

Tudományos Diákköri Konferencia

Biológia szekció

Fehérje-fehérje kölcsönhatás vizsgálata atomerő-mikroszkóppal

Szűcs Mihály

SZTE TTIK Molekuláris Bionika Bsc III. évfolyam



Szegedi
Tudományegyetem



Szegedi Biológiai
Kutatóközpont

Témavezető: Dr. Szegletes Zsolt, tudományos munkatárs,
Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai Intézet

Konzulens: Dr. Rákhely Gábor, tanszékvezető, egyetemi
docens, SZTE TTIK Biotechnológiai tanszék

2014

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	2
1.1. A pásztázó tűszondás mikroszkópia története.....	2
1.2. Az atomerő-mikroszkóp felépítése, működése.....	3
1.2.1. A szonda	3
1.2.2. A pozícionálórendszer	4
1.2.3. A detektorrendszer.....	5
1.2.4. Képképzési módok	6
1.3. Az atomerő-spektroszkópia.....	7
1.3.1. Kalibrálás	8
1.4. Biomolekuláris felismerő folyamatok	9
1.5. A Bell-Evans modell	10
1.6. Célkitűzés	11
2. Anyagok és módszerek.....	12
2.1. Anyagok, eszközök	12
2.1.1. Antigén, antitest	12
2.1.2. Az AFM-es mérés.....	12
2.2. A minták előkészítése.....	13
2.2.1. A felületek funkcionálizálása	13
2.2.2. A fehérjék felületekhez kötése	14
2.3. Az erőmérések menete	16
3. Eredmények és kiértékelésük.....	17
3.1. A kísérlet általános értékelése	17
3.2. Az adatok értékelése.....	18
3.3. A Bell-Evans modell alkalmazása.....	20
3.4. Következtetés, kitekintés	21
4. Összefoglalás	22
Köszönetnyilvánítás.....	23
Irodalomjegyzék	24

1. Bevezetés

1.1. A pásztázó tűszondás mikroszkópia története

A hagyományos optikai, valamint elektronmikroszkópos módszerek egyaránt valamilyen elektromágneses hullám segítségével – fénnel, vagy az elektron hullámtermészetét kihasználva – alkotnak képet a mintáról. A diffrakció jelensége miatt ezek feloldóképessége függ a használt elektromágneses sugárzás hullámhosszától. A pásztázó tűszondás mikroszkópia (Scanning Probe Microscopy - SPM) ezzel szemben a minta és a szonda (egy rendkívül hegyes tű) között fellépő különféle fizikai, kémiai kölcsönhatásokat méri, ezek alapján „tapogatva” alkot képet a minta felületéről.

A pásztázó tűszondás mikroszkópia legelső képviselőjét, a pásztázó alagútmikroszkópot (Scanning Tunneling Microscope - STM) 1981-ben alkotta meg Gerd Binnig és Heinrich Rohrer, amiért 1986-ban megkapták a fizikai Nobel-díjat (Binnig, et al., 1982). Az STM a képalkotáshoz egy kvantumfizikai jelenséget, az alagúthatást használja; mely szerint, az egymástól néhány nanométeres távolságra lévő, elektromos tekintetben egyaránt vezető tű és minta közé feszültséget kapcsolva, bár nem érnek össze, mégis valamekkora áram mérhető közöttük, ami a távolság növekedésével gyorsan csökken. Az STM ennek köszönhetően igen érzékeny, képes akár atomi felbontásra is. Hátránya viszont, hogy működési elvéből kifolyólag csak elektromosan vezető minták mérhetők vele. (Chen, 2008)

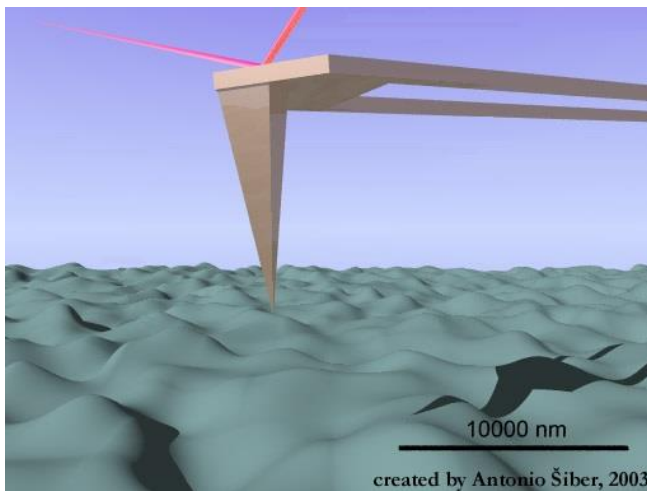
Binning munkatársaival 1986-ban mutatta be az SPM-család második tagját, az atomerő-mikroszkópot (Atomic Force Microscope - AFM) (Binning, et al., 1986). Ez az eszköz mechanikai kölcsönhatást mér a tű és a minta felszíne között. Óriási előnye az STM-mel szemben az, hogy lényegesen univerzálisabb: működéséhez egyáltalán nem szükséges vákuum, levegőben, vagy folyadékban is lehet vele mérni. A mintának sem kell elektromosan vezetőnek lennie. Az AFM-mel tehát könnyedén lehet nagyfelbontású képeket alkotni különféle biológiai struktúrákról, az egyes makromolekuláktól kezdve egészen az élő sejtekig.

A fenn említett eszközökön kívül még számos rendszer használja a pásztázó tűszondás mikroszkópia elvét, a mai napig jelennek meg új konstrukciók. Általánosságban elmondható ezekről a műszerekről, hogy a fény- és elektronmikroszkópokkal ellentétben nem „látják”,

inkább „letapogatják” a mintát, akár molekuláris felbontásra is képesek, illetve, hogy nem csak mérni, hanem befolyásolni is tudják a mintát, nano méretű litográfiák készítésére is alkalmasa. (Morris, et al., 2010)

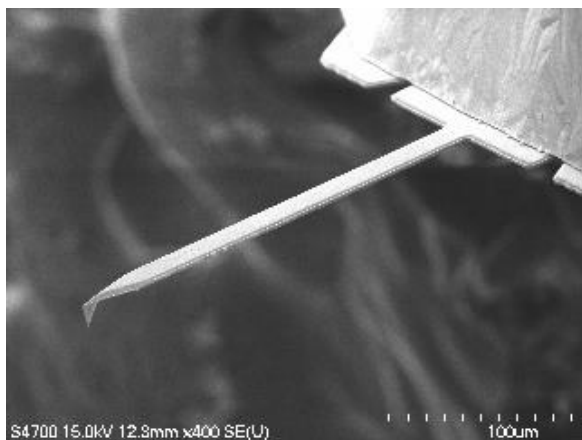
1.2. Az atomerő-mikroszkóp felépítése, működése

Az atomerő-mikroszkóp (AFM) a pásztázó tűszondás mikroszkópok családjába (SPM) tartozik. Működésének alapelve igen egyszerű: Egy nagyon hegyes tűvel pásztázza a minta felszínét, eközben detektálja a tű elmozdulását, és ez alapján alkot képet a minta felületén lévő alakzatokról. (1. ábra)



1. ábra: Az atomerő-mikroszkóp egy tűvel pásztázza a felszínt (http://www.nanotech-now.com/Art_Gallery/antonio-siber.htm)

1.2.1. A szonda



2. ábra AFM-tű (http://probe.olympus-global.com/en/product/omcl_ac240ts_w2/)

A tű egy rugólapka (konzol) végén helyezkedik el, melynek másik vége egy néhány milliméteres chiphez kapcsolódik, ezt megfogva lehet kényelmesen ki- és behelyezni a tűket a készülékbe. (2. ábra) Egy chipen több téglalap, vagy V alakú konzol is helyet kaphat, ezek közül ki lehet választani, hogy éppen melyikre van szükség. A chip a konzollal és a tűvel együtt a mikroelektronikai áramkörök gyártási technológiáihoz hasonló módszerekkel készül, anyaga legtöbbször szilícium, vagy

szilícium-nitrid. Az ilyen anyagokból készült tű elég kemény ahhoz, hogy deformációja a mérés során elhanyagolható legyen. (Morris, et al., 2010)

Az atomerő-mikroszkópiában legfőképpen a szondának használt tű paraméterei határozzák meg a feloldóképességet. Az oldalirányú felbontás a tű hegyének görbületi sugarától függ (ennek értéke általában 10 nm körüli), míg a „mélységélességet” a tű csúcsszöge, valamint magassága befolyásolja. (Morris, et al., 2010) A feloldóképesség két szomszédos pont közötti legkisebb távolság, amelynél még a pontok külön felismerhetők:

$$d = \sqrt{8R\Delta Z} \quad (1)$$

Ahol R a tű hegyének görbületi sugara és ΔZ az a legkisebb függőleges irányú elmozdulás, amelyet a műszer még a zajszint felett érzékelni tud. (Yeskin, 2005.)

A rugalmas konzol elhajlásából a Hooke-törvény alapján lehet következtetni a tűt ért erőhatásra:

$$F = k \times \Delta z \quad (2)$$

Ahol F a konzolra ható erőt, k a konzolra jellemző rugóállandót, valamint Δz a konzol alakváltozását jelöli. A k rugóállandó az AFM-szondák esetében általában 0,01 és 100 N/m között változik. Értéke a konzol alakjától, méreteitől függ az alábbi összefüggés alapján (Bizzarri & Salvatore, 2012):

$$k = E \frac{w}{4} \left(\frac{t}{l} \right)^3 \quad (3)$$

Ahol w a rugólapka szélessége, t a vastagsága, l a hossza, és E az anyagra jellemző Young-modulus (ennek értéke szilícium esetén $1,69 \cdot 10^{11}$ N/m²). (Bizzarri & Salvatore, 2012)

1.2.2. A pozícionálórendszer

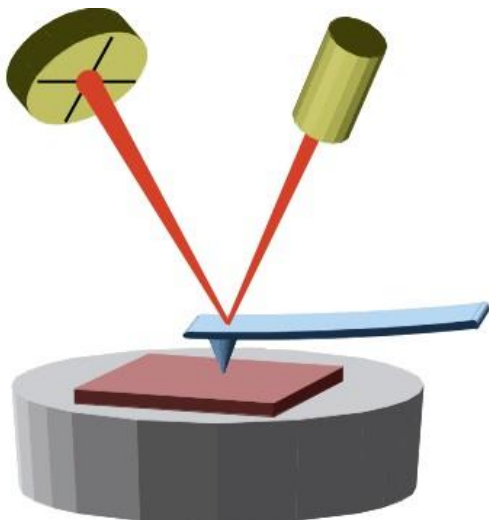
A tű pozícionálását, piezoelektromos kristályok végzik. Piezoelektromos kristályokkal rendkívül kicsi, akár atomi nagyságú mozgások is pontosan vezérelhetők. Noha a piezokristályok feszültség-megnyúlás összefüggése nem teljesen lineáris, bizonyos

tartományon közelíthető egyenessel, illetve elmozdulás-érzékelők segítségével jól kalibrálható. (Morris, et al., 2010)

Gyakorlati szempontból lényegtelen, hogy a tűt mozgatjuk a minta fölött, vagy hogy a minta mozog a tű alatt. A korai konstrukciókban a vízszintes és a függőleges irányban mozgó kristályok egy hengert alkottak, melynek tetején kapott helyet a mintatartó. Ez az elrendezés gyakorlatilag a piezo-henger elhajlásával oldotta meg a minta vízszintes pozicionálását. Ebből kifolyólag a különböző irányba mozgó kristályok egymásra is hatással voltak, ami pontatlanná tette a rendszert. Manapság már ennél sokkal kifinomultabb és célszerűbb elrendezések használatosak. Legtöbbször külön helyezkedik el a három különböző irányú mozgást végző kristály, így a rendszer pontosabban vezérelhető. Szintén ezt segítik a piezokristályok alakváltozásait követő mozgásérzékelők, melyek segítségével kalibrálható a pozicionáló rendszer, így korrigálható a piezokristályok feszültség-méretváltozás függvényének nem-linearitása. (Morris, et al., 2010)

1.2.3. A detektorrendszer

Több különféle módszer is született a tű elmozdulásának érzékelésére, ezek közül az optikai úton történő detektálás bizonyult a legjobbnak, és ma már szinte az összes atomerő-mikroszkóp ezt a rendszert használja. Az optikai detektálás során egy lézer világítja meg a tűt



tartó rúgólapka hátoldalát, ami a lézerfényt egy detektorra reflektálja. (3. ábra) Ahogy a tű kölcsönhatásba lép a felülettel, elhajlik a konzol, ezáltal elmozdul a detektorra eső lézerfolt. Ez a rendszer a visszavert fénysugár hosszával arányosan megnöveli a detektáló felületen a lézerfolt elmozdulásának mértékét, ezért nagyon kicsi változások érzékelésére is alkalmas.

3. ábra: Az optikai detektorrendszer
(<http://www3.physik.uni-greifswald.de/method/afm/eafm.htm>)

A detektor általában négy részre osztott fotodióda. Ez képes érzékelni a konzol függőleges irányú elhajlásán kívül a csavarodását is. (Bizzarri & Salvatore, 2012)

Az atomerő-mikroszkóp működéséhez vákuum nem szükséges, levegőben, vagy akár folyadékban is képes képet alkotni. A levegőben történő mérés során figyelembe kell venni a minta felületén, valamint a tűn adszorbeálódott vízréteget, melynek vastagsága a légkör páratartalmától függ. Az ilyenkor fellépő kapilláris-erő jelentős mértékben vonzza a felszínhez a tűt, ennek következtében a minta deformálódhat, károsodhat. Folyadékban történő méréskor ez a hatás nem tapasztalható. (Morris, et al., 2010)

1.2.4. Képalkotási módok

Az atomerő-mikroszkóp különböző mérési módokban használható. Történetileg a legrégebbi a kontakt, vagy érintkező mód. Ennek során a tű a letapogatás során végig érintkezik a mintával. A módszer előnye, hogy nagy, akár atomi felbontás is elérhető vele, valamint hogy mérhető a konzol csavarodása is, amiből következtetni lehet a tű és a minta felszíne közötti súrlódási erőre. Hátránya viszont az, hogy a felületen végighúzott tű felsértheti az érzékenyebb (például biológiai) mintákat. Két változatban használják: egyik esetben a tű által a felületre kifejtett erő állandó. Ha a tű a felületen magasságkülönbséggel találkozik, elhajlik az őt tartó rúgólapka. Az elhajlás mértékét érzékeli az optikai detektor, majd a vezérlőrendszer ez alapján parancsot küld a függőleges piezokristálynak, ami a megfelelő mértékben elmozdítja a konzolt, hogy az elhajlása megegyezzen egy előre beállított konstans értékkel. Ez által a felületre ható nyomóerő állandó marad. Ilyenkor a kép a függőleges piezokristályra adott feszültségértékekből tevődik össze. A másik eset a konstans magasság mód, ahol a mozgatórendszer nem korrigálja a tű magasságát, a tű csak annyit mozdulhat, amennyit a konzol elhajlása enged. A képet ebben a módban optikai szenzor jele adja, ami konzol elhajlását mutatja. A konstans magasság mód kis érdekességű felületek nagy felbontású vizsgálatára használatos. (Morris, et al., 2010)

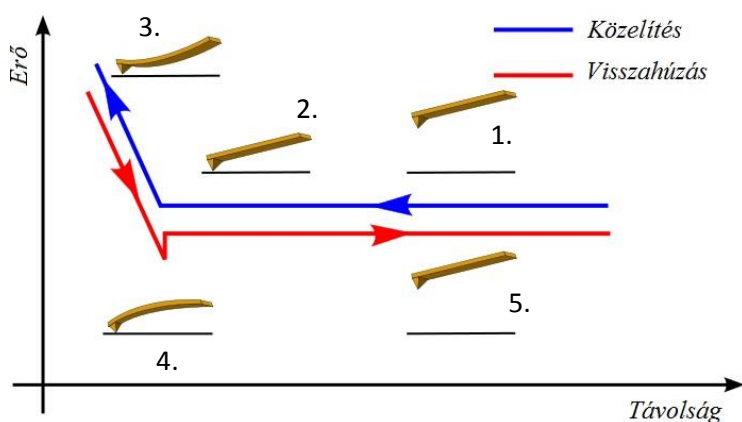
Az AFM másik, gyakori mérési módja a rezgő (AC) mód. A tű rezgőmozgást végez közvetlenül a felület felett, melynek amplitúdója a felülethez közeledve a fellépő erők miatt megváltozik. Ezt a változást az optikai detektor érzékeli, és ez alapján történik a visszacsatolás az előre beállított amplitúdóra, a konstans erő módhoz hasonlóan. Ennek a

módnak is két változata használatos. Az egyik a kopogtató (tapping) mód. Ez esetben a tű rezgés közben az alsó holtpontra hozzáütődik a felülethez. A rezgés fázisa ekkor megváltozik, amiből ütközéskor elnyelődő energiára, ez által a minta viskoelasztikus tulajdonságaira lehet következtetni. A másik eset a nem-kontakt mód, melynek során a tű rezgése során egyáltalán nem ér hozzá a mintához, csak a felület közelében érzékelhető erőket detektálja. A rezgő mód legnagyobb előnye a kontakt móddal szemben, hogy a tű nem súrolja a felszínt, így a mérés során a minta minimális károsodást szenved, ezért ez a mérési mód a legalkalmasabb az érzékeny biológiai minták vizsgálatára. (Bizzarri & Salvatore, 2012)

1.3. Az atomerő-spektroszkópia

Az AFM-készülék képkészítésen kívül alkalmas a tű és a felület közötti erők mérésére is. Ez a mérési mód az atomerő-spektroszkópia (AFS). (A „spektroszkópia” elnevezés megtévesztő lehet: itt nem elektromágneses hullámokról van szó, hanem erőspektrumokról.)

Ennek során a tű csak függőleges irányú mozgást végez, megközelíti a felszínt, majd



4. ábra: Erőgörbe (<http://www.freesbi.ch/en/illustration/figures>)
1. A tű megközelíti a felszínt. 2. A tű helye eléri a mintát. 3. A tű hozzányomódik a mintához, a konzol meghajlik. 4. A piezokristály felfelé mozdítja a tűt, de az adhéziós erők miatt még a felületen marad. 5. A tű felemelkedik a felületről.

felemelkedve eltávolodik tőle. Ez alatt a fotodióda érzékeli a tűt tartó konzol elhajlásának mértékét, ennek változásait. A mérés eredménye egy erő-távolság görbe. A görbén látható (4. ábra), hogy mikor a tű eléri a felszínt a Pauli-féle kizárás miatt taszító erő lép fel. A tű felemelésekor vonzó erő jelenik meg, melynek több oka is lehet, például a már említett

kapilláris-hatás, ami levegőben folytatott méréseknél jelentkezik, a Hofmeister-effektus, vagy specifikus adhéziók. (Bizzarri & Salvatore, 2012)

1.3.1. Kalibrálás

Az erőgörbék értékeléséhez szükségesek a fellépő erők pontos értékei. Ezek kiszámításához ismerni kell a tűt tartó konzol rúgóállandóját, valamint a detektor által mért jel és a konzol elhajlása közötti összefüggést.

Ezt utóbbit adja meg az InvOLS (inverse optical lever sensitivity – inverz optikai érzékenység). Ez a legegyszerűbben egy kemény felszínen erő-távolság görbe felvételével mérhető.

$$InvOLS = \frac{s}{V} \quad (4)$$

Ahol V a fotodiódán mért feszültségváltozás, ami a felszínre érő konzol elhajlását reprezentálja, s pedig a piezokristály függőleges elmozdulása. Az InvOLS mértékegysége: m/V . (Morris, et al., 2010)

A tűt tartó konzol rúgóállandóját azért kell minden egyes konzolra külön kísérletileg meghatározni, mert ebben a mérettartományban már számottevőek a sorozatgyártás pontatlanságai. A legelterjedtebb eljárás a termikus módszer. Az optikai detektorrendszer olyan érzékeny, hogy mérhető vele a rúgólapka termikus sajátrezgése. (Hutter & Bechhoefer, 1993, Butt & Jaschke, 1995, Florin, et al., 1995)

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad (5)$$

Az 5. egyenlet írja le egy rúgó végéhez erősített tömegpont sajátfrekvenciáját. f jelöli a sajátfrekvenciát, k a rúgóállandót, és m a rezgő tömeget. Ez a modell nem veszi figyelembe magának a rúgónak a tömegét, ezért ebben a formában nem alkalmazható. A rúgólapkák hossza és szélessége lényegesen meghaladja a vastagságuk mértékét, ezért a gyártási pontatlanságok arányaiban a vastagságnál a legnagyobbak. Ez alapján, ha feltételezzük, hogy megbízhatóak a gyártó adatai a konzol hosszáról és szélességéről, az alábbi egyenletet kapjuk:

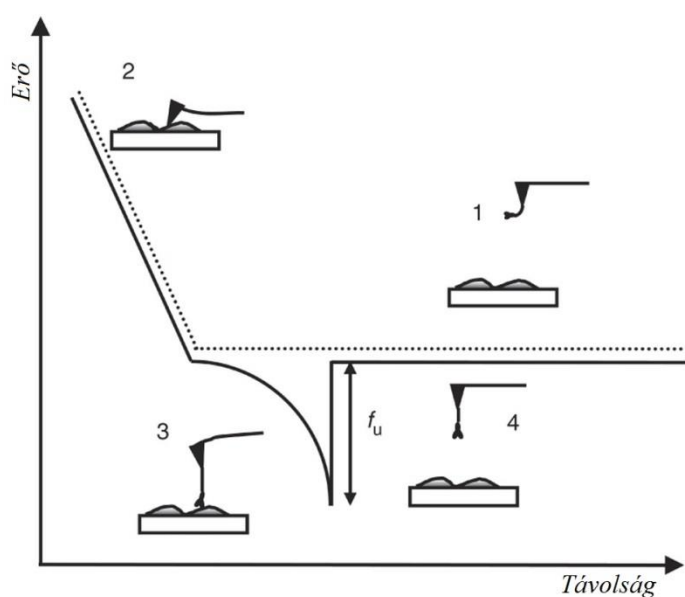
$$k = 2w(\pi lf)^3 \sqrt{\frac{\rho^3}{E}} \quad (6)$$

Ahol k a konzol rúgóállandója, l a hossza, w a szélessége, f a mért rezonanciafrekvencia, ρ a konzol anyagának sűrűsége, és E a Young-modulusa. Ezen összefüggés alapján jó közelítéssel megadható a konzol rúgóállandója. (Morris, et al., 2010)

1.4. Biomolekuláris felismerő folyamatok

A biomolekuláris felismerő folyamatok az egyik legjelentősebb hasznosítási területei az atomerő-spektroszkópiának. Ezek során biomolekulák között történik az erőmérés, azzal a céllal, hogy feltárják a közöttük kialakuló kötések tulajdonságait, illetve hogy a molekulák szerkezetéről nyerjenek információkat.

Ezzel a módszerrel vizsgálhatók sejt-sejt adhéziók, immunfelismerő folyamatok, receptor-ligandum kötések, és még sok egyéb folyamat során létrejövő molekulakapcsolatok. Minden esetben szükséges funkcionalizálni a tűt és a mintafelület: a vizsgálandó molekulapár egyik felét a tűhöz, a másik felét egy sima (általában üveg) felülethez kell kötni kovalensen, vagy erős adhézióval. A tű méretei lehetővé teszik, hogy AFM segítségével akár egyetlen molekulapár kapcsolódását is figyelemmel lehessen követni jelölőmolekulák nélkül, fiziológias környezetben. (Bizzarri & Salvatore, 2012)



Az atomerő-mikroszkópon kívül más eszközök is alkalmasak hasonló mérések elvégzésére, úgy, mint például az optikai csipesz, a lamináris folyadékkamra, a felületi plazmon-rezonancia mérés, valamint az immunoassay-vizsgálatok, noha ezek a módszerek nem tudnak egyedi molekulákat külön vizsgálni. (Allen, et al., 1997, Bizzarri & Cannistraro, 2010)

5. ábra: A kötési erő mérése. (http://www.nature.com/nprot/journal/v6/n9/fig_tab/nprot.2011.370_F1.html) 1. A tű a hozzá kötött molekulával megközelíti a felszínt. 2. A tű eléri a felszínt. A tű és a felülethez kötött molekulák közel kerülnek egymáshoz, kialakul a vizsgált kötés. 3. A tű felemelkedik a felszínről. A molekulák közötti kötés elszakításához szükséges erőt (f_u) mérjük. 4. A tű felemelkedett a felszínről, a vizsgált molekulák elszakadtak egymástól.

A mérés menete nem különbözik az atomerő-spektroszkópiai mérésektől: a tű leereszkedik, megnyomja a minta felszínét, majd felemelkedik. Ez utóbbi, visszahúzási fázisban láthatók a molekulák közötti kötések elszakadását jelző csúcsok. (5. ábra)

1.5. A Bell-Evans modell

Az atomerő-spektroszkópiás mérések során külső erő váltja ki az antigén és az antitest kapcsolódását, elszakadását. Az élő szervezetben viszont ez egy egyensúlyi reakció, amely során ilyen erő nem hat a rendszerre. A nem egyensúlyi körülmények között mért adatokból a Bell-Evans modell alkalmazásával lehet következtetni az egyensúlyi reakciót jellemző disszociációs rátára (k_{off}), valamint a kötés és az átmeneti állapot közötti távolságot jelző reakciókoordinátára (x_β) (Bizzarri & Cannistraro, 2010).

George Bell állította fel azt az elméletet, amely megmutatta az atomerő-spektroszkópia alatt alkalmazott nyomóerő (F) és az egyensúlyi állapotra jellemző disszociációs ráta (k_{off}) közötti összefüggést:

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

Ahol $k_{off}(F)$ a rendszer disszociációs rátája F erő alkalmazása mellett, e az Euler-féle szám, k_B a Boltzmann-állandó és T az abszolút hőmérséklet. (Bell, 1978)

Eauth Evans és Kauth Ritchie ezt a modellt fejlesztették tovább. Időtől függő szakadási erővel számoltak, így meghatározták a szakadási idő és a terhelés közötti összefüggést. A terhelés (R) az erő időbeli változását jelenti. Ennek értéke kifejezhető a konzol rugóállandója (k) és a visszahúzási sebesség (v) szorzataként:

$$R = \frac{dF}{dt} = k \frac{dx}{dt} = kv \quad (8)$$

Az általuk megalkotott egyenlet megadja a legvalószínűbb szakadási erőt (F^*) egy adott terhelés (R) mellett.

$$F^* = \frac{k_B T}{x_\beta} \ln \left(\frac{R x_\beta}{k_{off} k_B T} \right) \quad (9)$$

Ahol k_B a Boltzmann-állandó, és T az abszolút hőmérséklet. Ezt az összefüggést nevezzük Bell-Evans modellnek. (Evans & Ritchie, 1997)

1.6. Célkitűzés

Kísérletünk során célul tűztük ki a humán $\beta 2$ mikroglobulin és egérben termelt monoklonális anti- $\beta 2M$ antigén-antitest pár kötődésének vizsgálatát. Kíváncsiak voltunk a közöttük kialakuló kötés erősségére, valamint a kialakulásának dinamikáját jellemző paraméterekre.

Méréseink a „Cost Action TD1002” standardizációs program részét képezik, melynek során különböző kutatócsoportok hasonló, módszerekkel ugyanazt az ismert antigén-antitest párt vizsgálják. A szerzett tapasztalatok hozzásegíthetnek majd ahhoz, hogy érdemben összehasonlíthatóvá váljanak a biomolekuláris felismerő folyamatokkal kapcsolatos mérések.

2. Anyagok és módszerek

2.1. Anyagok, eszközök

2.1.1. Antigén, antitest

A kísérletben humán β_2 mikroglobulin (β_2 M; antigén), valamint egérből származó monoklonális anti- β_2 M (antitest) között fellépő kölcsönhatásokat vizsgáltunk. A β_2 mikroglobulin egy 100 aminosavból álló fehérje, az MHC I. osztályba tartozó komplexek egyik alegysége. (Peterson, et al., 1972) Ezek az ember minden sejtmaggal rendelkező sejtjén megtalálhatók, hozzájárulnak ahhoz, hogy az immunrendszer meg tudja különböztetni a szervezet saját anyagait más, idegen anyagoktól. A β_2 mikroglobulin transzmembrán doménnel nem rendelkezik, az MHC I. fehérjekomplexek $\alpha 1$ alegységéhez kapcsolódik a membrán extracelluláris oldalán. Glikoprotein, molekulatömege 11,6 kD. A méréshez a Lee Biosolutions által előállított, 126-12-es katalógusszámú, 2x1 mg-os kiszerelésű β_2 M-et használtunk.

Antitestként a Sigma-Aldrich cégtől származó, egérben termeltetett monoklonális anti- β_2 M antitestet (katalógusszám: SAB4700010-100UG) használtunk, mely specifikusan kötődik a β_2 mikroglobulinhoz.

Az antitestet üveg tárgylemez felszínére, míg az antigént az AFM-tűhöz kötöttük.

2.1.2. Az AFM-es mérés

A méréseket egy Asylum Research (USA, California, Santa Barbara) MFP-3D típusú atomerő-mikroszkóppal végeztük. Ez egy kifejezetten biológiai minták vizsgálatára optimalizált konstrukció: az AFM fej egy Zeiss Axiovert 200 típusú inverz optikai mikroszkópon helyezkedik el, amely használható fluoreszcens üzemmódban is. Ezzel alulról nézve nyomon követhető az AFM-es mérés, de legfőbb funkciója, hogy segít a tű pozicionálásánál. Maga az AFM fej elég magas ahhoz, hogy akár egy Petri-csésze is beférjen

alá. A tűt tartó rúgólapka helyzetének detektálása optikai módszerrel történik. A precízebb működés érdekében a tű pozicionálását végző piezo-kristályok külön helyezkednek el: a mintát vízszintes síkban mozgató két kristály a mintaasztalban, a tűt függőleges irányban mozgató piezo pedig a fejben kapott helyet. A műszer által leképezhető maximális magasságtartomány (a függőleges piezokristály mozgástere) $10\text{ }\mu\text{m}$, a vízszintes síkban a mintának legfeljebb $90\times 90\text{ }\mu\text{m}$ -es tartományáról tud képet alkotni. Az AFM feloldóképessége függőleges irányban meglehetősen jó, $0,3\text{ nm}$, vízszintesen a tű görbületi sugarától függően néhány nm körüli.

Az atomerő-mikroszkópot a gyártó által az Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, Oregon, 6.32-es verzió) programban fejlesztett MFP-3D Xop szoftver vezérli. Részben az adatok kiértékelése is ezzel a programmal történt.

Kísérletünkhöz a Bruker gyártmányú MSCT-10 chip „D” jelzésű, „V” alakú konzolján lévő tűt használtuk. A konzol szilícium-nitrid, 600 nm vastag, hátoldalán 40 nm arany-, valamint 15 nm titánbevonattal, névleges rugóállandója (k_{nom}) $0,03\text{ N/m}$. A tű szilíciumból készült, hegyének névleges görbületi isugara 10 nm .

2.2. A minták előkészítése

Az előkészítésnél a standardizációs bizottság által előírt protokollt követtük, melynek alapját a Hermann J. Gruber és munkatársai által közölt leírás alkotja (Hinterdorfer, et al., 1996, Riener, et al., 2003/a, Riener, et al., 2003/b). Az eljárás során polietilén-glikol (PEG) molekulán keresztül kötöttük az antitestet a tárgylemezre, valamint az antigént a tűre.

2.2.1. A felületek funkcionálizálása

Mivel a tű anyaga is szilíciumvegyület, melynek felületén oxidáló légkörben oxidréteg képződik, ugyanazt a módszert használhattuk az üveg és a tű előkészítéséhez. Első lépésként APTES-réteget (3-aminopropil-trietoxiszilán) hoztunk létre a mintákon, ezzel aminos csoportokat alakítottunk ki a felületeken, hogy ezekhez kovalensen lehessen kötni a PEG molekulákat.

Hogy eltávolítsuk az apoláros szennyeződéseket, 5 percig acetonban mostuk a felületeket és a tűket. Miután nitrogénárammal megszárítottuk, 30 percre ultraibolya fény alá helyeztük őket. Ez elősegítette a szilanol (-Si-OH) csoportok kialakulását a felszínen. Argont engedtünk egy exsikkátorba, ezzel eltávolítottuk belőle a levegőt. Belehelyeztük a tárgylemezeket és a tűket, valamint egy kis, nyitott edényben 30 μ l APTES-t, egy másikban pedig 10 μ l trietilamin. Az APTES a tárgylemez, valamint a tű felületén lévő hidroxil-csoportokhoz kovalensen köt vízkilépés mellett, ezt a folyamatot katalizálja a trietilamin. A reagensek gáz fázisban érkeztek a felszínre, hogy elkerüljük az aggregátum-képződést (Riener, et al., 2003). Két órás inkubációs idő után kivettük az APTES-t és a trietilamint tartalmazó edényeket, ezután az exsikkátort újra átöblítettük argonnal. A levegő páratartalma elősegíti az APTES molekulák közötti keresztkötések kialakulását. Vízmentes környezetben azonban kiküszöbölhetők ezek a hatások, és jó közelítéssel egyszeres APTES-réteg hozható létre. Ezért volt szükség az argonra, ami kiszorította a levegőt a reakciótérből, ezáltal elenyésző páratartalmú gázközeget hozva létre. Két napig szobahőmérsékleten inkubáltuk, hogy stabilizálódjon az APTES-réteg.

2.2.2. A fehérjék felületekhez kötése

A tű felületén létrejött APTES-réteg amino-csoportjaihoz PEG láncokat kapcsoltunk, ezekhez kötöttük hozzá a fehérjét. A hosszú láncú összekötő molekula szabadabb mozgást ad a fehérjének, így könnyebben vehetik fel a kapcsolódáshoz szükséges orientációt. (Riener, et al., 2003) A tű és a tárgylemez PEG-es kezelése megegyezik.

A polietilén-glikol egy heterobifunkcionalizált változatát, az aldehid-PEG-NHS-t használtunk, melyben a polietilén-lánc egyik végén egy aldehid csoport, másik végén pedig egy N-hidroxil-szukcinimid (NHS) csoport található. Azért fontos, hogy a PEG két végén más funkciós csoportok legyenek, hogy megakadályozzuk, hogy mindkét végével a felülethez kötődve felesleges hurkokat alakítson ki.

Elkészítettük a PEG-oldatot 6,6 mg aldehid-PEG-NHS feloldásával 1 ml kloroformban. Hozzá adtuk az oldathoz 60 μ l trietilamint katalizátorként. (Ebner & Pete Hinterdorfer, 2007) Ezt az oldatot felvittük a tárgylemezekre, illetve egy kis üveg reakciókamrában belemerítettük az AFM-tűket. Lefedtük a mintákat, hogy folyadék ne

párologjon el róluk, és két óráig inkubáltuk őket szobahőmérsékleten. Ez idő alatt az aldehid-PEG-NHS NHS funkciós csoportja kötést létesített az előző lépésben a felületre kötött APTES-molekulák amino-csoportjaival. A nem kötött PEG molekulákat háromszor 2 perces kloroformos mosással eltávolítottuk, majd a mintákat megszárazítottuk nitrogénáramban.

A minta-előkészítés utolsó fázisát képezi a mérendő fehérjék felvitele. A PEG-lánc végére kötöttük őket; az antigént a tűre, az antitestet az üveg tárgylemezre.

Felhasználás előtt az antigént egy liter PBS (foszfáttal pufferelt sóoldat, 10 mM foszfát puffer, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH=7,4) ellenében, 4 °C-on egy éjszakán keresztül dializáltuk, hogy eltávolítsuk a fehérje izolálásakor nyomokban belekerülő ammóniumsót.

13 mg szilárd nátrium-cianoborohidridet (NaCNBH_3) feloldottuk 180 μl desztillált vízben és 20 μl 100 mM-os NaOH-ban, így 1 M-os NaCNBH_3 -oldatot készítettük. Az üveg felületekre 100 $\mu\text{g/ml}$ -es anti- β 2M-oldatot cseppentettünk. Egy cseppnyi 100 $\mu\text{g/ml}$ -es β 2M-oldatba mártottuk az AFM-tűket. Így kevés antigén is elegendő volt az összes tű kezeléséhez. Mind a tűkön, mind pedig a tárgylemezeken lévő cseppekhez 2-2 μl -t cseppentettünk a NaCNBH_3 -oldatból. 1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. A NaCNBH_3 segített abban, hogy az aldehid-PEG-NHS aldehid csoportjához kötődő fehérje a $\text{C}=\text{N}$ kettős kötés helyett a stabilabb $\text{C}-\text{N}$ egyszeres kötéssel kapcsolódjon az összekötő molekulához.

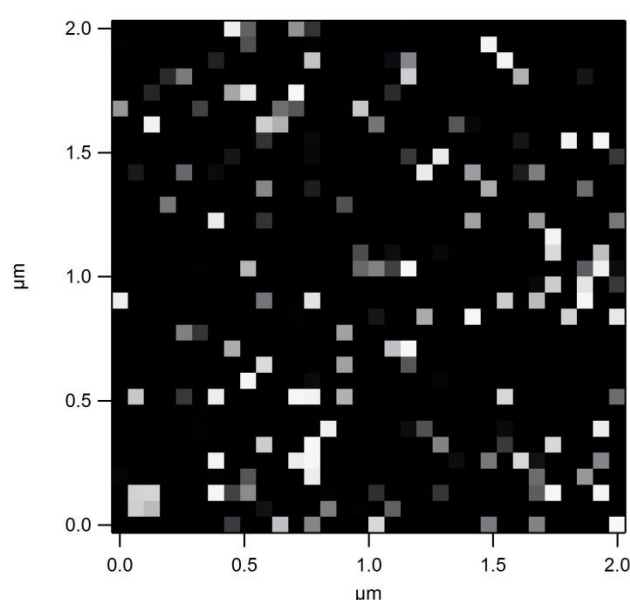
Végül egyenként 5 μl 1 M-os etanolamint raktunk a tárgylemezre, valamint a tűket nedvesítő cseppbe. 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Erre azért volt szükség, hogy a mérés során ne zavarjanak a szabad aldehid csoportok adhézioi. Ezután háromszor 2 percig mostuk a mintákat PBS-sel. A mérés megkezdéséig PBS-ben, 4 °C-on tároltuk a tárgylemezeket és a tűket.

Eredményképpen olyan tárgylemezeket kaptunk, melyekhez kovalens kötésekkel antitest molekulák kapcsolódnak, és olyan AFM-tűket, melyekhez szintén kovalens kötéssel kötődnek az antigének. Ezzel megteremtettük az erőmérések feltételeit, nevezetesen, hogy a mérendő molekulapár a közöttük létrejövő kapcsolathoz képest erősebben kötődjenek a tűhöz, valamint az üveg felülethez.

2.3. Az erőmérések menete

Az erőméréseket folyadékban (PBS) végeztük. A tű állandó 150 nm/s-os sebességgel közelítette meg a felszínt. A megengedett legnagyobb nyomóerő mértékét minden esetben 1 nN alatt tartottuk. Mihelyt a tű által a felületre kifejtett erő elérte ezt az értéket, a tű 0,1 másodperc várakozási idő után eltávolodott a felületről. Ezek a paraméterek megfelelőek ahhoz, létrejöjjön a kötés az antigén és az antitest között. A mérést 50, 150, 400, 1000, valamint 3000 nm/s-os visszahúzási sebességekkel végeztük. Ezáltal különböző terhelésekkel mértünk erőket, ami szükséges volt a Bell-Evans modell alkalmazásához. (9. egyenlet)

A kiszámítottuk a visszahúzási sebességekhez tartozó terheléseket. (8. egyenlet) Ezek értéke rendre 2,15; 6,45; 17,2; 43; valamint 129 nN/s.



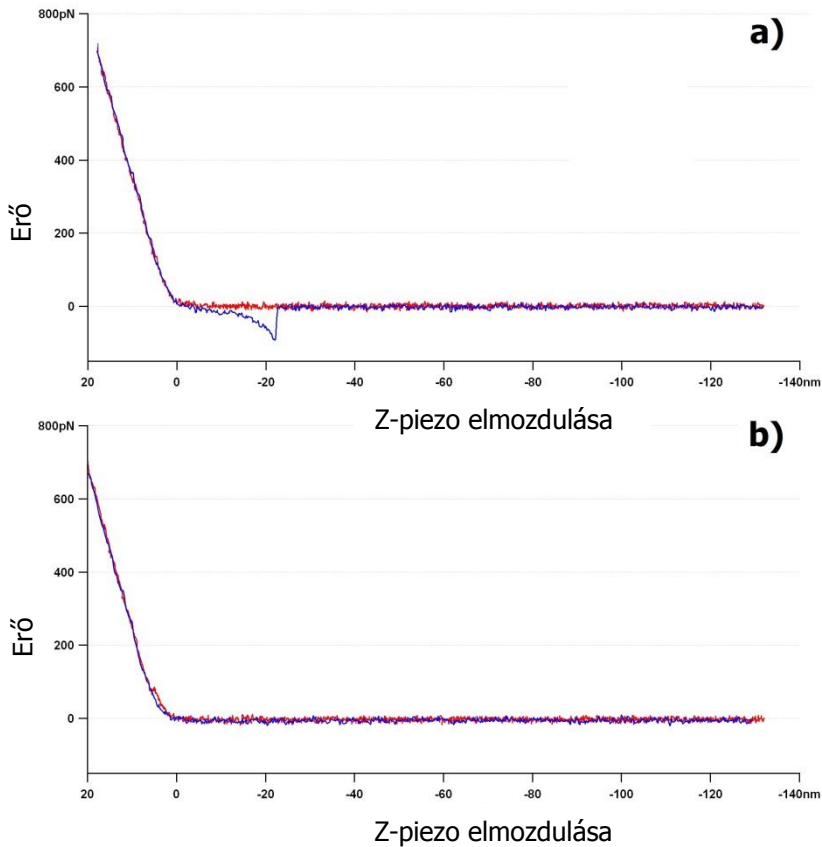
6. ábra: Erőtérkép. A fehérrel jelölt pontokban mért szakadási erők jellemzőek az antigén-antitest kapcsolatokra.

Ennek során egy $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ -es területet 32×32 „képpontra” bontottunk, és minden pontban egy-egy erőgörbét vettünk fel.

Minden egyes visszahúzási sebesség mellett 1024 erőgörbét vettünk fel. A használt tárgylemezek felületét vizsgáló előkísérletek alapján tudtuk, hogy a felszín homogén, az antitestek mindenütt egyforma valószínűséggel kötődnek hozzá. Ezért megtehettük azt, hogy az erőgörbéket nem egy helyen mértük, hanem úgynevezett erőtérképeket vettünk fel. (6.

3. Eredmények és kiértékelésük

3.1. A kísérlet általános értékelése



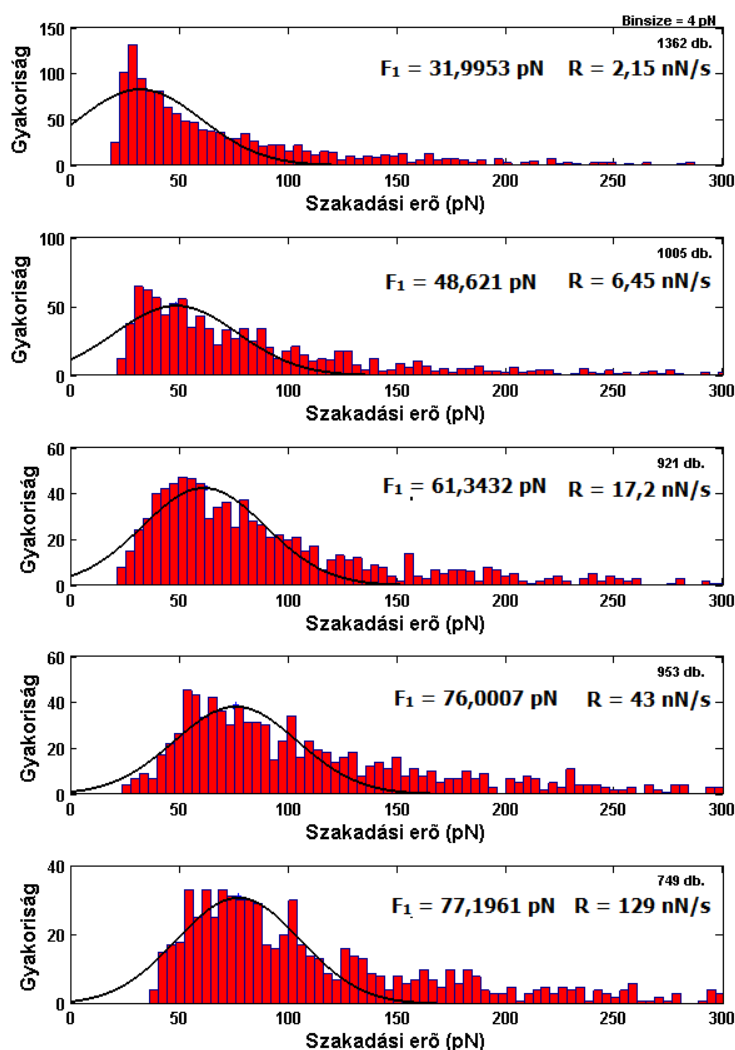
7. ábra: Mért erőgörbék. Az a) görbén jól látható az adhéziót jelző csúcs. A b) görbe nem mutat adhéziót.

Miután a vizsgálandó molekulákat hozzákötöttük a tűhöz, valamint az üvegfelülethez, elvégeztük az erőméréseket. Az eredményül kapott erőgörbék közül látható kettő a 7. ábrán. A b) görbén nincs adhéziós csúcs, míg az a) görbén egyértelműen van. Pusztán az adhézió jelenlétéből nem derül ki, hogy antigén-antitest kapcsolódást detektáltunk-e, erre a kérdésre a csúcs további vizsgálata adhat választ. Az adhéziós csúcs nem a tű és a felület találkozási pontjában van, hanem megközelítőleg

20 nm-rel magasabban. Ez a tény már utal az antigén-antitest kölcsönhatásra, mert a polietilén-glikol molekula 6-10 nm hosszú, és az antigén és az antitest is PEG-en keresztül kapcsolódik a tűhöz. PEG jelenlétét jelzi továbbá a csúcs görbülete, ami PEG molekula megnyúlásából eredhet. A csúcs magassága, vagyis az adhéziós erő mértéke is megfelel az antigén-antitest kapcsolatokra jellemző irodalmi adatoknak (Bizzarri & Cannistraro, 2010). Ezek alapján kijelenthetjük, hogy antigén-antitest kölcsönhatásokat mértünk.

A fentiek fényében megállapíthatjuk, hogy a minták előkészítése sikeres volt, valamint, hogy az általunk használt AFM alkalmas egyedi molekulák között fellépő erők mérésére, pN-os felbontással.

3.2. Az adatok értékelése



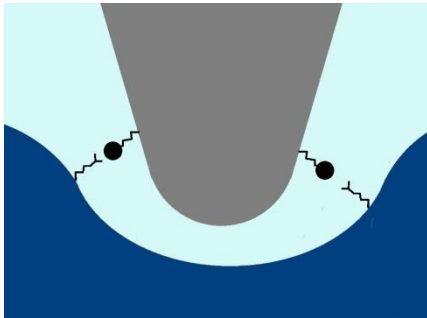
8. ábra: Különböző terhelések mellett mért adhéziós erők hisztogramon. Az első csúcsot Gauss-görbével illesztettük, ez alapján határoztuk meg az adott terhelésre jellemző szakadási erőt.

Ábrázoltuk az erőértékek hisztogramját, majd Gauss-görbével megillesztettük (8. ábra). Az illesztett görbe maximumának helye megadta a legvalószínűbb szakadási erőt (F_1) az egyes szakítási terhelési értékekhez (R). Látható, hogy a nagyobb terheléseknél nagyobb erő szükséges a fehérjék között kialakult kötés elszakításához, kijelenthetjük továbbá, hogy a terhelés és az adhéziós erő közötti összefüggés nem lineáris.

A Gauss-görbék nem illeszkednek jól a hisztogramokra. Ennek oka abban rejlik, hogy egyszerre több antigén-antitest kötés is létre jöhet. A tű hegyének mérete (görbületi sugár $\sim 10 \text{ nm}$) jóval nagyobb, mint a $\beta 2\text{M}$ molekulák ($\sim 1\text{-}2 \text{ nm}$), ennél fogva több antigén is

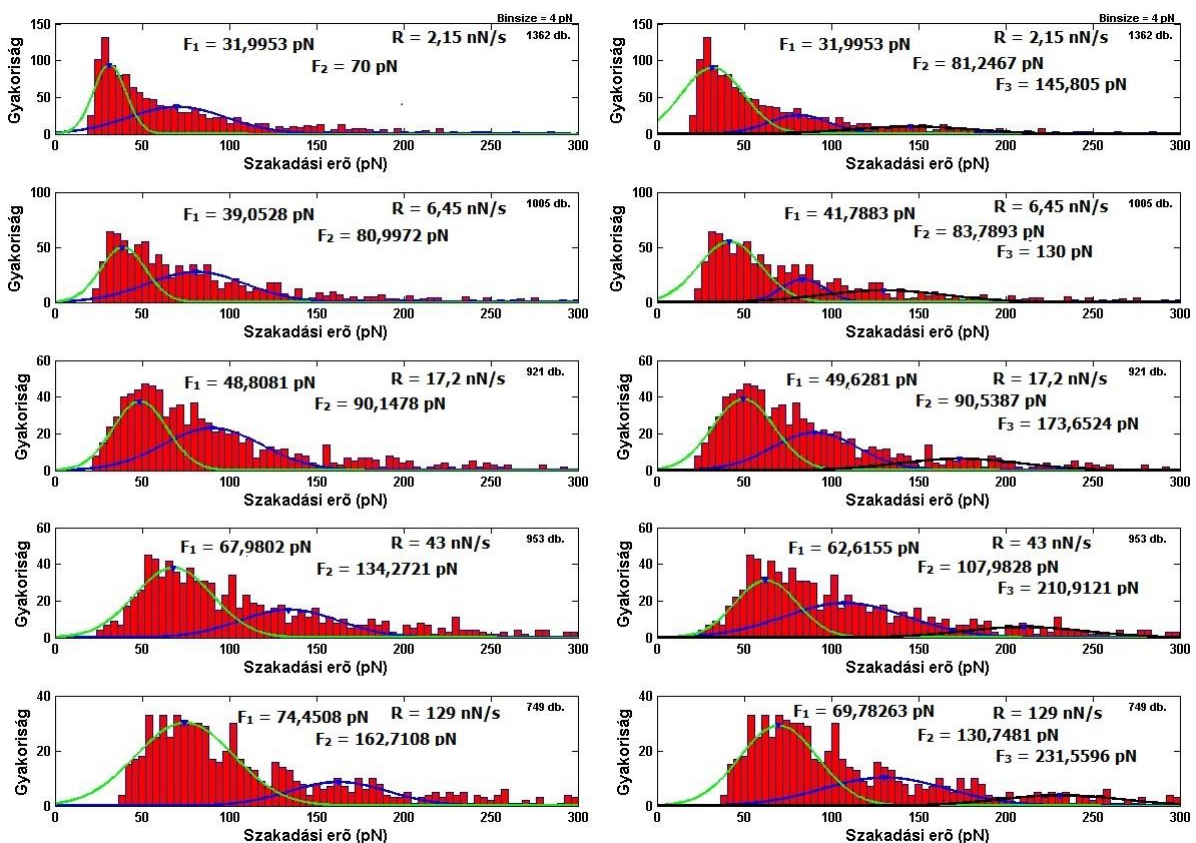
Az adatelemzés során a különböző terhelések mellett felvett erőgörbékéből kizártuk azokat a görbéket, melyeken az adhéziós csúcs nagysága nem érte el a görbe vízszintes szakaszán számolt átlagos zajszint háromszorosát (7. ábra). Azokból a görbékéből, melyeket megtartottunk, kiszámítottuk az adhéziós erők számszerű értékét. Ezt úgy végeztük, hogy az erőgörbék felszínétől távoli végének egy szakaszán átlagoltuk a zajt, majd erre egyenest illesztve megkaptuk 0 N adhézióhoz tartozó alapvonalat. Az adhéziós csúcsok minimumának alapvonalától mért távolságát vettük az adott csúcshoz tartozó adhéziós erő értékének.

kötődhet a tühöz. Emellett az üvegfelszín pár nanométeres mérettartományba eső egyenetlenségei miatt is előfordulhat, hogy egy időben akár kettő, három molekulapár is kapcsolódik. (10. ábra) Ez értelemszerűen az adott erőgörbén kétszer, háromszor nagyobb adhéziót eredményez. (10. ábra)



9. ábra: Geometria okokból egyszerre több antigén-antitest kötés is kialakulhat.

A hisztogramokon emiatt az első, domináns (F_1) mellett megjelennek kisebb csúcsok is, kétszer (F_2), háromszor (F_3) akkora jellemző adhézióval. Ezt figyelembe véve a Gauss-illesztéskor kettő, majd három görbével is elvégeztük az illesztést. (10. ábra) A kisebb csúcsok külön kezelése pontosabbá tette a Bell-Evans-összefüggés kiszámításához szükséges első Gauss-görbe illeszkedését.



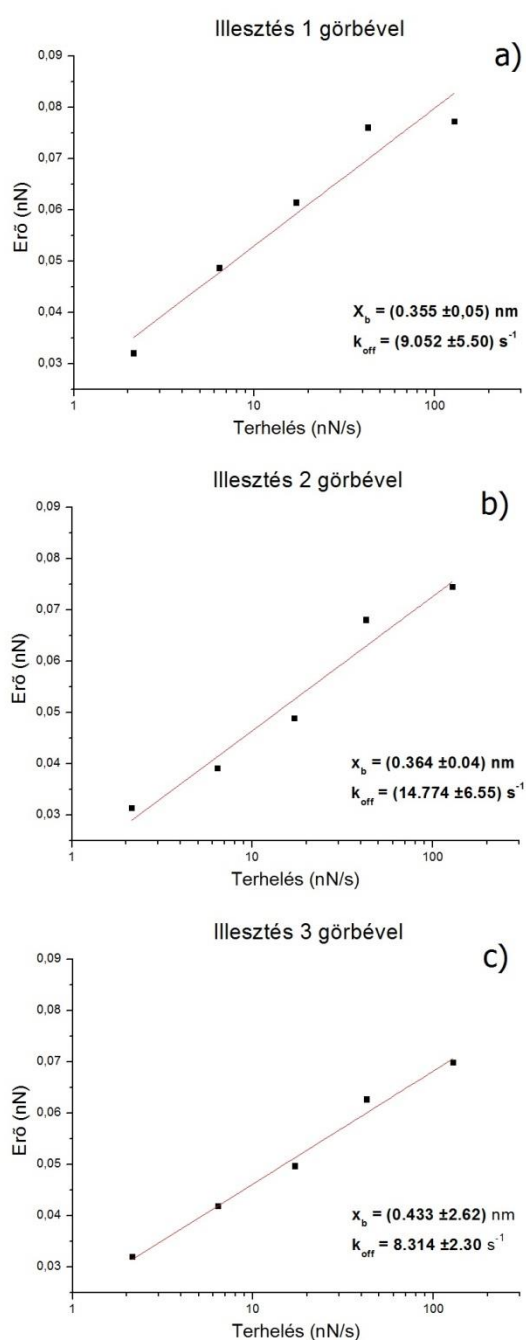
10. ábra: Hisztogramok illesztése több Gauss-görbével. A második, illetve harmadik illesztés maximumhelye jól megközelíti az első csúcs maximumhelyének kétszeresét, illetve háromszorosát.

3.3. A Bell-Evans modell alkalmazása

A kísérletek során egy külső erővel váltottuk ki az antigén és az antitest elszakadását, az élő szervezetben viszont ez egy egyensúlyi reakció. A mért adatokból a Bell-Evans modell segítségével határoztuk meg az egyensúlyi reakció paramétereit. A 9. egyenletben foglalt x_β és k_{off} értékek egyszerű módszerrel kiszámíthatók: A hisztogramok első csúcsára illesztett Gauss-görbe maximumának helye adta meg szakadási erőt (F^*), melyet ábrázoltunk a

logaritmikus skálán felvett terhelési értékek függvényében. A kapott pontokra egyenest illesztettünk. Az x_β -t az illesztett egyenes meredekségéből, a k_{off} -ot a vízszintes tengelymetszetéből határoztuk meg (11. ábra). (Bizzarri & Cannistraro, 2010)

Az általunk kapott k_{off} és x_β értékek nagyságrendi egyezést mutattak a szakirodalomban fellelhető antigén-antitest kapcsolatokra jellemző adatokkal (Bizzarri & Cannistraro, 2010). Ez is megerősítette azt, hogy valóban $\beta 2M$ – anti- $\beta 2M$ kötéseket mértünk.



11. ábra: A Bell-Evans illesztések. Az erőket (F^*) mindhárom esetben a hisztogramok első csúcsára illesztett göbge alapján határoztuk meg, a különbség az, hogy az a) grafikonon szereplő erőket az 1, a b)-n lévőket a 2, míg a c) grafikonon ábrázolt erő-értékeket a 3 Gauss-görbés hisztogram-illesztés alapján számoltunk.

3.4.Következtetés, kitekintés

Kapott értékeinket irodalmi adatokkal összevetve (Bizzarri & Cannistraro, 2010) arra a következtetésre jutottunk, hogy az atomerő-spektroszkópia hatékony módszer egyedi biomolekulák kötéseinek vizsgálatára, akár pN-os erők detektálására is képes. Ráadásul a mérési adatokból a molekulakapcsolatok dinamikai paraméterei is meghatározhatók. Az AFM a méréseket szabályozott környezetben végzi, így a molekula-kapcsolatokra gyakorolt külső hatások befolyása is meghatározható vele.

Az AFM-mel biomolekuláris felismerő mérések folytathatók szerves felületekhez kötött molekulákon, ezért automatizálható folyamatokkal nagy mennyiségű adat gyűjthető vele, ami lehetővé teszi a széleskörű laboratóriumi alkalmazását.

Mérési tapasztalataink alapján tervezzük sejtfelszíni receptorok eloszlásának valamint tulajdonságainak meghatározását. Terveink között szerepel továbbá egyetlen fehérje kitekeredésének vizsgálatával molekuladinamikai mérések kivitelezése.

4. Összefoglalás

A fehérjék között fellépő kölcsönhatásoknak létfontosságú élettani szerepük van; meghatároznak sejt-sejt kapcsolatokat, immunreakciókat, citoskeletális hálózatokat, valamint sok más, élő szervezetben előforduló folyamatot és struktúrát.

A kölcsönható fehérjék között ébredő erők mérésére több módszer is létezik, melyek közül kiemelkedik az egyedi molekulák mérését lehetővé tévő, általunk is használt atomerő-spektroszkópia. Méréssorozatunk egy standardizációs folyamat része, melynek célja, hogy a különféle módszerekkel végzett erőmérések eredményeinek összehasonlításával egységesítse, összehasonlíthatóvá tegye a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat vizsgáló méréseket.

A kísérletek során egy, már jól ismert antigén-antitest pár, a humán $\beta 2$ mikroglobulin, valamint az ez ellen egérben termelt antitest (anti- $\beta 2M$) között létrejövő adhézió paramétereit vizsgáltunk. Méréseink során a fehérjék között kialakult kötések elszakadásakor ébredő erőket detektáltuk, ezekből számoltuk ki a kötésre jellemző paramétereket. Eredményeinket statisztikai módszerekkel értékeltük, valamint vizsgáltuk a Bell-Evans modell teljesülését. A kapott értékek nagyságrendi egyezést mutattak a szakirodalomban fellelhető adatokkal.

Mindennek fényében az atomerő-spektroszkópia hatékony módszer egyedi molekulák kötési paramétereinek, valamint körülményeinek vizsgálatára. További terveink között szerepel sejtfelszíni receptorok tulajdonságainak és eloszlásának meghatározása, valamint egyes fehérjék molekula-dinamikájának mérése.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőnek, Dr. Szegletes Zsolt tudományos munkatársnak, amiért segítségemre volt szakmai kérdésekben, és amiért munkámat hasznos tanácsaival támogatta.

Köszönöm Dr. Rákhely Gábornak, hogy konzulensként segítette a munkámat.

Köszönöm továbbá Dr. Váró György tudományos tanácsadónak, hogy lehetőséget adott arra, hogy aktívan részt vegyek a kutatócsoport kísérleteiben.

Köszönet illeti Varga Béla Phd. hallgatót, aki tapasztalataival, és aktív segítségével járult hozzá dolgozatom megszületéséhez, valamint Végh Attila Gergely tanácsait és építő jellegű kritikus szemléletét.

A kutatást az OTKA K81180, valamint a COST Action TD1002 pályázatok támogatták.

Irodalomjegyzék

- Bell, G. I., 1978. Models for the Specific Adhesion of Cells to Cells. *Science*, 200. kötet, pp. 618-628.
- Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C. & Weibel, E., 1982. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Physical Review Letters*, 49(1), pp. 51-61.
- Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C., 1986. Atomic force microscopy. *Physics Review Letters*, 56(9), pp. 930-933.
- Bizzarri, A. R. & Cannistraro, S., 2010. The application of atomic force spectroscopy to the study of biological complexes undergoing a biorecognition process. *Chemical Society Reviews*, 39. kötet, pp. 734-749.
- Bizzarri, A. R. & Salvatore, 2012. *Dynamic Force Spectroscopy and Biomolecular Recognition*. Boca Raton: CRC Press.
- Butt, H.-J. & Jaschke, M., 1995. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 6(1), pp. 1-7.
- Chen, C. J., 2008. *Introduction to Scanning Tunneling Microscopy*. Oxford: Oxford University Press.
- Dammer, U., Hegner, H., Anselmetti, D., Wagner, P., Dreier, M., Huber, W., Güntherodt, H.-J., 1996. Specific Antigen/Antibody Interactions Measured by Force Microscopy. *Biophysical Journal*, 70. kötet, pp. 2437-2441.
- Ebner, A. & Hinterdorfer, H. J. G., 2007. Comparison of different aminofunctionalization strategies for attachment of single antibodies to AFM cantilevers. *Ultramicroscopy*, 107. kötet, pp. 922-927.
- Evans, E. & Ritchie, K., 1997. Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophysical Journal*, 72(4), pp. 1541-1555.
- Florin, E.-L., Rief, M., Lehmann, H., Ludwig, M., Dornmair, C., Moy, V. T., Gaub, H. E., 1995. Sensing molecular interactions with the atomic force microscope. *Biosensors and Bioelectronics*, 10. kötet, pp. 895-901.
- Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H. J., Schlicher, K., Schindler, H., 1996. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93. kötet, pp. 3477-3481.
- Hutter, J. L. & Bechhoefer, J., 1993. Calibration of atomic-force microscope tips. *Review of Scientific Instruments*, 64(7), pp. 168-1873.
- Manbachi, A. & Cobbold, R. S. C., 2011. Development and application of piezoelectric materials for ultrasound generation and detection. *Ultrasound*, 19. kötet, pp. 187-196.
- Morris, V. J., Kirby, A. R. & Gunning, A. P., 2010. *Atomic Force Microscopy for Biologists*. London: Imperial College Press.

Peterson, P. A., Cunningham, B. A., Berggård, I. & Edelman, G. M., 1972. β 2-Microglobulin - A Free Immunoglobulin Domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(7), pp. 1697-1701.

Riener, C. K., Romanin, C., Klampfl, C., Lackner, B., Prinz, H., Blaas, D., Hinterdorfer, P., Gruber, H. J., 2003. Heterobifunctional crosslinkers for linking of single ligand molecules to scanning probes. *Analytica Chimica Acta*, 497. kötet, pp. 101-114.

Riener, C. K., Stroh, Cordula M., Ebner, Andreas, Klampfl, Christian, Gall, Alex A., Romanin, christoph, Lyubchenko, Yuri L., Hinterdorfer, Peter, Gruber, Hermann J., 2003. Simple test system for single molecule recognition force microscopy. *Analytica Chimica Acta*, 479. kötet, pp. 59-71.

Yeskin, I. N., 2005.. *Ultimate resolution in contact mode*. [Online]
Available at: <http://www.ntmdt.com/spm-basics/view/ultimate-resolution-contact-mode>
[Hozzáfértés dátuma: 8. April 2014].