

Sejtadhézió valós idejű rögzítése és a kinetikai adatok kiértékelése

Balogh Anna

ELTE TTK Fizikus MSc

TDK dolgozat



Témavezetők: **Dr. Horváth Róbert**

Kovács Kinga Dóra

Nanobioszenzorika Laboratórium, Műszaki Fizikai és Anyagtudományi

Kutatóintézet, Energiatudományi Kutatóközpont

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
Néhány felhasznált anyag jellemzése	3
Bevezetés	4
Célkitűzés	6
Irodalmi áttekintés	7
A sejtadhézió	7
Integrinek, sejtadhézió RGD hangolt felületeken	7
Rákos sejtek glikokálixa	9
Optikai bioszenzorok	10
Anyagok és módszerek	13
Alkalmazott műszerek	13
RWG bioszenzor	13
Felhasznált sejtek és anyagok	14
A HeLa sejtvonala és sejtfelvétel	14
Felületkezelés	15
Kondroitináz ABC enzim	16
Echistatin	16
Az élő sejt kísérletek	17
Elmélet és programfejlesztés	20
A sejtadhézió kinetikus modellje	20
Programleírás	21
Eredmények	23
Sejtadhézió a sejtek felületi koncentrációjának függvényében	23
Sejtek glikokálisának enzimatisz emésztése kondroitináz ABC enzimmel	26
Az echistatin bekötődésének vizsgálata sejteken	29
Két ligandumos kinetikus adhéziós modell	32

Összegzés	40
Köszönetnyilvánítás	42
Irodalomjegyzék	43

Rövidítések jegyzéke

DMEM	Dulbecco's modified Eagles medium	Dulbecco módosított Eagle oldat
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline	Dulbecco fiziológiás foszfát puffer
ECM	extracellular matrix	extracelluláris mátrix
HBSS	Hanks' balances saltsolution	Hanks' sóoldat
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav
PEG	poly-ethylen-glicol	polietilén-glikol
PLL	poly-L-lysine	poli-L-lizin
RGD	ardinine glycine aspartic acid	arginin glicin aszparaginsav
PLL-PEG-RGD	PLL(20)-g(3.5)PEG(2)/PEG(3.4)-RGD(14.7%)	PLL(20)-g(3.5)PEG(2)/PEG(3.4)-RGD(14.7%)
RWG	resonant waveguide grating	rezonáns rácsos hullámvezető
TE	trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid	tripszin-etilén-diamin-tetraecetsav

Néhány felhasznált anyag jellemzése

- HEPES: puffer, az oldat fiziológiás PH-ját változó CO₂ szint mellett is megtartja.
- MQ víz: Milli-Q víz, nagy tisztaságú deionizált víz.
- HBSS: olyan pufferoldat, amely a sejtes oldat PH-ját megfelelő szinten tartja, illetve a sejtek életben maradásához szükséges ionokat is biztosítja.
- DPBS: a normál sejtmétabolizmus fenntartásában segít a víz és bizonyos ionok biztosítása segítségével, fenntartja az ozmoregulációt, az intracelluláris és extracelluláris részek közötti nyomásgradiens egyensúlyát.
- Tripszin: fehérjebontó enzim, azaz proteáz - a fokális adhézión kötésekkel vágja fel ezzel elválasztva a felülettől a sejteket.
- EDTA: kelátképző molekula, a Ca²⁺ és Mg²⁺ ionokkal kelátot képezve teszi lehetővé a sejt-sejt kapcsolatok felbontását a sejtek ionigényes folyamatainak gátlásával.
- DMEM: oldat számos különböző emlőssejt növekedésének támogatására.

Bevezetés

A sejtadhézió azon folyamat, amely során a sejtek egymással vagy a környezetükkel kölcsönhatnak, így lehetővé téve a kitapadásukat. Ezen mechanizmus fontos szerepet játszik a sejtek differenciálódásában, a sejtciklusban, illetve a sejtek migrációjában. A szöveti sejtek 6-8 óránál hosszabb időt letapadás nélkül nem élnek túl, a sejtadhézió a lét-fenntartásukhoz elengedhetetlen, így ezen folyamatok vizsgálata és megértése lehetőséget nyújt újabb rákterápiás módszerek kifejlesztésére. [1]

Az egyedi sejtek adhéziója alapvető szerepet játszik a biológiai és orvosbiológiai kutatásokban, viszont a pontos mérése nagy számú sejt esetén a mai napig kihívást jelent. A sejtek adhézióját jól lehet jellemezni azzal az erővel, amely ahhoz szükséges, hogy ezen sejteket leválasszuk arról a felületről, amelyre tapadnak. Ezen erőt mérhetjük közvetlen, és közvetett módon is.

Az előbbi esetben olyan technológiák alkalmazhatóak, mint például az atomerő- mikroszkópia, amely felhasználásakor a sejtek kémiaiilag fixálva vannak az AFM konzoljához, és úgy szedik fel a sejteket az adhézióra alkalmas felületről. Viszont ezen kötés kialakulásához akár 20-30 perc is szükséges, illetve ezen rögzítési módból fakadóan a mért erőértékek maximum néhány nanonewton-os értékeket vehetnek fel. További probléma, hogy a mért eredmények validációja sok kísérletet igényel. Ezen mérési eljárás esetén legfőképp csak molekuláris kölcsönhatásokat vizsgálhatunk, mivel az adhéziós felülettel nem érintkezik a sejt olyan hosszú ideig, hogy az adhéziós folyamatok teljes egészében végbemenjenek.

Egy másik, közvetlen erőmérésre alkalmas technológia egy mikrofluidikai csatornával és nyomáskontrollerrel ellátott atomerő-mikroszkóp, a FluidFM. Ezen eszköz használata során nem kell megvárni, amíg a sejtek kötésbe kerülnek az adhéziós felülettel, mivel a már teljesen letapadt sejteket lehet felszedni néhány másodperces várakozási idővel. A mikrofluidikai csatorna egyik végén az apertúra, a másik végén pedig a nyomáskontroller található. Ha negatív nyomást kapcsolunk a mikrofluidikai csatornára, a sejt membránjának felső része hozzátapad az apertúrához. Ezen kapcsolat kialakulása után a műszer felhúzza a konzolt, a sejtet ezzel felemelve az adott felületről. A konzol meghajlását egy lézernyaláb segítségével tudjuk detektálni, amely visszaverődik a hegy alsó részén található aranyfóliáról. Ezen eljárás az adhéziós erők nagyon pontos meghatározását teszi lehetővé. Az így mért erő-távolság függvény meghatározása után a sejtek túlnyomás

segítségével eltávolíthatóak a konzolról, míg a klasszikus atomerő-mikroszkópok kémiai rögzítést alkalmazó eljárásai esetén a konzol már nem használható fel újra. [2]

Nagy hátránya ezen erőmérésre alkalmas technikáknak, hogy csupán egy végállapotot látunk, a sejtek felvétele után pedig a mérés be is fejeződik. Az adhéziós folyamatok valós idejű követése így nem lehetséges, ehhez már olyan eszközökre lesz szükség, amelyek az adhéziós erőt közvetett módon mérik: az egyik ilyen lehetőség a jelölésmentes, felületérzékeny optikai bioszenzorok alkalmazása. Ezen eszközök laterális felbontástól függően akár egyedi sejtek vizsgálatára is alkalmasak. Az optikai bioszenzorok képesek az adhéziós folyamatok valós idejű, kvantitatív követésére adott magasságban, mivel az általuk mért jel arányos az adhéziós zónában található anyagmennyiséggel. Az így kapott mérési eredményekre már kinetikai görbék illeszthetők. A technika által szolgáltatott optikai jel egyedi sejtre történő erőkalibrációja következtében ezen technika alkalmassá vált nagy számú sejt erőgörbéinek nagy precizitással való meghatározására, relatíve alacsony költségek mellett. [3]

Célkitűzés

Dolgozatomban a HeLa immortalizált sejtvonalat vizsgáltam jelölésmentes optikai bioszenzor segítségével, és az így nyert kinetikai adatokat elemeztem. A sejtek adhéziója valós időben követhető ezen nagy érzékenységgű műszerek segítségével. Egyszerre több minta vizsgálatát is lehetővé teszik, illetve párhuzamos mérések is elvégezhetőek, még hozzá viszonylag rövid idő alatt. Emellett jelölésmentes mivoltukból fakadóan költséghatékony módszernek számítanak.

Kutatómunkám során a szenzorokon sejtheadhéziót elősegítő funkcionális felületeket hoztam létre, majd valós időben vizsgáltam a sejtek adhézióját. Az adhéziót elemezhetjük a jelen lévő sejtek száma, és különböző hatóanyagok koncentrációjának függvényében is. Ezen paraméterek eltérő módon befolyásolták a sejtek adhézióját, amely kinetikája az általam használt jelölésmentes bioszenzor segítségével volt rögzíthető.

A mérés után sor kerülhetett a mért jelek analízisére: eljárástól függően a felületi sejtkoncentrációk vagy éppen a hatóanyag koncentrációk függvényében elemeztem a mért jeleket. A mérések során kapott adatok segítségével olyan kinetikus sejtheadhéziós modelleket hoztam létre és teszteltem közvetlen módon, amelyek a molekuláris paramétereket is figyelembe veszik - ilyenek például a különböző be- és kikötődési ráták, amelyek által jellemezhető az integrin-ligandum komplexek kötési erőssége is.

Kutatómunkám célja egy olyan módszer kidolgozása volt, amely lehetővé teszi a sejtek kitapadásának hatékony, pontos és megbízható elemzését akár különböző mérések széles skálájára is.

Irodalmi áttekintés

A sejtadhézió

A sejtadhézió olyan alapvető aktív biológiai folyamat, amely során a sejtek alkalmas felületre érve kiterülnek és sejtvázukat átrendezve felveszik az adott sejtvonagra jellemző morfológiát. A sejtfelszín speciális molekulái segítségével mechanikai kapcsolatot hozhatnak létre a sejt környezetében található felülettel, és a belőlük kiinduló jelátviteli útvonalak által sejtválaszokat tudnak indukálni. Az adhézió nagy szerepet játszik a jelátvitelben, a sejtek ezáltal képesek észlelni a környezetet és reagálni a környezet változásaira. [1] [4] A sejtadhézió felel a sejt migrációért és a többsejtű szervezetek szövetfeljődéséért is, azaz a sejtek differenciálódásához elengedhetetlen folyamat. [5] A kitapadás folyamatának hibás végbemenetele esetén számos patológias állapot kialakulhat. Ilyen például az ízületi gyulladás és a daganatos megbetegedések. [6] [7]

A sejtadhéziós folyamatokat két nagy csoportba oszthatjuk attól függően, hogy a sejtek egymás között létesítenek adhéziós kapcsolatokat, vagy az extracelluláris mátrixszal. Az előbbi esetben sejt-kapcsolatok általi, míg az utóbbinál közvetett kölcsönhatásról beszélhetünk. Közvetett kölcsönhatás esetén a sejtadhézió speciális transzmembrán fehérjék által tud megvalósulni: ezeket adhéziós molekuláknak nevezzük. [4]

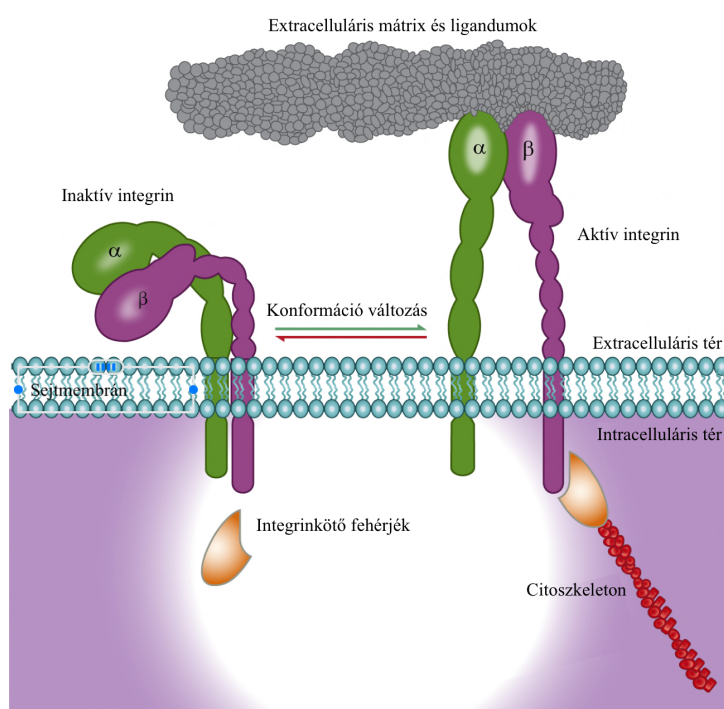
Az adhéziós molekulák csoportokba oszthatóak szerkezetük és funkcióik szerint. Fehérjeszerkezetük alapján négy főbb csoportba tudjuk sorolni őket: az immunglobulin szupercsaládra, a kadherinekre, integrinekre, és a C-típusú, lektin féle doménproteinekre. A fehérjeszerkezet mellett aszerint is csoportosíthatjuk ezeket a kölcsönhatásokat, hogy az adhéziós folyamatok megvalósulása függ-e a Ca^{2+} ionok jelenlététől. Az immunglobulin szupercsalád molekuláris kölcsönhatásai nem függenek a Ca^{2+} ionoktól, míg a többi igen. [8]

Integrinek, sejtadhézió RGD hangolt felületeken

Az integrinek a sejt-mátrix kapcsolatok közvetítésére alkalmas heterodimerek, amelyek két alegységből állnak. A 18 α -integrin alegység és 8 β -integrin alegység 24 különböző integrin receptort alkothat. Ez a 24 különböző integrin négy csoportba sorolható: RGD receptorok, kollagén receptorok, laminin receptorok és leukocita-specifikus receptorok. Az α és β alegységek egy nagy, heterodimer extracelluláris doménnel, egy transzmembrán

doménnel, és rövid citoplazmatikus farokrésszel rendelkeznek. [9]

Az integrinek a sejtadhéziót a sejtmembrán lokális besűrűsödése mellett fokális adhézios korongok létrehozásával képesek megvalósítani. A fokális adhézió által az integrinek képesek a citoszkeletonhoz és az aktin filamentumokhoz kötni. Ekkor tulajdonképpen szerkezeti kapcsolatot biztosítanak a citoszkeleton és az extracelluláris mátrix között. [10] Rögzítő szerepük mellett információkat is továbbítanak a sejt számára annak környezetéről, így lehetővé téve a komplex sejtválaszok kialakulását. Ilyen válaszok például a sejt alakjának változása a letapadásra alkalmas felület függvényében, a proliferáció és génexpresszió, illetve a sejtmigráció szabályozása. [11]



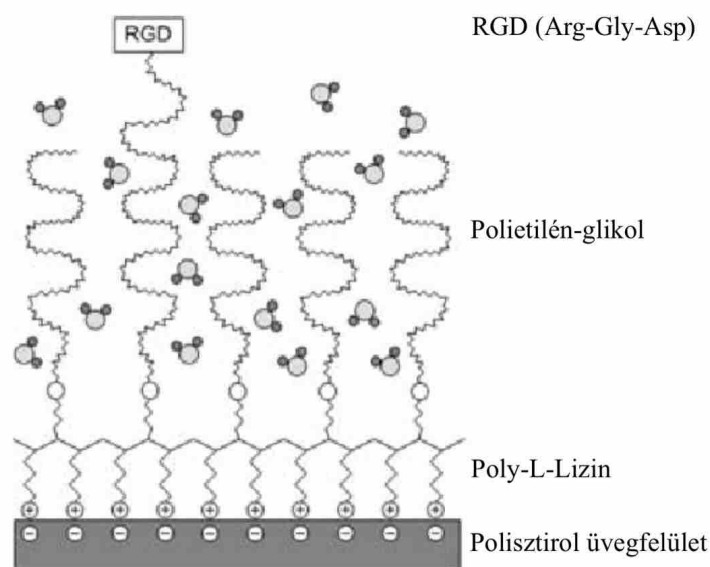
1. ábra. Az integrinek felépítése és konformációváltozása. [12]

Az integrinek egyik csoportját a már említett RGD receptorok alkotják. Ezen receptorok képesek felismerni az RGD (arginin glicin aszparaginsav) tripeptidszakaszt, így receptor-ligandum komplexeket hoznak létre. Ezen tripeptidek lokális felületi sűrűsége befolyásolja a sejtek adhéziójának erősségét, ezáltal a vizsgált sejtípus számára ideális felületi ligandumkoncentrációt lehet kialakítani a mérések során. Ehhez kétféle kopolimer bevonatot szokás alkalmazni, az egyik a PLL-g-PEG, a másik az RGD-funkcionalizált PLL-g-PEG-RGD. [13]

A PLL-g-PEG, azaz poli-(L-lizin)-g-(polietilén-glikol) olyan szintetikus kopolimer, amely az adott felületen immobilizált polimerek esetén fehérjerezisztens és ebből faka-

dólag sejttaszító réteggént funkcionál. A PLL-g-PEG gerincét a PLL (poli-L-lizin) poli-aminosav alkotja, míg az oldalláncait a hidrofil PEG (azaz polietilén-glikol) molekulák, amelyek egy sűrű szálú ecsethez hasonlóan ágaznak le a poliaminosav gerincéről. A PLL képes elektrosztatikus kölcsönhatásba lépni nem csak a szenzorlemez felületével, hanem a sejtfelszínnel és az extracelluláris mátrixszal is. A PEG oldalláncok speciális tulajdonsága a fehérjetaszító jelleg. A mérési zaj minimalizálható általuk mivel a felhasznált anyagokban található szennyeződések, például fehérjék ronthatnák a mérések pontosságát. [14]

A sejtek RGD specifikus receptoraik által képesek kitapadni a PLL-g-PEG-RGD kopolimeren. Így az adott felületen csak specifikus fehérjékkel rendelkező sejtek képesek adhézióra. Ha csupán PLL-t használnánk, a kísérleteink nem lennének célravezetőek, mivel bár ehhez is tapadnak a sejtek, az RGD-vel ellentétben nem fordul elő a szervezeteinkben. [15] [16]



2. ábra. A PLL-PEG-RGD polimer sematikus rajza a felületi elektrosztatikus kölcsönhatás feltüntetésével. [15]

Rákos sejtek glikokálixa

A glikokális, más néven pericelluláris mátrix a sejtmembrán külső oldalán található szénhidrátban gazdag réteg, amely mind a baktériumok, mind a legtöbb sejt típus, például a daganatos sejtek sejtmembránját is körülveszi. Ezen viszkózus bevonat glikolipidekből, glikoproteinekből, és oligoszacharidokból, pl. glikozaminoglikánokból (GAG)

áll. A glikolipidek szénhidrát része segíti ezen molekulákkal a sejtfelismerést, a sejtek egymással való kommunikációját, és a sejtadhéziót. [17] A glikokálix egyfajta azonosítóként funkcionál, amelyet a szervezet saját egészséges sejtjei és az átültetett szövetek, beteg sejtek vagy különböző kórokozók megkülönböztetésére használ.

A glikokálixban olyan sejtadhéziós molekulák találhatók amelyek lehetővé teszik a sejtek egymáshoz tapadását, így ezen réteg különösen fontos szabályozó szerepet játszik az integrin rendszer viselkedésében és szignalizációban. [18] A glikokálix az integrin rendszer viselkedésében és szignalizációban erős szabályozó funkciót lát el, emiatt pedig a vizsgálata különösen fontos lehet a daganatok kutatása során, mivel ezen sejtek közel 95%-ának módosul a glikokálix összetétele vagy a struktúrája. [19] [20] A sejtek jobban tapadnak ha a glikokálix sűrűsége ideális, ekkor a sejtfelszíni integrin receptorok jobb klasztereződésében játszik szerepet. Ha a glikokálix túl sűrű, az integrin receptorok és a ligandumok közötti távolság megnő, ezáltal az adhézió mértéke csökken, a sejtek akár le is válhatnak az adhéziós felületről. Így a glikokálix komponenseinek összetétele, mennyisége nagyban befolyásolja a daganatos sejtek viselkedését. [21] [20]

Munkám során a HeLa méhnyakrák-eredetű, immortalizált sejtvonalat vizsgáltam. Ezen sejtek glikokálixja nagy részben kondroitin-szulfátból, dermatán-szulfátból, heparán-szulfátból, szialsavból és a hialuronsavból épül fel, melyek mind negatív töltésűek semleges pH-n. [22] A glikokálix enzimmel való emésztése miatt a sejtmembrán alakja megváltozhat, emellett a receptorok szerveződése és aktivitása is megváltozhat. [23] [24] A glikokálix összetevőit, a kondroitin-4-szulfátot, kondroitin-6-szulfátot és dermatán-szulfátot olyan enzimek hasítják le, mint például a kondroitináz ABC (ChrABC). [25] [20]

Optikai bioszenzorok

Az optikai bioszenzorokat alapvetően két nagyobb csoportra tudjuk osztani. A jelölésmentes optikai bioszenzorok esetében az érzékelés közvetlenül történik, míg a jelöléses bioszenzorok használata során egy molekuláris markert kell kötnünk a vizsgálandó mechanizmusban szerepet játszó, vagy éppen a mérés során detektálandó célmolekulára.

A jelölésmentes optikai bioszenzorok költséghatékony vizsgálati módszerek, mivel több kísérletben is felhasználhatóak újra és újra, illetve jelölésmentes mivoltukból fakadóan nem csupán a jelölőmolekulára nem kell költeni, hanem a jelölőmolekula kölcsönható tulajdonságainak kiküszöbölésére sincs szükség a mérések megtervezése során. Ezen szenzo-

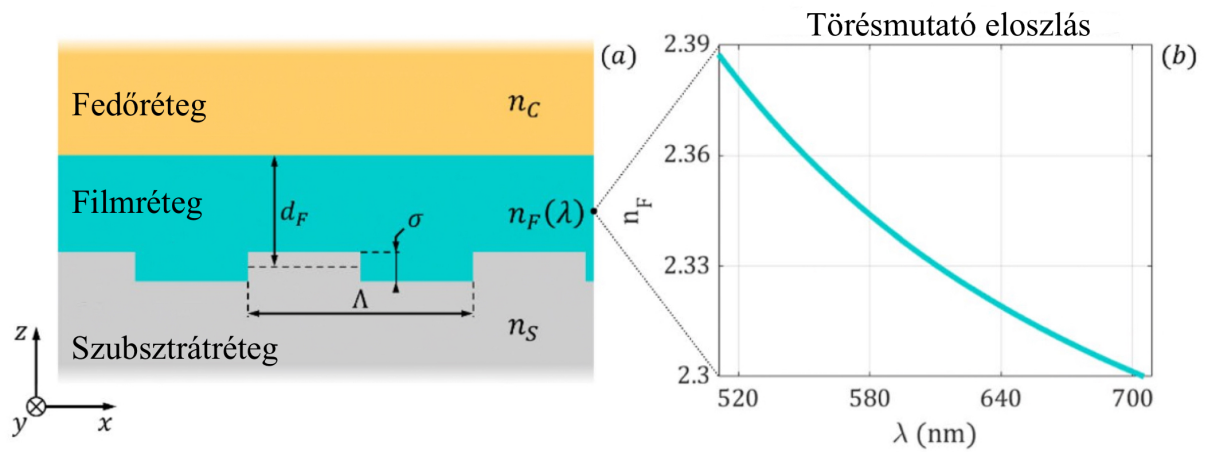
rok több minta párhuzamos, nagy érzékenységgű és felbontású vizsgálatát is lehetővé teszik - ekkor a folyamatokat akár valós időben is megfigyelhetjük. A jelölésmentes módszerek a vizsgálandó biomolekulák vagy sejtek belső tulajdonságait kihasználva működnek: ilyen például a törésmutató vagy a töltés - viszont az így mért jel általában több komplex biológiai folyamat eredményeképpen áll össze, emiatt a kapott integrált jel kiértékelése és értelmezése bizonyos esetekben bonyolult feladat lehet.

A jelölésmentes bioszenzorok tovább csoportosíthatóak aszerint, hogy a minta vizsgálatát milyen működési elv alapján végzik. Beszélhetünk például akusztikus hullám alapú, elektrokémiai, és félvezetésen alapuló bioszenzorokról is a már említett optikai bioszenzorok mellett. A leggyakrabban használt eljárások a következők: rezonáns hullámvezető rács (resonant waveguide grating - RWG) optikai bioszenzorok, a felszíni plazmon rezonancia (surface plasmon resonance - SPR) optikai bioszenzorok, illetve az akusztikus rezonancián alapuló quartz crystal microbalance (QCM) szenzor és az elektromos sejt-szubsztrát impedancia mérésén alapuló (electrical cell-substrate impedance sensing - ECIS) eljárás. Az optikai bioszenzorok működése alapvetően a fényforrás által kibocsátott fény és a biofelismerő elem interakcióján alapszik, azaz ezen eszközök a biológiai válaszjelet alakítják át mérhető jellé.

A hullámvezetésen alapuló bioszenzorok a felszíni plazmon rezonancia (SPR) szenzorokhoz hasonlóan a közvetlenül a hullámvezető réteg felett jelenlévő evanescens teret használják fel a törésmutató változásainak észlelésére egy (150-200) nm vastag rétegben. A rezonáns rácsos hullámvezető konfigurációban az érzékelő lemezt alulról szélessávú fényforrás világítja meg, de csak egy meghatározott és szűk hullámhossz-tartományt (a rezonancia hullámhosszt) veri vissza. A visszavert hullámhossz eltolódása akkor következik be, amikor a törésmutató megváltozik a hullámvezető réteg felett, ahol az evanescens tér is található. Így a rezonancia hullámhossz monitorozásával valós időben követhető nyomon a felület közeli réteg törésmutatójának változása. [26]

Az optikai hullámvezető réteg egy vékony, körülbelül (120-200) nm vastag, nagy törésmutatójú film, ebbe egy optikai rácsot ágyaznak be. Ezen rács felel a fény megfelelő szögben való becsatolásáért és kicsatolásáért. A filmet általában egy kicsi, sík üveglapra viszik fel, amit szubsztrátnak vagy hordozónak neveznek. A szenzor így tulajdonképpen egy integrált, egy módusú optikai chipként kezelhető, ami csak a nulladik módus hordozására képes a szubsztráton található hullámvezető réteg rendkívül vékony mivoltából

fakadóan. [27]



3. ábra. A szenzorlap felépítése: n_C a cover, azaz a fedőréteg törésmutatója, n_F a filmrétegé és n_S a szubsztráté. A rácsállandó Λ és a filmréteg d_F vastag. [27]

Anyagok és módszerek

Alkalmazott műszerek

RWG bioszenzor

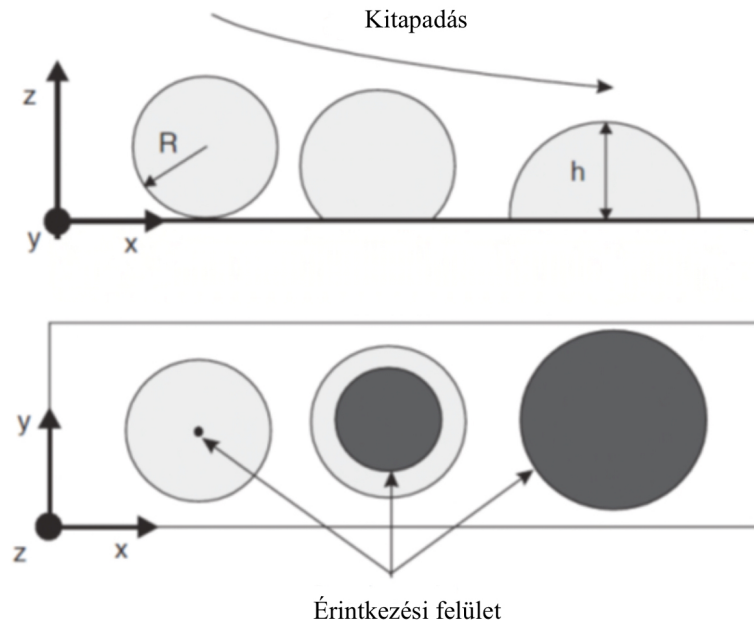
A mérések a Corning Inc. Epic BenchTop jelölésmentes optikai bioszenzorával készültek, amely RWG technológián alapul. A szenzor alapvetően két részből áll: az egyik a mikroplate olvasó, a másik pedig maga a mikroplate, amely egy cserélhető mikroszenzorlap. A mikroplate-ből létezik 96 és 384 well-es (lyukú) is.

Mindegyik well alján a hullámvezető rétegbe egy (2 x 2) mm-es niobium-pentoxidból készült rezonáns hullámvezető rács van beágyazva. Erre a rácsra érkezik be a klasszikus elrendezéstől eltérően merőleges irányból, alulról a (825-840) nm hullámhossztartományú és közel monokromatikus lézerfény. A becsatolt módus szinte egyből ki is csatolódik a szubsztrát irányába, miután fáziseltolódást szenved el - ezt a nagyon erős rács reszi lehetővé. Az így kicsatolódó módust az alulra elhelyezett CCD kamera érzékeli.

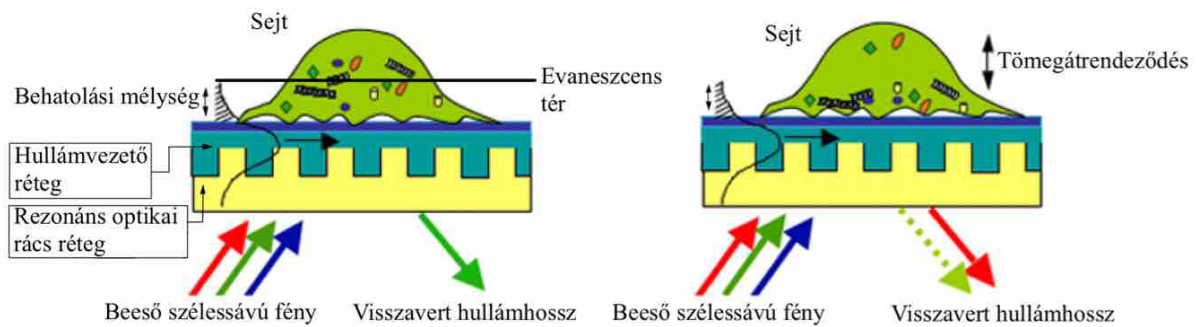
A szenzor a beérkező fény hullámhosszát hangolja a mérés során 0.25 pm-es lépésekben, egy szenzorlap teljes beolvasása 3 másodperc. A nagy időbeli felbontás lehetővé teszi a valós idejű megfigyelését a vizsgálandó folyamatoknak. [28]

A szenzoron lévő sejtek az adhézió során receptor-ligandum komplexeket alakítanak ki. Ekkor a sejtek sűrűsége és térfogata is módosulhat. A sejtek szuszpenzióban gömb alakúak, így ha az adhéziós felületre érnek, azzal csupán kis felületen érintkeznek - azaz csak kis részük ér bele az evanescens térbe. Viszont megfelelő idő eltelte után az adhézióra alkalmas felülethez érve a sejtek szétterülnek - így a sejtek térfogata és sűrűsége is megváltozik. A sejtek ezáltal egyre nagyobb részben lesznek a letapadás során jelen az evanescens térben, így ezen a rétegben is változik majd a sűrűség, ezzel együtt pedig a törésmutató is (4. ábra).

Az evanescens téren belül lévő anyagok törésmutatójától függ a fáziseltolódás, azaz a sejtleletapadás miatti törésmutatóváltozás fáziseltolódást idéz elő. A hullámvezetés a beeső fény más-más hullámhosszai esetén tud megvalósulni - emiatt a kimenő jelünk elsődlegesen a rezonáns hullámhossz-eltolódásának mértékét fogja jellemezni egy adott referenciaponthoz viszonyítva. [28]



4. ábra. A sejt alakjának változása az adhézión során. [29]



5. ábra. Az EPIC BT bioszenzor működése egy letapadó sejttel szemlélítve. [30]

Felhasznált sejtek és anyagok

A HeLa sejtvonal és sejtfelvétel

A mérések a HeLa immortalizált méhnyakrák sejtvonallal készültek, amely az egyik legrégebbi és legszélesebb körben használt sejtvonal. George Otto Gey tenyésztette ki először 1951-ben egy Henrietta Lacks nevű afroamerikai nő szövettani mintájából. Ezen sejtvonal könnyen tenyésztethető laboratóriumi körülmények között, és ha megfelelő felületre jut, az adhézió szinte biztosan végbemegy. A HeLa sejtvonal széles körben vizsgált, sztenderd

sejtvonal: szakirodalma jelentős, így a kapott mérési eredmények könnyen összehasonlíthatóak és ellenőrizhetőek is. [31]

Méréseimhez a HeLa sejtek polisztirol petri-csészékben lettek rutinszerűen tenyésztve, 37°C-os, 5% CO₂-t tartalmazó inkubátorban. A mérések előkészítése során a sejtekről először eltávolítottam az elhasznált tápot. Ezután 2 ml DBPS-sel (Dulbecco fiziológiás foszfát puffer) átmostam a sejteket, majd pedig pipettával leszívtam, eltávolítva a sejttörmeléket. Ezután 1 ml tripszin EDTA-t pipettáztam a sejtekre, majd pedig 2 perc várakozás után pipettával leszívtam az oldatot. A tripszin olyan szerinproteáz, amely képes a sejtek fokális adhézis kötéseinek felvágására, azaz a petri-csészében letapadt sejtek felszedésére. Az oldat másik komponense az EDTA, amely a Ca²⁺ és Mg²⁺ ionokkal keletkező képzve teszi lehetővé a sejt-sejt kapcsolatok felbontását, gátolva a sejtek ionigényes folyamatait.

A sejtekre 1 ml HeLa DMEM tápoldatot pipettáztam, és addig mostam vele a sejteket, amíg a petri-csésze alján látható opálosság eltűnt: a letapadt sejtek keltik ezen opálós hatást, és ha ez eltűnik, akkor megbizonyosodhatunk róla, hogy sikeresen felszedtük őket. Ezután centrifugálással eltávolítottam a sejtes tápot, amit pufferre cseréltem. Ehhez először is Falcon csőbe mértem át a kapott szuszpenziót. 5 percig centrifugáltam 200 x g-n, majd pedig gyors leöntéssel eltávolítottam a felülúszót. 3 ml 20mM pH 7.4 HEPES HBSS-t adtam hozzá, majd újra 5 percig centrifugáltam 200 x g-n, és szintén gyorsan leöntöttem a felülúszót. Ezután hozzáadtam 1 ml 20mM pH 7.4 HEPES-HBSS-t, majd pedig felszuszpendáltam az oldatot. Bürker-kamra segítségével a sejteket megszámláltam: beinjektáltam 10 µl-nyit a sejtes oldatból a kamra és a rögzített üveglemez közé. Végül pedig megfelelő koncentrációra hígítottam a sejtes szuszpenziót 20mM pH 7.4 HEPES HBSS-sel. Ezután a sejtek az adott felületre pipettázhatóak.

Felületkezelés

A mérések során a sejtek kitapadásához a 384 well-es mikroszenzorlapot használtam. A lyukak (well-ek) felületén RGD funkcionális felületeket kellett kialakítani. Ehhez először a megfelelő mennyiségű PLL-g-PEG-RGD-t HEPES MQ-val duplájára hígítottam, és az így kapott 0.5 mg/ml-es PLL-g-PEG-RGD oldatot a well-ekbe pipettáztam. Ezután Allegra X-30R típusú centrifuga segítségével 10 másodpercig, 200 x g-n lecentrifugáltam a plate-et, hogy így eltávolítsam a buborékokat, amelyek az oldat pipettázása

során kerülhetnek a lyukakba. Végül pedig 30 percig billegettem a mikroplate-et, hogy a sejtek egyenletes bevonatra tudjanak majd kitapadni. A 30 perc letelte után szöszmentes papírtörlőre kiütöttem az oldatot a plate-ből, és kétszer átmostam a lyukakat 20mM pH 7,4 HEPES-HBSS-sel, amelyből 30 μ l-t pipettáztam mindegyik well-be, majd pedig kiütöttem őket. Ezután újra 30 μ l HEPES HBSS-t pipettáztam a mérőlyukakba. A kontrollhoz egy sornyi well-et üresen hagytam, melyekbe csak 30 μ l HEPES-HBSS került, felületkezelés nélkül. Hasonló beállítások mellett újra lecentrifugáltam a mikroplate-et, ezután sor kerülhetett az alapvonal felvételére, majd pedig a sejtek felületre való pipetázása után magára a mérésre.

Kondroitináz ABC enzim

A kondroitináz ABC a *Proteus vulgaris* baktériumból származó enzim, amely a kondroitin-szulfát típusú glikozaminoglikánokat emészt. A glikokálix-integrin interakció könnyen megszakítható a glikokálix enzimatis emésztése által. A kondroitin-4-szulfát, kondroitin-6-szulfát és a dermatán-szulfát mind hasítható kondroitináz ABC-vel, ami egyértelműen befolyásolja a rákos sejtek adhézióját. [32]

Echistatin

Az echistatin a legkisebb aktív RGD fehérje, amely a dezintegrinek családjába tartozik. Kígyóméregből lehet kivonni, a vérlemezke-aggregáció erős inhibitoraként viselkedik. A kígyóméreg dezintegrinek olyan alacsony molekulatömegű fehérjék, melyek szintén tartalmaznak RGD szekvenciát. [33]

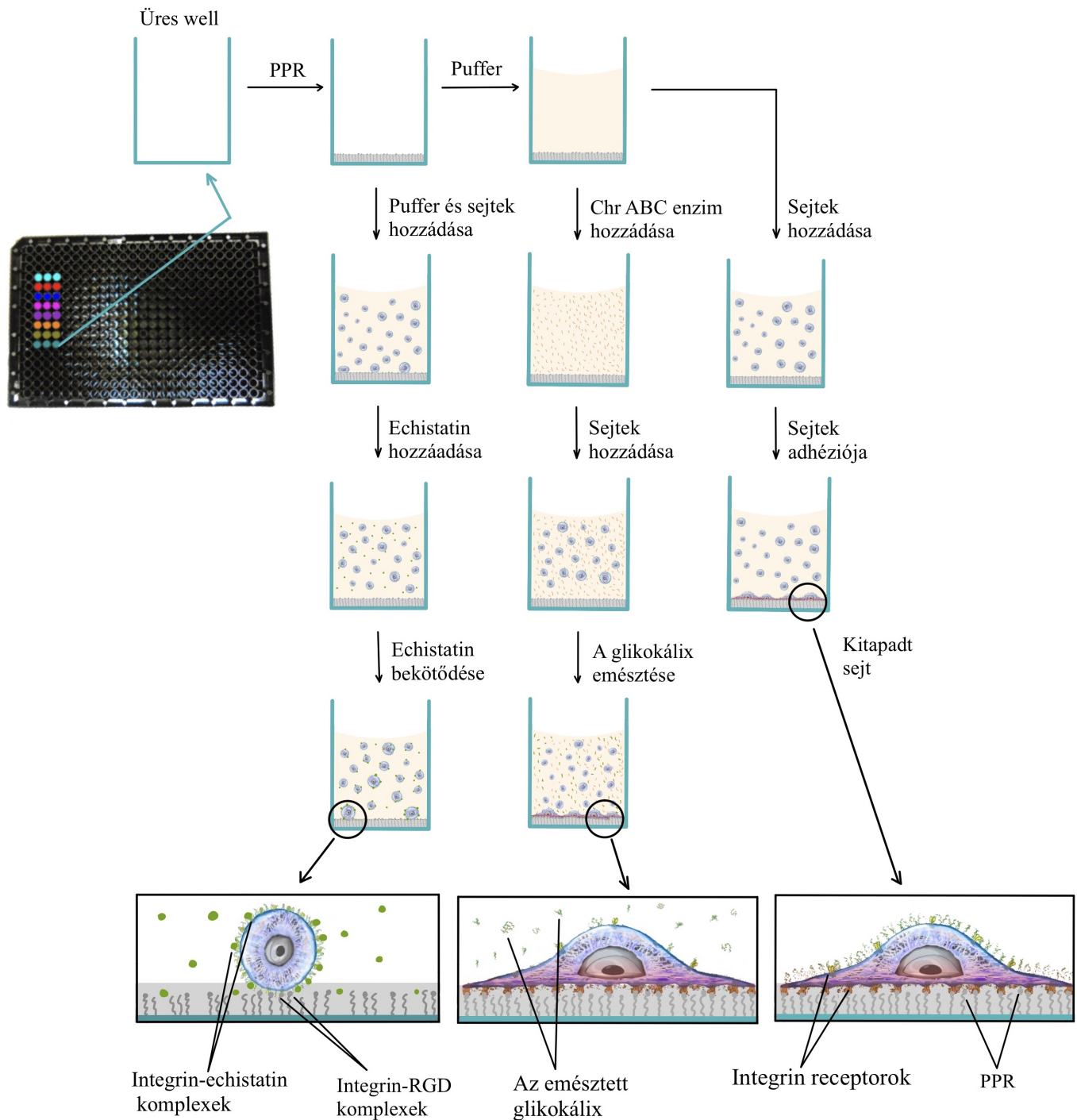
A HeLa sejtek integrinjeivel képesek integrin-ligandum komplexek létrehozására, még hozzá nagy affinitással, így gyakran használják pozitív kontrollként számos integrinkötési vizsgálathoz. Ezen okból az echistatin szerepe a gyógyszerkutatásban is jelentős. [34]

Az élő sejtes kísérletek

A felületkezelés elvégzése után a microplate lyukaiba puffer kerül, majd pedig azt a plate-olvasóba helyezve, és a mérést elindítva az alapvonal felvételére került sor. Célszerű addig várni, amíg egymással párhuzamosan kezdenek el futni az érkező jelek. A sejtszám-függő mérés esetében az alapvonal párhuzamossá válása után a mérés egyik részében 9000 db/lyuk sejtszámtól 3000 db/lyuk sejtszámgig mértem, minden esetben 4 párhuzamos méréssel, kontrollnak pedig olyan lyukakat használtam, amelyekbe 20 μ l puffert pipettáztam. Az eljárást egyszerűbb így kivitelezni, mivel a kevesebb párhuzamos mérés rövidebb pipettázási időt jelent, ezáltal az eljárás nagyobb pontosságú lesz.

A következő mérési eljáráshoz, azaz a sejtek glikokálixának kondroitináz ABC-vel való emésztéséhez a különböző koncentrációjú enzimoldatok a következő módon állíthatóak elő: a liofilizált por állagú enzimekből és 20 mM-os pH 7.4 HEPES HBSS pufferből kell létrehozni az oldatokat 4 és 2.5 U/ml-es koncentrációkkal. Ezeket a felhasználásig -20 C°-on kell tárolni. Az így kapott oldatokból megfelelő koncentrációkban 30 μ l-nyit a felületre pipettázva az alapvonal felvételére kerül sor, a kontroll feladatát ezen esetben is 30 μ l puffer látja el. Ha már párhuzamosan futnak a görbék, 30 μ l, megfelelő koncentrációjú, 8000 sejtet tartalmazó oldat került a lyukakba. Ezután már valós időben nyomon követhető a sejtek adhéziója, a mérés pedig egészen addig tartott, amíg a szigmoid görbe el nem érte maximumát, és lineárisan kezdett futni újra. Ezesetben három párhuzamos mérés futott egy időben.

Az echistatin-os eljárásnál az alapvonalat 30 μ l puffer adta. Az alapvonalak párhuzamossá válása után különböző koncentrációjú echistatin-t tartalmazó oldat lett a felületekre pipettázva, majd pedig 30 μ l, 8000 sejtet tartalmazó oldat került minden egyes well-be. A kontroll jelet ezesetben olyan HeLa sejtek adták, amelyekhez nem adtak echistatint. Ekkor négy párhuzamos mérés futott. A három különböző mérési eljárást a 6. ábrán foglaltam össze.



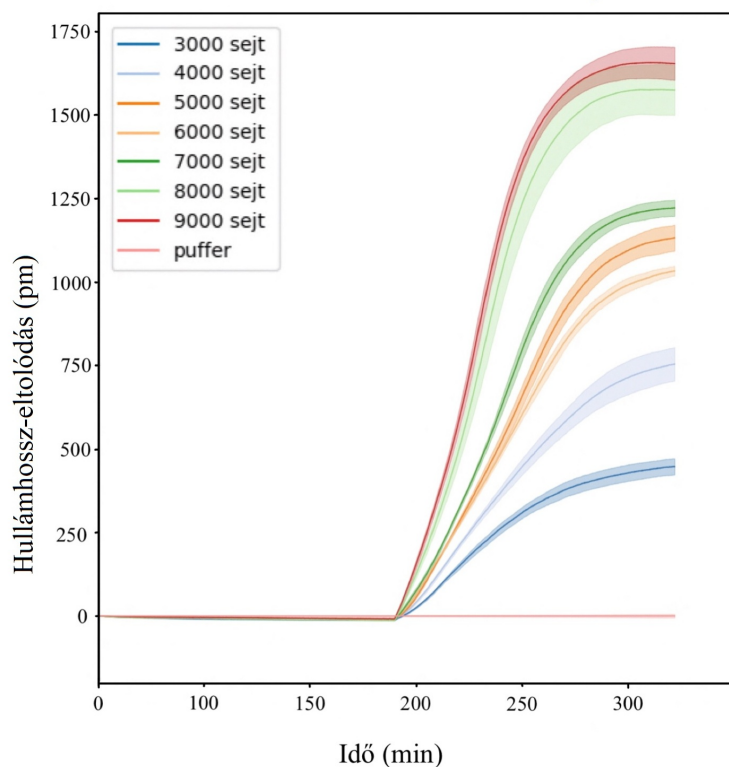
6. ábra. A három különböző mérési eljárás.[20] [35]

A mérések során kapott hullámhossz-eltolódás - idő görbékről általánosan kijelenthető, hogy szigmoid alakúak, ahogy például a 7. ábrán is látható. Az adhéziós folyamat során a sejtek alján található integrinek hozzákötnek a felületen adott koncentrációban jelen lévő RGD-hez. Ez elindít egy olyan folyamatot, amely során az integrin receptorok levándorolnak a sejt tetejéről és oldaláról az adhéziós zóna irányába, így lehetővé téve

további integrin-RGD komplexek létrehozását. A folyamat az egyensúlyt megközelítve lelassul, azt elérve pedig leáll - ekkor a sejtek elérik végső alakjukat a felületen kitapadva. Ezen folyamatot befolyásolhatják a különböző hatóanyagok. [36]

A mérés kiértékelését az alapvonal korrekciójával kezdtem. A mérés során voltak olyan well-ek amelyekbe csupán puffer, vagy kezeletlen HeLa sejtek kerültek, ezen lyukak hullámhossz-eltolódásait 0-nak vettem. A korrekció során a kapott szigmoidokból levontam a kontroll well-ek értékeit minden időpillanatban. A szórást szintén a kiértékelőprogram segítségével számoltam. Emellett a hibás méréseket adó well-eket nem vettem figyelembe: ez például akkor fordulhatott elő, ha a sejtek well-ekbe való pipettázásakor légbuborék került a lyukakba. Ilyenkor a szenzor nem képes érzékelni a sejteket és nem kapunk mérhető jelet.

A szenzorral mért hullámhossz-eltolódások eltérő sejtszámok esetén



7. ábra. A kapott hullámhossz-eltolódás idő grafikon a sejtszámfüggő mérés esetén.

Elmélet és programfejlesztés

A sejtadhézió kinetikus modellje

Kanyó és munkatársai az RWG bioszenzor által rögzített adhéziós görbék elemzésére egy olyan kinetikai modellt dolgoztak ki, amely figyelembe veszi a molekuláris szinten fellépő fontosabb kölcsönhatásokat. [20] A modell közönséges csatolt differenciálegyenletekkel írja le a ligandumok, a szabad integrinek, és az integrin-ligandum komplexek felszíni koncentrációinak időbeli változását, illetve az integrinek adhéziós zónába való toborzását kinetikus sebességi állandókkal jellemzi. Így a ligandum (L), a szabad integrin (I) és az integrin-ligandum komplex (B) felületi koncentrációjának változása az adhéziós zónában az idő múlásával a következő egyenletek szerint alakul:

$$\frac{dB}{dt} = k_1 L \cdot I - k_2 B \quad (1)$$

$$\frac{dL}{dt} = -k_1 L \cdot I + k_2 B \quad (2)$$

$$\frac{dI}{dt} = -k_1 L \cdot I + k_2 B + k_3 B(I_{\max} - I) \quad (3)$$

Ahol k_1 és k_2 az integrinek és ligandumaik asszociációs és disszociációs sebességi rátája, k_3 pedig az integrinek toborzási sebességi rátája az adhéziós zónába. $I_{\max}$ az integrinek maximális lehetséges felszíni koncentrációja az adhéziós zónában. Ha az I szabad integrin koncentráció eléri ezen felső határt, a receptorok toborzása leáll. A szenzor által mért hullámhossz-eltolódások értéke arányos az adhéziós folyamatok során kialakuló integrin-ligandum komplexek felszíni koncentrációjával, a B értékkel. [20] Dolgozatomban a különböző mérések során kapott adatokra illesztettem meg ezen differenciálegyenleteket.

Ezen kinetikai modell megillesztéséhez először a pm-ben kapott mérési adatokat át kellett váltani $\frac{1}{\mu\text{m}^2}$ -ra. Kanyó és munkatársai méréseik során azt figyelték meg, hogy a mért maximális hullámhossz-eltolódás 1200 pm körül van, ekkor pedig a sejt alsó részén, az adhéziós zónában a legnagyobb az integrinek sűrűsége. Ezután mikroszkóp segítségével képeket készítettek a sejtekről és arra jutottak, hogy körülbelül $1000 \mu\text{m}^2$ -nyi felületet fed le egy átlagos letapadt sejt. A HeLa sejtek esetén ekkor ezen területen körülbelül 6000 darab, kötött állapotban lévő integrin található telített állapot esetén.

Azaz 1200 pm-nyi hullámhossz-eltolódást 6000 db integrin/1000 μm^2 idéz elő: $6 \frac{1}{\mu\text{m}^2} = 1200\text{pm}$ azaz a hullámhossz-eltolódás és a kötött integrinek felületi koncentrációja közötti konverzió: $1\text{pm} \leftrightarrow \frac{1}{200} \frac{1}{\mu\text{m}^2}$. [20] [37]

Az illesztés ezután már elvégezhető lesz, és a k_1 , k_2 , k_3 , illetve a I_{max} illesztési paraméterek megkaphatóak. Az illesztés a mérés $t=0$ időpillanatától az utolsóig, általában $t=120$ percig futott a következő kezdeti feltételekkel a sejtszámfüggő és az echistatin-os mérések esetén: $L(t=0)=30\,000 \frac{1}{\mu\text{m}^2}$, $B(t=0)=0 \frac{1}{\mu\text{m}^2}$ és $I(t=0)=0.1 \frac{1}{\mu\text{m}^2}$. A glikokálix enzimatis emésztésének vizsgálata során a felületkezelést 50%-s RGD koncentrációval készült, ekkor $L(t=0)=15\,000 \frac{1}{\mu\text{m}^2}$. Az illesztés során mekapott k_1 és k_2 ráták hányadosaként a disszociációs állandó értékét a következő módon kaphatjuk meg:

$${}^{2\text{D}}K_d = \frac{k_2}{k_1} \quad (4)$$

A kétdimenziós, felületi disszociációs állandó más kísérleti eredményekkel való összehasonlításához meg kell határozni a tradicionális, oldatokra jellemző háromdimenziós disszociációs állandót. Ezt a következő módon tehetjük meg:

$$K_D^s = \frac{{}^{2\text{D}}K_D}{d_C} \quad (5)$$

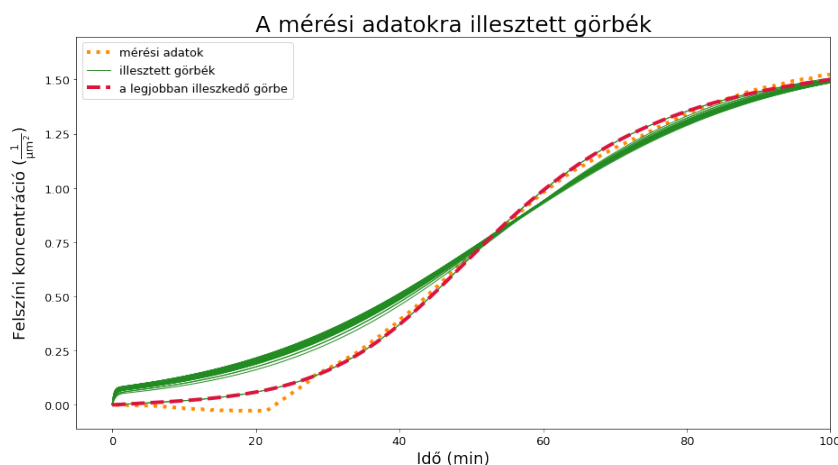
Ahol d_C a sejt felületi adhézión zónájának átlagos vastagsága. Ez körülbelül (40-160) nm közötti értéket vehet fel, és így az oldatra jellemző disszociációs állandó értéke már meghatározható lesz. [38] Az egyszerűség érdekében célszerű ezen értéket 100 nm-nek venni. [20]

Programleírás

A hullámhossz-eltolódás - idő görbék a már említett okokból szigmoid alakúak. A mérés kiértékelésének első lépése a Kovács Kinga Dóra által írt kiértékelőprogram használata, amely segítségével elvégezhető az alapvonal korrekciója, a szórás értékeinek meghatározása, és a hibás jelet tartalmazó mérések eltávolítása is. Az így kapott fájlokban két oszlopba rendezve megtalálhatóak az adott időpillanatokban az egyes well-ekben mért hullámhossz-eltolódások. Az általam írt, az így kapott kinetikai adatok megillesztésére alkalmas kiértékelőprogram ezen .xlsx kiterjesztésű fájlokat olvassa be az adott mapából. A differenciálegyenlet rendszer megoldásához és az adatok megillesztéséhez a

`scipy.integrate.odeint` és a `scipy.optimize.curve_fit` beépített függvényeket használtam, amelyek a Python programnyelv nyílt forráskódú SciPy könyvtárból származnak. Ahhoz, hogy valóban az optimális paramétereket lehessen az illesztés során kapni a differenciálegyenlet rendszert többször is meg kell oldani, ehhez pedig eltérő kezdeti paramétereket kell alkalmazni minden egyes kísérlet során. A `curve_fit` algoritmus az illesztések során a nemlineáris legkisebb négyzetek módszerét használja, amely során tulajdonképpen egy multidimenzionális költségfüggvényt minimalizál. A kinetikus modell differenciálegyenleteinek viselkedéséből adódóan az illesztés során kapott eredmények nagy mértékben függtek a kezdeti paraméterektől. Ez azt jelenti, hogy a kinetikus adhéziós modellt alkotó differenciálegyenletek "stiff", azaz merev egyenletek rendszereként jellemezhetők: ebben az esetben az egyenletek megoldására használható numerikus módszerek instabilak, kivéve ha a lépésköz nagyon kicsi értékeket vesz fel. Ekkor nagy valószínűséggel nem lehet megtalálni a globálisan legjobb paramétereket mivel a függvény kvázi bele tud ragadni a lokális minimumokba, ezzel magyarázható a kapott paraméterek erős függése a kezdeti paraméterektől.

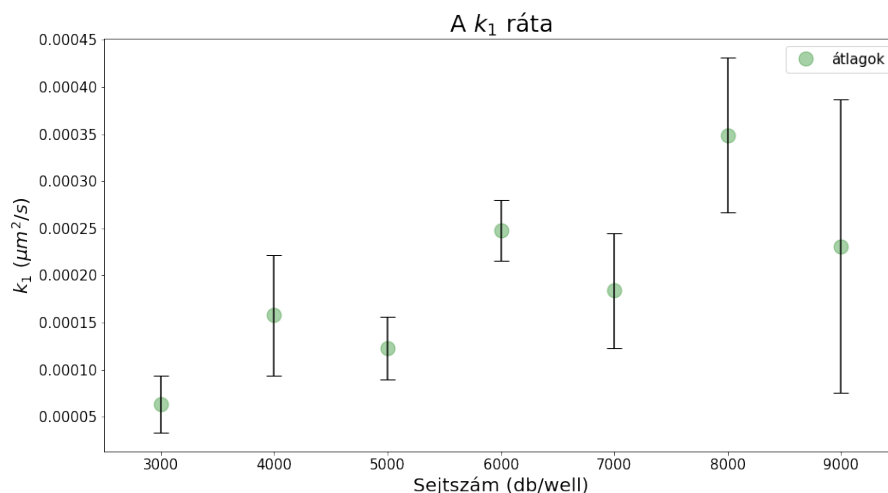
Azzal, hogy többször, eltérő kezdeti paraméterekkel is elvégzem az illesztést, majd pedig kiválasztom a legjobb illesztett paramétereket, a `curve_fit` algoritmus által használt gradiens módszer nehézségei kiküszöbölhetőek. Az illesztésre írt kód tulajdonképpen végigpásztázza a paraméterteret, majd pedig kiválasztja a legjobbakat a kapott paraméterek közül. A párhuzamos mérésekből kapott paramétereket kiátlagoltam. A kapott értékeket méréstől függően ábrázoltam vagy a sejtszám, a kondroitináz ABC enzim koncentrációja, vagy az echistatin koncentrációjának függvényében.



8. ábra. A különböző, a mért adatokra illesztett görbék egy echistatin-os mérés esetén.

Eredmények

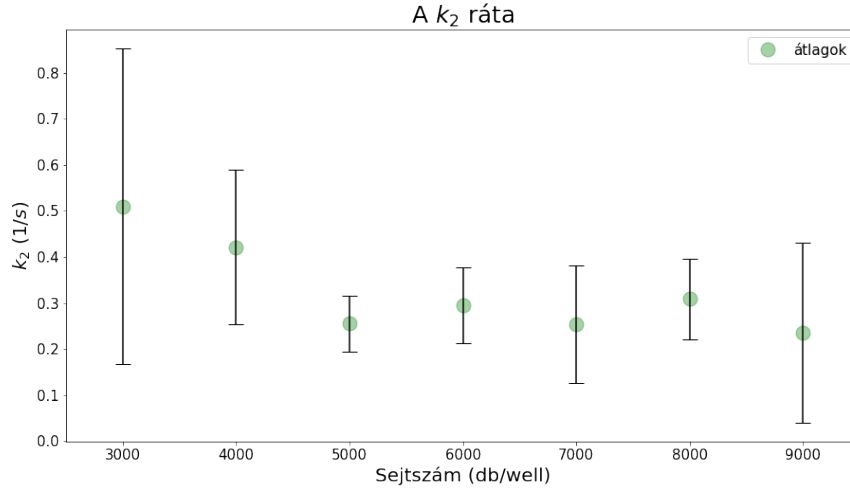
Sejtadhézió a sejtek felületi koncentrációjának függvényében



9. ábra. Az asszociációs sebességi rátákra kapott értékek átlaga és szórása a sejtszám függvényében.

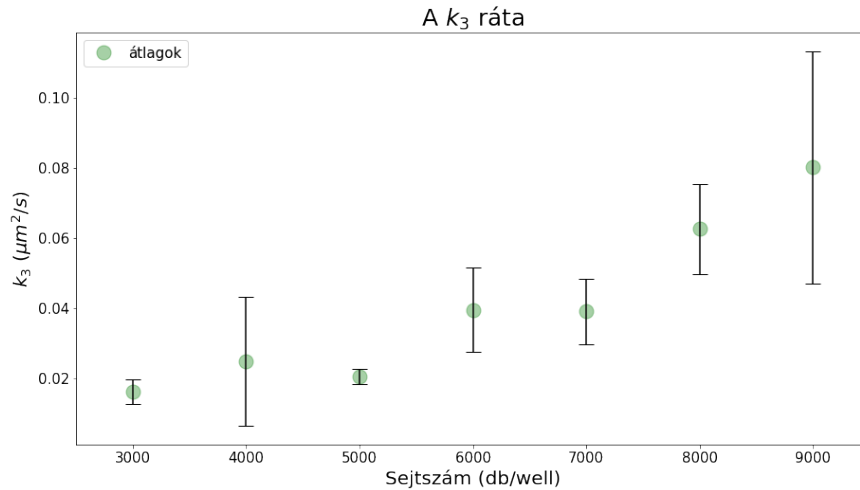
A 9. ábrán látható, hogy az integrinek és az RGD ligandumok asszociációs sebességi rátája, k_1 , a sejtszámmal együtt nő. Ennek több lehetséges oka is van. Az egyik, hogy mivel több sejt van egy adott well-ben, így több integrin receptor is. Emiatt nagyobb valószínűséggel jönnek létre újabb integrin-ligandum komplexek is. Az ábrán még egy érdekes jelenség figyelhető meg: az asszociációs sebességráta értéke akkor a legnagyobb, amikor nagyobb sejtkoncentrációk találhatók az adott well-ekben.

Erre egy lehetséges magyarázat az lehet, hogy a tumorsejtek bizonyos ideális sejtszámok esetén elősegíthetik egymás letapadását. Ezen jelenség a növekedési faktor fehérjék fokozott szekréciójával jár, viszont azt is figyelembe kell venni, hogy a sejtekből készített adott koncentrációjú szuszpenzió elkészítésekor a hígítási sorral együtt hígulnak a növekedési faktorok is. Az egészséges sejtek, ellentétben a rákos sejtekkel, addig osztódnak csupán, amíg érintkezésbe nem kerülnek a szomszédos sejtekkel, megállítva a folyamatot. Ez a kontakt gátlás jelensége. Jelen esetben az ellentétét figyelhettük meg.



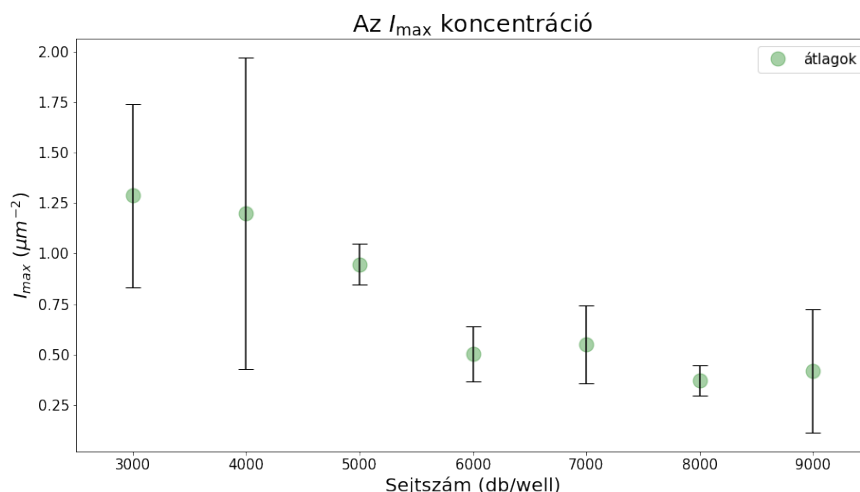
10. ábra. A disszociációs sebességi ráták értékek átlaga és szórása a sejtszám függvényében.

Az integrinek és ligandumok disszociációs sebességi rátáiról (k_2) feltételezhető, hogy értékük a sejtkoncentrációtól független, végig közel állandó (10. ábra). Bár a kisebb koncentrációknál az adatok jobban szórnak, feltételezhető, hogy idővel beáll egy dinamikus egyensúly: ekkor az integrin-RGD ligandum komplexek szétesési sebességét nem befolyásolja a felületre vitt sejtek sűrűsége, amennyi komplex szétesik, annyi össze is áll.



11. ábra. Az integrinek toborzási rátáinak átlaga és a kapott szórások a sejtszám függvényében.

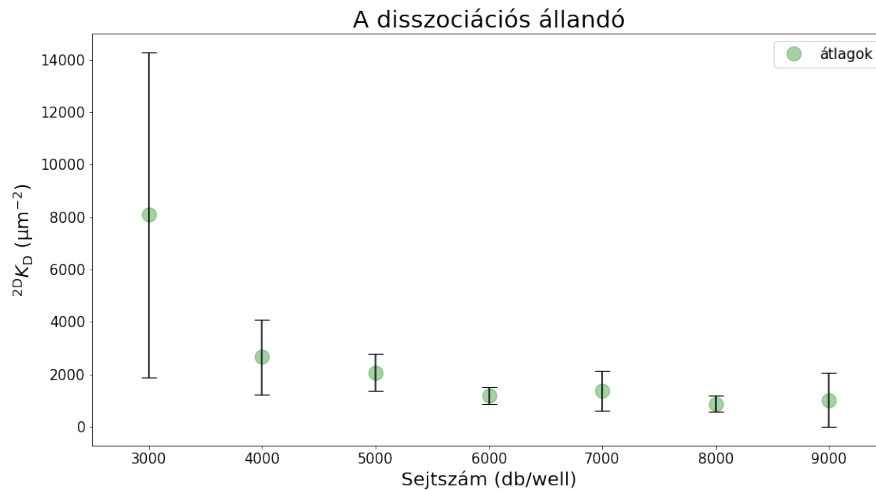
Az integrinek toborzási rátája, k_3 esetén (11. ábra) a sejtkoncentrációkkal együtt nő. Az effektus oka összefügg a 9. ábrán látható jelenséggel: feltételezhető, hogy ideális sejtkoncentráció esetén az adhézión folyamatokban a sejtek egymást segítik. Azaz ezen esetben az figyelhető meg, hogy a sejtek nagyobb sejtkoncentrációk esetén több integrin receptort hoznak aktív állapotba.



12. ábra. A szabad integrinek maximális felületi koncentrációjára kapott értékek átlaga és szórása a sejtszám függvényében.

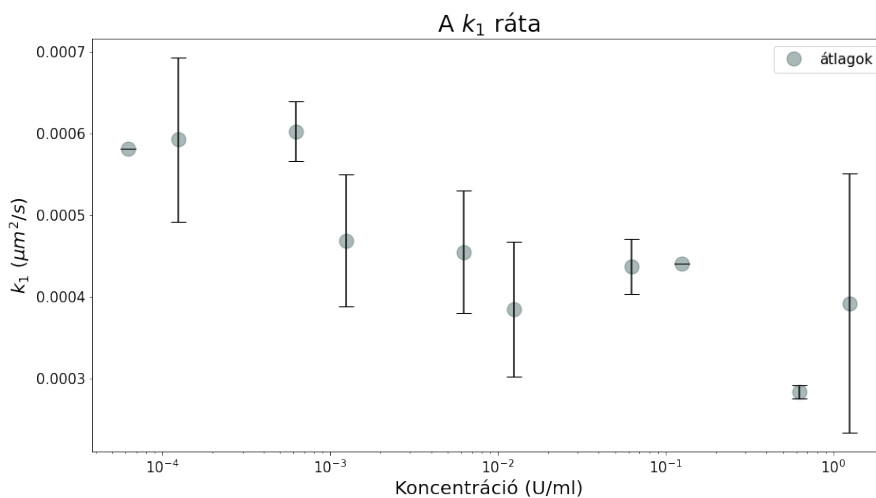
A szabad integrinek átlagos, maximális felületi koncentrációja esetén az értékek csökkenő tendenciát mutatnak (12. ábra). Az adhézión folyamatok kezdetén a sejtek alján található integrinek hozzákötnek a felületkezelés során a felületre vitt, adott koncentrációban jelen lévő RGD ligandumokhoz, ezután pedig az integrin receptorok levándorolnak a sejt tetejéről és oldaláról az adhézión zóna felé. [36]

A kétdimenziós, kinetikai disszociációs állandó (4. egyenlet) értéke, mivel k_1 ráta nő, és k_2 közel konstans, csökken (13. ábra). Ezen értékek más kísérleti eredményekkel való összehasonlításához a már említett módon meg kell határozni a tradicionális, oldatokra jellemző háromdimenziós disszociációs állandót az 5. egyenlet szerint. Ha d_C -t, a sejt szubsztráttól való elválasztásához szükséges átlagos távolságot $d_C = 100$ nm-nek vesszük az egyszerűség kedvéért, akkor a két disszociációs állandónak a sejtszámtól való függése megegyezik. Ha a disszociációs állandó kisebb értékeket vesz fel, a kötés erőssége nő az integrinek és ligandumok között, azaz a sejtkoncentrációk növekedésével együtt nő a kötéserősség a sejt és a szubsztrát között. [20]



13. ábra. A disszociációs állandókra kapott értékek átlaga és szórása a sejtszám függvényében.

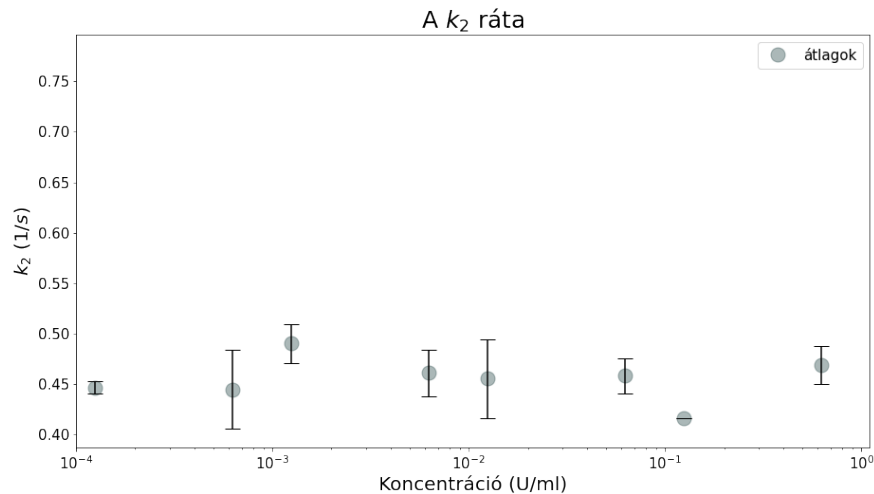
Sejtek glikokálixának enzimatis emésztése kondroitináz ABC enzimmel



14. ábra. Az asszociációs sebességi ráták értékek átlaga és szórása a kondroitináz ABC enzim koncentrációjának függvényében.

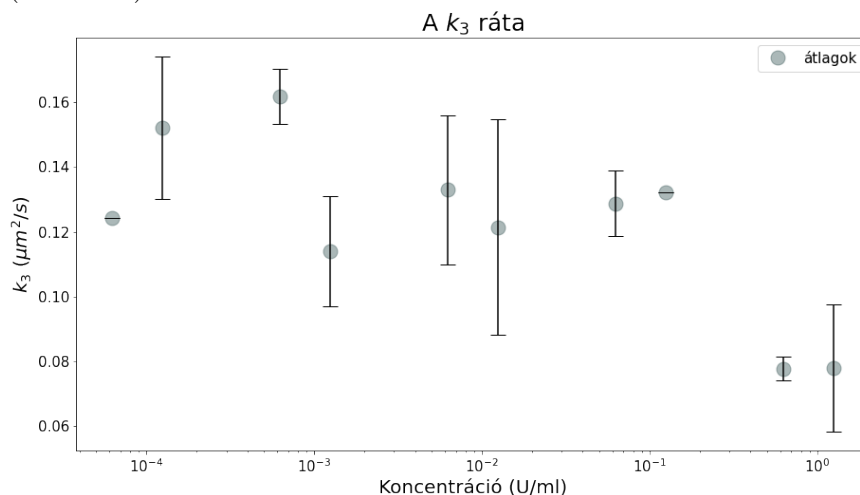
Ahogy a 14. ábrán látható, a ChrABC enzim koncentrációjának növekedésével a kinetikus asszociációs ráta $6.25 \cdot 10^{-4}$ U/ml-es koncentrációnál töményebb enzimkoncentrációjú oldat hozzáadása esetén csökken. Ekkor a glikokálix enzimatis emésztése során az integrin-RGD ligandum párok kisebb mértékben hoznak létre komplexeket, mivel a

glikokálix alapvetően segít egyben tartani az adhéziós komplexeket, körbeöleli őket. A legalacsonyabb enzimkoncentrációk esetén, $6.25 \cdot 10^{-5}$ U/ml és $1.25 \cdot 10^{-4}$ U/ml között az asszociációs sebességráta a kontroll mérésekhez képest nagyobb értékeket vesz fel. Erre magyarázatként szolgálhat, hogy a glikokálix enyhe emésztése meg is könnyítheti akár az integrin-ligandum komplexek létrejöttét. [20]



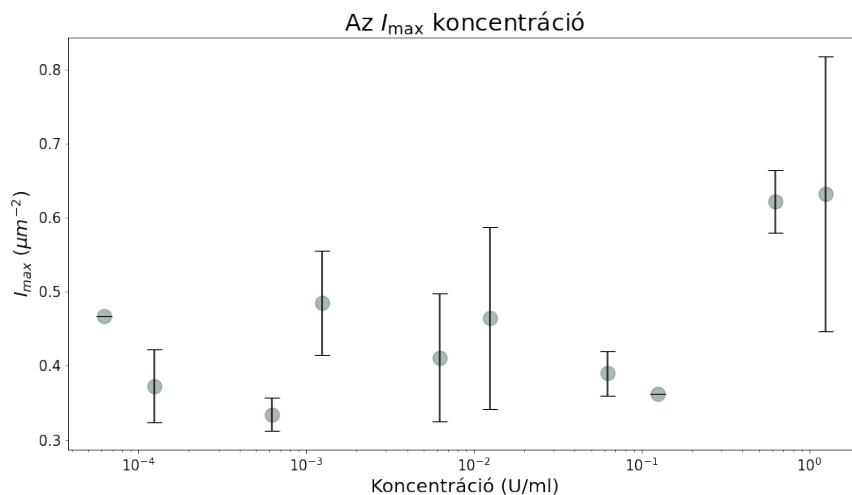
15. ábra. A disszociációs sebességi ráták értékeik átlaga és szórása a kondroitináz ABC enzim koncentrációjának függvényében.

A k_2 disszociációs ráta értékét nem befolyásolja a kondroitináz ABC enzim koncentrációja, az értéke közel konstans marad végig az enzim koncentrációjának növekedése mellett is. (15. ábra)



16. ábra. Az integrin toborzási ráták értékeinek átlaga és szórása a kondroitináz ABC enzim koncentrációjának függvényében.

A k_3 integrin toborzási ráta csökken a ChrABC enzim koncentrációjának növekedésével (16. ábra). A glikokálix enzimatisz emésztése során a sejtek asszociációs rátája, k_1 szintúgy csökken (ld. 14. ábra). Ekkor egyre kevesebb integrin receptor hoz létre komplexeket a felület ligandumjaival, így várható is, hogy a sejtek integrinjeinek toborzási rátája egyre kisebb értékeket vegyen fel.

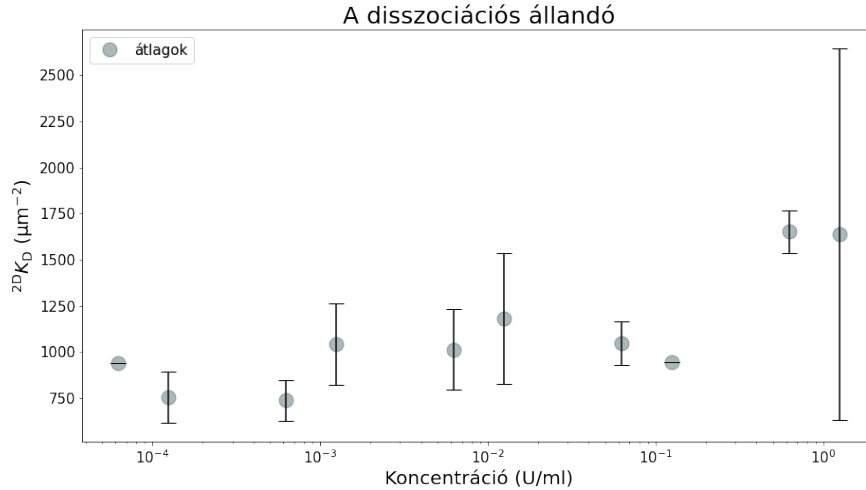


17. ábra. A szabad integrinek maximális felületi koncentrációjának az értékeinek átlaga és szórása a kondroitináz ABC enzim koncentrációjának függvényében.

Az $I_{\max}$ paraméter kezdetben közel állandó ahogy, a 17. ábrán látható, viszont nagyobb koncentrációk esetén közel kétszeresére nő. Azaz a glikokálix nagy koncentrációjú Chr ABC-vel való emésztése során a sejtek képesek nagyobb szabad integrin koncentráció létrehozására az adhézión zónában.

A kétdimenziós, kinetikus disszociációs állandó, ${}^2D K_D$ értéke a k_2 és k_1 kinetikai disszociációs és asszociációs sebességi ráták hányadosaként kapható meg. Értéke közel konstans az enzimkoncentráció növekedésével de a két legnagyobb koncentráció esetén, főleg 0.625 U/ml-nél látható, hogy nagyobb értékeket vesz fel. A kapott kétdimenziós értékek irodalmi értékekkel való összehasonlításához ezesetben is meg kell határoznunk a háromdimenziós, oldatokra jellemző disszociációs állandót, amit az 5. egyenlet segítségével tehetünk meg. A sejtszámfüggő mérésekhez hasonlóan, az így kapott háromdimenziós disszociációs állandók koncentrációfüggése megegyezik a kétdimenziós párjával.

Minél nagyobb értékeket vesz fel a disszociációs állandó, annál gyengébb lesz a kötés-erősség. Emiatt ezen illesztési paraméterek esetében valószínűsíthető, hogy a disszociációs állandó és az $I_{\max}$ koncentráció hasonló tendenciái mögött az áll, hogy a sejtek a gyengébb

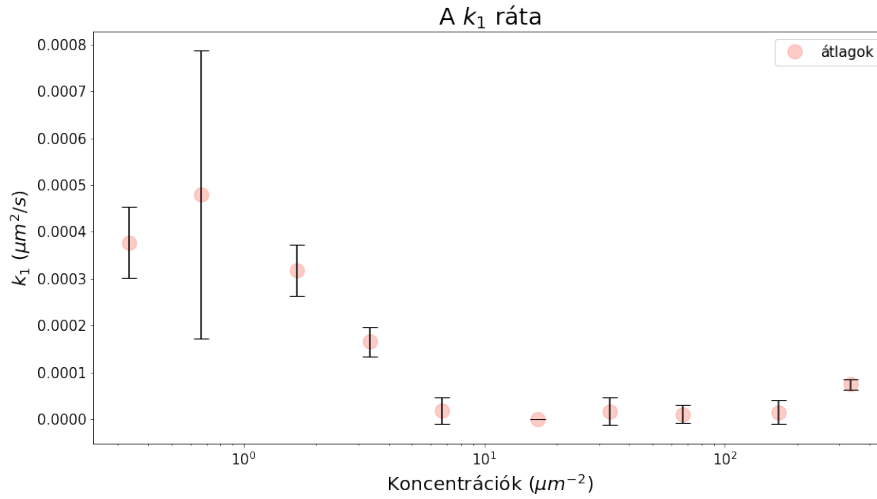


18. ábra. A disszociációs állandók a kondroitináz ABC enzim koncentrációjának függvényében.

integrin-ligandum kötéseket magasabb szabad, adhézios zónán belüli integrinkoncentrációval kompenzálják. Ezen mérések megillesztése a Python kódom ellenőrzésére szolgált, mivel a kapott adatokat Kanyó és munkatársai már publikálták. [20] Eredményeim az eltérő illesztési módszereket figyelembe véve nagy átfedést mutatnak a nagy pontosságú, már publikált illesztésekkel.

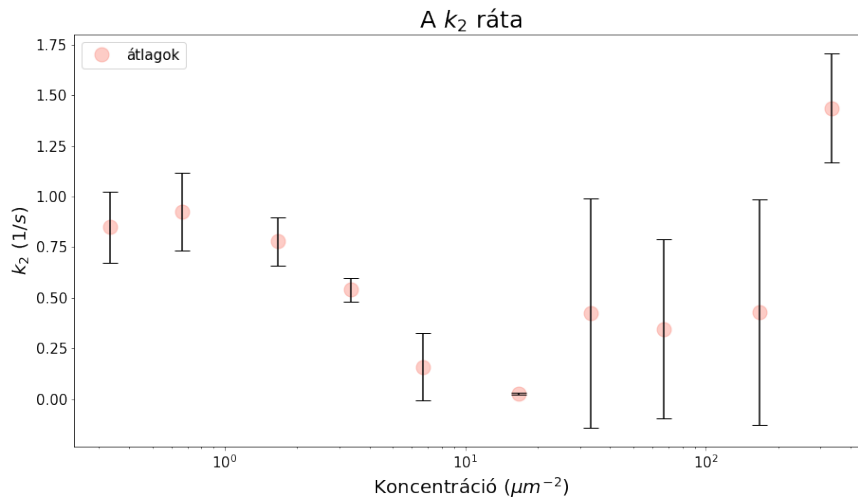
Az echistatin bekötődésének vizsgálata sejteken

Az adhéziót különböző hatóanyagok befolyásolják, a már említett kondroitináz ABC enzim mellett például az echistatin is. A felhasznált sejtek integrinjeivel ezek a molekulák nagy affinitással képesek integrin-ligandum komplexeket létrehozni. Ennek fényében olyan helyzet áll elő, hogy mind a felületkezelés során a szenzorlemezre vitt RGD ligandumok, mind az echistatin molekulák egyszerre képesek kötést létrehozni az integrin receptorokkal – a két típusú ligandum valójában „versenyez” a szabad integrinekért. Ezen jelenséget modellezve az echistatin az RGD-bekötődés inhibitoraként való viselkedése, és az adhézióra gyakorolt hatása megérthető. A kinetikus adhézios modellt alkalmazva az illesztés során kapott paraméterek:



19. ábra. Az asszociációs sebességi ráták értékeinek átlaga és szórása az echistatin koncentrációjának függvényében.

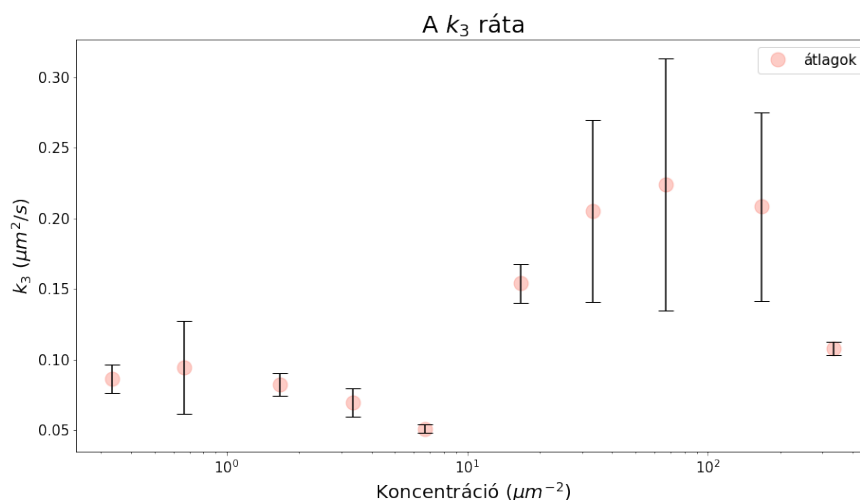
A k_1 sebességi ráta (19. ábra) csökkenő tendenciát mutat, majd pedig közel konstanssá válik az 5. adatpont után, amely a 40 nM-os echistatin koncentrációnál felvett értéket jelenti. Ezen kritikus koncentráción túl az integrinek RGD-vel való komplex képzése közel teljesen leáll.



20. ábra. Az disszociációs sebességi ráták értékeinek átlaga és szórása az echistatin koncentrációjának függvényében.

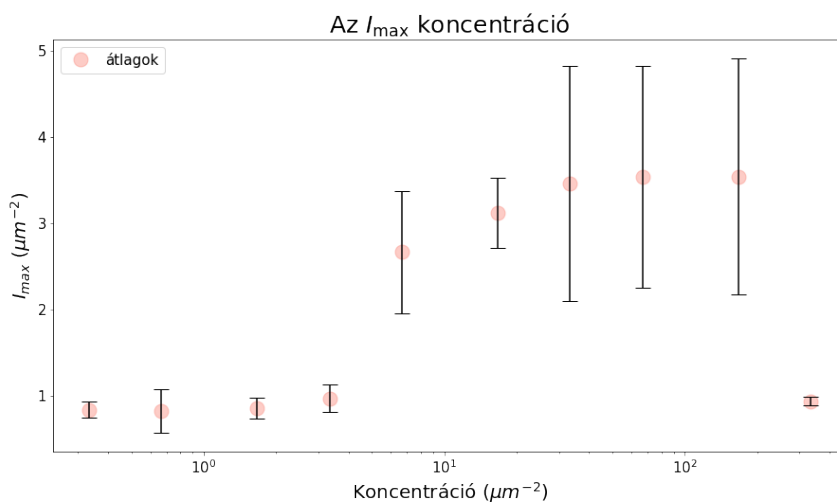
Az integrin-RGD komplexek disszociációs sebességi rátája csökkenő tendenciát mutat az 5. és 6. adatpontig, azaz a 40-100 nM-os koncentrációkig (20. ábra). Ezután a nagyobb

koncentrációk esetén feltehetően nő a disszociációs sebességi ráta értéke, de ezt a nagy szórások miatt nem lehet teljes bizonyossággal kijelenteni.



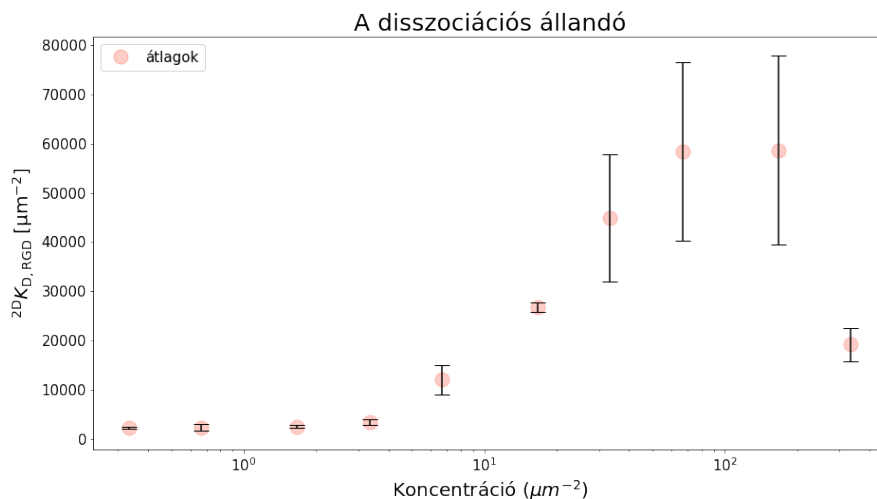
21. ábra. Az integrinek toborzási rátájának az átlaga és szórása az echistatin koncentrációjának függvényében.

A k_3 toborzási ráta értéke több, mint duplájára nő az 5. adatponttól, azaz a 40 nM-os koncentrációnál nagyobb esetekben (21. ábra). Ekkor feltehető, hogy a magasabb echistatin koncentrációkat a sejt a felületen található RGD-t kötő receptorok fokozott toborzásával kompenzálja.



22. ábra. A szabad integrinek maximális felületi koncentrációjának az átlaga és szórása az echistatin koncentrációjának függvényében.

A szabad integrinek maximális felületi koncentrációja közel konstans a 4. adatpontig, amelyhez a 20 nM-os echistatin koncentráció tartozik (22. ábra). Ezután a 40 nM feletti koncentrációk esetén a paraméter értéke gyors növekedésnek indul, a kapott paraméterek több mint kétszeresei a kisebb koncentrációk esetén kapottaknak. Ezen jelenség magyarázataként szolgálhat, hogy a sejtek ezesetben is a magasabb echistatin koncentrációkat próbálják meg kompenzálni.



23. ábra. A disszociációs állandók az echistatin koncentrációjának függvényében.

Az integrin-RGD komplexek disszociációs állandója közel konstans az integrinek maximális felületi koncentrációjához hasonlóan, egészen a 4. adatpontig (23. ábra), majd pedig növekedésnek indul. Az utolsó, legmagasabb, 2000 nM-os echistatin koncentrációhoz tartozó értékek szokatlan viselkedésére magyarázatul szolgálhat mind a k_2 , k_3 , az I_{max} , és a $2^D K_{D, \text{RGD}}$ esetében is, hogy a kapott paraméterek ezen adatpontokra nagyon szórnak, így nem lehet pontos tendenciákat meghatározni a mérés pontatlanságából fakadóan (ld. 24, 21, 22, 23. ábrák). Ezen esetben célszerű a jövőben megismételni a mérést több párhuzamos lyukkal. A jelenség emellett azzal is magyarázható, hogy túl nagy echistatin koncentráció esetén már nem indulnak be a fentebb említett kompenzációs folyamatok.

Két ligandumos kinetikus adhézións modell

A kinetikus adhézións modell eredményei csupán az integrin receptorok és az RGD ligandumok komplex képzését veszik figyelembe, az echistatin bekötődésének jellemzésére nincsenek alkalmas paraméterei. Ekkor a modell kiegészítésére van szükség: célszerű

bevezetni a k_4 és a k_5 asszociációs és disszociációs sebességi rátákat, melyek az integrin-echstatin komplexek kialakulását és felbomlását jellemzik. A két ráta hányadosaként kapjuk meg a ${}^{2D}K_{D,ech}$ -val jelölt, echistatinra jellemző disszociációs állandót. Ezen paraméterek figyelembe vételével a kinetikus modell differenciálegyenletei a következő módon módosulnak:

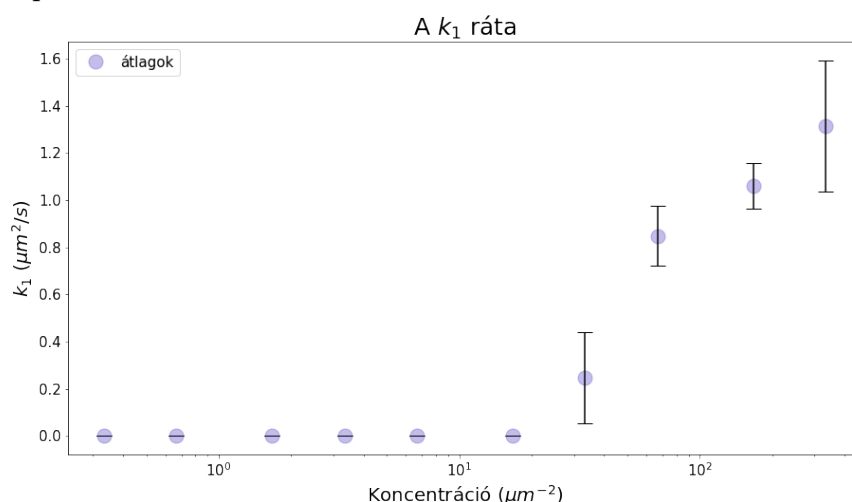
$$\frac{dB_{RGD}}{dt} = k_1 L_{RGD} \cdot I - k_2 B_{RGD} \quad (6)$$

$$\frac{dB_{ech}}{dt} = k_4 (C - B_{ech}) \cdot I - k_5 B_{ech} \quad (7)$$

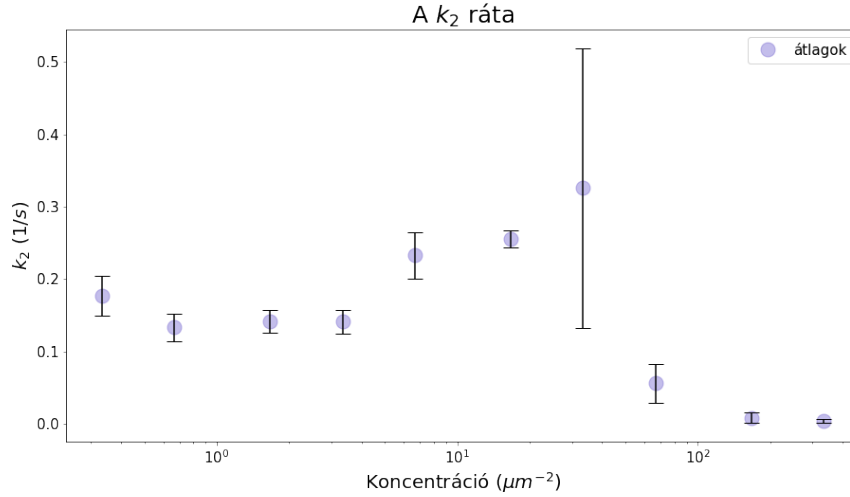
$$\frac{dL_{RGD}}{dt} = -k_1 L_{RGD} \cdot I + k_2 B_{RGD} \quad (8)$$

$$\frac{dI}{dt} = -k_1 L_{RGD} \cdot I + k_2 B_{RGD} + k_3 B_{RGD} (I_{\max} - I) - k_4 (C - B_{ech}) \cdot I + k_5 B_{ech} \quad (9)$$

Ahol k_1 , k_2 , és $I_{\max}$ a már említett paraméterek, k_4 és k_5 pedig az echistatin asszociációs és disszociációs sebességi rátái. B_{RGD} az integrin-RGD komplexek felületmenti koncentrációja, míg B_{ech} az integrin-echstatin komplexeké. Az L_{RGD} paraméter adja meg a szabad RGD komplexek felületmenti koncentrációját, míg a szabad echistatinokét a $(C - B_{ech})$ különbséggként adhatjuk meg, ahol C a különböző, a mérés elején a sejtekhez adott echistatin koncentrációkat jelöli, felületi koncentrációba átszámolva. Az illesztések során kapott paraméterek a következők:

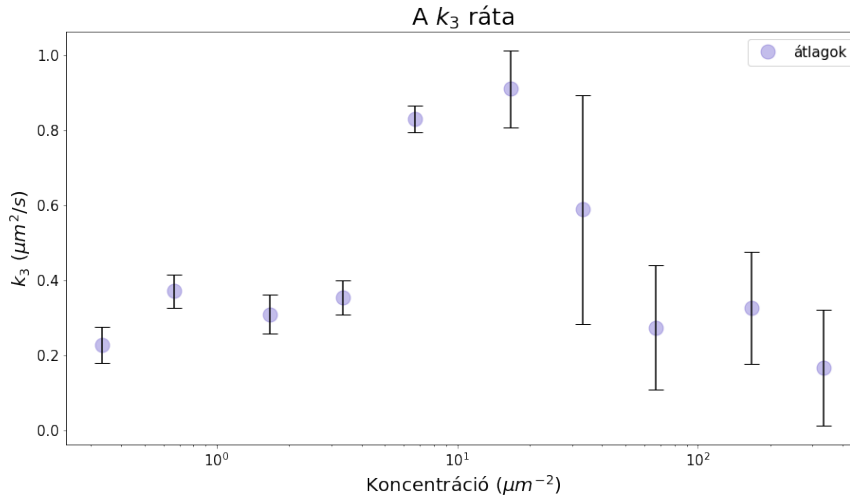


24. ábra. Az asszociációs ráták értékeinek átlaga és szórása az echistatin koncentrációjának függvényében.



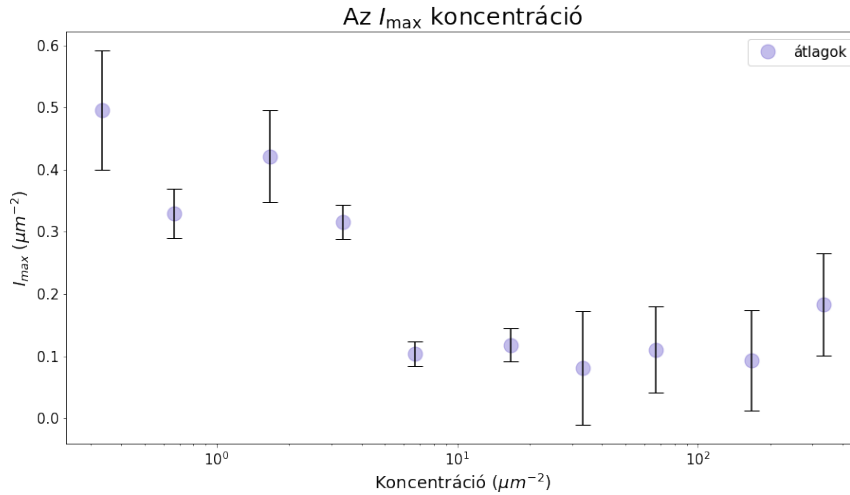
25. ábra. A disszociációs ráták értékeinek átlaga és szórása az echistatin koncentrációjának függvényében.

A k_1 ráta kezdetben $1.30 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^{-2}$ és $2.46 \cdot 10^{-4} \mu\text{m}^{-2}$ közötti értékeket vesz fel növekvő tendenciát mutatva egészen a 6. adatpontig, azaz a 200 nM-os echistatin koncentrációig. Ekkor a kapott paraméter értéke gyorsabb növekedésnek indul (24. ábra). A k_2 ráta értéke nő, majd pedig a 6. és 7. adatpontnál, azaz (100-200) nM-os koncentrációknál vált tendenciát (25. ábra).



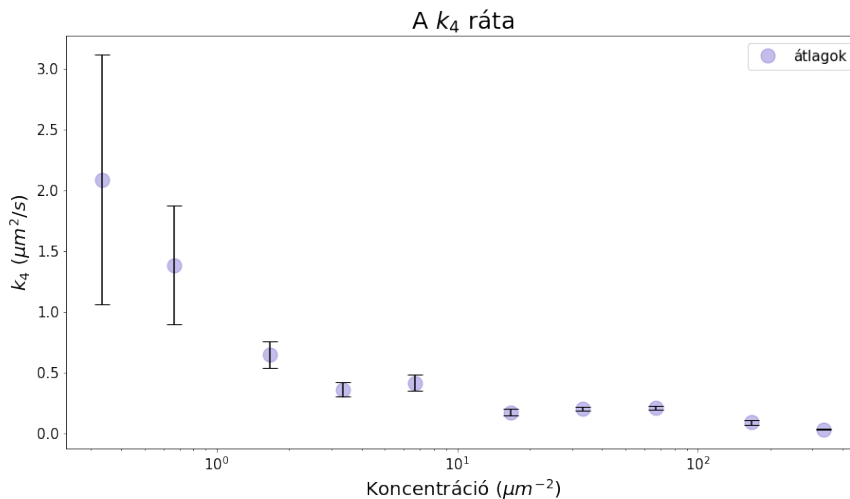
26. ábra. Az integrinek toborzási rátájának az értékeinek átlaga és szórása az echistatin koncentrációjának függvényében.

A k_3 ráta értékének (40-100) nM-os echistatin koncentrációknál, azaz a 4. adatpont környékén maximuma van, ezután pedig feltehetően csökkenő tendenciát mutat (ld. 26).

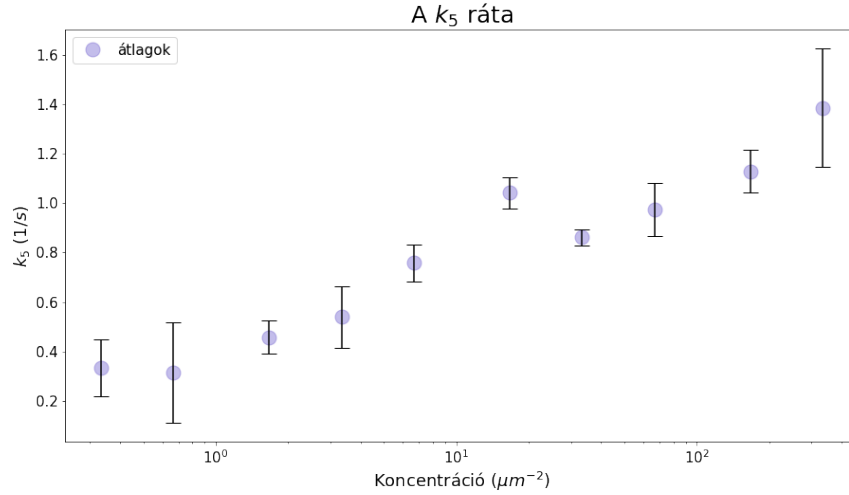


27. ábra. A szabad integrinek maximális felületi koncentrációjának az értékeinek átlaga és szórása az echistatin koncentrációjának függvényében.

A szabad integrinek maximális felületi koncentrációjának átlagos értéke csökkenő tendenciát mutat 4. adatpontig (azaz 40 nM-os echistatin koncentrációig), a nagyobb értékek esetén közel konstanssá válik (27. ábra). Megfigyelhető, hogy ekkor a 22. ábrával ellentétben, itt az integrin receptorok maximális felületi koncentrációjának értéke a 40 nM-os koncentrációnál nagyobb esetekben közel a felére esik.

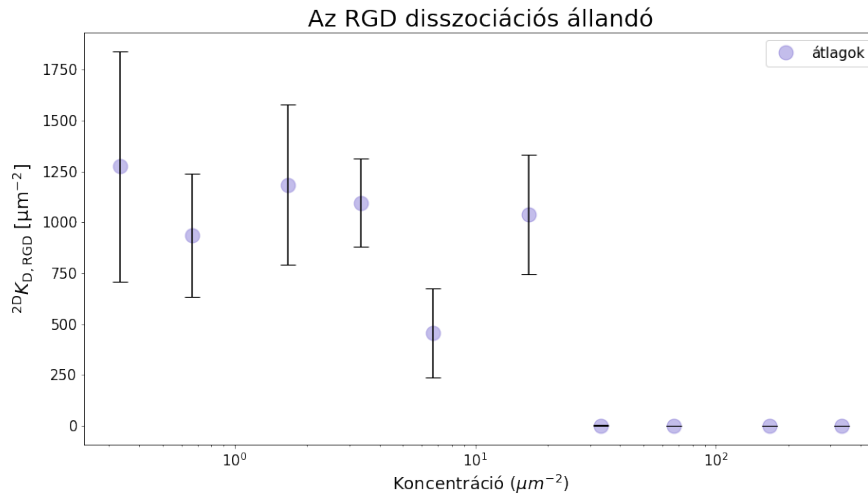


28. ábra. Az integrin-echistatin komplexek asszociációs rátáinak átlaga és szórása az echistatin koncentrációjának függvényében.

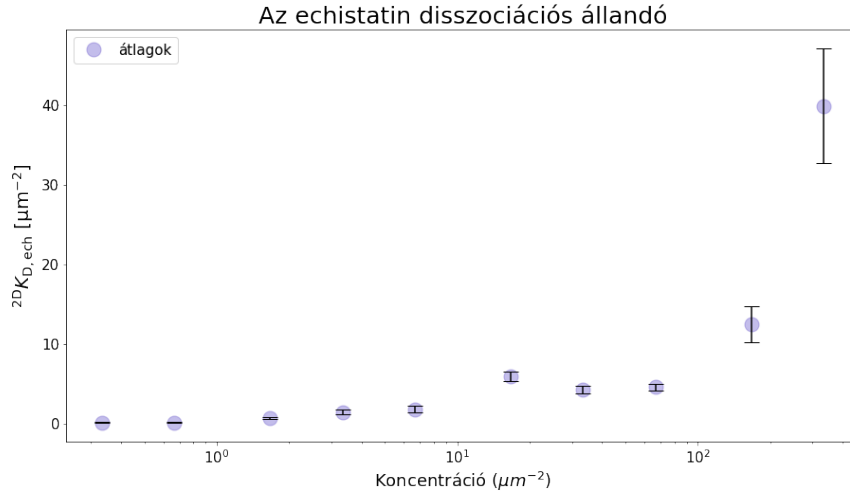


29. ábra. Az integrin-echistatin komplexek disszociációs rátáinak értékeinek átlaga és szórása az echistatin koncentrációjának függvényében.

Az integrin-echistatin komplexek asszociációs rátái csökkennek az echistatin koncentráció növekedésével, míg a disszociációs ráták értéke nő (28. és 29. ábrák). Megfigyelhető, hogy az integrin-echistatin komplexek az echistatin koncentráció növelése során egyre gyorsabban esnek szét, és egyre lassabban jönnek létre.



30. ábra. Az integrin-RGD komplexek disszociációs állandóinak átlaga és szórása az echistatin koncentrációjának függvényében.



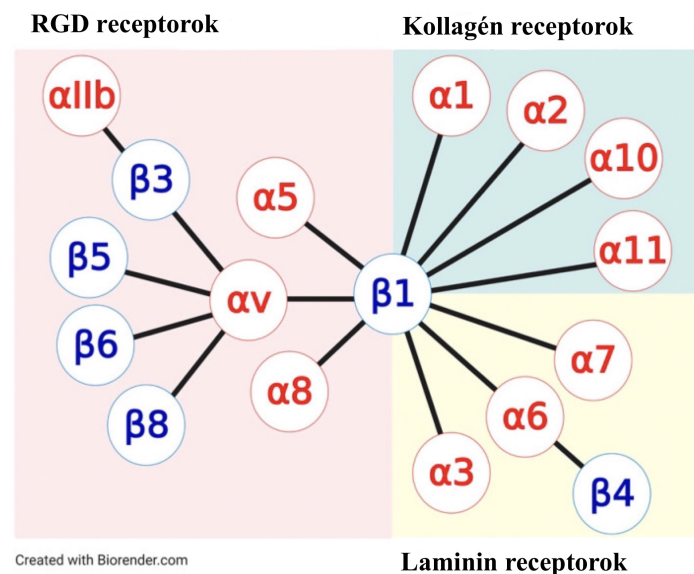
31. ábra. Az *integrin-echistatin* komplexek disszociációs állandóinak átlaga és szórása az *echistatin* koncentrációjának függvényében.

Az integrin-RGD komplexek kétdimenziós disszociációs állandói $3 \cdot 10^{-3} \frac{1}{\mu\text{m}^2}$ és $1300 \frac{1}{\mu\text{m}^2}$ között mozognak (30. ábra), míg az integrin-echistatin komplexek disszociációs állandói ezredrészei ezen értékeknek. A tendenciák a háromdimenziós esetben ezzel megegyezők a 5. egyenlet alapján. Mivel az integrin-echistatin kötés kb. 1000-szer erősebb, mint az integrin-RGD, így a kapott paraméterek reális nagyságrendbe esnek. [39]

Körülbelül (40-100) nM echistatin koncentráció környékén mind az egy- és a kétligan-
dumos kinetikus adhézións modell megillesztése során kapott paraméterek értéke nagyfokú
változást mutat. Szekacs és munkatársai méréseik során meghatározták azt az echistatin
koncentrációt, amelynél megközelítőleg a potenciálisan kialakítható kötések létrejöttét az
esetek felében az echistatin gátolja. Ezen koncentráció értéke 20 és 40 nM közötti, amely
egybevághat az illesztés során kapott eredményekkel. Például a 21. ábrán az integrinek
toborzási rátája közel duplájára nő, ekkor pedig feltételezhető, hogy sejt így kísérheti
meg kompenzálni a magasabb echistatin koncentrációk hatását. [35]

Magasabb echistatin koncentrációk esetén az adhézións komplexek minősége megvál-
tozhat. A kapott görbék alapján feltételezhető, hogy az előbb említett kritikus echistatin
koncentrációnál nagyobb értékek esetén szelektív integrin aktivizációt figyelhetünk meg.
Lehetséges, hogy ekkor a sejt a hatékonyabb komplex képzésre alkalmas receptorok to-
borzását folytatja, míg a kevésbé hatékonyakét leállítja. A mérések során kapott ered-
mények alapján feltételezhető, hogy a sejtek a magasabb echistatin koncentrációkat vagy

más morfológiájú adhézións komplexek kialakításával, vagy olyan integrinek toborzásával kísérik meg kompenzálni, melyek hatékonyabban képesek kötni a felületen rögzített RGD ligandumokkal. Ezt alátámasztja az, hogy az integrin-RGD kötési erősség együttenő az echistatin koncentrációval, míg az echistatin-integrin pedig csökken. Az integrin receptorok három csoportja képes az extracelluláris mátrix fehérjével kötésbe kerülni. Ezek az RGD, a kollagén és a laminin receptorok. [40]



32. ábra. A három, extracelluláris mátrixszal kötés létrehozására alkalmas receptor család. [40]

A dezintegrinek, mint például az echistatin szelektív módon hatnak kölcsön az integrinokkal. A kölcsönhatás létrejöttét befolyásolhatják a különböző, RGD-vel szomszédos aminosavak, az intramolekuláris diszulfid hidak elrendeződése, és egyéb molekuláris tényezők is. Az echistatin potens inhibitora az $\alpha\text{II}\beta 3$, az $\alpha\text{v}\beta 3$, és az $\alpha 5\beta 1$ integrinek ligandumokkal való komplex képzésének, mivel a $\beta 3$ és a $\beta 1$ alegységgel rendelkező receptorokat blokkolja. [41]

A nyolc RGD-kötő integrin ($\alpha\text{v}\beta 3$, $\alpha\text{v}\beta 5$, $\alpha\text{v}\beta 6$, $\alpha\text{v}\beta 1$, $\alpha\text{v}\beta 8$, $\alpha 5\beta 5$, $\alpha\text{II}\beta 3$, $\alpha 8\beta 1$) expressziója megnő a daganatos sejtekben, így befolyásolva a különböző patofiziológiai funkciók működését. [40] Mivel az echistatin az $\alpha\text{II}\beta 3$, az $\alpha\text{v}\beta 3$, és az $\alpha 5\beta 1$ integrineket blokkolja, így a továbbiakban célszerű lehet az $\alpha\text{v}\beta 3$ és az $\alpha 5\beta 1$ receptorokat vizsgálni, mivel mindkettő előfordul méhnyakrák sejtekben, ahogy például a vizsgált HeLa sejtekben is. Feltételezhető, hogy ezen receptorok toborzását a sejtek leállítják a nagy echistatin

koncentrációk kompenzálásához, hogy így adaptálódva az effektívebb receptorok további toborzásával folytathassák a receptor-RGD ligandum komplexek képzését. Az $\alpha\text{II}\beta 3$ integrin kizárólag trombocitákban található meg, így vizsgálata a továbbiakban a HeLa sejtvonalra fókuszáló kutatásom szempontjából nem lenne effektív. [40]

Összegzés

Dolgozatom elkészítése során jelölésmentes RWG bioszenzor által rögzített kinetikai görbéken vizsgáltam, hogy a HeLa sejtek adhéziós kinetikáját hogyan befolyásolja a környező sejtek felületi sűrűsége, a kondroitináz ABC enzim koncentrációja, és az echistatin koncentrációja. Dolgozatomban ismertettem a sejtadhézió mechanizmusát, a folyamatban résztvevő főbb anyagokat, és a méréseim során használt eszközök működését.

A mérési eredményeket vizualizáltam és kiértékeltem már meglévő és általam írt programok segítségével. A továbbiakban célszerű lenne a mérések ismétlése több párhuzamos méréssel, hogy pontosabb eredményeket kapjunk. Az adatokat sikeresen megillesztettem az általam írt, a legjobban illeszkedő görbék kiválasztására alkalmas programmal, amelyhez a Kanyó és munkatársai [20] által létrehozott kinetikai modellt alkalmaztam, illetve annak egy módosított változatát.

A kapott paramétereket ábrázoltam a releváns tényezők függvényében (sejtszám, kondroitináz ABC enzim koncentrációja, echistatin koncentrációja). A sejtkoncentrációk változtatásával készült mérések eredményei alapján megfigyeltem, hogy megfelelő sejtszámok esetén a HeLa sejtek elősegítik egymás adhézióját. Ezen adhéziót elősegítő kölcsönhatást én figyeltem meg először a kinetikai görbék illesztése során. A sejtek glikokálixának kondroitináz ABC enzimmel való emésztése során készült mérések adatainak megillesztése a kódom validációjára szolgált. Az így nyert paraméterek nagyfokú átfedést mutatnak a már publikált eredményekkel. Az echistatin bekötődésének vizsgálatához a megillesztettem a kinetikai adatokat a Kanyó és munkatársai által készített modellt [20] alkalmazva, illetve a jelenség optimálisabb vizsgálata érdekében módosítottam a differenciálegyenlet rendszert. Ezen új, kinetikai adhéziós modell mind az RGD, mind az echistatin bekötődését figyelembe veszi.

Az így kapott eredmények arra utalnak, hogy a sejtek képesek adaptálódni a magasabb echistatin koncentrációkhoz. Ekkor feltételezésem szerint azon receptorok toborzását leállítják, melyek képesek nagy affinitással komplexek képzésére az echistatinnal, és így adaptálódva az effektívebb receptorok további toborzásával folytatják a receptor-RGD ligandum komplexek képzését. Az echistatin bekötődését leíró kinetikai görbék analízisére még nem került sor, ez a dolgozat az első amelyben kísérletet teszünk arra, hogy ezen szempontból vizsgáljuk a folyamatot.

A kapott eredmények alapján további mérések elvégzését tervezzük molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával. A lehetséges eljárások lehetnek festékes módszerek, illetve kvantitatív PCR segítségével célszerű lenne meghatározni, hogy az adott receptorok közül az echistatin hozzáadása előtt és után melyek kerülnek kifejeződésre. Emellett célszerű lenne az ELISA eljárás alkalmazása is, amellyel ellenanyagok segítségével tudjuk detektálni a keresett anyagokat oldatban. Ezen eljárással már vizsgálták az $\alpha v\beta 3$ és az $\alpha 5\beta 1$ receptorokat Gémes és munkatársai is, csak más anyagok hatását vizsgálva, így különösen kézenfekvő lenne ezen eljárás alkalmazása. [42] Ezen molekuláris folyamatokat eddig a sejtekből izolált molekulák segítségével vizsgálták. Az általam használt jelölésmentes érzékelés és kinetikai modellezés lehetővé teszi az adhézíós folyamatok molekuláris szintű tanulmányozását a sejt élő állapotában, az integrinek izolációja nélkül.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Horváth Róbertnek és Kovács Kinga Dórának a sok segítségért, a tanácsokért. Köszönettel tartozom a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport tagjainak, különösen Kanyó Nicolettnak és Kovács Kinga Dórának a sejtek glikokálixának enzimatis emésztésének mérése során rögzített adatokért, és Székács Innának az echistatin bekötődésének vizsgálata során kapott mérési adatokért. Köszönöm családomnak és barátaimnak a türelmüket, Száraz Dánielnek a segítségét és Rajmon Imolának azt, hogy vele mérhettem, dolgozhattam ebben a félévben.

Irodalomjegyzék

- [1] László Valéria Darvas Zsuzsa. *Sejtbiológia*. 2005.
- [2] Prithwidip Saha, Tal Duanis-Assaf, and Meital Reches. Fundamentals and applications of fluidfm technology in single-cell studies. *Advanced Materials Interfaces*, 7:2001115, 12 2020.
- [3] Milan Sztilkovics, Tamas Gerecsei, Beatrix Peter, Andras Saftics, Sandor Kurunczi, Inna Szekacs, Balint Szabo, and Robert Horvath. Single-cell adhesion force kinetics of cell populations from combined label-free optical biosensor and robotic fluidic force microscopy. *Scientific Reports*, 10:61, 12 2020.
- [4] Harvey Lodish, Arnold Berk, Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, Lawrence Zipursky, and James Darnell. *Molecular Cell Biology*. 2003.
- [5] Kaelyn D Sumigray and Terry Lechler. Cell adhesion in epidermal development and barrier formation. *Current topics in developmental biology*, 112:383–414, 2015.
- [6] Zoltan Szekanecz and Alisa E Koch. ell-cell interactions in synovitis: Endothelial cells and immune cell migration. *Arthritis Research*, 2:368, 2000.
- [7] Setsuo Hirohashi and Yae Kanai. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Science*, 94:575–581, 7 2003.
- [8] C Yoshida-Noro, N Suzuki, and M Takeichi. Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Developmental biology*, 101:19–27, 1 1984.
- [9] Amelia Khalili and Mohd Ahmad. A review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16:18149–18184, 8 2015.
- [10] Nikki R. Paul, Guillaume Jacquemet, and Patrick T. Caswell. Endocytic trafficking of integrins in cell migration. *Current Biology*, 25:R1092–R1105, 11 2015.
- [11] Richard O Hynes. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110:673–87, 9 2002.

- [12] Integrin field guide.
- [13] Norbert Orgovan, Boglarka Kovacs, Eniko Farkas, Bálint Szabó, Natalya Zaytseva, Ye Fang, and Robert Horvath. Bulk and surface sensitivity of a resonant waveguide grating imager. *Applied Physics Letters*, 104:083506, 2 2014.
- [14] Pll-g-peg.
- [15] S. Tosatti, S.M.De Paul, A. Askendal, S. VandeVondele, J.A. Hubbell, P. Tengvall, and M. Textor. Peptide functionalized poly(l-lysine)-g-poly(ethylene glycol) on titanium: resistance to protein adsorption in full heparinized human blood plasma. *Biomaterials*, 24:4949–4958, 12 2003.
- [16] D Vonwil, M Schuler, A Barbero, S Ströbel, D Wendt, M Textor, U Aebi, and I Martin. An rgd-restricted substrate interface is sufficient for the adhesion, growth and cartilage forming capacity of human chondrocytes. *European Cells and Materials*, 20:316–328, 11 2010.
- [17] M. McKinley and V.D. O’Loughlin. *Human Anatomy*. 3rd edition, 2012.
- [18] Saladin and Kenneth. *Anatomy Physiology: The unity of form and function*. 5th edition, 2010.
- [19] Matthew J. Paszek, David Boettiger, Valerie M. Weaver, and Daniel A. Hammer. Integrin clustering is driven by mechanical resistance from the glycocalyx and the substrate. *PLoS Computational Biology*, 5:e1000604, 12 2009.
- [20] Nicolett Kanyo, Kinga Dora Kovacs, Andras Saftics, Inna Szekacs, Beatrix Peter, Ana R. Santa-Maria, Fruzsina R. Walter, András Dér, Mária A. Deli, and Robert Horvath. Glycocalyx regulates the strength and kinetics of cancer cell adhesion revealed by biophysical models based on high resolution label-free optical data. *Scientific Reports*, 10:22422, 12 2020.
- [21] Joe Chin-Hun Kuo, Jay G Gandhi, Roseanna N Zia, and Matthew J Paszek. Physical biology of the cancer cell glycocalyx. *Nature physics*, 14:658–669, 2018.

- [22] Ye Zeng, Eno E. Ebong, Bingmei M. Fu, and John M. Tarbell. The structural stability of the endothelial glycocalyx after enzymatic removal of glycosaminoglycans. *PLoS ONE*, 7:e43168, 8 2012.
- [23] Carolyn R. Shurer, Joe Chin-Hun Kuo, LaDeidra Monét Roberts, Jay G. Gandhi, Marshall J. Colville, Thais A. Enoki, Hao Pan, Jin Su, Jade M. Noble, Michael J. Hollander, John P. O'Donnell, Rose Yin, Kayvon Pedram, Leonhard Möckl, Lena F. Kourkoutis, W.E. Moerner, Carolyn R. Bertozzi, Gerald W. Feigenson, Heidi L. Reesink, and Matthew J. Paszek. Physical principles of membrane shape regulation by the glycocalyx. *Cell*, 177:1757–1770.e21, 6 2019.
- [24] Matthew J. Paszek, Christopher C. DuFort, Olivier Rossier, Russell Bainer, Janna K. Mouw, Kamil Godula, Jason E. Hudak, Jonathon N. Lakins, Amanda C. Wijeko-on, Luke Cassereau, Matthew G. Rubashkin, Mark J. Magbanua, Kurt S. Thorn, Michael W. Davidson, Hope S. Rugo, John W. Park, Daniel A. Hammer, Grégory Giannone, Carolyn R. Bertozzi, and Valerie M. Weaver. The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. *Nature*, 511:319–325, 7 2014.
- [25] Martin A. Thelin, Katrin J. Svensson, Xiaofeng Shi, Mariam Bagher, Jakob Axelson, Anna Isinger-Ekstrand, Toin H. van Kuppevelt, Jan Johansson, Mef Nilbert, Joseph Zaia, Mattias Belting, Marco Maccarana, and Anders Malmström. Dermatan sulfate is involved in the tumorigenic properties of esophagus squamous cell carcinoma. *Cancer Research*, 72:1943–1952, 4 2012.
- [26] Ye Fang, Ann M. Ferrie, Norman H. Fontaine, John Mauro, and Jitendra Balakrishnan. Resonant waveguide grating biosensor for living cell sensing. *Biophysical Journal*, 91:1925–1940, 9 2006.
- [27] Vörös János. Integrált optikai hullámvezető szenzor alkalmazása a bioanyagkutatásban, 1999.
- [28] Kinga Dóra Kovács, Martin Novák, Zoltán Hajnal, Csaba Hős, Bálint Szabó, Inna Székács, Ye Fang, Attila Bonyár, and Robert Horvath. Label-free tracking of whole-cell response on rgd functionalized surfaces to varied flow velocities generated by fluidic rotation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 599:620–630, 10 2021.

- [29] Jeremy J. Ramsden and Robert Horvath. Optical biosensors for cell adhesion. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 29:211–223, 8 2009.
- [30] Emma Easthope. Innovations in label-free detection, 2018.
- [31] Raheleh Rahbari, Tom Sheahan, Vasileios Modes, Pam Collier, Catriona Macfarlane, and Richard M. Badge. A novel 11 retrotransposon marker for hela cell line identification. *BioTechniques*, 46:277–284, 4 2009.
- [32] Guillaume Jacquemet, Hellyeh Hamidi, and Johanna Ivaska. Filopodia in cell adhesion, 3d migration and cancer cell invasion. *Current Opinion in Cell Biology*, 36:23–31, 10 2015.
- [33] T. Riikonen, P. Vihinen, M. Potila, W. Rettig, and J. Heino. Antibody against human 11 integrin inhibits hela cell adhesion to laminin and to type i, iv, and v collagens. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 209:205–212, 4 1995.
- [34] Klaus Ley, Jesus Rivera-Nieves, William J. Sandborn, and Sanford Shattil. Integrin-based therapeutics: biological basis, clinical use and new drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15:173–183, 3 2016.
- [35] Inna Szekacs, Norbert Orgovan, Beatrix Peter, Boglarka Kovacs, and Robert Horvath. Receptor specific adhesion assay for the quantification of integrin–ligand interactions in intact cells using a microplate based, label-free optical biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 256:729–734, 3 2018.
- [36] E A Voger and R W Bussian. Short-term cell-attachment rates: a surface-sensitive test of cell-substrate compatibility. *Journal of biomedical materials research*, 21:1197–211, 10 1987.
- [37] Norbert Orgovan, Beatrix Peter, Szilvia Bősze, Jeremy J. Ramsden, Bálint Szabó, and Robert Horvath. Dependence of cancer cell adhesion kinetics on integrin ligand surface density measured by a high-throughput label-free resonant waveguide grating biosensor. *Scientific Reports*, 4:4034, 5 2015.

- [38] K.-F. Giebel, C. Bechinger, S. Herminghaus, M. Riedel, P. Leiderer, U. Weiland, and M. Bastmeyer. Imaging of cell/substrate contacts of living cells with surface plasmon resonance microscopy. *Biophysical Journal*, 76:509–516, 1 1999.
- [39] Tamás Gerecsei, Péter Chrenkó, Nicolett Kanyo, Beatrix Péter, Attila Bonyár, Inna Székács, Balint Szabo, and Robert Horvath. Dissociation constant of integrin-rgd binding in live cells from automated micropipette and label-free optical data. *Biosensors*, 11:32, 1 2021.
- [40] Beatrice S. Ludwig, Horst Kessler, Susanne Kossatz, and Ute Reuning. Rgd-binding integrins revisited: How recently discovered functions and novel synthetic ligands (re-)shape an ever-evolving field. *Cancers*, 13:1711, 4 2021.
- [41] Cezary Marcinkiewicz, Senadhi Vijay-Kumar, Mary Ann McLane, and Stefan Niewiarowski. Significance of rgd loop and c-terminal domain of echistatin for recognition of iib3 and v3 integrins and expression of ligand-induced binding site. *Blood*, 90:1565–1575, 8 1997.
- [42] Borbála Gémes, Eszter Takács, Inna Székács, Robert Horvath, and András Székács. Comparative assessment of the inhibitory potential of the herbicide glyphosate and its structural analogs on rgd-specific integrins using enzyme-linked immunosorbent assays. *International Journal of Molecular Sciences*, 23:12425, 10 2022.