkben az erőgörbét a felület egy kiválasztott $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ -es térrészében 16×16 pontban vettük fel.



12. ábra A minta ugyanazon térrészről készült, három egymást követő erőterkép.

A 12. ábra a felület ugyanazon térrészen három egymást követő mérést mutat be. A színskálát úgy választottuk meg, hogy a sötét pontok az erők azon tartományát jelölik, amelyek az előző méréseink szerint az antigén és antitest kapcsolódásokhoz köthetők (100-160 pN). A három ábrán megfigyelhető, hogy a valós események (antigén és antitest kapcsolódása) nem mindig a térrész ugyanazon pontjában alakulnak ki, annak ellenére, hogy a felületen az antitestek eloszlása nagy valószínűséggel homogén. Ez az antitest-antigén kapcsolódás kialakulásának véletlenszerűségével magyarázható, amely statisztikai folyamat és csak megfelelő orientáció és közelség esetén jön létre. A fenti méréseinkből arra következtethetünk, hogy a mérés szempontjából nem meghatározó az, hogy az erőgöböket egyetlen pontban vagy egy térrészt végigpásztázva vesszük fel.

4. Következtetések és kitekintés

A dolgozatban tárgyalt kísérleteink során pN skálájú erőméréseket végeztünk egy specifikus antigén-antitest kötési erejének meghatározására. Az kapcsolódási erőket a terhelés függvényében vizsgáltuk, ami a szakirodalomban egy elfogadott módszer. Az egyes terhelésekre a legvalószínűbb szakadási erőknek 103 és 167 pN közti értékeket kaptunk, amelyek közel állnak a szakirodalom által említett hasonló kísérletek eredményeihez [15]. Az erők és a terhelés függéséből számolt kölcsönhatási paramétereknek a következőket kaptuk: reakció koordináta $x_\beta = 0,178$ nm, disszociációs ráta $k_{off} = 1,49$ s⁻¹, amelyek nagyságrendileg megfelelnek a szakirodalomban leírtakkal [15]. További kísérletekkel igazoltuk, hogy az általunk antigén-antitest esetén mért kötési erők, melyek értéktartománya jól elkülönül a referenciakísérletek eredményeitől, valós kölcsönhatások következményei. A felület egy kiválasztott térrészén mért erőterképek segítségével kimutattuk, hogy a mérés szempontjából nem meghatározó, hogy az erőméréseket a felület egy rögzített pontjában, vagy egy térrészt végigpásztázva végezzük.

További kísérleteink során a leírt módszer segítségével egyéb molekulapárok vizsgálatát tervezzük, valamint ezek tanulmányozását különböző külső körülményekre.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Váró György tudományos tanácsadónak, hogy lehetőséget adott a laborcsoport kísérleteiben való aktív részvételhez és munkámat hasznos, építő jellegű tanácsaival segítette.

Köszönet illeti Dr. Szegletes Zsolt tudományos munkatársat és Dr. Végh Attila Gergelyt, akik hasznos hozzászólásaikkal, kritikus szemléletükkel és aktív segítségükkel járultak hozzá a kísérlet sikeréhez.

Köszönettel tartozom továbbá a román állam ERASMUS ösztöndíj-támogatásának, ami biztosította a Szegeden való kutatás hátterét.

A kutatást az OTKA (K81180) és a COST Action (TD1002) támogatta.

Hivatkozások

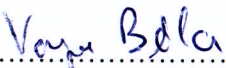
- [1] Binnig G, Rohrer H. Scanning tunneling microscopy. *Helvetica Physica Acta* []. 1982;55(6):726-735.
- [2] Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* []. 1986;56(9):930-933. . Accessed . doi: .
- [3] Mueller SA, Mueller DJ, Engel A. Assessing the structure and function of single biomolecules with scanning transmission electron and atomic force microscopes. *Micron* []. 2011;42(2):186-195.
- [4] Casuso I, Rico F, Scheuring S. Biological AFM: Where we come from - where we are - where we may go. *J Mol Recognit* []. 2011;24(3):406-413.
- [5] Baclayon M, Roos WH, Wuite GJL. Sampling protein form and function with the atomic force microscope. *Mol Cell Proteomics* []. 2010;9(8):1678-1688.
- [6] Rugar D, Mamin H, Erlandsson R, Stern J, Terris B. Force microscope using a fiber-optic displacement sensor. *Rev Sci Instrum* []. 1988;59(11):2337-2340.
- [7] Mulhern P, Hubbard T, Arnold C, Blackford B, Jericho M. A scanning force microscope with a fiber-optic-interferometer displacement sensor. *Rev Sci Instrum* []. 1991;62(5):1280-1284.
- [8] Tortonese M, Barrett R, Quate C. Atomic resolution with an atomic force microscope using piezoresistive detection. *Appl Phys Lett* []. 1993;62(8):834-836.
- [9] Meyer G, Amer N. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Appl Phys Lett* []. 1988;53(12):1045-1047.
- [10] Alexander S, Hellemans L, Marti O, et al. An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical-lever. *J Appl Phys* []. 1989;65(1):164-167.
- [11] Ducker W, Cook R, Clarke D. Force measurement using an ac atomic force microscope. *J Appl Phys* []. 1990;67(9):4045-4052.
- [12] Hutter J, Bechhoefer J. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev Sci Instrum* []. 1993;64(7):1868-1873.
- [13] Cleveland J, Manne S, Bocek D, Hansma P. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Rev Sci Instrum* []. 1993;64(2):403-405.
- [14] Anna Rita Bizzari, Salvatore Cannistraro, ed. *Dynamic force spectroscopy and biomolecular recognition*. th ed. USA: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2012 ; No. . . Accessed . .
- [15] Bizzarri AR, Cannistraro S. The application of atomic force spectroscopy to the study of biological complexes undergoing a biorecognition process. *Chem Soc Rev* []. 2010;39(2):734-749.

- [16] Bell G. Models for specific adhesion of cells to cells. *Science* []. 1978;200(4342):618-627.
- [17] Evans E, Ritchie K. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J* []. 1997;72(4):1541-1555.
- [18] Neuert G, Albrecht C, Pamir E, Gaub H. Dynamic force spectroscopy of the digoxigenin-antibody complex. *FEBS Lett* []. 2006;580(2):505-509.
- [19] Bongrand P. Ligand-receptor interactions. *Reports on Progress in Physics* []. 1999;62(6):921-968.
- [20] Butt H, Jaschke M. Calculation of thermal noise in atomic-force microscopy. *Nanotechnology* []. 1995;6(1):1-7.
- [21] Florin E, Rief M, Lehmann H, et al. Sensing specific molecular-interactions with the atomic-force microscope. *Biosens Bioelectron* []. 1995;10(9-10):895-901.
- [22] Vanoss C. Interaction forces between biological and other polar entities in water - how many different primary forces are there. *J Dispersion Sci Technol* []. 1991;12(2):201-219.
- [23] Clackson T, Wells J. A hot-spot of binding-energy in a hormone-receptor interface. *Science* []. 1995;267(5196):383-386.
- [24] Tha S, Shuster J, Goldsmith H. Interaction forces between red-cells agglutinated by antibody .2. measurement of hydrodynamic force of breakup. *Biophys J* []. 1986;50(6):1117-1126.
- [25] Evans E, Berk D, Leung A. Detachment of agglutinin-bonded red-blood-cells .1. forces to rupture molecular-point attachments. *Biophys J* []. 1991;59(4):838-848.
- [26] Florin E, Moy V, Gaub H. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science* []. 1994;264(5157):415-417.
- [27] Lee G, Kidwell D, Colton R. Sensing discrete streptavidin biotin interactions with atomic-force microscopy. *Langmuir* []. 1994;10(2):354-357.
- [28] Nishizaka T, Miyata H, Yoshikawa H, Ishiwata S, Kinosita K. Unbinding force of a single motor molecule of muscle measured using optical tweezers. *Nature* []. 1995;377(6546):251-254.
- [29] Thoumine O, Kocian P, Kottelat A, Meister J. Short-term binding of fibroblasts to fibronectin: Optical tweezers experiments and probabilistic analysis. *Eur Biophys J Biophys Lett* []. 2000;29(6):398-408.
- [30] Schwesinger F, Ros R, Strunz T, et al. Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates. *Proc Natl Acad Sci U S A* []. 2000;97(18):9972-9977.
- [31] Sulchek T, Friddle R, Langry K, et al. Dynamic force spectroscopy of parallel individual Mucin1-antibody bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A* []. 2005;102(46):16638-16643.

1. Függelék - Tételes szerzői hozzájárulás

Alulírott Varga Béla a dolgozatomban tárgyalt kísérletsorozat alább felsorolt pontjait végeztem saját magam:

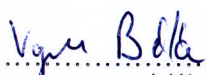
- a mikroszkóp kezelésének elsajátítása
- az üvegfelületek antitestekkel való funkcionlizálása
- a rugólapkák antigénnel való funkcionlizálása
- a mérések elvégzése és mentének nyomonkövetése
- a referencia kísérletek elvégzése
- az adatok utólagos kiértékelése
- Bell-Evans model alkalmazása


.....
(aláírás)

Szeged, 2014. április 28.

2. Függelék

Alulírott Varga Béla nyilatkozom, hogy a fenti dolgozat egy műhelymunka eredménye, melyet, mint Erasmus-ösztöndíjas áthallgató diák (2012. szeptember – 2013. május), a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizika Intézetének, Váró György által vezetett kutatócsoportjában készítettem. A kísérletsorozatból összeállt dolgozatot a XVI. Erdélyi Tudományos Diákköri Konferencián mutattam be (2014. április 25.) „Antigén – Antitest kölcsönhatás tanulmányozása atomerő mikroszkóppal” címmel, ahol ajánlották a XXXII. OTDK-n való bemutatásra. Később ugyanebből a munkából angol nyelven írt „Antigen-Antibody interactions investigated with Atomic Force Microscopy” című MSc. diplomadolgozatot védtem meg (2014. július 6.), ahol azt az ETDK eredményeként fogadták el.


.....
(aláírás)

Szeged, 2014. április 28.