

Egyedi sejtek adhéziójának tanulmányozása mikrofluidikai erőmikroszkóppal

Rajmon Imola

ELTE TTK Fizika MSc I. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Horváth Róbert

(ELKH EK MFA Nanobioszenzorika Lendület Csoport)

Belső konzulens:

Dr. Szabó Bálint

(ELTE Biológiai Fizika Tanszék)



Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Absztrakt	5
3. Bevezetés	6
3.1. Sejtadhézió	6
3.2. Egyedi sejtszintű technológiák	8
3.3. Atomerő mikroszkóp (AFM)	9
3.4. Fluidikai erőmikroszkóp (FluidFM)	12
4. Célkitűzés	17
5. Anyagok és módszerek	18
5.1. Felhasznált sejtek és alkalmazott protokollok	18
5.2. Használt puffer oldatok	21
5.3. A kísérletek során alkalmazott felületi bevonatok	21
6. A mérés menete	22
7. Eredmények	25
7.1. Az általam vizsgált sejtek adhéziós ereje	25
7.2. Optimális paraméterek preosteoblast sejtek számára	27
7.3. Kettős minimum vizsgálata	31

8. Összefoglalás	35
9. Köszönetnyilvánítás	36

1. Rövidítések jegyzéke

AFM	Atomic Force Microscopy	Atomerő mikroszkóp
DMEM	Dulbecco 's modified Eagles medium	Dulbecco módosított Eagle tápoldat
DPBS	Dulbecco 's Phosphate-buffered saline	Dulbecco fiziológiás foszfát puffer
ECM	Extracellular matrix	Extracelluláris mátrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Etilén-diamin-tetraecetsav
FluidFM	Fluidic Force Microscopy	Fluidikai erő mikroszkóp
HBSS	Hanks' balanced salt solution	Hanks' sóoldat
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(-2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav
PBS	Phosphate-buffered saline	Fiziológiás foszfát puffer
PP	Poly-(L-lysine)-graft-poly (ethylene-glycol)	Poli (l-lizin)-graft-poli (etilén-glikol)
PPR	Poly-(L-lysine)-graft-poly (ethylene-glycol)-RGD	Poli (l-lizin)-graft-poli (etilén-glikol)-RGD
RGD	Arginine glycine aspartic acid	Arginin glicin aszparaginsav

2. Absztrakt

Napjainkban a biofizikai és biológiai kutatásokban fontos szerepet tölt be a biológiai jelenségek vizsgálata az egyedi sejtek szintjén. A hagyományosan elterjedt, teljes populáción végzett mérések során minden esetben átlagoljuk az eredményeket. Markánsan eltérő alpopulációkkal rendelkező biológiai rendszerek esetében az így nyert eredmények félrevezetőek lehetnek. A hagyományos technikákkal szemben az egyedi sejt szintű mérések esetén sokkal részletesebb képet kaphatunk a szövetek heterogenitásáról, komplex biológiájáról és a lehetséges alpopulációkról. A sejtadhézió nagy jelentőségű számos alapvető biológiai folyamatban, és a megismerése közelebb visz a sejtek magasabb szerveződésének feltérképezéséhez. A folyamat megkerülhetetlen jelentőségű pl. implantátumok és gyógyszerhatóanyagok kifejlesztésében is.

Méréseimet egy mikrofluidikai csatornával ellátott atomerőmikroszkóppal (FluidFM) végeztem. A mikrofluidikai csatornában uralkodó nyomás változtatásával a műszer konzoljához másodpercek alatt hozzá lehet rögzíteni a célsejtet, majd azt a felületről eltávolítva mérhető a sejt felszakítására jellemző erő-távolság görbe. A műszer konzolja különböző apertúrákkal rendelkezhet. Adhéziós méréseket 2 μm , 4 μm és 8 μm átmérőjű kör alakú apertúrával lehet végezni. A konzol egy másik fontos paramétere a rugóállandó, mely lehet 2 N/m vagy 0.3 N/m.

A kutatásom célja az erősen letapadt sejtek felszakításának a sikerességének a tesztelése volt, különböző rugóállandójú és geometriájú konzolokkal. Ehhez HeLa méhnyakrák és preosteoblast csontszöveti sejteken végeztem méréseket. Tapasztalataim szerint az egészséges preosteoblast sejteket csak a puhább (0.3 N/m rugóállandójú), míg a rákos sejteket mindkét konzollal fel tudtuk szedni. Emellett a kisebb apertúrájú konzollal mért erőgörbék alakja jelentősen eltérve a nagyobbakétól, kettős minimumot mutat. A minimumok közelében az erőgörbe meredekségét kielemezve meghatároztam az adott biológiai rendszerre jellemző adhéziós erő/távolság értékeket, melyek összefüggésben vannak a sejtek rugalmasságával. Munkám hozzájárul ahhoz, hogy az élő sejtek adhéziós paramétereit nagyszámú egyedi sejten, hatékonyan tanulmányozni tudjuk, szemben a korábbi néhány sejten elvégzett adhéziós kutatásokkal.

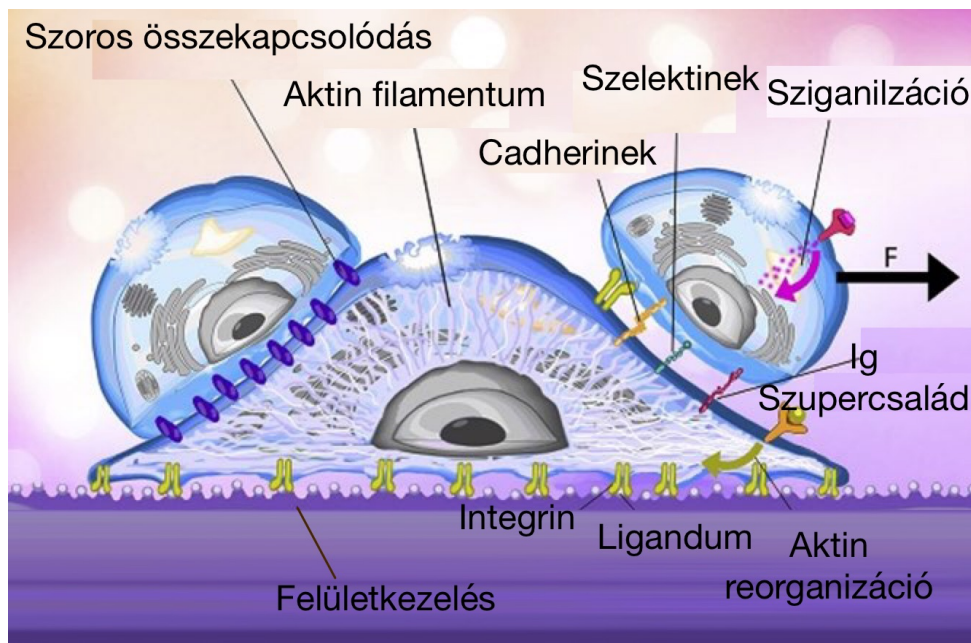
3. Bevezetés

3.1. Sejtadhézió

Szervezetünk sejtjeinek egy része adherens, így számukra fontos, hogy egymáshoz vagy különböző fehérjekomplexeken keresztül az extracelluláris mátrixhoz (ECM) tudjanak kapcsolódni. Ha ezen sejtek kitapadását meggátoljuk, akkor elpusztulnak. A szolid tumor sejtek ebbe a kategóriába tartoznak, így a sejtadhézió vizsgálatának fontos szerepe van a rákkutatásban. A sejtadhéziónak jelentős szerepe van a sejtnövekedésben, migrációban és differenciálódásban [10]. Magát az intracelluláris adhéziót közvetítik dezmoszómák, szoros és adherens összekapcsolódások. Ebben az esetben a sejt az extracelluláris mátrix molekuláival fokális adhézióon keresztül hat kölcsön [3]. Adhéziókor a sejtek átrendezik a sejtvázaikat felvéve az adott sejt típusra jellemző morfológiát és kiterülnek a rendelkezésükre álló felületen [10].

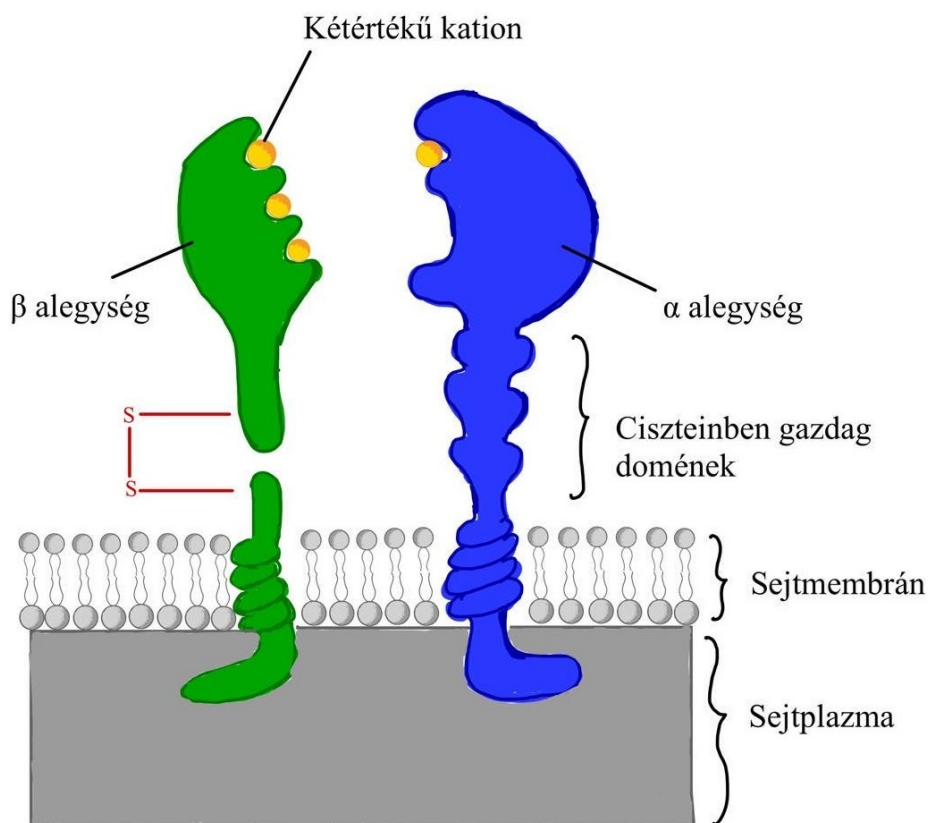
Az adhézió jellemzésére azt az erőt szokás használni, ami a tapadó felületek, azaz a sejt-szubsztráttól vagy egy másik sejttől való elválasztásához szükséges. Ezt az erőt különböző műszerekkel közvetetten vagy közvetlenül mérni lehet. Közvetett mérést végezhetünk jelölésmentes optikai bioszenzorokkal, melyek felülethez kötött evaneszcens hullámok segítségével detektálni tudják a lokális törésmutató változást. Megmérve az eszköz szenzoráról visszaverődő és a spektroszkópba érkező fény hullámhossz-eltolódását, érzékeltük a sejtmembránban a sejt alatti területen felhalmozódó adhéziós proteineket. Ezzel a technikával megmérhető egy sejt optikai területe, melyből következtetni lehet az adhéziós erejére [16]. Közvetlen adhéziómérést végezhetünk atomerőmikroszkóppal (AFM) vagy fluidikai erőmikroszkóppal (FluidFM). AFM esetén kémiai kötással rögzítjük a sejtet a konzolhoz, míg FluidFM-nél nyomáskontrolálással. Miután létrejön a sejt és a konzol közötti kapcsolat, a sejtet lassan felemeli a műszer, ezzel leválasztva a felületről.

A sejtek egymáshoz vagy az extracelluláris mátrixhoz makromolekulákon keresztül kapcsolódnak, s a sejtfelületeken található makromolekulák között vagy a makromolekulák és az ECM között nem kovalens kötés jön létre. A sejtadhéziós molekulákat 2 csoportba szokták sorolni, attól függően a kölcsönhatás kialakításához szükséges-e Ca^{2+} ion. Míg az integrinek, a kadherine és a szelektinek függenek a Ca^{2+} -tól, addig az immunoglobulin szupercsaládba tartozó sejtadhéziós molekulák függetlenek.



1. ábra. A sejtadhézió és a folyamatban jelentős szerepet játszó adhézións molekulák [19].

Az adhézións molekulák egyik legfontosabb csoportját alkotják az integrinek, melyek két alegységből (α és β) álló heterodimer transzmembránfehérjék. 24 féle α és 9 féle β alegység létezik, s a dimerkombináció határozza meg az integrin mely ligandumokat képes felismerni. Egy integrin lehet aktív vagy inaktív, s az aktiváció konformációváltozáson keresztül megy végbe. Inaktív állapotban az alegységek C-terminálisai egymáshoz közel, míg aktív helyzetben egymástól távol helyezkednek el. Integrinek segítségével alakul ki a kapcsolat a citoszkeleton, azaz a sejt szerkezeti váza (megszabja a sejt alakját) és az extracelluláris mátrix között. A citoszkeleton nyúló végét az aktin filamentumok alkotják. Ehhez kapcsolódnak a rendezett fokális adhézións komplex segítségével az integrinek és az adhézións molekulák [11]. Az integrin és az adhézións molekula közötti kapcsolat specifikus aminosavszekvenciákon például RGD-n keresztül valósul meg. Sejtadhéziókor az integrinek lokálisan sűrűsödnek, ezzel fokális adhézións korongokat létrehozva [12].



2. ábra. A két alegységből álló integrin és a sejtmembránban elfoglalt konformációjának sematikus ábrázolása

3.2. Egyedi sejtszintű technológiák

Az élő organizmusok sejtekből állnak, így kiemelten fontos a releváns egyedi sejt szintű kölcsönhatások feltérképezése és megértése. Napjainkban a biofizikai kutatások egyik kiemelkedő ága az egyedi sejtek nagy áteresztőképességű manipulálása. Ebből látható, hogy az egyedi sejt technológiák fontos eszközévé váltak a biológiai analíziseknek. Ilyen technikákat használnak a rendszer biológia, genomika és proteomika területén. Összehasonlítva egy teljes sejtpopuláción végzett átlagolt méréshez képest az egyedi sejtszintű mérések- ből sokkal részletesebb képet kaphatunk a szövetek heterogenitásáról és komplex biológiájáról. A mikrofluidikai, elektrofiziológiai, nagy felbontású képkészítéssel zajló, tömeg spektrometriai és szekvenáló mérések során a precizitás növelésével részletesebb képet kaphatunk az egyes sejtek szöveten belüli elhelyezkedéséről. Ezen módszerek kiemelkedő érzékenysége lehetővé teszi a sejtek funkcióinak vagy patogénikus hatásainak vizsgálatát[6].

Egyedi sejtek adhézióját különböző technikákkal lehet mérni. Elterjedt mérőeszköz a jelölésmentes optikai bioszenzor, melyek felülethez kötött evaneszcens hullámokat használnak, s detektálni tudják a szenzorfelület 150-200 nm-es tartományában bekövetkező törésmutató változást. Ennek köszönhetően lehetővé teszik a sejtadhézió időbeli lefolyásnak tanulmányozását. Viszont ezen technikák egyik nagy hátránya, hogy az atomerőmikroszkóppal ellentétben az erőt nem direktbe mérik, hanem arra az optikai területből következtetnek. Sztilkovics és társai cikkükben FluidFM-es mérések segítségével meghatározták a bioszenzorral mért optikai területek milyen konkrét erőértékeknek felelnek meg [16].

Szintén egy jelölésmentes sejtvizsgálási technika a digitális holografikus mikroszkópia, más néven holomonitor. A műszerben valós időben lehet vizsgálni a sejt morfológiáját és a fiziológiai paramétereket. A mérni kívánt objektumról visszaverődik vagy keresztül megy egy lézer fény. Az említett lézerfény fázistolása függ a minta optikai vastagságától, amit meghatároz az objektumon belüli törésmutató és a vizsgálandó anyag fizikai vastagsága. A műszer az optikai vastagságot nanométeres pontossággal tudja mérni [14].

A korábbiaktól jelentősen eltérő műszer a mikropipetta, mely a sejt fölé megy, majd a nyomás lecsökkentésével beszívja azt. A mintára adott nyomás ismeretében következtetni lehet ugyan arra az erőre, amivel felszedték a sejtet, de jelenleg nem lehet vele pontos adhéziós kísérleteket végezni [18].

3.3. Atomerő mikroszkóp (AFM)

Atomerőmikroszkótot először 1985-ben Binning, Quate és Gerber használt. Maga a műszer biztosít egy nagy felbontású nem optikai elven működő képalkotó technikát, így szokás felületek vizsgálatára használni. AFM-mel pontos és rengeteg tulajdonságot (pl. topológia, elektromos, mágneses, kémiai, optikai és mechanikai) nem módosító méréseket lehet vákuumban, levegőben vagy folyadékban végezni.

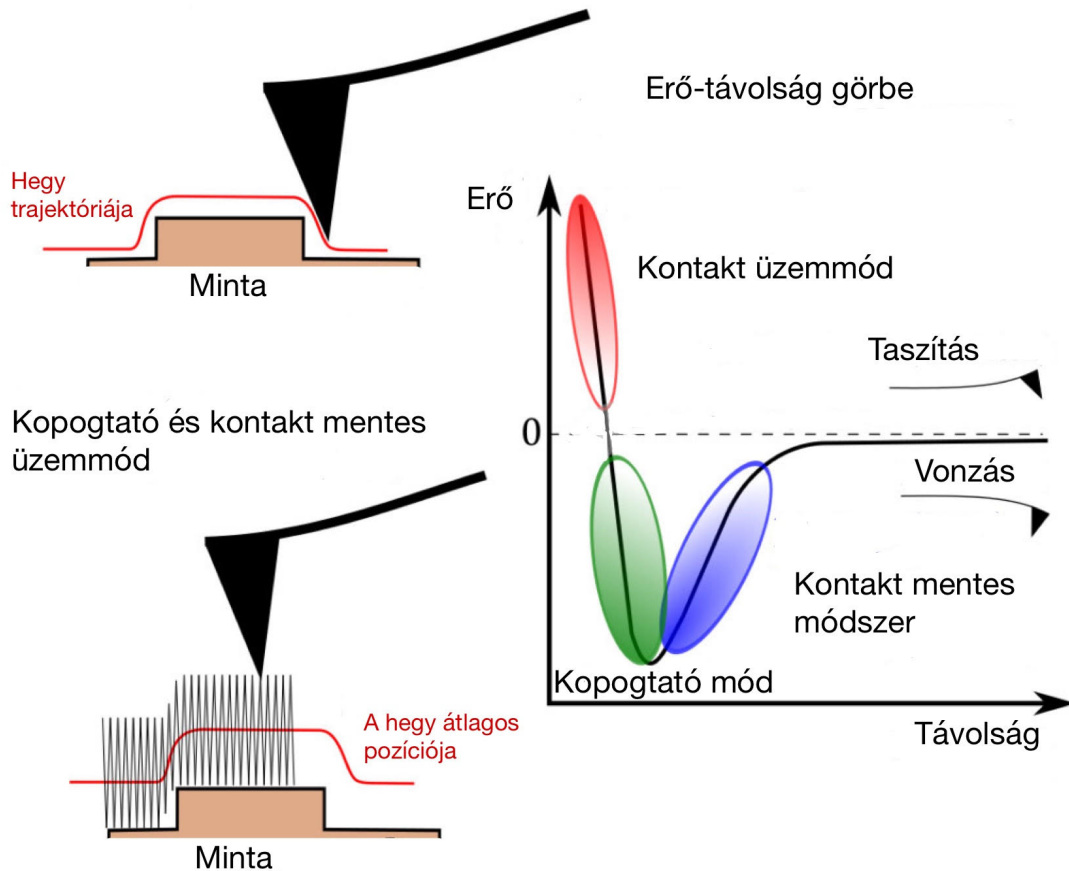
Az AFM szondája egy hegyes tű, aminek nem kell feltétlenül elektromosan vezetőnek lennie. Ezt a tűt leggyakrabban szilíciumból (Si) vagy szilícium nitridből (SiN) készítik. A tű egy rugólapkához van rögzítve, aminek a meghajlásából következtethetünk a tű és a minta között fellépő erőre. A tűt és a rugólapkát egy piezoelektromos szkennelrel horizontális és vertikális irányba együttesen mozgatjuk a minta felett. A minta felületétől függően az egyes pontokban

a konzol meghajlása eltérő mértékű lesz. Magát a meghajlást optikai úton, egy lézernyaláb segítségével tudjuk detektálni. A rugólapka mintával ellentétes oldaláról visszaverődő fény pozícióját egy detektorral lehet érzékelni[8][5]. Az a cél, hogy az AFM konzoljának meghajlása közel állandó legyen, s így a kölcsönható erőt is tekinthetjük konstansnak. Ha rögzítjük az AFM hegyének koordinátáit, akkor a felületről egy 3 dimenziós topológiai képet kapunk[5].

Két gyakran használt alap AFM felület topológiai képalkotási módszer létezik. Az egyik a sztatikus vagy kontakt módszer, a másik a dinamikus módszer. A dinamikus módszeren belül még két almodot szokás megkülönböztetni, a megszakított kontakt vagy kopoktató és a kontakt mentes módszert. A kontakt mód esetén az AFM hegye konstans kontakt mellett végigpásztázza a minta felületét. A visszacsatolási rendszer célja egy konstans konzol meghajlás és kölcsönhatási erő fenntartása. Az AFM hegy és a felület között ható erők ilyenkor taszító jellegűek. Ehhez a módszerhez puha AFM konzolokat használnak, ezzel minimalizálva a hegy kopását, a felület sérülését és növelve az érzékenységet. Megszakított kontakt mód esetén a konzol az első rezonanciafrekvenciája körül gerjesztődik egy piezoelektromos elven működő rendszer által. Az AFM hegyét mozgatják úgy, hogy éppen hozzáér a felülethez az oszcilláció legmélyebb pontjában. Így az oszcilláció amplitúdója csillapítást szenved. A módszer esetén a konzol oszcillálási amplitúdója és ezen keresztül a kölcsönhatási erő konstans értéken van tartva. Itt szintén taszító erő lép fel a minta és a konzol között. A kontaktmentes módszer esetén az AFM konzol a rezonanciafrekvenciája környékén egy a kontakt módbelinél kisebb amplitúddal van rezgetve. A rezgés amplitúdója akkora, hogy a konzol és a felület között maradjon néhány nanométernyi távolság. Többnyire a konzol oszcillálási frekvenciáján keresztül tartják konstans értéken a kölcsönhatási erőt. Ez a módszer folyadékban precíz erőkontrollt és jó felbontású képeket tud biztosítani. Előnye a másik két módszerrel szemben az, hogy alkalmazásakor a létező legkevesebb kölcsönhatás lép fel a tű és a felület között[6].

Különböző AFM mérési módszerek

Kontakt üzemmód

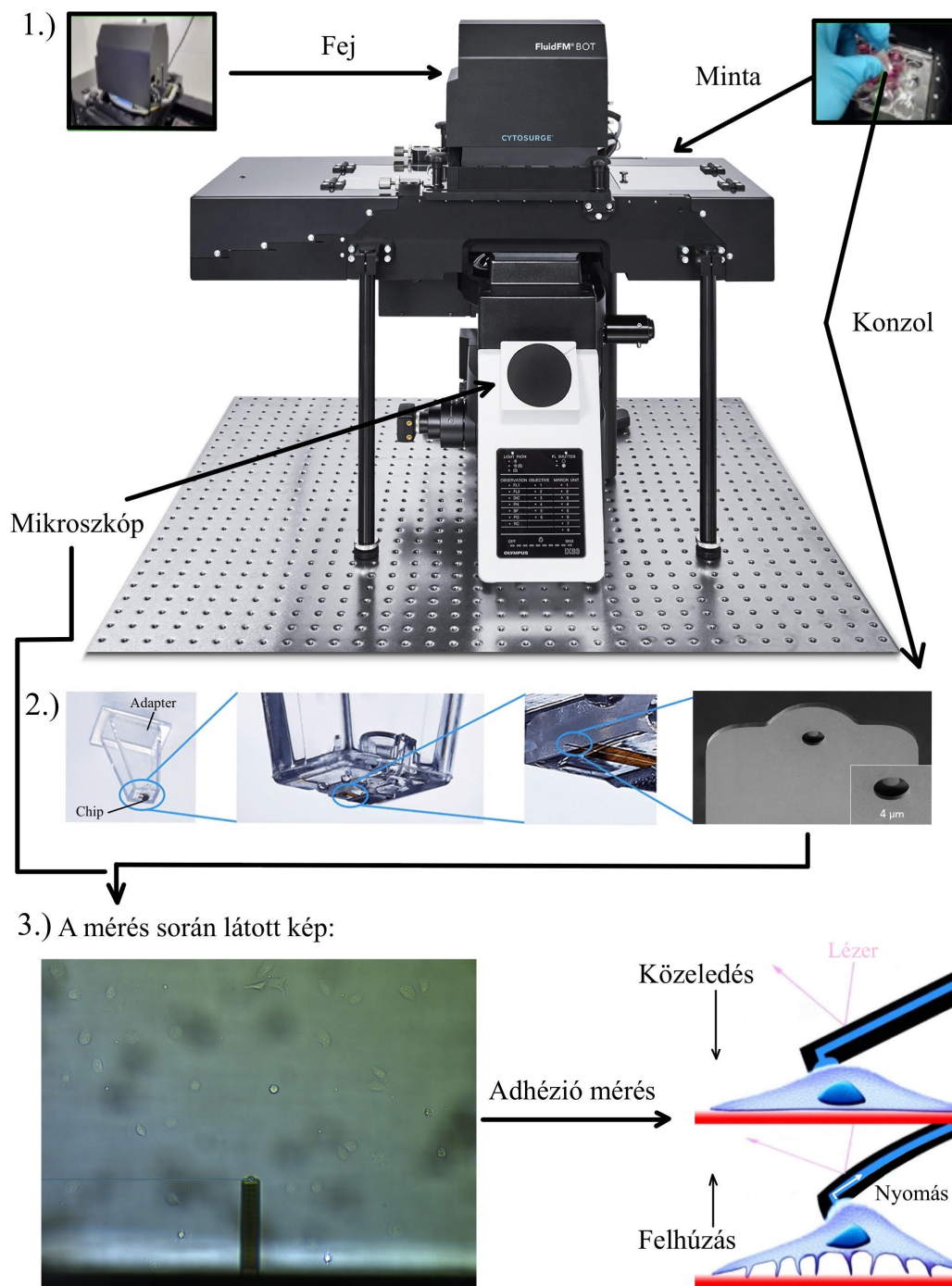


3. ábra. Baloldalt a konzol és a minta között fellépő kölcsönhatás látható, míg jobboldalt a minta-tű erő van ábrázolva a távolság függvényében. A kontakt üzemmód során van a mintához legközelebb a tű hegye, így ilyenkor erős taszítás jellemzi a tű-minta kölcsönhatást. Kontakt mentes üzemmódban a tű hegye az erősen taszító tartományon kívül marad. Kopogtató üzemmódban a kontakt és a kontakt mentes tartomány között mozog a tű hegye [1].

Az atomerőmikroszkópot gyakran használják sejt-szubsztrátum vagy sejt-sejt kölcsönhatás egyedi sejtszintű tanulmányozására. Ilyen típusú felhasználáskor a sejtek többnyire kémiai módon rögzítve az AFM konzoljához. Viszont a kémiai rögzítés miatt a mérhető adhézión erők maximum néhány száz nanonewton nagyságú értékeket vehetnek csak fel és sok kísérlet elvégzése szükséges az eredmények egyértelmű alátámasztásához[19].

3.4. Fluidikai erőmikroszkóp (FluidFM)

Kísérleteim során egy mikrofluidikai csatornával és nyomáskontrollerrel ellátott atomerőmikroszkóppal, azaz úgynevezett FluidFM-mel mértem, melyet a Cytosurge fejlesztett ki. Magához a műszerhez tartozik egy Olympus inverz optikai mikroszkóp, ami lehetővé teszi a mérés közben a sejtek, és a műszer működésének a megfigyelését. Két oldalra lehet mintát behelyezni, jobbra és balra, s a mintatartót x-y irányba lehet mozgatni. A konzolt a z tengelyt tartalmazó fejhez rögzítjük a mérés során. A fejben található egy nyomáskontroller, mely segítségével a csatornában uralkodó nyomást -700 és 1000 mbar között tudjuk variálni. A z tengely az x-y-től függetlenül mozog akár 1 nm-es felbontással. Maga a műszer többféle mérést tesz lehetővé. Kutatásom ugyan csak az adhéziós kísérletekre fókuszál, de emellett lehet vele sejtekbe különböző anyagokat injektálni, kivonni vagy különböző gyorsan változó mértékben adhezív felületeket létrehozni. A korábban már említett mikrofluidikai csatorna magában a szilícium, szilícium-nitrid konzolban helyezkedik el és az egyik vége a nyomáskontrollerhez kapcsolódik, míg a másik egy apertúrában végződik. Ez az apertúra a használatától függően eltérő lehet. Adhézió méréshez kör alakút használunk, melynek az átmérője lehet $2\ \mu\text{m}$, $4\ \mu\text{m}$, és $8\ \mu\text{m}$. Ezzel szemben injektáláshoz egy olyan piramidális hegyben végződő apertúrát szokás alkalmazni, melynek az oldalán van egy kis 600 nm átmérőjű lyuk. Egy ilyen konfigurációval könnyen átszakítható a sejtmembrán anélkül, hogy a mikrofluidikai csatorna eldugulna. Az apertúra mellett a konzolnak egy másik nagyon fontos tulajdonsága a rugóállandója, mely a Cytosurge által gyártottak esetén névlegesen 0.3 N/m vagy 2 N/m lehet[21].



4. ábra

1. A FluidFM, mint műszer. A képen látható a fej, a mikroszkóp és a mintatartók [20][2].
2. A méréshez használt konzol. Balról a 2. képen látható a tartály, amit fel kell tölteni, míg az utolsó kép az apertúrát mutatja [2].
3. A mikroszkóppal látott kép és az adhéziós mérés menete [20].

Mérés előtt $1 \mu l$ pufferral (vagy egyéb ideális folyadékkal) fel kell tölteni még a FluidFM-be helyezés előtt a mikrofluidikai csatorna mögött található kis tartályt. Ezt követően behelyezzük az alkatrészt a műszerbe és a mikroszkóp segítségével rögzítjük a fejre. Magát a mérést és a kalibrálást egy speciálisan ilyen célokra fejlesztett ARYA nevezetű szoftverrel végezzük. Minden mérés kezdete előtt érdemes megmérni a konzol rugóállandóját, ugyanis annak értéke akár nagyban eltérhet a névlegestől. A szoftverbe be van építve egy rugóállandó mérés, ami a Sader-módszert alkalmazza. Ez a módszer a konzol első rezonanciafrekvenciájának (ω_R) mért pozíciójára és jósági tényezőjére (Q) alapoz és az egyenlete a következő:

$$k = 0,1906\rho w^2 L Q \Gamma_i(\omega_R) \omega_R^2 = 0,1906\rho w^2 L \Gamma_i(\omega_R) \omega_R^3 \sigma^{-1} \quad (1)$$

Ahol k a rugóállandója w a szélessége ($36 \mu m$ a méréseink során), L ($200 \mu m$ a mienknél) pedig a hosszúsága a konzolnak. ρ a közeg sűrűsége, Γ_i pedig a frekvenciafüggő komplex hidrodinamikai függvény imaginárius része. Q -t ω_R -et megkaphatjuk a levegőben megmért még feltöltetlen konzol termikus zaj spektrumából. A spektrumra Lorentz-görbét illesztve meghatározható a rezonancia csúcs pozíciója és félértékszélessége (σ). A módszer egyik hátránya, hogy a jósági tényezőt precízen kell meghatározni. Mivel egy optikai elven működő detektort használunk a termikus zaj spektrumának detektálásához, a paraméterek melyek hatással vannak az optikai reflexión alapuló mérésekre befolyásolják a kapott rugóállandót is[21].

Az atomerőmikroszkópos mérésekhez hasonlóan a konzol meghajlását lézerfényt használva lehet detektálni, ami a konzol felfele néző arany réteggel borított erősen reflektív felületéről verődik vissza és jut egy két szegmensből álló pozíció érzékeny detektorba. Mivel a műszer egy két szegmensű detektort alkalmaz nem lehet vele torziós vagy tangenciális erőket mérni. Sejt-adhézió méréskor valójában egy feszültség idő függést rögzítünk, melyből a Hooke-törvényt alkalmazva megkaphatjuk a sejt és a konzol között fellépő erőt.

$$F(t) = k\delta(t) = kU(t) \cdot InvOLS \quad (2)$$

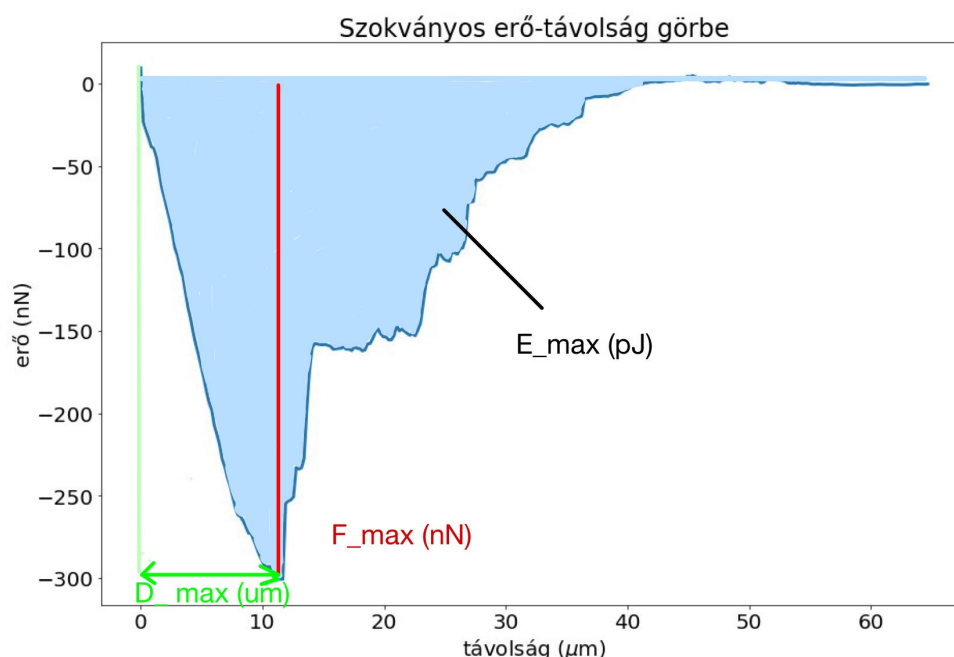
Ahol k N/m-ben mérve a konzol rugóállandója, $\delta(t)$ a méterben mért meghajlás, amit az $U(t)$ mért feszültségből és az inverz optikai érzékenységből ($InvOLS [m/V]$) kaphatunk meg. Az inverz optikai érzékenységet meg tudjuk határozni, ha egy kemény felülethez, például a petricsésze aljához hozzányomjuk a konzolt. Mivel a felület egyenletlensége ilyen esetekben elhanyagolható, a konzol meghajlásának következtében a detektorban egy lineáris jelet fogunk kapni. Így az inverz optikai érzékenység megkapható a piezo mozgásából (Δz) és a mért feszültség-

ből [21].

$$InvOLS = \frac{\Delta z}{\Delta U} \quad (3)$$

Az eddig említetteken kívül az élő sejtes adhézión kísérleteket egyéb paraméterek szintén nagyban befolyásolhatják. Mivel a sejtek érzékenyek a környezeti változásokra, így egyes beállításoknál könnyebben elszakadhatnak, leválhatnak a felületről. Az egyik ilyen kritikus paraméter a konzol felfele húzásának a sebessége, mely reprezentálja a sejtre felfele ható erő nagyságát. Mivel a molekuláris sejt-felület kötésen kívül a sejt mechanikai tulajdonságait is meghatározza a felemelés sebessége, ezért figyelni kell rá, hogy ez a mérés alatt konstans legyen. A méréseim során ez a paraméter minden esetben $1 \mu m/s$ volt. Ezen kívül fontos a sejt-konzol kapcsolat kialakítására szánt idő, mely meghatározza milyen hosszan szívódik be a sejt a mikrofluidikai csatornába. Kísérleteimben ezt a paramétert variáltam, tesztelve mennyire befolyásolja a sejt-felszedés sikerességét. A mikrofluidikai csatornában generált negatív nyomással tudjuk a sejtet a konzolhoz rögzíteni, így annak nagysága szintén jelentős. Ezt a paramétert is változtattam -300 és -700 mbar között, vizsgálva a sejt-felszedés sikerességére gyakorolt hatását. A műszer csak egy küszöbértékig húzza fel adhézióméréskor a konzolt. Az ideális érték különböző típusú sejtek esetén eltérő lehet.

A kísérletek szempontjából a legfontosabb az, hogy sejt-felszedéskor a műszerrel a sejt-felület szétválasztásához szükséges erő-távolság függvényt tudjuk detektálni. A detektált görbe minimuma, azaz a maximális erő reprezentálja a leválási erőt. Feltételezve, hogy az adhézióért felelős receptorok a kontakt zónában egyenletesen helyezkednek el, a sejt szélén több kötés jön létre, mint a közepén. Emiatt a maximális erőt a sejtszéli kötések felszakadása előtt közvetlenül tudjuk detektálni. Miután elértük a maximális erőt az erőértékek rohamosan csökkenni fognak, hiszen már csak kevesebb adhézión kötés van a sejt és a felület között. Mivel a receptorok és a rajtuk keresztül kialakult kötések erőssége összefügg a maximális erővel, szokás ezt az erőt az adhézió jellemzésére használni[17].



5. ábra. A sejt felszedéskor kapott adhézión görbe. F_{max} az adhéziós erő, E_{max} az adhézión energia, D_{max} pedig az a távolság, ahol a sejt feljön a felületről és a legnagyobb erőt mérjük.

Miután részleteztem az AFM és a FluidFM működését, összehasonlítom a két technikát. Alapvetően mindkét módszert használják sejt-sejt vagy sejt-szubsztrátum kölcsönhatások tanulmányozására. Atomerőmikroszkópot használva a sejteket kémiaiilag rögzítik a konzolhoz, mely időigényes folyamat (körülbelül 20-30 perc). Ezzel szemben fluidikai erőmikroszkópot alkalmazva a sejt rögzítése csak néhány másodpercet vesz igénybe. Mivel a kísérleteket élő mintákon végezzük fontos az idő tényezője (a sejteink körülbelül 3-4 óra mérést bírnak), ezért FluidFM-et alkalmazva sokkal több sejt adhézión erejét tudjuk adott idő alatt lemérni. Egy másik előnye a FluidFM-nek, hogy túlnyomást alkalmazva a sejtet könnyen el tudjuk távolítani a konzolról, és így akár más vizsgálatoknak, pl. génszekvenálásnak is alá lehet vetni [15]. Ez atomerőmikroszkóppal nem lehetséges. Emellett a kémiai rögzítés miatt a mérhető adhézión erők maximum néhány száz nanonewton értékeket vehetnek csak fel, ami limitálja a használatát ha teljesen kitapadt sejteink vannak, melyeknek az adhézión ereje elérheti akár a 2000 nN-t is [7]. Megjegyezném, hogy a FluidFM-et leszámítva kevés olyan technika van mellyel rendszeren kitapadt sejtek adhézión erejét tudnánk mérni. Ugyanakkor a FluidFM-nek egy nagy hátránya, hogy a mikrofluidikai csatornát membrándarabkák, egyéb sejtalkotók vagy nagyobb molekulák eltömíthetik. Szerencsére ezt a problémát mosással és szennyezőgátló bevonatokkal el lehet kerülni vagy enyhíteni [15].

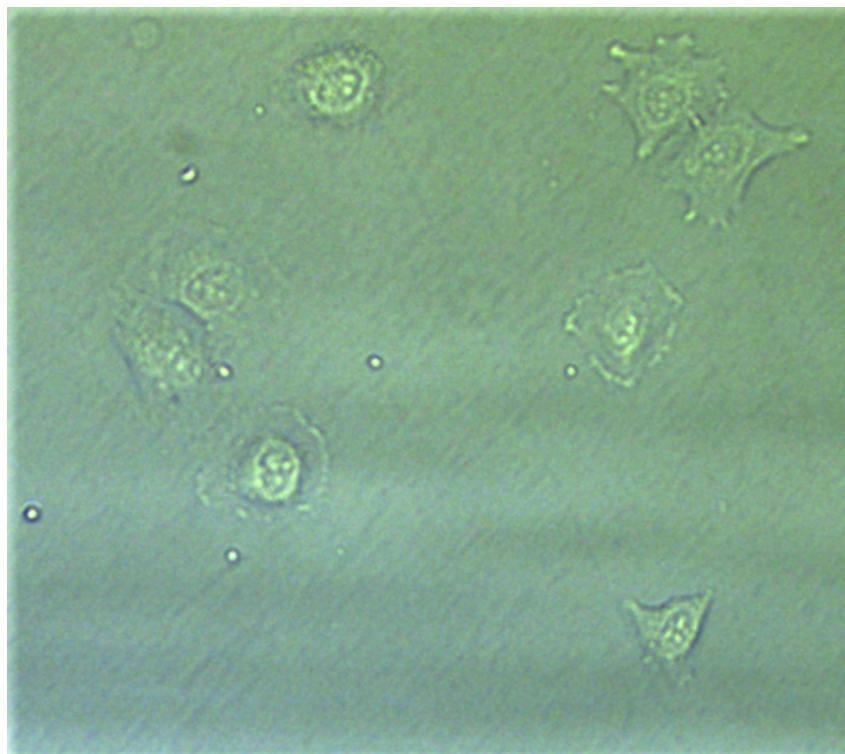
4. Célkitűzés

Kutatásom célja a sejtdhézió jobb megértése volt, mely egy fontos tulajdonsága az adherens sejteknek. Mivel a szolid tumor sejtek ebbe a kategóriába tartoznak, ha meggátoljuk a kitapadásukat akkor elpusztulhatnak. Ezen kívül a sejtdhézió tanulmányozása segíthet megérteni az áttét képződést. Korábbi kísérletek során azt tapasztaltuk az egészséges preosteoblast sejteket nem tudjuk a $8\text{ }\mu\text{m}$ apertúrájú 2 N/m rugóállandójú FluidFM konzolokkal felszedni, melyek HeLa sejtekre ideálisak. Mivel ezen kívül létezik még kétféle apertúra, és minden konzolnak van egy kisebb, 0.3 N/m rugóállandójú változata, valamint a műszerben lehet még egyéb a sejtlevétel befolyásoló paramétereket állítani, igyekeztem minden kombinációval méréseket végezni. A kutatásom fő célja a preosteoblast sejtek számára optimális sejtlevélesi paraméterek megtalálása volt, melyekkel a későbbi mérések hatékonyságát és sikerességét jelentősen növelni lehet. Igyekeztem a sejtlevéles módszerét hatékonyan elsajátítani, valamint úgy optimalizálni, hogy sok sejt adhéziós karakterisztikáját meg tudjam egy mérés alatt határozni. Ezek mellett törekedtem a kapott erőgörbék érdekességeinek, mint például a szokványostól eltérő kettős minimumok jelenségének a megmagyarázására és egy fajta sejtrugalmasság meghatározására.

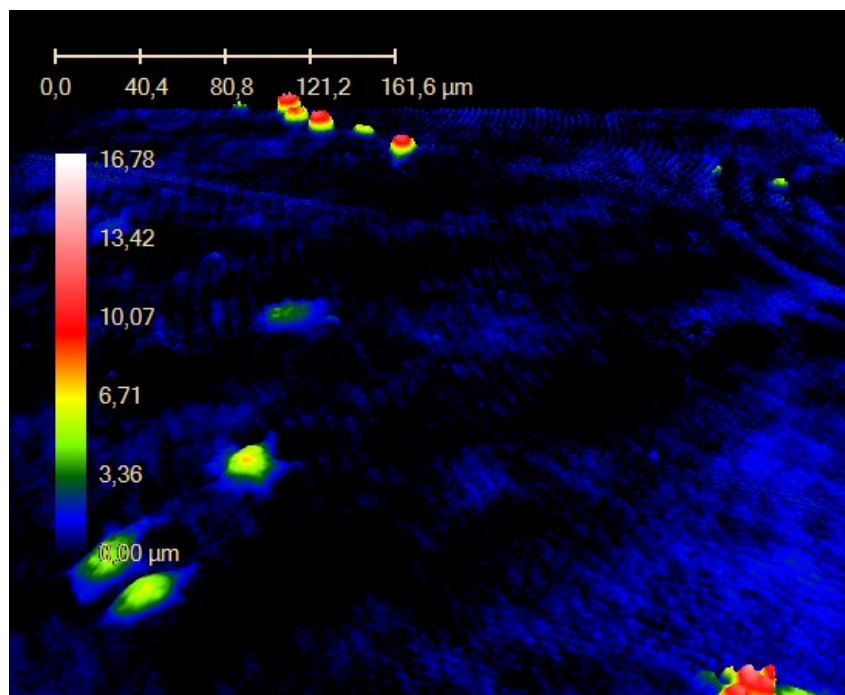
5. Anyagok és módszerek

5.1. Felhasznált sejtek és alkalmazott protokollok

A méréseim során kétféle sejttel foglalkoztam. Ezek közül első körben a HeLa méhnyakrák sejteket részletezem. Ezt az immortalizált tumoros sejtvonalat használják a leggyakrabban és a legrégebb óta tudományos célokra. Magukat az eredeti sejteket 1951-ben egy Henrietta Lacks nevű páciens méhnyakából távolították el. Mivel a sejtvonal rendkívül jó szaporodóképességgel és ellenállóképességgel rendelkezik jól használható tudományos kutatásokra.

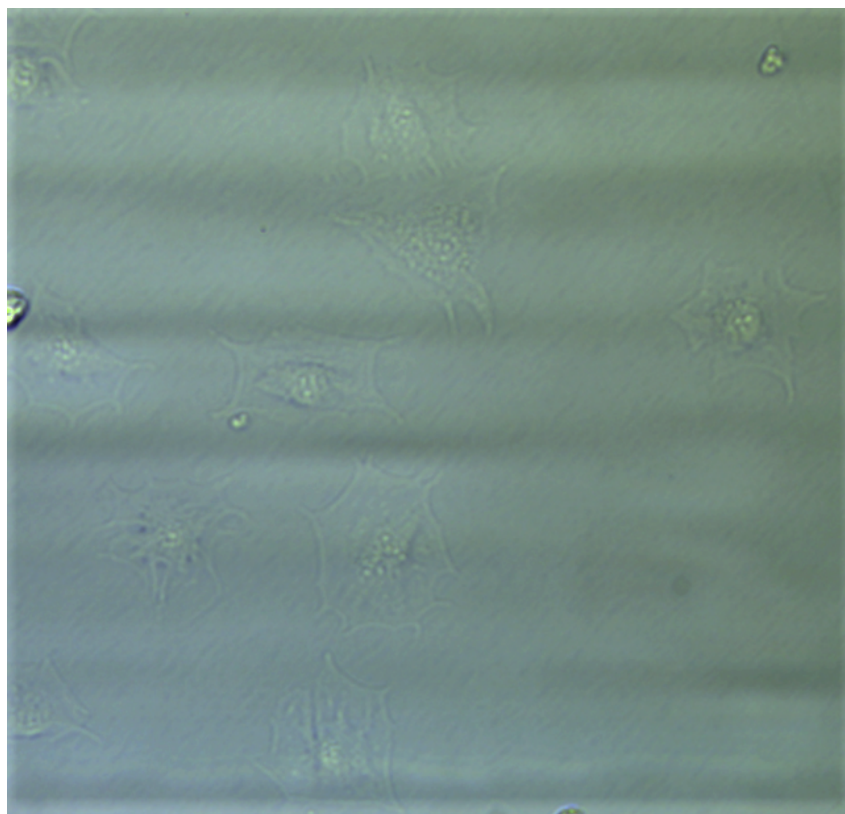


6. ábra. A méréseimhez használt HeLa sejtek a FluidFM mikroszkópjával fotózva. (A tapadás ideje kb. 1.5 óra volt a kép készültekor)

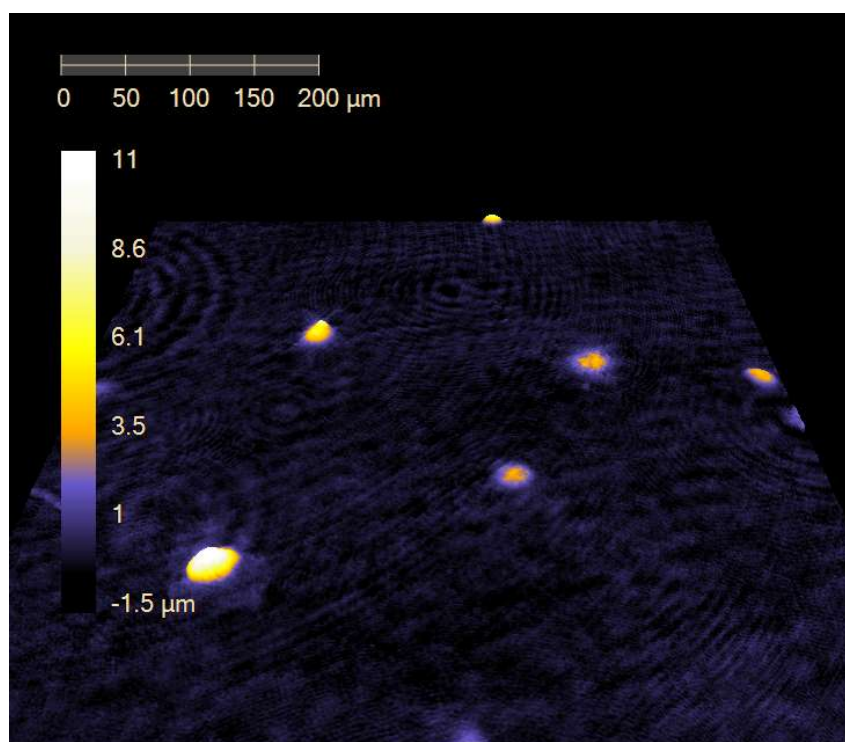


7. ábra. Holomonitorral készült képek RGD-re 2 óra alatt kitapadt HeLa sejtekről

Egyes méréseimhez preosteoblast sejteket használtam. Az osteoblast sejtek egy sejtmaggal rendelkeznek és a csontszövet kialakításában fontos szerepet játszanak. Csontot egy darab sejt nem tud kialakítani, emiatt a folyamatot egy csoportnyi osteoblast végzi. Ezek a sejtek véglegesen differenciálódtak a mezencimális (alapszöveti) őssejtekből. Sűrű keresztkapcsolatokkal rendelkező kollagént és speciális fehérjéket (osteocalcin, osteopontin) termelnek, amik a csontszövet fontos alkotóelemei [4]. A preosteoblast sejtek az osteoblast sejtek elődei. Szabályozzák a csontok kristályosodását és a funkcionális proteinek, mint az alkalin foszfatáz és az oszteocalcin expresszióját. A presoteoblast és az osteoblast sejteket használják szintetikus csontszövetek létrehozásához [13]. A kísérleteimhez használt MC3T3-E1 preosteoblast sejtek egerek koponyájából származnak.



8. ábra. A méréseimhez használt preosteoblast sejtek a FluidFM mikroszkópjával fotózva. (A tapadás ideje kb. 1.5 óra volt a kép készültekor)



9. ábra. Holomonitorral készült képek RGD-re tapadt preosteoblast sejtekről

Az általam használt sejtek rutinszerűen voltak tenyésztve polisztirol Petri-csészékben egy 37 °C hőmérsékletű, 5% CO₂-dal ellátott inkubátorban. Passzáláskor a sejtek pufferoldatokat segítségével fel lettek véve, majd megfelelő tápanyagellátás mellett új Petri-csészébe kerültek.

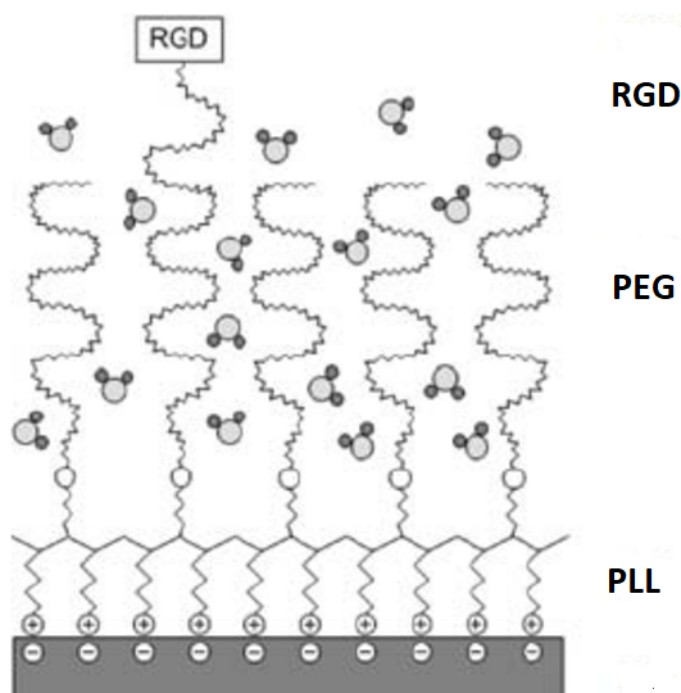
A sima mikroszkópos és a holomonitoros képen is azt látjuk, hogy a preosteoblast sejtek nagyobb területen tapadnak ki, mint a HeLa-k. Holomonitorral nem csak a sejt területe, hanem annak a magassága is megfigyelhető. A képeket kielemezve a HeLa sejtek magassága kb. 6.71-11 μm lehet, míg a preosteoblastoké kb. 3-6.1 μm között mozog. A sejtek átmérőjére pedig átlagosan preosteoblastok esetében 23 μm , HeLa-ra pedig 11 μm adódott.

5.2. Használt puffer oldatok

Mivel fontos, hogy a kísérletek laboratóriumtól függetlenül reprodukálhatóak legyenek a sejtekkel végzett munkám során már korábban bevált standard oldatokat használtam. A méréseknél a sejtek 20mM koncentrációjú 7,4-es pH-jú HEPES-HBSS pufferban voltak. Sejtfelszedés előtt a sejttörmelék eltávolítására DPBS-t használtam, míg a felület létrehozásakor a polimereket 10mM-os HEPES puferral hígítottam.

5.3. A kísérletek során alkalmazott felületi bevonatok

A méréseim felületkezelését PLL-g-PEG-RGD kopolimerrel végeztem [PLL(20)-g(3,5)-PEG(2,3) /PEG(3,4)-RGD]. Az általam létrehozott felület első rétege PLL (poli-L-lizin) volt, ami egy homopolypeptid, és 7.4-es pH-n rendelkezik egy pozitív töltésű hidrofil aminosocsoporttal. Egy PLL felületen a sejtek jól ki tudnak tapadni, viszont ez az anyag nem fordul elő a szervezetünkben, így annyira nem célszerű vizsgálni. A felületben a PLL réteget egy PEG (poli-etilén-glikol) molekularéteg követi, ami szintén hidrofil, viszont taszítja a fehérjéket, s ezen keresztül a sejteket is. A PLL-g-PEG-RGD felület harmadik rétege az RGD (arginin-glicin-aszparaginsav) aminosav szekvencia, mely számos sejtmátrix alkotóelemben megtalálható. Az RGD motívumon keresztül sejtadhéziókor az integrin nevezetű membránproteinek receptorként viselkednek az adhéziós molekulák számára. Mivel a hidrofób PEG hozzátapad a PLL-hez, így a sejtek nem tudnak a PLL-hez kötődni és ezáltal specifikusan vizsgálható az integrin-ken keresztüli sejt-RGD kapcsolat. PLL-PEG-RGD-t alkalmazva lehetőségünk nyílik *in vivo* körülmények szimulálására.



10. ábra. A PLL-g-PEG-RGD szerkezete. Legalul helyezkedik el a petri csésze anyaga, majd ezt követi egy PLL réteg, amire egy hidrofíl PEG réteg lett rárakva. A PEG-hez kötődik az RGD, és a sejtek kitapadásakor ezzel létesítenek kapcsolatot. [8]

6. A mérés menete

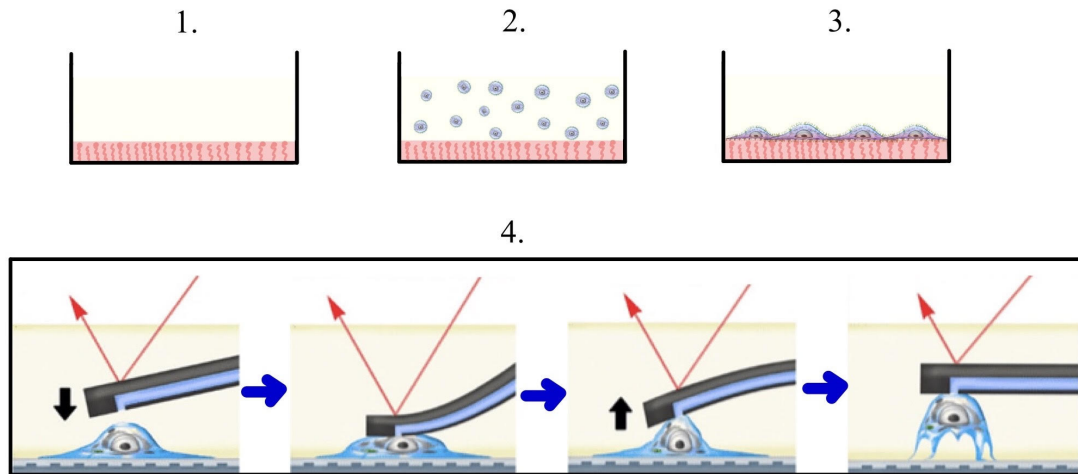
A mérést egy felületkezeléssel kezdtem, mely során 50%-os PLL-PEG-RGD felületet hoztam létre egy műanyag 6 db 35 mm átmérőjű lyukból álló mintatartó egyik lukában. Ehhez egymással megegyező mennyiségű PLL-PEG és PLL-PEG-RGD-t injektáltam egy eppendorfba, majd az oldatot HEPES pufferrel a kétszeresére hígítottam, s így az RGD koncentráció 0.5 mg/ml lett.

A felületkezelést a Petri-csészéből való sejtfelvétel követte. A sejtfelvétel a HeLa és a preosteoblast sejtek esetében hasonló volt. Először Vacusippel vagy pipettával leszívtam a letapadt sejtekről a tápot, majd 2 ml 1xDPBS-t használva eltávolítottam a sejtörmeléket. A DPBS-t először óvatosan a Petri-csésze oldalára pipettáztam, majd leszívtam. Ezt követően a petricsésze méretétől függően 1 vagy 2 ml tripszin-EDTA oldatot pipettáztam a sejtekre, és 2 percig hagytam rajtuk. A tripszin egy fehérjebontó enzim (proteáz), ami hidrolizálja a fehérjékben található peptidkötéseket, melynek következtében a proteinek kisebb peptidekre, majd aminosavakra

bomlanak. Emiatt a tripszin képes a fokális adhíziós komponensek hasítására, s így egy letapadt sejt könnyen felszedhető lesz. A tripszinnel gyakran együtt használják az EDTA-t, mely egy kelátképző molekula. Az EDTA képes két- és háromértékű fémionokkal kelátokat képezni, így a segítségével eltávolíthatóak a Ca^{2+} és a Mg^{2+} ionok, aminek köszönhetően a sejtek ionigényes folyamatai gátolva lesznek, és a sejt-sejt kapcsolatok felbonthatóvá válnak. 2 perc elteltével leszívtam az oldatot, majd az adott sejtípusnak megfelelő tápoldatot pipetázva semlegesítettem a tripszin hatását. Ezután a méréstől függően 1-2 ml tápoldatban felvettem a sejteket, majd a Petri-csészéből egy Falcon-csőbe helyeztem őket. A centrifuga kiegyensúlyozását követően a sejteket 200xg-n 5 percen keresztül centrifugáltam. Centrigulás során elválaszthatjuk a szuszpenzió különböző alkotóit. Ezt a jelenséget a következő összefüggés alapján értelmezhetjük.

$$F_c = F_k = f v = m \left(1 - \frac{\rho}{\rho_r} \right) \omega^2 r \quad (4)$$

ahol F_c a centrifugális erő, F_k a közegellenállási erő, f a közegellenállási együttható, v a részecske sebessége, ω a szögsebesség és $1 - \frac{\rho}{\rho_r}$ a lebegési faktor (ρ a közeg, ρ_r a részecske sűrűsége. Ezek alapján látható a centrifuga elválasztást tesz lehetővé a részecske tömege és sűrűsége szerint[9]. Mivel a sejtek nehezebbek és sűrűbbek a folyadéknál, amiben találhatóak, így a centrifuga cső alján a pelletben találhatók. Emiatt miután az oldatot kivettem a centrifugából leöntöttem a felülúszót, majd 1 ml 20mM HEPES-HBSS-t pipetáztam a sejtekre. Ezt egy a korábbival megegyező paraméterekkel rendelkező centrifugálás és folyadék csere követte. A sejteket felszuszpendáltam, majd Bürker-kamrát használva meghatároztam 1 ml-ben mennyi sejt található. A szuszpenzióból 10 μl -nyit beinjektáltam, majd megsámoltam hány darab sejt helyezkedik el egy 4 db 4x4-es négyzetet tartalmazó területen. A 4 db táblázatban található sejtszámokat kiátlagoltam, ezzel meghatározva az 1 ml-ben található sejtmennyiséget. Ezt követően a hígítás képletét $c_{\text{kezdeti}} V_{\text{kezdeti}} = c_{\text{össz}} V_{\text{össz}}$ (c a szuszpenzió koncentrációja, V pedig a térfogata) alkalmazva kihígítottam a sejtsuszpenziót úgy, hogy a méréshez használt Petri-csészébe körülbelül 30000 sejt kerüljön. A sejteket bele pipetáztam egy 6 db 35 mm átmérőjű lyukat tartalmazó felületkezelte műanyag tartóba, amit 1.5 órára egy széndioxid mentes inkubátorba helyeztem. Az általam használt HBSS HEPES pufferban kevés nátrium-bikarbonát található, így nem szabad benne sejteket szén-dioxid kontroll mellett inkubálni. A tapadási idő lejártá után a mintát behelyeztem a FluidFM jobb oldalára.



1. A felületkezeléssel ellátott petri-csésze.
2. A sejtek petri-csészébe pipettázása
3. A kitapadt sejtek
4. Sejtfelvétel FluidFM-mel.

Bal oldalra egy 24 lyukú mosásra alkalmas műanyag tálcát tettem. Ebből egy méréshez csak 7 lukat használtam, melyekből 3 darabba desztillált vizet, ugyanennyibe puffert és 1 lyukba 14%-os hipót tettem. A FluidFM konzoljában található tartályt feltöltöttem 1 μl pufferral majd azt a műszerbe helyeztem. Ezt követően megmértem a konzol rugóállandóját és beállítottam a lézert, majd nagy nyomással feltöltöttem pufferral a mikrofluidikai csatornát. A minta egy sejtmentes területén megmértem az inverz optikai érzékenységet, majd automatizált adhézió méréssel kijelöltem pár sejtet és beállítottam a megfelelő paramétereket, melyek a következők voltak.

- Konzol sejthez közeledésének sebessége: $50 \mu\text{m/s}$
- A konzolt addig közelíti a felszínhez a műszer, amíg 200 nN erejű ellenállásba nem ütközik
- A sejtet a konzol 5 s, 10 s, 15 s vagy 20 s ideig szívta be az adott mérésnek megfelelően
- Mikrofluidikai csatornában uralkodó nyomás: -300 mbar vagy -700 mbar
- A sejt felfele húzásának sebessége: $1 \mu\text{m/s}$

- Az a távolság a konzol és a felszín között ami felett már nem húzza tovább felfele a sejtet:
HeLa esetén $70\ \mu m$, preosteblastra $85\ \mu m$

Minden egyes sejt felszedést egy mosás követte. Ez szintén automatizálva volt és a Cytosurge által javasolt mosási protokollt alkalmaztuk, mely az alábbi [2]:

anyag	nyomás (mbar)	időtartam (s)
desztillált víz	1000	5
hipó	10	5
hipó	-20	5
hipó	100	5
desztillált víz	500	5
desztillált víz	500	5
puffer	100	5
puffer	100	5
puffer	1	5

1. táblázat. A mosási protokoll egymást követő lépései. Fontos arra figyelni, hogy a hipó folyadékszintje alacsonyabb legyen a vízénél. Ezzel elkerülhetjük, hogy a sejtek számára toxikus hipó rajta maradjon a konzolon.

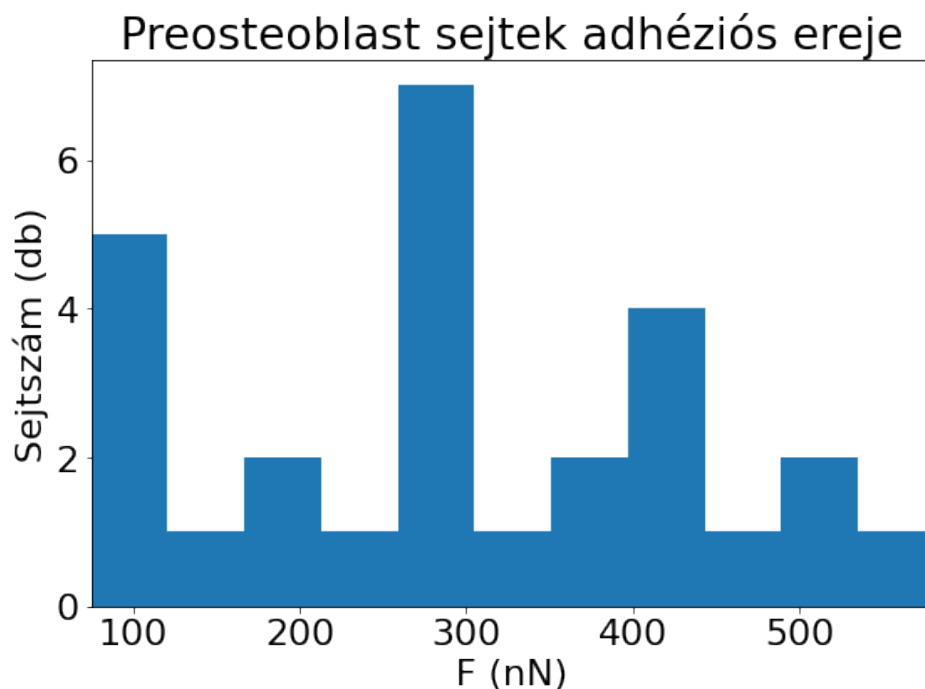
7. Eredmények

A kapott adatok kiértékelését főként saját python kódok segítségével végeztem. A kódjaim validálásához és néhány specifikus adat kiszedéséhez egy a labor munkatársai által írt matlab programot használtam.

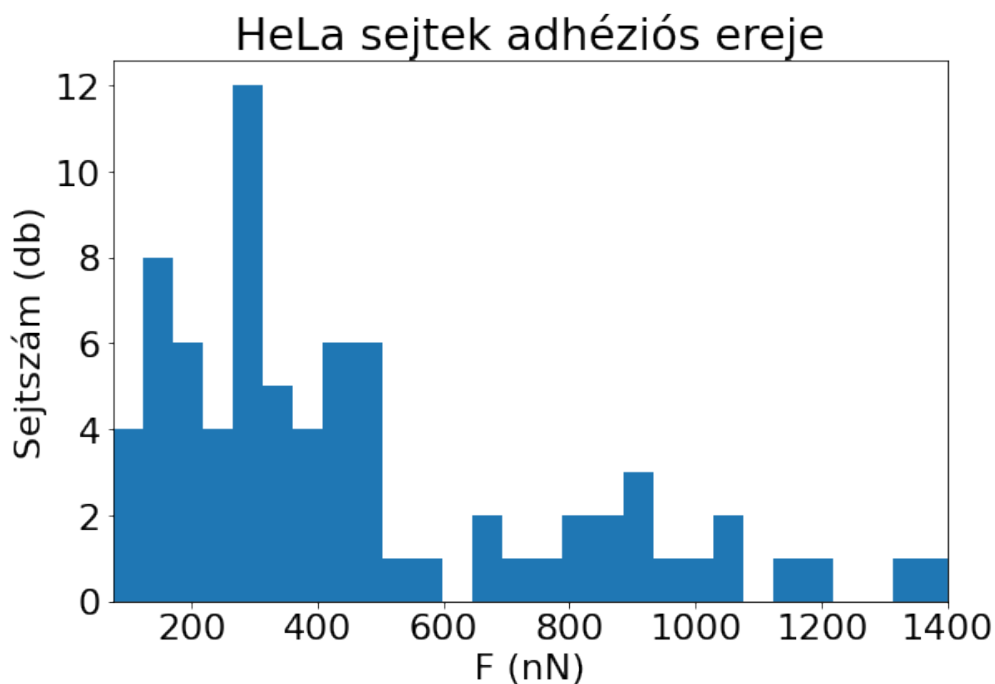
7.1. Az általam vizsgált sejtek adhéziós ereje

A sejtek adhéziós ereje megadja azt az erőt, ami ahhoz kell, hogy egy sejtet egy másik sejttől vagy szubsztráttól szétválasszunk. A méréseim során a műszer által rögzített erő-távolság görbe minimumának értéke megegyezik az adhéziós erővel. Mivel a cég által a műszerhez biztosított ARYA szoftver adhéziós erő meghatározása nem túl pontos, saját python kódok segítségével

megkerestem a minimumokhoz tartozó erők értékét, s az adataimból a különböző sejtekre hisztogramokat készítettem.



11. ábra. *Preosteoblast sejtek adhézíós ereje ábrázolva hisztogramon. A felosztás finomsága 46 nN és az ábra 33 sejtől készült.*



12. ábra. *HeLa sejtek adhézíós ereje ábrázolva hisztogramon. A felosztás finomsága 47 nN és az ábra 77 db sejtől készült*

A mikroszkópos és holomonitoros képek alapján azt várná az ember, hogy mivel a preosteoblast sejt jobban kitapad, mint a HeLa a felületen, az előbbinek nagyobb az adhéziós ereje. Viszont ezzel ellentétben a fenti két ábrán azt látjuk, hogy a kétféle sejt adhéziós ereje alapvetően egy nagyságrendben van, ugyanakkor a HeLa sejtek felvehetnek 600 nN feletti értékeket, ami a preosteoblastokra nem jellemző.

7.2. Optimális paraméterek preosteoblast sejtek számára

Kutatásom kezdetét megelőzte pár sikertelen mérés. Ezen mérések során RGD felületre kitapasztott preosteoblast sejteket próbáltunk felszedni $8\text{ }\mu\text{m}$ átmérőjű, 2 N/m rugóállandójú konzolokkal. A konzol típusa megegyezett a HeLa sejtek számára ideálissal és az egyéb paraméterek is akkorák voltak, hogy nagyon kitapadt sejteket is fel kellett volna tudnunk venni. Ugyanakkor a kísérletek során egyáltalán nem tudtuk ezekkel a beállításokkal felszedni a sejtjeinket. Mivel a szakirodalomban nem találtunk semmi információt a jelenségről és a műszer gyártói se tudtak nekünk beállításokat javasolni, megpróbáltuk magunk kikísérletezni a dolgot. Még a sikertelen mérések során a mikroszkóp képe alapján azt láttuk, hogy a sejtfelszedési folyamat elején van a probléma, a sejt kicsúszik az apertúrából. Felmerülhetne, hogy mivel a preosteoblast sejtek nagyobb területen tapadnak ki az adhéziós erejük is nagyobb, s emiatt nem jók rájuk a HeLa sejtekre bevált paraméterek. Ám mind a sikeres sejtfelszedésekkor meghatározott adhéziós erők, mind a sikertelen próbálkozások erőgörbéi nem erre utatnak. Egy másik elméletünk szerint a preosteoblast sejtek morfológiája eltér a HeLa sejtektől és emiatt a nagyobb apertúrájú konzol nem illeszkedik elég jól a sejtre, így a műszer a felemeléskor elengedi a mintát. Viszont a kísérleteim során azt tapasztaltuk ugyan az apertúra mérete is befolyásolja a sejtfelszedés sikerességét, de nem meghatározó. Sokkal fontosabb a rugóállandó. A preosteoblast sejteket 2 N/m rugóállandójú konzolokkal egyáltalán nem sikerült felszednünk függetlenül attól, hogy a $2\text{ }\mu\text{m}$, $4\text{ }\mu\text{m}$ vagy $8\text{ }\mu\text{m}$ apertúrák közül melyiket használtuk. Ezzel szemben a puhább 0.3 N/m -es konzollal bármely apertúrát választva a sejtek többsége feljött. Ezen kívül változtattuk még a mikrofluidikai csatornában uralkodó nyomást és a sejt-konzol kontakt kialakításának idejét, de egyik se befolyásolta igazán a mérés sikerességét.

Az általunk tapasztalt jelenség pontos magyarázata egyenlőre nem ismert, de vannak különböző lehetséges megoldásaink arra miért járunk sikerrel a puhább konzol esetében. Kisebb rugóállandó esetén a Hook-törvény $F = -kx$, (F az erő, k a rugóállandó, x a megnyúlás) értelmében a

puhább konzollal időegységenként kisebb erőt adunk a sejtre, aminek köszönhetően több idő kell ahhoz, hogy ugyanazt az erőkülönbséget ráadjuk a mintára, így finomabban húzzuk azt. Mivel nem egyből adjuk rá a nagyobb erőt hanem apránként, kisebb eséllyel csúszik ki a minta a konzolból. Ennek a szemléltetésére felállítottunk egy olyan modellt, melyben a sejt-konzol rendszert sorba kötött rugókként kezeljük. A modellben első körben felírtuk a sejtre, mint rugóra és a konzolra a Hook törvényt. Innen:

$$F_s = D_s \Delta x_s \quad (5)$$

Ahol F_s erővel húzzuk a D_s rugóállandójú sejtet, ami ennek a hatására Δx_s mértékben megnyúlik.

$$F_r = D_r \Delta x_r \quad (6)$$

Itt F_r azaz erő, amivel húzva a D_r rugóállandójú konzolt az Δx_r mértékben nyúlik meg. A sorbakötött rugóink esetében a teljes megnyúlás

$$\Delta x = \Delta x_s + \Delta x_r = \frac{F}{D_s} + \frac{F}{D_r} \quad (7)$$

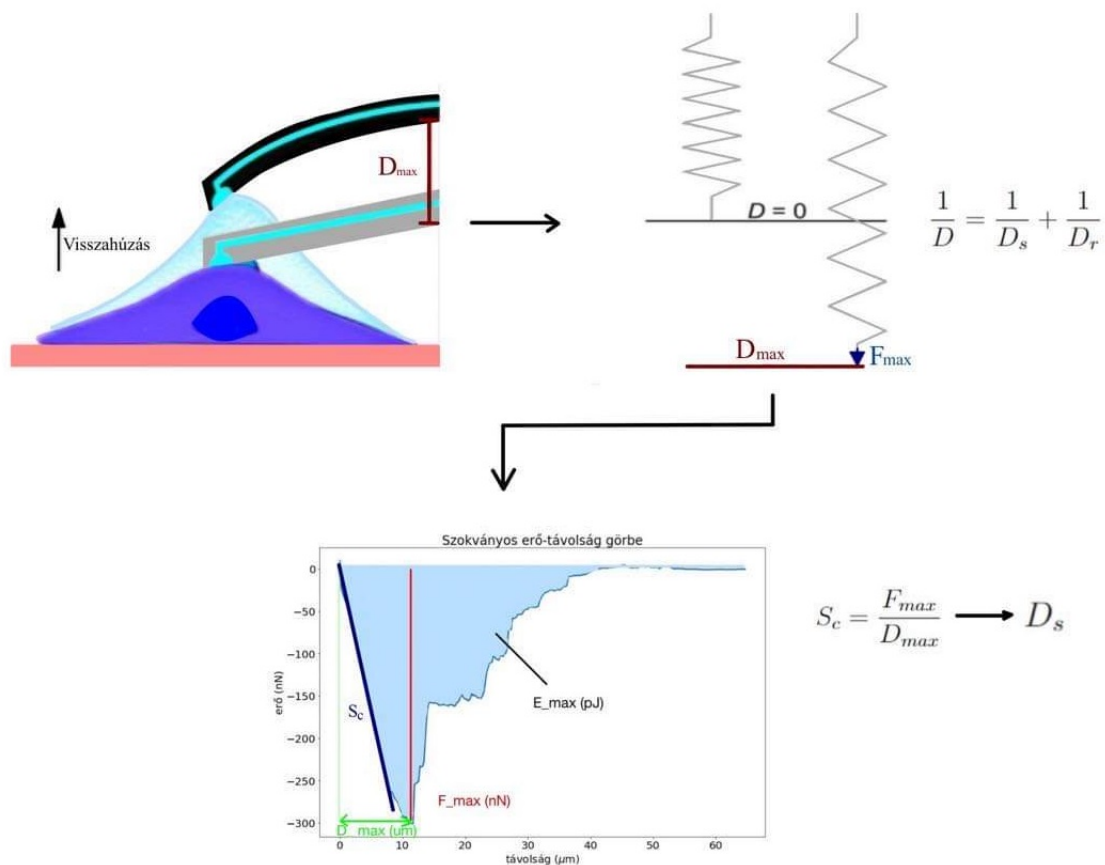
Ahol F az erő amivel a sejt-konzol rendszert húzzuk. A puhább és a keményebb konzol által adott pillanatban kifejtett erőt összehasonlíthatjuk a következő képletet használva:

$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{\frac{1}{D_s} + \frac{1}{D_{r1}}}{\frac{1}{D_s} + \frac{1}{D_{r2}}} \quad (8)$$

A képletből láthatjuk, hogy merevebb sejt esetében nagyobb lesz a két konzol húzóereje között a különbség. A sejtek pontos rugóállandóját sajnos nem tudtam meghatározni. Csak egy a mintára jellemző rugalmassági állandó, mely kiszámolásához a Nagy és társai [20] által bevezetett, rugalmas koefficienszt használtam, ami a következőképpen számolható ki:

$$S_c = F_{max} / D_{max} \quad (9)$$

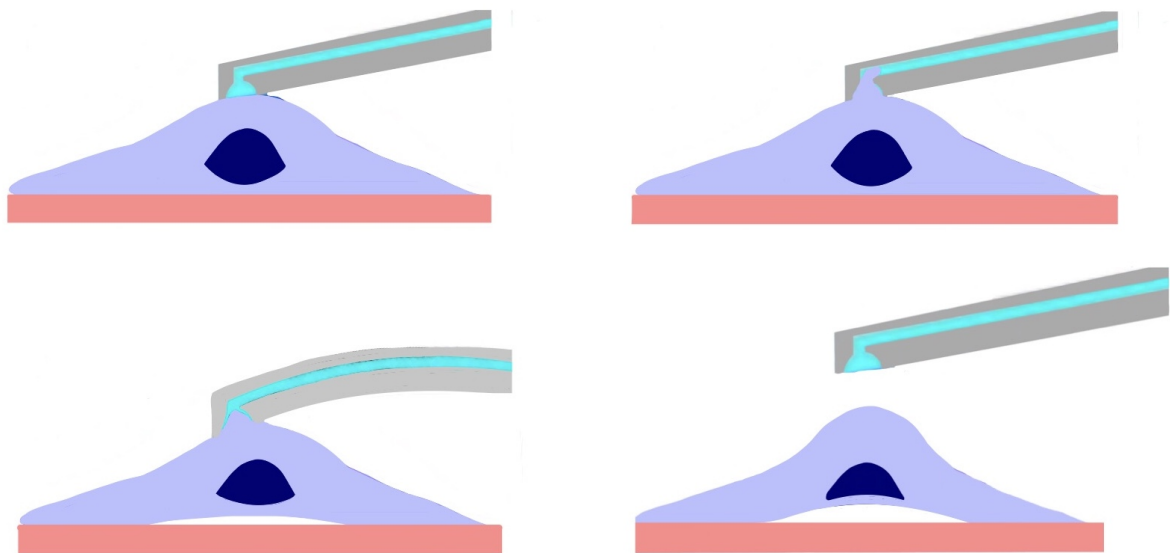
Ahol S_c egy rugalmassági állandó, mely összefüggésben van a sejtek átlagos elaszticitásával, F_{max} a minimumomhoz tartozó erő (a legmélyebb minimum ereje megegyezik a felszakításhoz szükséges erővel, ami maga az adhézis erő), D_{max} pedig a minimumhoz tartozó távolság. A szerzők szerint a konzolt és a sejtet kezelhetjük két sorba kötött rugóként, s így technikailag S_c a sejt-konzol rendszer rugóállandója [20].



13. ábra. Az ábra bal oldalán látható egy nyugalmi állapotban levő és egy megnyújtott sejt. Mellette a sorbakötött rugókkal modellezve a rendszer. Az alsó ábra azt mutatja hogyan lehet egy erőgörbéből meghatározni a sejt rugalmas koefficiensét

A mért erőgörbéimre egyenest illesztettem a maximális erő pontjáig, majd a meredekségből meghatároztam a sejtekre jellemző rugalmas koefficiens. Azt tapasztaltam, hogy HeLa sejtek esetén kisebb ez a meredekség, kb. 0.2 N/m, míg preosteoblastokra 0.6 N/m körüli érték adódott 0.3 N/m rugóállandójú konzolt használva. Mivel a konzol rugóállandója és a rugalmas koefficiens egy nagyságrendbe esik nem mondhatjuk egyértelműen, hogy a 8-as képletben egyik vagy másik tag egyértelműen dominálni fog. Viszont jól látható, hogy egy merevebb sejt esetén nagyobb a különbség a két típusú konzol húzóereje között. Ebből a modelltől HeLa sejtekre 1.13, preosteoblastokra pedig 2.5 adódik a két húzóerő arányára. Az értékeket megvizsgálva az erőkülönbség egy lehetséges, de nem biztos magyarázata annak, hogy csak a puhább konzollal tudjuk felszedni ezeket a sejteket.

Pár sikertelen preosteoblastos mérésnek szintén megvizsgáltam a rugalmas koeficiensét. Itt a konzolból kicsúszás pillanatáig illesztettem. A kapott merekségek több nagyságrendet átívelők voltak, de a legnagyobb is feleakkora, mint a sikeres sejtfelszedések esetében tapasztalt S_c érték. Ebből látszik, hogy a konzol próbálja a sejtet a megengedettnél jobban megnyújtani, amit annak a merevsége nem enged, így kicsúszik az apertúrából.



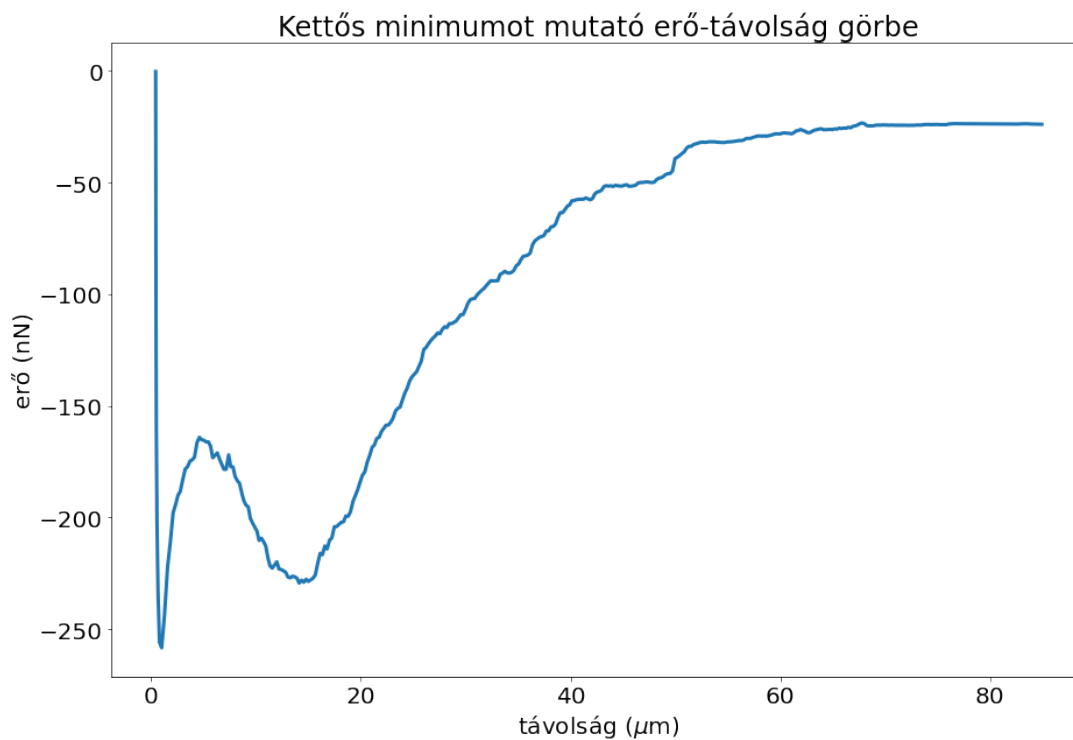
14. ábra. Sikertelen sejtfelszedéskor a korábban beszívott tartomány a felemelést követően kijön a konzolból.

Magát a húzás erejét közvetlenül nem tudjuk állítani csak a konzol felemelésének a sebességét, melyből az erő időderiváltja meghatározható, ha beszorozzuk egy a rendszerre jellemző rugalmas állandóval. A témából tervezett cikkhez a jövőben méréseket fogok végezni a puhább konzollal, melyek során tesztelem az elméletileg kiszámolt erőkülönbséghez hasonló sebességváltoztatás, hogyan befolyásolja a felszedés sikerességét.

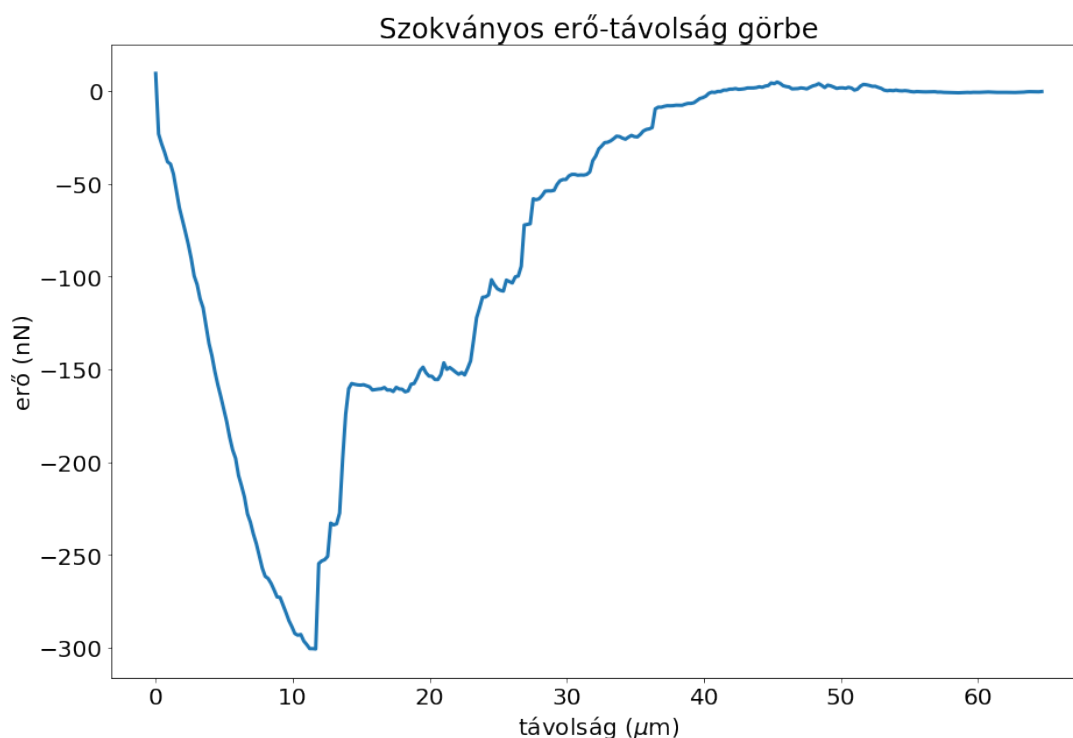
Egy másik lehetséges magyarázat az, hogy a két különböző rugóállandójú konzol kialakítása nem azonos. A merevebbekben a mikrofluidikai csatorna magasabban van, mint a puhábban. Korábbi mikroyöngyökkel végzett kísérletek során azt tapasztalták a keményebb konzolba jobban illeszkedik a kisebb átmérőjű minta, mint a puhábbba. Mivel a preosteoblast sejtek morfológiájukból adódóan laposabbak, s nagyobb területen vannak kitapadva elképzelhető, hogy az alacsonyabb csatornájú, 0.3 N/m-es konzol jobban illeszkedik a sejtre, s így könnyebben be tudja azt szívni [14].

7.3. Kettős minimum vizsgálata

A puhább konzolok esetén mindegyiknél, a keményebb esetében csak a kisebb apertúrájúaknál azt tapasztaltuk, hogy a felszedett sejteknek 30-50%-a a szokványos (2 N/m-es 8 μm apertúrájú konzollal felszedett) erőgörbétől eltérően kettős sminimumot mutat.



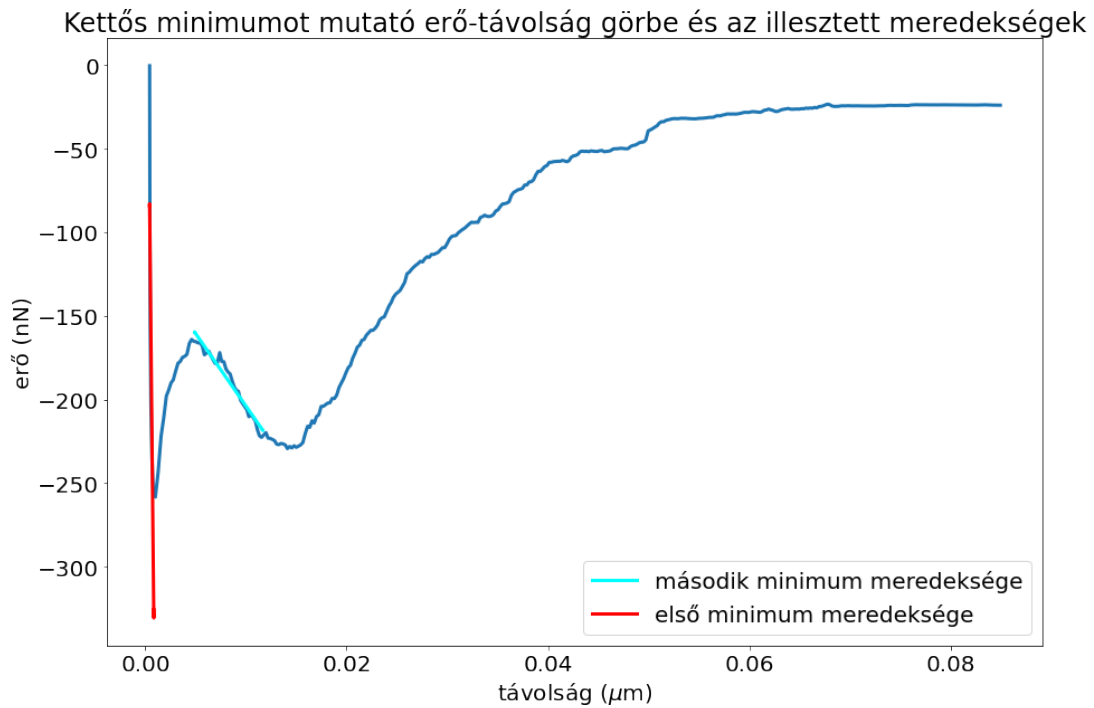
15. ábra. Kettős minimumot mutató erőgörbe



16. ábra. A $8\ \mu\text{m}$ átmérőjű, $2\ \text{N/m}$ rugóállandójú konzollal felszedett sejtek szokványos erőgörbéje.

A kettős minimum jelenségének egy potenciális magyarázata lehet, hogy az adhézión kötések nem egyenletesen oszlanak el a sejt teljes területén, így bizonyos részei erősebben tapadnak. Ennek köszönhetően sejt felszedéskor mikor elérjük az első minimumot a kötéseknek csak egy részét szakítjuk fel. A maradék a második minimum elérésekor szakad fel. A műszerben sajnos nehéz pontosan látni mikor melyik része jön fel a sejtnek, de a működési mechanizmusból adódóan úgy gondoljuk először a középen található centrális kötések szakadnak fel, a szélsők pedig kicsit később a második minimum elérésekor válnak le. Ennek az elméletnek a tesztelésére az az ötletünk, hogy a későbbiekben fluoreszcensen megfestjük a sejtek különböző részeit, ezzel a mikroszkópban jobban láthatóvá téve a sejt felszedés folyamatát.

A kettős minimumot mutató erőgörbék esetében mindkét minimum előtt az adatokra egyenest illesztve meghatároztam a görbék meredekségét.



17. ábra. Kettős minimumot mutató erőgörbe és a minimumokra illesztett egyenesek.

Kiátlagolva a különböző konzolokkal mért erőgörbékre illesztett egyenesek meredekségét a következőket kaptam:

- **HeLa 2 um 0.3 N/m:**

- első minimum meredeksége: $0.140 \pm 0.079 \text{ N/m}$
- második minimum meredeksége: $0.00004 \pm 0.00005 \text{ N/m}$

- **HeLa 4 um 2 N/m:**

- első minimum meredeksége: $0.396 \pm 0.299 \text{ N/m}$
- második minimum meredeksége: $0.00013 \pm 0.0001 \text{ N/m}$

- **HeLa 8 um 0.3 N/m:**

- első minimum meredeksége: $0.29 \pm 0.037 \text{ N/m}$
- második minimum meredeksége: $0.00017 \pm 0.00007 \text{ N/m}$

- **presoteoblast 2 um 0.3 N/m:**

- első minimum meredeksége: $0.735 \pm 0.157 \text{ N/m}$

- második minimum meredeksége: $0.07 \pm 0.01 \text{ N/m}$
- **presoteoblast 8 μm 0.3 N/m:**
 - első minimum meredeksége: $0.485 \pm 0.093 \text{ N/m}$
 - második minimum meredeksége: $0.318 \pm 0.086 \text{ N/m}$

Megvizsgálva a kapott értékeket arra jutottunk, hogy HeLa sejteknél minden konzol esetében az első és a második minimum meredeksége is jelentősen kisebb, mint a preosteoblastoknál. A kapott eredmény alátámasztotta azt, amit vártunk, hiszen az illesztett egyenesek meredekségei a sejteknek egyfajta rugalmasságát jellemzik és a szakirodalom szerint az egészséges sejtek merevebbek, így a preosteoblast esetében nagyobb meredekséget várunk, mint a HeLa-nál. Megvizsgálva a második minimumokat látható, hogy az értékük minden esetben jóval kisebb, mint az első minimumé. Ezt az okozhatja, hogy a sejtek egy része ilyenkor már feljött, és beékelődött a konzol és a még letapadt szakasz közé, ezzel növelve a rendszer rugóállandóját, biztosítva egy finomabb húzóerőt.

8. Összefoglalás

Munkám során egy újszerű egyedi sejt szintű technikának a hatékonyságát fejlesztettem. Az általam használt fluidikai atomerő mikroszkóp kiválóan alkalmas nagyszámú egyedi sejtek adhéziós erejének rögzítésére, és nagy áteresztőképességének köszönhetően az adhéziós paraméterek populáció szintű eloszlása is tanulmányozható a segítségével.

Dolgozatomban azt vizsgáltam hogyan befolyásolják a különböző beállítások és konzol típusok az erősen letapadt sejtek felszakításának a sikerességét.

Kétféle sejtrel (egy egészséges és egy rákos sejt vonallal) végeztem adhéziós kísérleteket. Azt tapasztaltuk, hogy a sejt felszedésnek csak egy paramétere, a konzol rugóállandója befolyásolja a sikerességet. Ennek magyarázatára kidolgoztunk egy modellt, melyben a sejt-konzol rendszert két sorbakötött rugóval modelleztük. Mivel az általam használt egészséges sejtek merevebbek a rákosaknál a két különböző rugóállandójú konzollal gyakorolt erők aránya nagyobb preosteoblast sejtekre, mint HeLa-ra. A puhább konzolokkal időegységenként kisebb erőt adunk a sejtekre, s ezzel kisebb annak az esélye, hogy a sejt felemelés közben kicsúszik a konzolból. Ilyenkor a sejt-konzol kapcsolat ugyan rendesen létrejön, de a sejt ennél a kötődésnél erősebben tapad a felülethez, s felemeléskor folyamatosan jön ki a beszívott sejt darab a konzolból. A sorbakötött rugókon alapuló modellünk alapján számolt erőkülönbség nem túl nagy, így lehet a jelenség magyarázata, de nem kizárt, hogy más effektusok is szerepet játszanak. Ezek közé tartozhat, hogy a puhább és a keményebb konzol csatorna magassága nem ugyanakkora, aminek következtében elképzelhető az alacsonyabb csatorna jobban illeszkedik a preosteoblast sejtekre, mint a magasabb. Ezen kívül puhább és/ vagy kisebb geometriájú konzolokkal viszonylag nagy százalékában a mért erőgörbék kettős minimumot mutatnak. A jelenség mögött az rejlik, hogy a sejt különböző területein található adhéziós kötések nem egyszerre szakadnak fel. A centrálisak előbb, míg a perifériásak csak később. A minimumok előtti szakaszra egyenest illesztettem, melyek meredekségéből azt kaptam az általam használt rákos sejtek rugalmasabbak, mint az egészségesek. Eredményem megegyezik a szakirodalom alapján várttal. Emellett a második minimumok meredeksége jelentősen kisebb az elsőnél, aminek a magyarázata az, hogy miután már pár kötés felszakadt, a sejt egy része beékelődik a letapadt szakasz és a konzol közé, ezzel létrehozva egy a korábbinál kisebb rugóállandójú rendszert.

Összességében munkám során tapasztaltam olyan jelenségeket, amik a szakirodalom alapján várhatóak voltak és olyanokat is, melyek jelen tudomásom szerint még feltáratlanok. Emellett kísérleteim eredményei a jövőben hatékonyabbá tudják tenni a FluidFM-mel végzett méréseket.

9. Köszönetnyilvánítás

A kutatás az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-22-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

Szeretném megköszönni Dr. Horváth Róbertnek, a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport vezetőjének a szakszerű témavezetést és a lehetőséget, hogy a kísérleteimet magas színvonalú közegben, kiváló szakemberek között végezhetem. Köszönettel tartozom Balogh Annának a mérések és ötletelések során nyújtott támogatásáért és segítségéért. Továbbá köszönöm Dr. Szabó Bálintnak a munkámból készült írott dokumentumok átnézését, lektorálását és a kutatásomat előrevivő ötleteket. S nem utolsó sorban szeretném megköszönni Kovács Kinga Dórának a dolgozatom átnézését és a rengeteg szakmai segítséget, amit eddigi munkám során kaptam tőle.

Hivatkozások

- [1] AFM scanning modes.
- [2] Automated SCFS / Adhesion experiment (FluidFM OMNIUM).
- [3] Cell adhesion.
- [4] Osteoblast.
- [5] What is Atomic Force Microscopy (AFM).
- [6] Single-cell technology, 11 2016.
- [7] Nanosurf AG. Using AFM for Cell Adhesion, 8 2018.
- [8] Szabó Bálint. Atomi erőmikroszkópia.
- [9] dr Hegyi György, dr Kardos József, dr Kovács Mihály, dr Málnási-Csizmadia András, Micsonai András, dr Nyitrai László, dr Pál Gábor, dr Radnai László, dr Reményi Attila, and István dr Venekei. *Bevezetés a biokémiába gyakorlati jegyzet*, volume 202. 2013.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Minsoo Kim, Christopher V. Carman, and Timothy A. Springer. Bidirectional Transmembrane Signaling by Cytoplasmic Domain Separation in Integrins. *Science*, 301:1720–1725, 9 2003.
- [13] Zong-Keng Kuo, Po-Liang Lai, Elsie Khai-Woon Toh, Cheng-Hsi Weng, Hsiang-Wen Tseng, Pei-Zen Chang, Chih-Chen Chen, and Chao-Min Cheng. Osteogenic differentiation of preosteoblasts on a hemostatic gelatin sponge. *Scientific Reports*, 6:32884, 9 2016.

- [14] Beatrix Peter, Judit Nador, Krisztina Juhasz, Agnes Dobos, Laszlo Korosi, Inna Székács, Daniel Patko, and Robert Horvath. Incubator proof miniaturized Holomonitor to in situ monitor cancer cells exposed to green tea polyphenol and preosteoblast cells adhering on nanostructured titanate surfaces: validity of the measured parameters and their corrections. *Journal of Biomedical Optics*, 20:067002, 6 2015.
- [15] Prithwidip Saha, Tal Duanis-Assaf, and Meital Rechtes. Fundamentals and Applications of FluidFM Technology in Single-Cell Studies. *Advanced Materials Interfaces*, 7:2001115, 12 2020.
- [16] 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, 1 2020.
- [17] Anna V. Taubenberger, Dietmar W. Hutmacher, and Daniel J. Muller. Single-Cell Force Spectroscopy, an Emerging Tool to Quantify Cell Adhesion to Biomaterials. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 20:40–55, 2 2014.
- [18] Rita Ungai-Salánki, Benjamin Csippa, Tamás Gerecsei, Beatrix Péter, Robert Horvath, and Bálint Szabó. Nanonewton scale adhesion force measurements on biotinylated microbeads with a robotic micropipette. *Journal of Colloid and Interface Science*, 602:291–299, 11 2021.
- [19] Rita Ungai-Salánki, Beatrix Peter, Tamás Gerecsei, Norbert Orgovan, Robert Horvath, and Bálint Szabó. A practical review on the measurement tools for cellular adhesion force. *Advances in Colloid and Interface Science*, 269:309–333, 7 2019.
- [20] Ágoston G. Nagy, Nicolett Kanyó, Alexandra Vörös, Inna Székács, Attila Bonyár, and Robert Horvath. Population distributions of single-cell adhesion parameters during the cell cycle from high-throughput robotic fluidic force microscopy. *Scientific Reports*, 12:7747, 5 2022.
- [21] Ágoston G. Nagy, Judit Kámán, Róbert Horváth, and Attila Bonyár. Spring constant and sensitivity calibration of FluidFM micropipette cantilevers for force spectroscopy measurements. *Scientific Reports*, 9:10287, 7 2019.