

A glikokálix sejtadhézióban betöltött szerepének kísérleti és elméleti vizsgálata

Készítette:

Szin Dorina

BME VBK Biomérnök BSc hallgató

TDK dolgozat

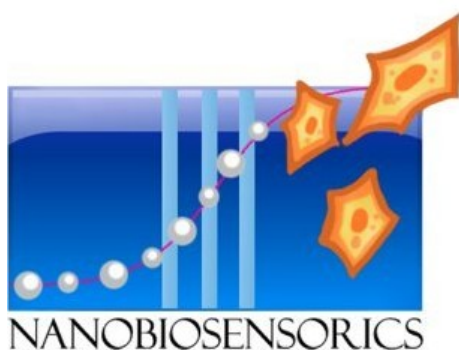
Témavezető:

Dr. Kovács Boglárka

Konzulensek:

Magyaródi Beatrix

Balogh Anna



Energiatudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi
Nanobioszenzorika Laboratórium

Tartalomjegyzék

Absztrakt.....	4
Abstract.....	4
Célkitűzés.....	5
Bevezetés, irodalmi áttekintés.....	7
1. Sejtadhézió fogalma és jelentősége.....	7
2. Adhéziós molekulák.....	7
3. Integrin.....	8
4. Glikokálix szerkezete.....	11
5. Glikokálix funkciói.....	12
5.1 Immunfelismerés, szializáció.....	12
5.2 Endoteliális mechanoszenzor.....	13
5.3 Glikokálix összetételének hatása a sejt morfológiára.....	13
5.4 A glikokálix vastagságának hatása a sejtadhézióra, integrin receptorokra.....	14
5.5 Integrinek és szindekánok szinergikus hatása a sejtadhézióra.....	15
5.6 Integrinek glikozilációja.....	15
5.7 Glikokálix és rák kapcsolata.....	15
Felhasznált eszközök és módszerek.....	16
Jelölésmentes optikai bioszenzorok.....	16
Epic® BenchTop jelölésmentes optikai bioszenzor.....	17
RGD biofunkcionalizált felület.....	18
Kísérletek bemutatása.....	19
Sejtfelvétel.....	20
Elméleti modell és programleírás.....	21
Integrin-RGD kötések reakciókinetikai modellje.....	21
Modellillesztő kód leírása.....	23
Adatok kiértékelése, illesztések eredménye.....	28
Enzimek hatása a maximális kitapadásra és az illesztett paraméterekre.....	29
A paraméterek közötti kapcsolat.....	33
Eredmények értelmezése.....	37
Konklúzió.....	40
Köszönetnyilvánítás.....	41
Irodalomjegyzék.....	42

Rövidítés jegyzék

ECM	extracelluláris mátrix	extracellular matrix
RGD	arginin-glicin-aszparaginsav	arginine-glycine-aspartic acid
PLL	poli-L-lizin	poly-L-lysine
PEG	poli-etilén-glikol	poly-ethylen-glycol
PLL-g-PEG	poli-etilén-glikollal funkcionizált poli-L-lizin	poly-L-lysine grafted poly-ethylen-glycol
DMEM	Dulbecco módosított Eagle médium	Dulbecco's modified Eagles medium
DPBS	Dulbecco fiziológiás foszfát puffer	Dulbecco's phosphate-buffered saline
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav	Ethylene-diamine-tetraacetic acid
HBSS	Hank-féle normalizált sóoldat	Hank's balanced salt solution
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil-etánszulfonsav	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
RWG	rezonáns rácsos hullámvezető	resonant waveguide grating

Absztrakt

A glikokálix a sejt felszínén megtalálható szénhidrátban gazdag, gél-szerű, negatív töltésű struktúra. Számos funkciója közül az egyik legfontosabb a sejtadhézióban betöltött szerepe, melynek mechanizmusa még nem teljesen megértett. Ez intenzív kutatás tárgya, mivel a rákos sejtek glikokálix jellegzetes eltéréseket mutat az egészséges sejtektől, például eltérő a glikozilációjuk és a sejt felszínükön túlexpresszálnak az erős glikozilált fehérjéket.

A dolgozatomban különböző glikokálix komponenseket emésztő enzimek sejtadhéziójára gyakorolt hatását vizsgáltam. A mérések jelölésmentes optikai bioszenzorral készültek RGD biofunkcionalizált felületen. A mérési adatokra az integrin-ligandum kötések kialakulását, felbomlását és az adhéziós zónába integrinek toborzását leíró matematikai modellt illesztettem.

Abstract

The glycocalyx is a carbohydrate-rich, gel-like, negatively charged structure located on the cell surface. Among its numerous functions, the most important is its role in cell adhesion, the mechanism of which is not yet fully understood. This is an area of intense research because the glycocalyx of cancer cells differs from that of healthy cells in characteristic ways, such as differences in glycosylation and the overexpression of highly glycosylated proteins.

During my study, I analyzed the effect of various enzymes that digest glycocalyx components on cell adhesion. The measurements were conducted using a label-free optical biosensor on different RGD biofunctionalized surfaces. I fitted a mathematical model to the measurement data describing the formation and breakdown of integrin-ligand complexes and the recruitment of integrins to the adhesion zone.

Célkitűzés

A dolgozatom célja a glikokálix komponenseket emésztő enzimekkel kezelt sejtek adhéziós kinetikájának vizsgálata. A sejtek letapadása közben mért jelre modellt illesztettem, aminek segítségével következtetéseket vontam le az integrin-RGD interakciók megváltozásáról reakciókinetikai szempontból.

A kísérleteket különböző sejtvonalakkal és három fajta enzimmal végeztük el. A vizsgált enzimek különböző glikánokat emésztnek le a sejtfelszínen megtalálható fehérjékről. Mivel a dolgozatomban szereplő eredmények publikálás alatt állnak, kódneveket használok az enzimek és sejtvonalak jelölésére.

A mérések Corning Epic® Benchtop System-mel, egy jelölésmentes optikai bioszenzorral készültek RGD biofunkcionalizált PLL-g-PEG felületen. A használt felület lehetővé teszi a sejtek letapadása során az integrin-RGD komplexek kialakulásának tanulmányozását, mivel meggátolja a nem integrin-RGD specifikus sejt és felület közötti sejtadhéziós kölcsönhatások létrejöttét [1].

A mért adatokra a következő modellt illesztettem, mely a sejtek kitapadása során az integrin-RGD interakciót írja le [2]:

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

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

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

I a szabad integrinek, L a szabad ligandumok, B pedig az integrin-ligandum komplexek felszíni koncentrációját jelöli. A k_1 az asszociációs, k_2 a disszociációs sebességi együttható. Az integrintoborzást leíró egyenletben (3) k_3 jelöli az integrintoborzás sebességi együtthatóját az adhéziós zónába, $I_{\max}$ pedig a maximális integrin koncentrációt a sejtfelszínen az adhéziós zónában.

A differenciál egyenletrendszer numerikus megoldásához és a mért jel megillesztéséhez Julia-ban kódot fejlesztettem. A megillesztett paraméterek alapján elemeztem az eltérő tendenciákat különböző enzim koncentrációk és sejtípusok esetén.

Bevezetés, irodalmi áttekintés

1. Sejtadhézió fogalma és jelentősége

A sejtadhézió nélkülözhetetlen a többsejtű organizmusok számára, mivel hozzájárul a sejtek közötti kapcsolatok fenntartásához, az információátvitelhez és a sejtek alakjának, szerkezetének és működésének szabályozásához. Mivel a sejtadhézió szerepe a sejtek életciklusának minden szakaszában fontos és változatos [3], ennek megértése kulcsfontosságú egyaránt fiziológiás és patológias jelenségek értelmezése szempontjából is. Ezek közé tartozik például a vér-agy gát működése [4] és a daganatok érhálózatának kialakulása [5].

Az itt bemutatott irodalmi áttekintés célja, hogy bemutassa a sejtadhézióban résztvevő fontosabb molekulákat, legnagyobb részletességgel az integrint, valamint rávilágítson a glikokálix sejtadhézióban betöltött szerepére és biológiai jelentőségére. Továbbá ismerteti a glikokálix és a sejtadhézió biofizikai vizsgálati módszereit.

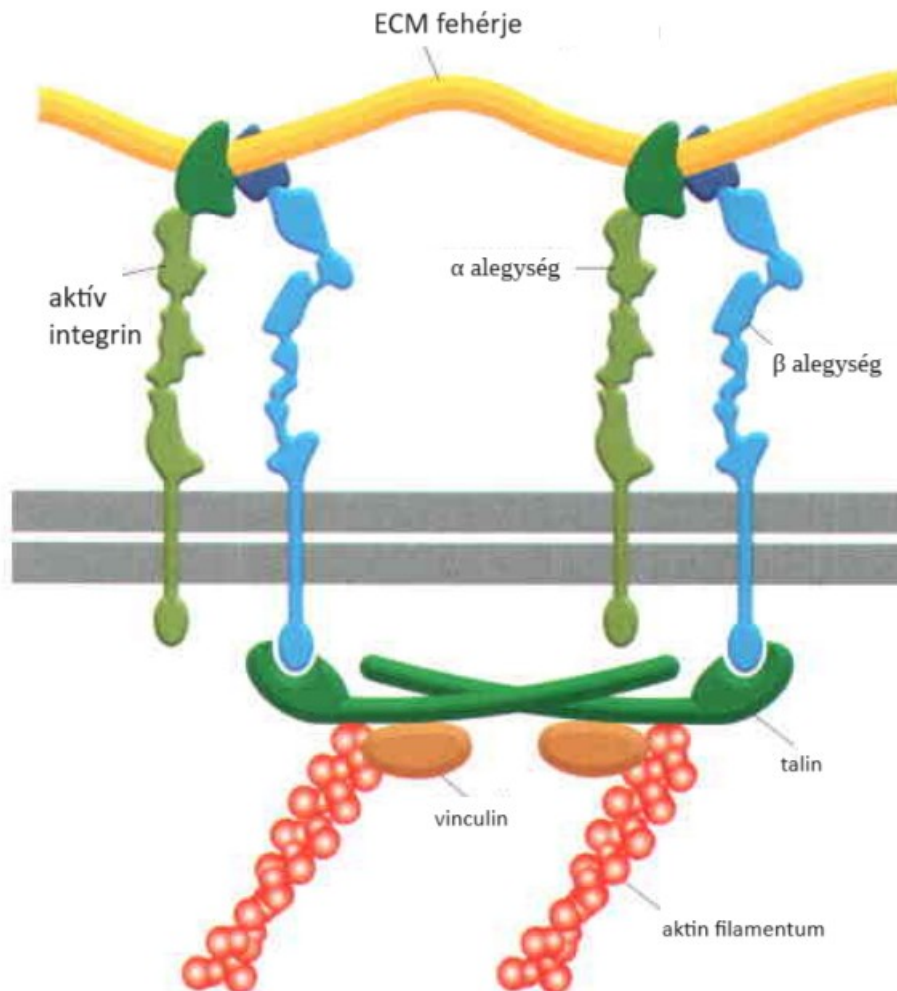
2. Adhéziós molekulák

Az adhéziós molekulák olyan fehérjék a sejt felszínén, amelyek lehetővé teszik a sejt-sejt és a sejt-extracelluláris mátrix (ECM) kölcsönhatást. A összeköttetést létesítő transzmembrán fehérjék intracellulárisan horgonyzódnak a sejtvázhoz, ebből kifolyólag a sejtadhézió befolyásolja a sejt morfológiáját, motilitását és a citoszkeleton szerveződését is.

A szerkezeti tulajdonságaik és funkcióik szerint az adhéziós molekulák négy csoportba sorolhatóak: integrinek, szelektinek, kadherineik, és az immunoglobulin szupercsalád tagjai. Ezek közül a kadherineik és immunoglobulin szupercsalád tagjai homotípiás interakciókba lépnek, azaz más sejteken kötődnek azonos típusú adhéziós molekulákhoz. Az integrinek és a szelektinek pedig heterotípiás kötéseket alakítanak ki, azaz más típusú molekulákhoz kapcsolódnak. A sejtadhéziós molekulák közül az integrinek, szelektinek és kadherineik Ca^{2+} -ionoktól függenek, míg az immunoglobulin szupercsalád tagjai Ca^{2+} -ionoktól függetlenek [6], [7].

3. Integrin

Az egyik legfontosabb ECM-sejt összeköttetésért felelős adhéziós molekula az integrin [8]. Az integrin receptorok nem csak minden emlősben, hanem sok más organizmusban, például fonalférgekben, szivacsokban és korallokban is megtalálhatók [9].



2. ábra: Az integrinek ECM-hez és aktin citoszkeletonhoz rögzülése[6].

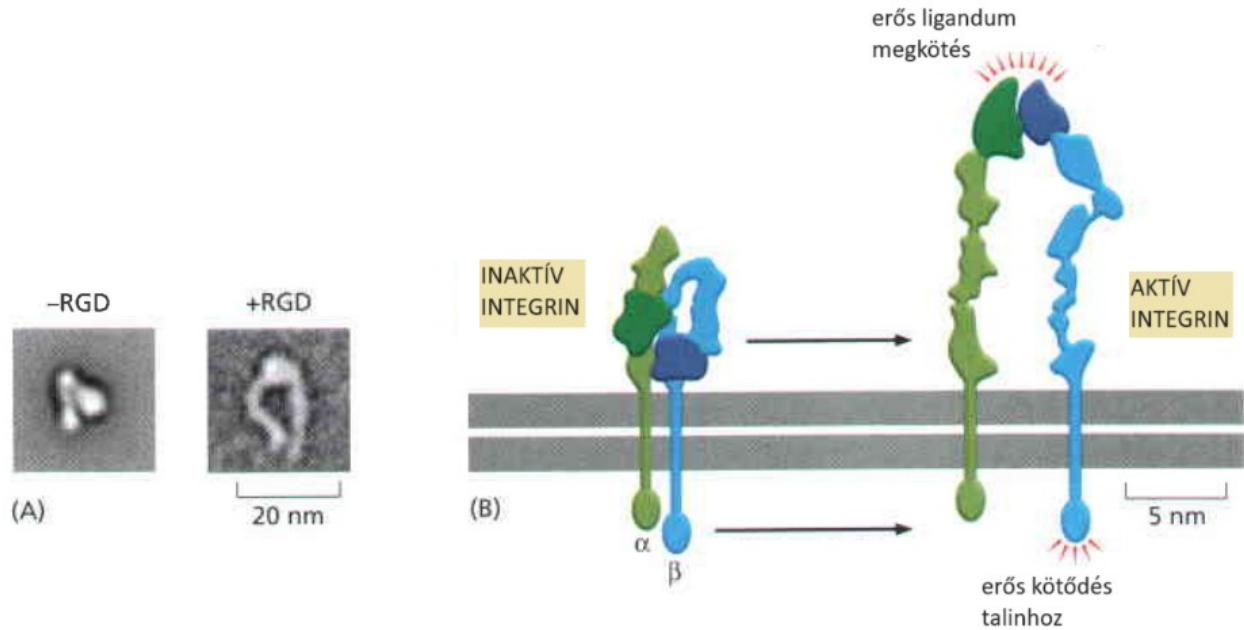
Az integrinek intracellulárisan kapcsolódnak kinázokhoz és a citoszkeletonhoz (aktin vagy intermedier filamentumokhoz) más fehérjéken keresztül (talin, vinculin) [6], [10], (2. ábra).

Extracellulárisan kötődhetnek ligandumokon keresztül az ECM különböző fehérjéihez (fibronektin, laminin, kollagén) vagy más sejteken található adhézis molekulákhoz (ICAM, VCAM-1). Ebből a kapcsolódási struktúrából kifolyólag az integrinek képesek fizikai összeköttetést és bidirekcionális jelátvitelt biztosítani a sejt és az ECM között [11].

Az integrin felépítését tekintve egy heterodimer transzmembrán glikoprotein, mely egymáshoz nem-kovalensen kötődő alfa és béta alegységekből áll. Az integrin alegységei egyszer szelik át a membránt, extracelluláris részük - ahol a ligandumkötő régiójuk található - hosszabb (700-1100 aminosav), mint az intracelluláris (20-30 aminosav) [12].

Jelenleg a gerincesekben 18 alfa és 8 béta integrin ismert, melyek összesen 24 különböző heterodimert alkotnak. A dimerösszetételtől függ az integrin affinitása különböző ligandumokhoz, fehérjékhez. Ligandum specifitása alapján a heterodimerek lehetnek: RGD, laminin, fehérvérsejt specifikus és kollagén receptorok. Az $\alpha 5 \beta 1$ heterodimer például RGD ligandumon keresztül kapcsolódik az ECM-ben lévő fibronektinekhez. Az RGD szinergiapeptidhez a 24 heterodimer közül 8-nak van affinitása: $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha v \beta 6$, $\alpha v \beta 1$, $\alpha v \beta 8$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha I \beta 3$, és $\alpha 8 \beta 1$ [11].

Az integrin ligandum megkötése közben konformáció-változáson megy keresztül (3. ábra). Az integrin konformációi közül a behajlottat alacsony affinitásúnak és inaktívnak, a megnyúltat pedig az ECM komponenseivel szemben magas affinitásúnak és aktívnak feltételezik. Az integrin inaktívból aktív állapotba lépésével asszociált konformáció változást a húzófeszültség idézi elő. A ligandum megkötésekor stabilizálódik a konformáció és az alegységek C-terminális oldalai közötti távolság megnő [13], [13]–[15].



3. ábra: (A) integrin konformációváltozása RGD ligandum megkötésekor elektronmikroszkóppal vizsgálva (B) az integrin aktiválódásakor történő konformációváltozás sematikus ábrázolása [6]

Az ECM ligandumainak megkötése az integrineken jelátviteli folyamatokat indít meg, aminek hatására az integrin citoplazmabeli C-terminálisához más fehérjék asszociálódnak és az integrinek a sejtmembránban elkezdenek aggregálódni, úgynevezett fokális adhéziós korongot képezve [16]. A kitapadás a kialakult fokális adhéziós korongon keresztül befolyásolja az aktinváz szerveződését és a sejtciklust [17], [18].

4. Glikokálix szerkezete

A glikokálix a sejt felszínén található szénhidrátban gazdag gél-szerű, negatív töltésű struktúra, ami nagyrészt glikolipidekből és glikoproteinekből áll. A glikokálixban található cukor molekulák integráns membránfehérjékhez és lipidekhez kapcsolódnak, azokkal glikoproteineket, glikolipideket és proteoglikánokat alkotva. A glikoproteinek olyan fehérje molekulák, amikhez kovalens kötással cukor molekulák kapcsolódnak. A glikolipidek lipid része a kettős foszfolipid rétegből álló plazmamembrán külső rétegébe vannak beágyazódva. A glikolipidekben a lipid részhez kovalens kötással kapcsolódik egy rövid szénhidrátlánc. A glikoproteinek és glikolipidek szintézise az endoplazmás retikulumban és a Golgi-készülékben zajlik. A lipidekre és a fehérjékre a cukordekoráció a Golgi-készülékben kerül rá. A proteoglikánok erősen glikozilált fehérjék, fehérjevázukhoz a szerin hidroxil csoportjánál glükózaminoglikán (GAG) láncok kapcsolódnak O-glikozidos kötással. A GAG-ok lineáris, ismétlődő diszacharid egységekből álló, negatív töltésű, polarizált és nagy mennyiségű víz megkötésére képes molekulák. A GAG-ok közé sorolhatóak: hialuronán, heparán-szulfát, heparán, kondroitin-szulfát, dermatán-szulfát és a keratán-szulfát. A hialuronán bioszintézise, szekréciós útvonala és sejtmembránhoz kapcsolódása szempontjából különbözik a többi glükózaminoglikántól. Szintézise nem az ER-ben és a Golgi készülékben, hanem a sejtmembránban található hialuronán-szintázok által zajlik [19]. A hialuronán a sejtfelszínen nem egy proteoglikánhoz kapcsolódik kovalens kötással, hanem a sejtfelszínhez a CD44 és RHAMM receptorokon keresztül rögzül [20].

5. Glikokálix funkciói

Már régóta ismert funkciója a glikokálixnak, hogy fizikai védelmet nyújt a sejt számára és megnehezíti a patogének bejutását a sejtbe. Azonban a glikokálixnak számos más funkciója is van, hiszen a sejt és a környezete közötti első érintkezési pont révén szerepet játszik a legtöbb biológiai folyamatban.

Egy adott glikokálix komponens szerepe a sejt-sejt és sejt-ECM kölcsönhatások szempontjából nagyon komplex. A glikozilált membránfehérjéknek megfigyelhetők bizonyos specifikus funkciói, mint például az integrin esetében a szelektív ligandum megkötés. Viszont ezeket a funkciókat nem csak izoláltan, hanem a receptorokat körülvevő glikokálix tulajdonságainak függvényében érdemes értelmezni, hiszen a receptorok működésére hatással van a környezet, amiben operálnak. Ez a jelenség nem csak bizonyos receptorok szinergikus működésére vagy egy adott receptor működését befolyásoló glikozilációra terjed ki, hanem a sejtfelszín biofizikai tulajdonságaira is, mint például a glikokálix vastagsága, töltése és a makromolekulák felszíni sűrűsége.

Ez a szemléletmód, ami a glikokálixot komplex receptorműködési interfésznek tekinti nagyon hasznos az enzimek integrin-RGD által kialakult sejtadhézióra gyakorolt hatásának megértésében. Ennek fényében az alábbiakban részletesebben ismertetem a glikokálix sejtadhézió és az enzimek által módosított glikoziláció szempontjából releváns funkcióit.

5.1 Immunfelismerés, szializáció

A glikokálix fontos szerepet játszik az immunrendszer működésében, szabályozásában és a fertőzések kialakulásában. Fertőzések során az első érintkezési pont a vírus és sejt között a sejtfelszínen elhelyezkedő glikokálix, ezért a vírusos fertőzések mechanizmusa úgy fejlődött, hogy kihasználja ezt a kapcsolódási pontot [21], [22].

Az immunfelismerésben jelentős szerepet játszó glikokálix komponens a szialsav, ami egy főleg glikolipidek és glikoproteinek szénhidrát láncainak terminális pozíciójában elhelyezkedő negatív töltésű monoszacharid. A különböző szializációs minták alapján az immunrendszer meg tud különböztetni saját és invazív sejteket (kórokozók, tumor sejtek) [23], [24].

Ennek megfelelően a szialsav részt vesz az immunrendszer homeosztázisának fenntartásában, a szializáció megvédi a „saját” sejteket a túl nagy mértékű immunaktivációtól. Az immunrendszer moduláló hatását a szializációnak a tumor sejtek is felhasználják az immunrendszer elkerülésére [25]. A szialsav az immunfelismerésen kívül számos más funkciót tölt be, amik a szializálódott glikokálix biofizikai tulajdonságaiból fakadnak. A szialsav hozzátesz a sejtfelszín hidrofóbicitásának és negatív töltésének kialakulásához. Ez a negatív töltés a sejt-sejt taszítást eredményez, ami hasznos a nemkívánatos sejt-sejt tapadás elkerülése szempontjából, például megnehezíti a vörösvérsejtek aggregációját [26].

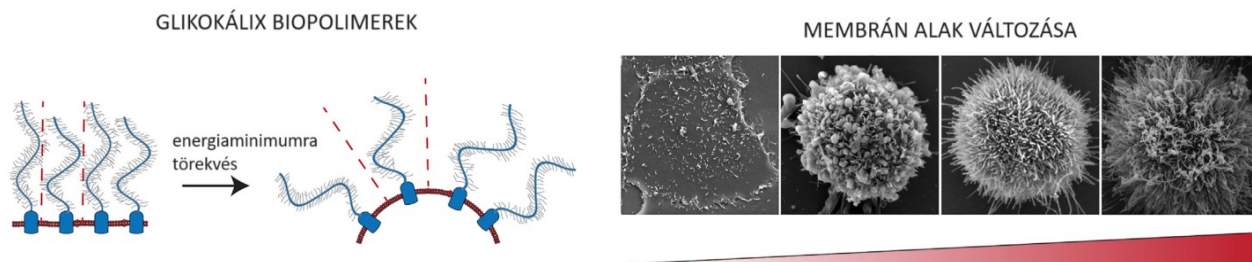
Továbbá a szialsav fontos tulajdonsága, hogy elfedhet receptorokat és ezáltal megakadályozhatja aktiválásukat: például $\beta 1$ integrin szializációja gátolja a galektin-3-hoz tapadást és ezáltal védelmet nyújt a sejtnek az apoptózis ellen [27].

5.2 Endoteliális mechanoszenzor

Ezen felül a glikokálix endotél sejtekben mechanoszenzor funkciót tölt be, ami által véráramlás hatására a sejtfelszínre kifejtett változó mértékű nyomás és nyírófeszültség függvényében a sejt képes modulálni a NO termelést [28]. Ezt a mechanotranszdukciós folyamatot a sejtfelszínen elhelyezkedő sok heparán-szulfát GAG láncot tartalmazó proteoglikánok szabályozzák [29].

5.3 Glikokálix összetételének hatása a sejtmorfológiára

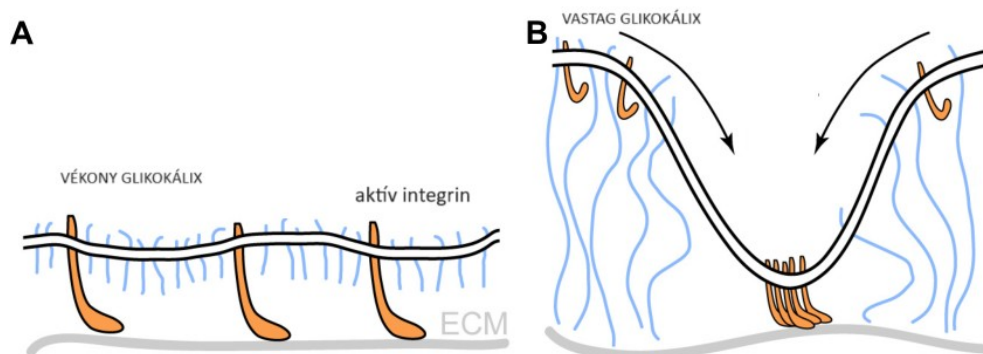
A glikokálix befolyásolja a sejt morfológiáját is. Az intracelluláris dinamikán kívül a sejtfelszínen található biopolimerek (pl.: mucin, hosszú flexibilis proteoglikán) sűrűségének függvényében ébredő erők is befolyásolják a sejtmembrán alakját az energiaminimumra törekvés elve szerint (4. ábra). Ezek az erők kedvezhetnek a membrán begyűrődések, nyúlványok kialakulásának, amikről vezikulák fűződhetnek le. A glikokálix polimerjeinek ezen sejt morfológia moduláló tulajdonsága a tumor sejtek szempontjából nagyon érdekes, mivel az agresszív rákos sejtekre sokszor jellemző a tubuláris membrán alak, amiről sok vezikula fűződik le [20], [30].



4. ábra: A membrán alak változása a biopolimer sűrűség hatására [30]

5.4 A glikokális vastagságának hatása a sejtadhézióra, integrin receptorokra

A glikokális vastagsága hatással van az integrinek működésére. Egy vékony glikokális esetében az integrin receptorok kicsit jobban kilóghatnak a glikokálisból, ebben az esetben az integrinekre ható húzófeszültség minimális (5. ábra A). Egy vastag glikokális esetében ahol az integrin receptorok nem érnek ki eléggé a glikokálisból, nem tudnak interakcióba lépni az ECM-el. Viszont ahol kialakult az összeköttetés, ott a ligandumkötött integrinekre nagy húzófeszültség hat és ezek az integrinek is kifejtenek erőt a környezetükben lévő nagyobb glikokális komponensekre (5. ábra B). Ahol kialakul adhézió, ott az integrinek nagy sűrűséggel fordulnak elő és környezetükben összenyomódik a többi hosszú glikoprotein és glikolipid. Az ilyen kialakult glikokális összehúzódásoknál sok integrin csoportosul. Ezáltal egy vastag glikokális annak ellenére, hogy az integrin-ligand kötések létrejöttének kinetikai sebessége alacsonyabb, segítheti a fokális adhéziós korongok kialakulását. A nagy méretű glikoproteineket túlexpresszáló tumor sejtek adhézióját valószínűleg segíti ez az effektus [20], [31].



5. ábra: A glikokális vastagságától függően kedvezhet a fokális adhéziós korongok kialakulásának. (A) vékony glikokális (B) vastag glikokális [20]

5.5 Integrinek és szindekánok szinergikus hatása a sejtadhézióra

Az integrin-RGD bekötődés általi kitapadást befolyásoló glikokálix komponensek a szindekánok, amik heparán-szulfát vagy kondroitin-szulfát glükózaminoglikán láncokat tartalmazó proteoglikánok. A szindekánok az integrinokkal szinergikus interakcióban alakítják ki a sejtadhéziót. A fokális adhéziós korongok kialakulása a fibronektinen való kitapadás közben az integrin és szindekán receptorok aktiválásával történik. A fibronektin esetében $\alpha 5 \beta 1$ és a szindekán-4 együttes hatása érvényesül, de más-más ECM fehérjét tartalmazó felületeknél változó, hogy a kitapadást mely integrin – szindekán páros kontrollálja [32].

5.6 Integrinek glikozilációja

Az integrinek N-glikozilációja szükséges megfelelő működésükhöz. Glikozilációjuk megváltozása a sejt-sejt, sejt-ECM kölcsönhatásokra hatással van [33]. Az integrin alegységek alulglikoziláltsága megnehezíti az adhézió során a sejtek kiterülését és befolyásolja az $\alpha \beta$ dimer asszociációt [34], [35].

5.7 Glikokálix és rák kapcsolata

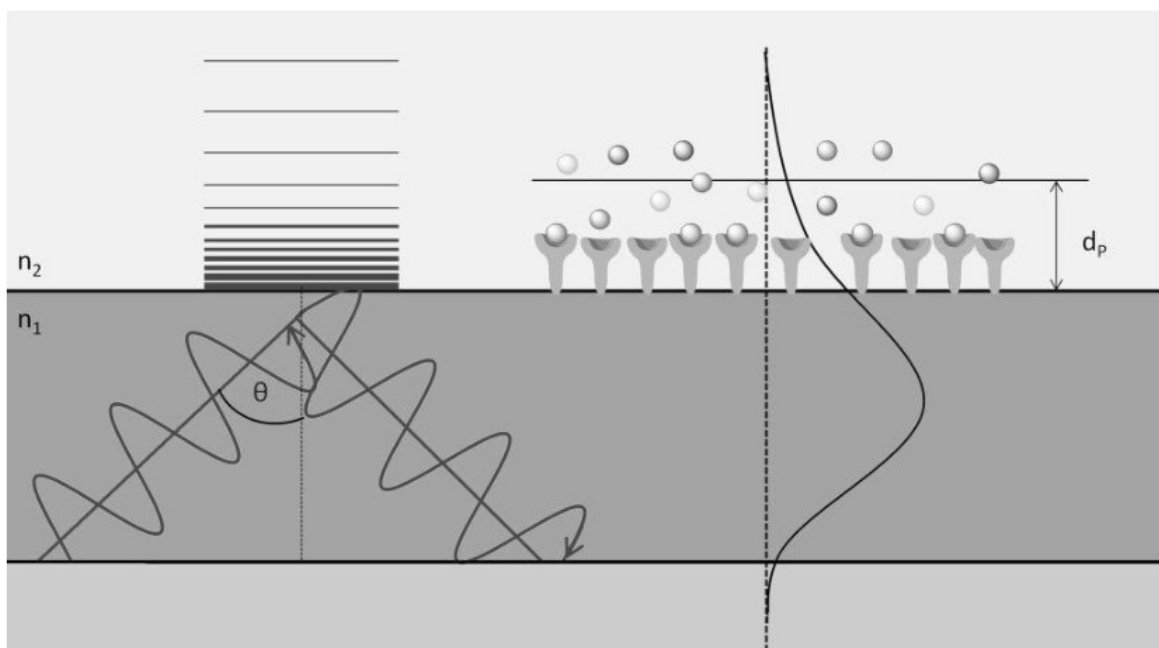
A rákos sejtek 95%-ának a glikokálixának a vastagsága és összetétele jellegzetes eltéréseket mutat az egészséges sejtektől, például túlexpresszálják a nagy méretű komponenseket: sejtfelszínükön gyakran több mucin és hialuronán található [2], [30], [36]. Sejtfelszínükön sűrűbben helyezkednek el a hosszú biopolimerláncok, ez a fizikai és elektrosztatikai szempontból megváltozott környezet receptoraik működésére is hatással van [20]. A daganatsejtek receptorainak mutációi és a funkcióikat befolyásoló környezet elváltozásai aszerint választódnak ki, hogy mikroevolúciós előnyöket biztosítsanak a sejt számára [37]. A környezettel való interakció és a külső ingerek feldolgozása oly módon változik meg, hogy a tumorsejtek sejthalált előidéző ingereket figyelmen kívül hagyják, a növekedést elősegítő ingereket pedig felerősítik [38]. Ennek a jelenségnek az egyik formája a megváltozott glikoziláció [39]. Bizonyos glikozilációs elváltozások segítik a tumor sejtek áttét képzését és az immunfelismerés elkerülését, ilyen gyakran előforduló elváltozás például a hiperszialisáció, ami feltehetően csökkent neuraminidáz és megnövekedett szialil-transzferáz aktivitás eredménye [25].

Felhasznált eszközök és módszerek

Jelölésmentes optikai bioszenzorok

A jelölésmentes bioszenzorok lehetővé teszik a sejtek vizsgálatát jelölő molekula használata nélkül. Ezek a bioszenzorok a vizsgált sejtek és biomolekulák bizonyos tulajdonságainak változását követik nyomon, például optikai törésmutató, elektromos vezetőképesség vagy akusztikus hullámok változása.

A jelölésmentes optikai bioszenzorok érzékelési módszerei közé tartoznak a felületi plazmon rezonancia (surface plasmon resonance, SPR), az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (optical waveguide lightmode spectroscopy, OWLS), kettős polarizációs interferometria (dual-polarization interferometry, DPI) és a ráccsatolt interferometria (grating coupled interferometry, GCI) [40]. Ezek a módszerek mind az evanescens hullám jelenségén alapulnak.

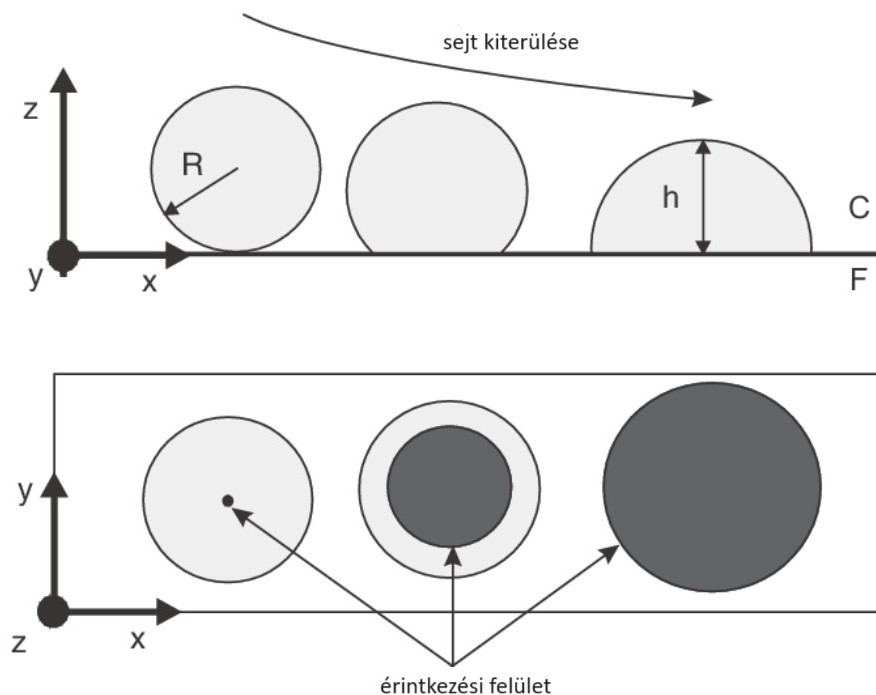


6. ábra: A közeghatáron átlépő fény intenzitása exponenciálisan csökken, a behatolási mélység (d_p) 100-200 nm. Ebben az evanescens térben érzékelhetők a biomolekulák kölcsönhatásai [43].

Az evaneszcens hullám (6. ábra) a közeghatáron átlépő fény, aminek az intenzitása a szomszédos médiumba érve exponenciálisan csökken, behatolási mélysége 100-200 nm-ig terjed. Ez alakítja ki az evaneszcens teret, ami lehetővé teszi ebben szenzorfelszínhez közeli a régióban a biomolekulák kölcsönhatásainak megfigyelését, ezen kölcsönhatások által bekövetkezett törésmutató-változás érzékelésével. A sejtadhéziót kialakító receptor-ligandum komplexek ebben a maximum 200 nm-es távolságban a szenzorfelületről jönnek létre, ezért az evaneszcens tér-alapú jelölésmentes optikai bioszenzorok ideálisak a sejtadhéziós folyamatok vizsgálatára. Ezen felül a mért jel nem csak az átlagos sejt-szenzorfelület érintkezéstől függ, hanem az optikai sűrűségtől is, így a szenzor nem csak a sejtek kiterülésének mértékéről, hanem a sejtadhézió erősségéről is információt szolgáltat [41].

Epic® BenchTop jelölésmentes optikai bioszenzor

A Corning® Epic BenchTop System egy nagy áteresztőképességű, jelölésmentes evaneszcens tér-alapú optikai bioszenzor, ami élő sejtek adhéziójának valós idejű vizsgálatára alkalmas. Ez egy rezonáns rácsos hullámvezető (resonant waveguide grating, RWG) technológián alapuló szenzor, tehát érzékeli és rögzíti a sejtek kitapadásakor megváltozó törésmutatót. Az érzékelt hullámhossz eltolódásból lehet következtetni az azt befolyásoló biológiai folyamatokra. Például megváltoztatja a törésmutatót a sejtek letapadáskori szétterülése (7. ábra). Szuszpenzióban a sejtek gömb alakúak, viszont miután letapadtak a szenzor felületére és kilapulnak, idővel nagyobb felületen érintkeznek vele. A hullámhossz változását az adhézió során kialakuló receptor-ligandum komplexek is befolyásolják. A műszer egy mikrotálca leolvasóból és egy 384 well-es mikrotálcából áll, így egyidejűleg akár több száz minta is vizsgálható vele.



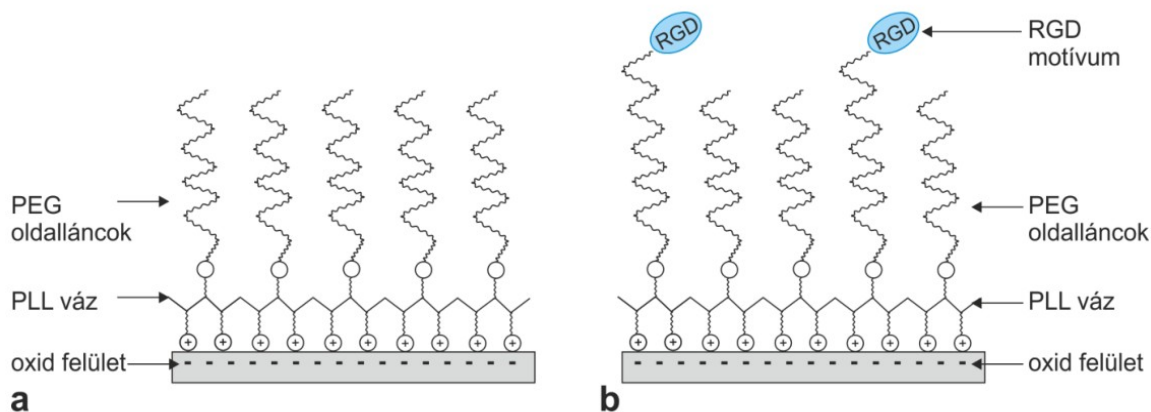
7. ábra: A sejtek kitapadása során egyre nagyobb felületen érintkeznek a szenzorlappal [42].

RGD biofunkcionalizált felület

A kísérletek során a bioszenzorban a sejtek RGD biofunkcionalizált poli-L-lizinnel funkcionizált poli-etilén-glikol (PLL-g-PEG) felületen tapadtak ki (8. ábra).

A PLL-g-PEG egy spontán önszerveződő monomolekuláris réteget alkot a felületen. Ennek a monomolekuláris bevonatnak a gerince a pozitív töltésű poli-L-lizin (PLL), ez lép elektrosztatikus kölcsönhatásba a negatív töltésű oxid felülettel. A PLL-hez nem töltött, flexibilis, hidrofíli polietilén-glikol (PEG) oldalláncok kapcsolódnak, amik RGD szinergiapeptiddel biofunkcionalizálhatók [40].

A kísérletekben használt felületen a PEG 50%-ához kötődik RGD motívum, ami lehetővé teszi a sejtek megfelelő mértékű kitapadását [1]. Mivel a nem RGD biofunkcionalizált PLL-g-PEG kémiaiilag inert, azaz nem hoz létre sejtadhéziós kötéseket és nem lép reakcióba a sejtfelszín molekuláival, a használt PLL-g-PEG-t és PLL-g-PEG-RGD-t 1:1 arányban tartalmazó felület alkalmas az integrin-RGD bekötődés reakciókinetikai vizsgálatára.



8. ábra: (a) PLL-g-PEG önmagában nem teszi lehetővé a sejtek adhézióját, PEG oldalláncok meggátolják a fehérjék adszorpcióját a felületre (b) PLL-g-PEG-RGD felületre ki tudnak tapadni a sejtek integrin által [40]

Kísérletek bemutatása

A méréseket, amiken részt vettem Magyaródi Beatrix végezte Epic BenchTop jelölésmentes optikai bioszenzorral. A mérés első szakasza a felületkezelés, mely során RGD funkcionális PLL-g-PEG bevonatot alakítunk ki a 384 lyukú mikrotálcan. Ennek első lépése a mikrotálca lyukainak hidratálása 30 μ l/lyuk 10 mM HEPES MQ-val. A mikrotalcát centrifugáljuk, ennek célja a buborékok eltávolítása. Majd 20 percre feltesszük a billegtetőre a hidratáló folyadék egyenletes eloszlása végett. Ezután eltávolítjuk a hidratáló folyadékot és belekerül a PLL-g-PEG-RGD és PLG-g-PEG 1:1 arányú elegye. Centrifugálás és 30 perc billegtetés után mossuk a mikrotálca lyukait 20 mM HBSS-HEPES pufferrel (pH 7.4), hogy eltávolítsuk belőlük a felesleges reagenst. A különböző enzim koncentrációkat 20 mM HBSS-HEPES pufferrel (pH 7.4) hígítva készítjük el, hígítási sorral. A mikrotalcát a megfelelő enzim koncentrációk felvitele után berakjuk a szenzorba és felvesszük az alapvonalat. Az alapvonal felvételt általában addig érdemes futni hagyni, amíg a mért jelek nem kezdenek el párhuzamossá válni. Miután beáll az alapvonal felvisszük a sejteket digitális pipetta segítségével a mikrotalcára. Ezután a jelrögzítés a szenzorban 2 óráig fut. A mérés után a mikrotálca lyukairól fénymikroszkóppal 20x nagyítással képeket készítünk.

Sejtfelvétel

A mérésekhez használt sejt kultúrák az inkubátorban 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom mellett voltak fenntartva. A sejtfelvétel előtt mikroszkóppal ellenőrizzük a csésze konfluenciáját és a sejtek morfológiáját. A sejtfelvételhez szükséges folyadékokat 15 percre berakjuk 37 °C-os vízfürdőbe melegedni.

Először steril fülke alatt leszívjuk a DMEM tápot. Ezután eltávolítjuk a sejt törmelékét 2 ml DPBS-el. A fokális adhézión korongokat 1 ml tripszin-EDTA hozzáadásával vágjuk el, amit 2 percig hagyunk állni a sejteken. A tripszin egy sejt felszedésre használt szerin proteáz, ami a fokális adhéziónban részt vevő fehérjék peptid kötéseit elvágja a lizin és az arginin C-terminálisánál. Az EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) egy kelátképző: Ca²⁺, Mg²⁺ ionokkal komplexet képez. Az EDTA ezáltal javítja a tripszin hatékonyságát. A tripszin-EDTA leszívása után hozzáadunk 1 ml DMEM tápot. A csészét megdöntve az aljáról ki kell pipettázni az oldatot és a tetejéről visszaönteni. Így addig kell mosni a sejteket, amíg a csésze alja már nem opálos. Ezután átpipettáztuk a sejteket Falcon-csőbe és 5 percig centrifugáljuk őket. Ezután leöntjük a folyadékot a pellettel átellenes oldalon és hozzáadunk 1 ml HBSS-HEPES-t. 5 perc centrifugálás után ismét leöntjük a felülúszót a pellettel átellenes oldalon. Ezután hozzáadunk 1 ml HBSS-HEPES-t.

Alapos szuszpendálás után a sejtes oldatból 10 µl-t a Bürker-kamrára pipettázunk és megszámloljuk a sejteket. Ezután a sejtes oldatot a megfelelő koncentrációjúra hígítjuk. A kísérletek során a mikrotitertálcára 8000 sejt/lyuk került.

Elméleti modell és programleírás

Integrin-RGD kötések reakciókinetikai modellje

Azon feltételezés alapján, hogy az integrin-RGD komplexek kialakulása során egy integrin kapcsolódik nem kovalensen egy RGD ligandumhoz, felírható a következő reakcióegyenlet:



Ahol k_1 az asszociációs, k_2 pedig a disszociációs sebességi együtthatók, B jelöli a létrejött integrin-RGD komplexet, L a szabad RGD ligandumokat, I pedig a szabad integrineket. A disszociációs és asszociációs reakciósebességi együtthatók hányadosa a “2D” disszociációs állandó:

$$(5) \quad {}^{2D}K_d = \frac{k_2}{k_1}$$

Az általában használatos, irodalmi értékekkel összevetésre alkalmas “3D” disszociációs állandó ebből úgy számítható ki, ha elosztjuk az átlagos sejt-szubsztrát távolsággal, ami 100 nm [1]:

$$(6) \quad {}^{3D}K_d = \frac{{}^{2D}K_d}{l_c} \quad l_c = 100nm$$

A sejt kitapadása során ellaposodik és a szenzorlappal nagyobb felületen érintkezik, továbbá képes integrint toborozni az aktív adhézión zónába, emiatt a modellben számításba kell venni az ezáltal bekövetkező szabad integrinszám növekedést. Ez alapján felírható a következő differenciálegyenlet rendszer [2]:

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

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

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

k_1 : integrinek és ligandumaik asszociációjának sebességi együtthatója

k_2 : integrinek és ligandumaik disszociációjának sebességi együtthatója

k_3 : integrintoborzás sebességi együtthatója az adhézión zónába

$I_{\max}$: maximális integrin koncentráció a sejtfelszínen az adhézión zónában

B: integrin-ligandum komplexek felszíni koncentrációja

L: szabad RGD ligandumok felszíni koncentrációja

I: szabad integrinek felszíni koncentrációja

A kialakult komplexek felszíni koncentrációja arányos a sejt kitapadása során mért hullámhossz-eltolódással. Az illesztéshez a pm-ben mért adatokat át kell váltani $(\mu m)^{-2}$ -be. Kanyó és munkatársai meghatározták a hullámhossz-eltolódás és a kialakult komplexek felszíni koncentrációja közötti konverziót:

$$(7) \quad 1pm \leftrightarrow \frac{1}{200} (\mu m)^{-2}$$

Mivel a kísérletek során a sejtek legalább 2 óráig tapadnak ki a szenzorfelületen, elérik a maximális kitapadási szintet. Így a görbe maximumán már beállt az egyensúly, amire a modell alapján felírható a következő képlet:

$$(8) \quad B_{max} \approx B_e = L_0 \cdot I_m \cdot \frac{k_1}{k_2} = \frac{L_0 \cdot I_m}{2D K_d}$$

$B_{\max}$: az integrin-ligandum komplexek felületi koncentrációjának a maximuma a mérés során

B_e : a modell szerint az integrin-ligandum komplexek felületi koncentrációja egyensúlyban

Modellillesztő kód leírása

A programozási nyelv kiválasztásakor a fő szempont az volt, hogy a nyelvhez tartozzon olyan differenciálegyenlet megoldó csomag ami jól kezeli a numerikusan instabil „stiff” modelleket. A biológiai rendszereket leíró modellek illesztésekor gyakran felmerül a numerikus instabilitás problémája, ami azt jelenti, hogy a megoldás során keletkező hiba továbböröklődik. Az optimalizálás során fontos, hogy a differenciálegyenletek megoldása ne csak pontos, hanem gyors is legyen, hiszen az optimalizáció során különböző paraméterekkel sokszor meg kell oldani a legjobb illeszkedés megtalálásához. Emiatt olyan programozási nyelvet kerestem a modellillesztéshez, amiben sok numerikus módszer közül lehet válogatni és a Jacobi-mátrixot is meg lehet adni analitikusan a megoldás gyorsításához és pontosításához. Ezeket a szempontokat figyelembe véve a modellillesztéshez a Julia-t választottam.

A Julia egy viszonylag új, nyílt forráskódú, dinamikusan fejlődő programozási nyelv, amit leginkább tudományos számítások, gépi tanulás és adatbányászat területén használnak. Egyik előnye a nagy gyorsasága, ami a C és a Fortran programozási nyelvekéhez hasonló. A differenciálegyenlet rendszer megoldásához a Christopher Rackauckas által fejlesztett DifferentialEquations.jl csomagot használtam.

Több különböző megoldási módszerrel is kísérleteztem. A legpontosabbak a Rosenbrock23() analitikusan definiált Jacobi-mátrix használatával és egy Sundials.jl segítségével meghívott C natív Newton-Krylov módszer voltak. Az utóbbi a Jacobi-mátrix analitikus definiálása nélkül a pontosságot nagyon magas iterációval éri el. Ennek a megoldási ideje hosszabb 100 μ s-nál, ezért inkább a Rosenbrock23()-t használtam. Ennek a megoldását nem csak pontosítja, hanem gyorsítja is a Jacobi-mátrix (9) analitikus definiálása a numerikus közelítése helyett, így a megoldási időt le tudtam csökkenteni 39,8 μ s-ra.

$$(9) \quad J = \begin{bmatrix} \frac{\partial \dot{B}}{\partial B} & \frac{\partial \dot{B}}{\partial L} & \frac{\partial \dot{B}}{\partial I} \\ \frac{\partial \dot{L}}{\partial B} & \frac{\partial \dot{L}}{\partial L} & \frac{\partial \dot{L}}{\partial I} \\ \frac{\partial \dot{I}}{\partial B} & \frac{\partial \dot{I}}{\partial L} & \frac{\partial \dot{I}}{\partial I} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -k_2 & k_1 \cdot I & k_1 \cdot L \\ k_2 & -k_1 \cdot I & -k_1 \cdot L \\ k_2 + k_3 \cdot (I_m - I) & -k_1 \cdot I & -k_1 \cdot L - k_3 \cdot B \end{bmatrix}$$

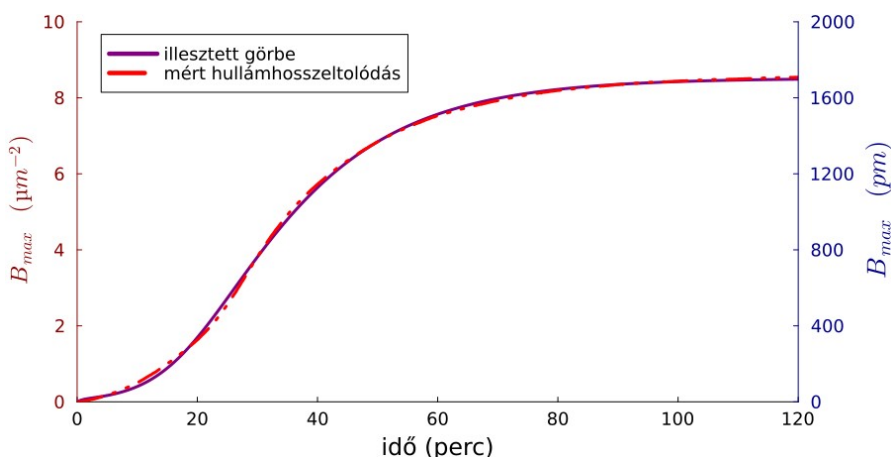
A differenciálegyenlet megoldásakor a következő kezdeti értékeket használtam:

$$(10) \quad B_0 = 0 (\mu m)^{-2}, \quad L_0 = 15000 (\mu m)^{-2}, \quad I_0 = 0.1 (\mu m)^{-2}$$

Ahol B_0 , L_0 , I_0 az integrin-RGD komplexek, szabad ligandumok és szabad integrinek felszíni koncentrációja a $t = 0$ s időpillanatban. A mérés idejét a sejtek szenzorlapra pipettázásától számítom.

A görbeillesztést nem egy általában használatos funkcióval végeztem, mint például a `scipy.optimize.curve_fit`, mert ezek a gradiens módszer nehézségei miatt hajlamosak beragadni egy lokális minimumnál. Ennek a problémának a kiküszöbölésére a `BlackBoxOptim.jl` csomagot választottam, ami alkalmas a sok paraméteres, számításigényes problémák globális optimalizálására. Az optimalizáláshoz írtam egy legkisebb négyzetek veszteségfüggvényt, amit minimalizáltam `BlackBoxOptim.jl` csomag algoritmusainak segítségével.

A kiértékelő kód beolvas két excel fájlt: a szenzorból kijött adatokat és egy táblázatot, ami tartalmazza a mikrotálca lyukaiban található enzimkoncentrációkat. Ez alapján a kód hasznos vizualizációkat (9. ábra) készít a kapott eredményekről, majd elmenti az adatokat a $\text{pm} \leftrightarrow (\mu\text{m})^{-2}$ konverzió után `jld2` formátumban, amiket az illesztéshez használt kód be tud olvasni. Julia-ban definiáltam egy struktúrát, ami hasznos a mért adatok és illesztett paraméterek eltárolására `jld2` formátumban. Ez a struktúra lehetővé teszi sok mérés gyors összehasonlítását és kielemezését.

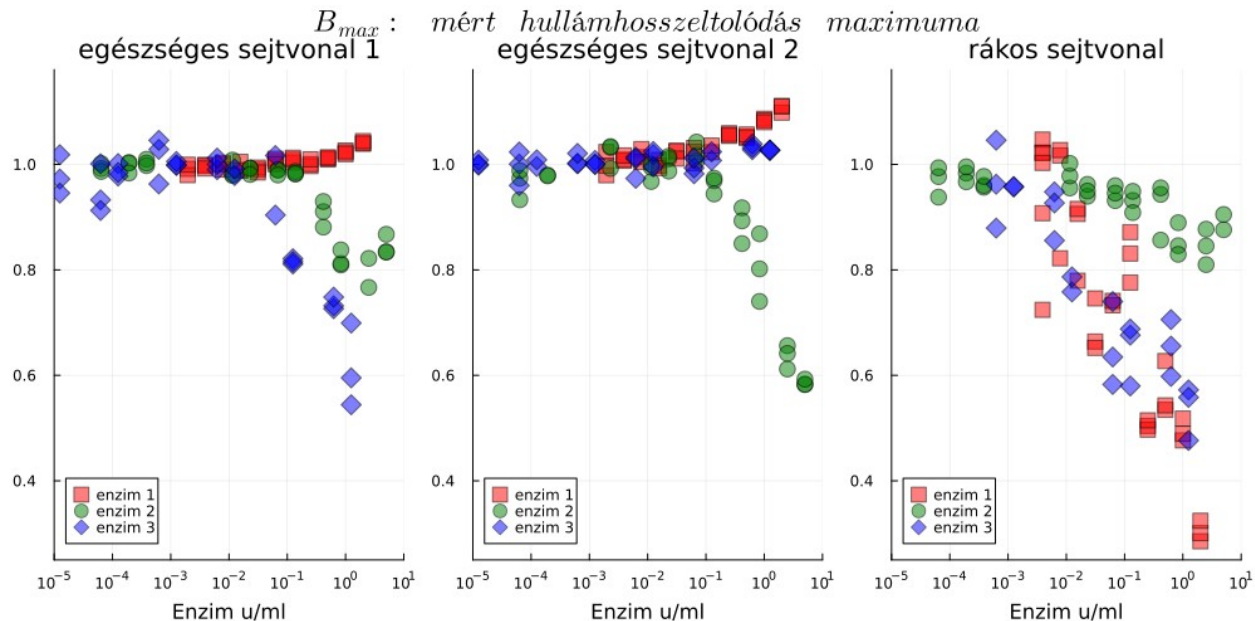


9. ábra: Példa illesztett sejtadhéziós görbére és $\text{pm} \leftrightarrow (\mu\text{m})^{-2}$ konverzióra

Enzimek hatása a maximális kitapadásra és az illesztett paraméterekre

Az illesztés során kapott értékek könnyebb összehasonlításához a paramétereket és a görbe maximumát a nem enzimmel kezelt kontrollt 1-re normálva ábrázoltam.

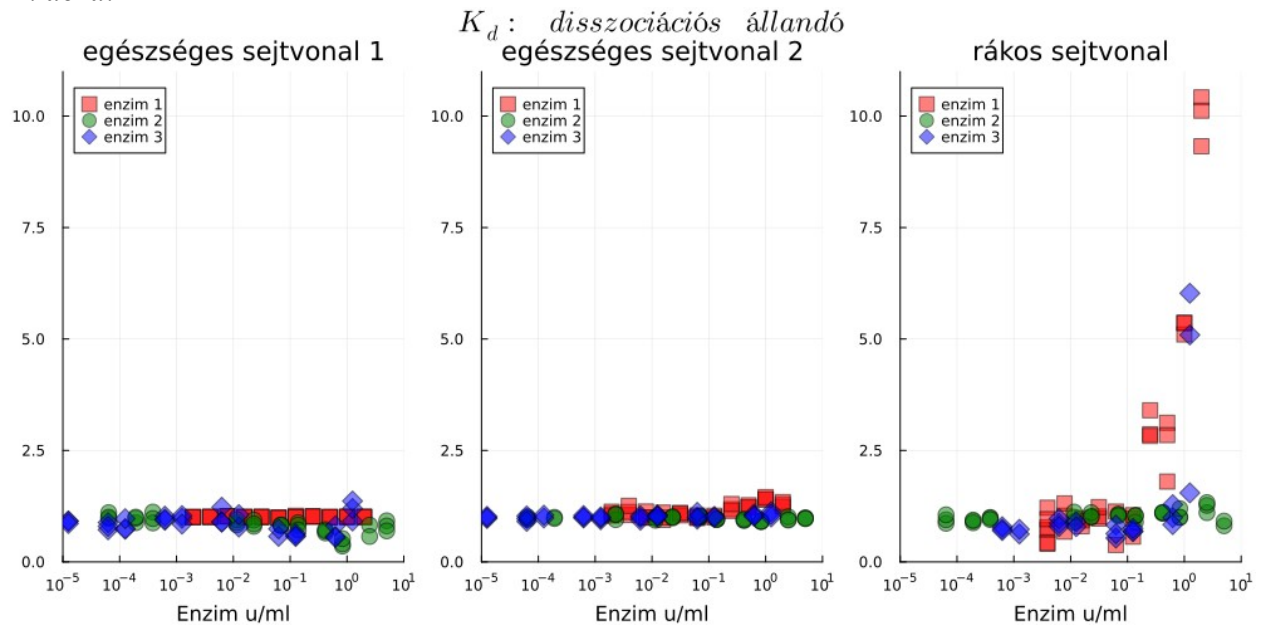
10. ábra:



A 10. ábrán látható, hogy a rákos sejt vonal kitapadását megnehezíti mindegyik enzimes emésztés, de legnagyobb mértékben enzim 1 és enzim 3. A legeltérőbb hatást rákos és egészséges sejtek kitapadására enzim 1 gyakorolt. Az egészséges sejtek kitapadását kis mértékben segítette, a rákosakét pedig nagy mértékben csökkentette. Továbbá az egészséges sejt vonalánál megfigyelhető, hogy a sejtadhézió enzim 2 és 3 hatására csak a 0,1 U/ml-nél nagyobb enzimkoncentrációk hatására változik meg jelentős mértékben.

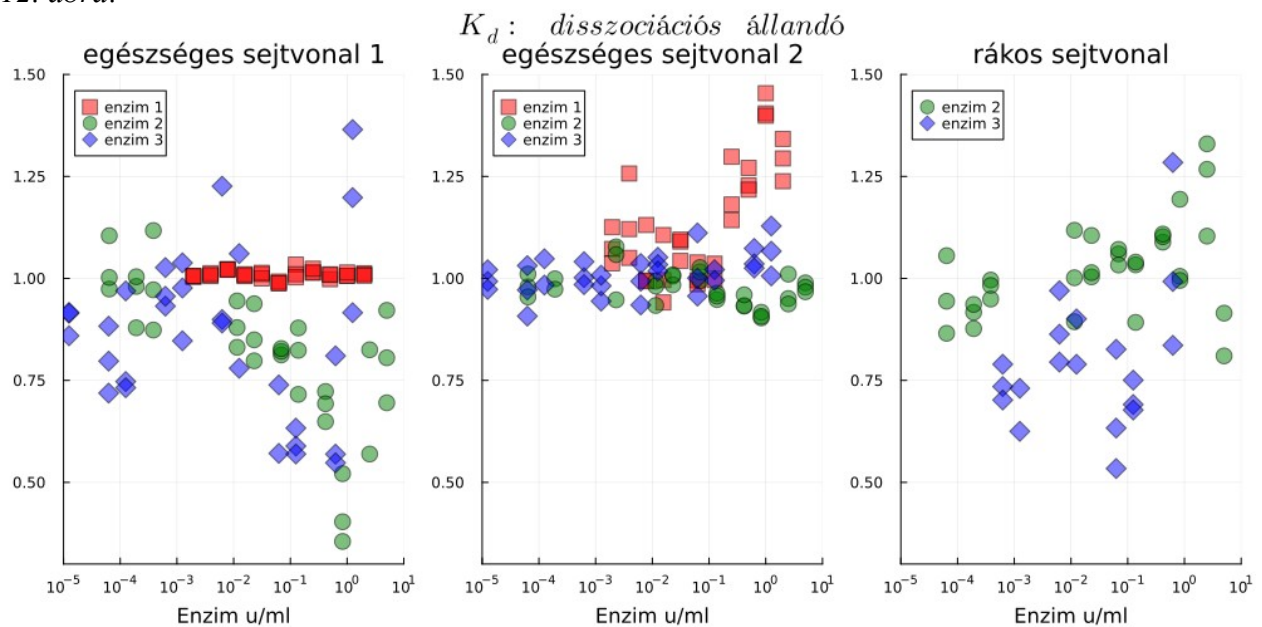
A glikokálix emésztésének rákos sejtek kitapadását gátló hatása tükröződik a modellillesztés során meghatározott hatalmas disszociációs állandó növekedésben. A rákos sejt vonal disszociációs állandója nagy enzim koncentrációk esetében akár egy nagyságrendet is változhat (11. ábra). Ebből is látszik, hogy adhéziójuk mennyire érzékeny az enzimek hatására.

11. ábra:

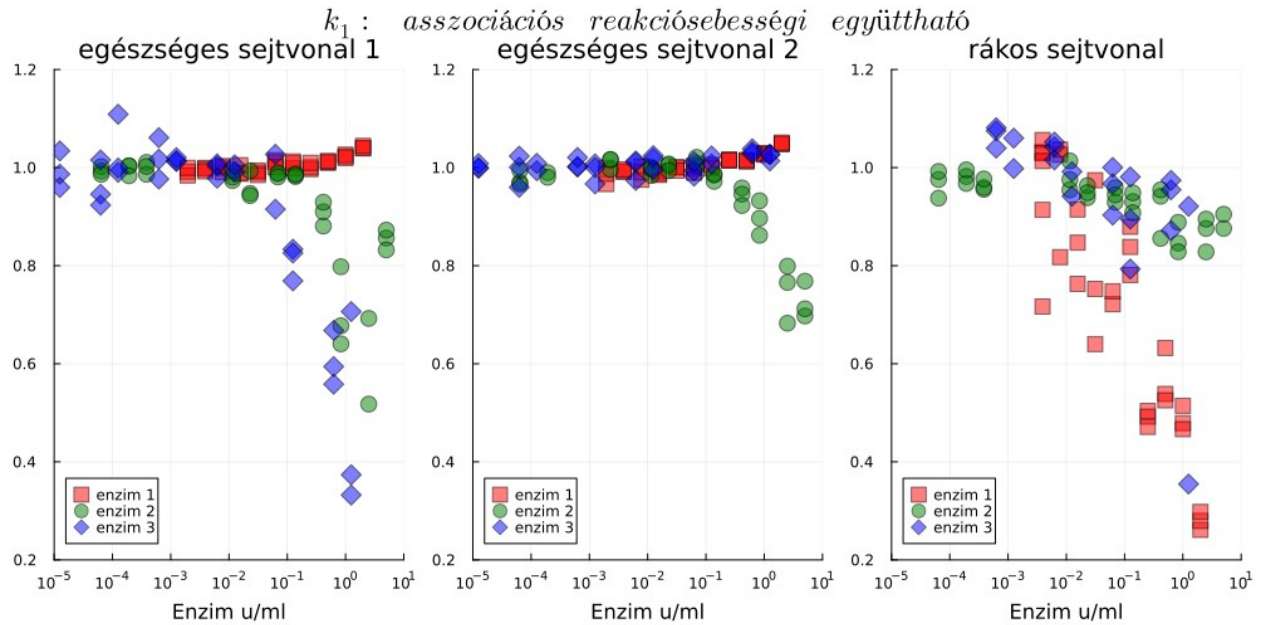


Az egészséges sejtvonalak disszociációs állandója is változik a glikokálix emésztésének hatására, de nem ennyire nagy mértékben (12. ábra). A disszociációs állandót ábrázoltam a rákos sejtvonal és enzim 1 esetében meghatározott nagy érték nélkül is, hogy a többi enzim hatása is látható legyen (12. ábra).

12. ábra:

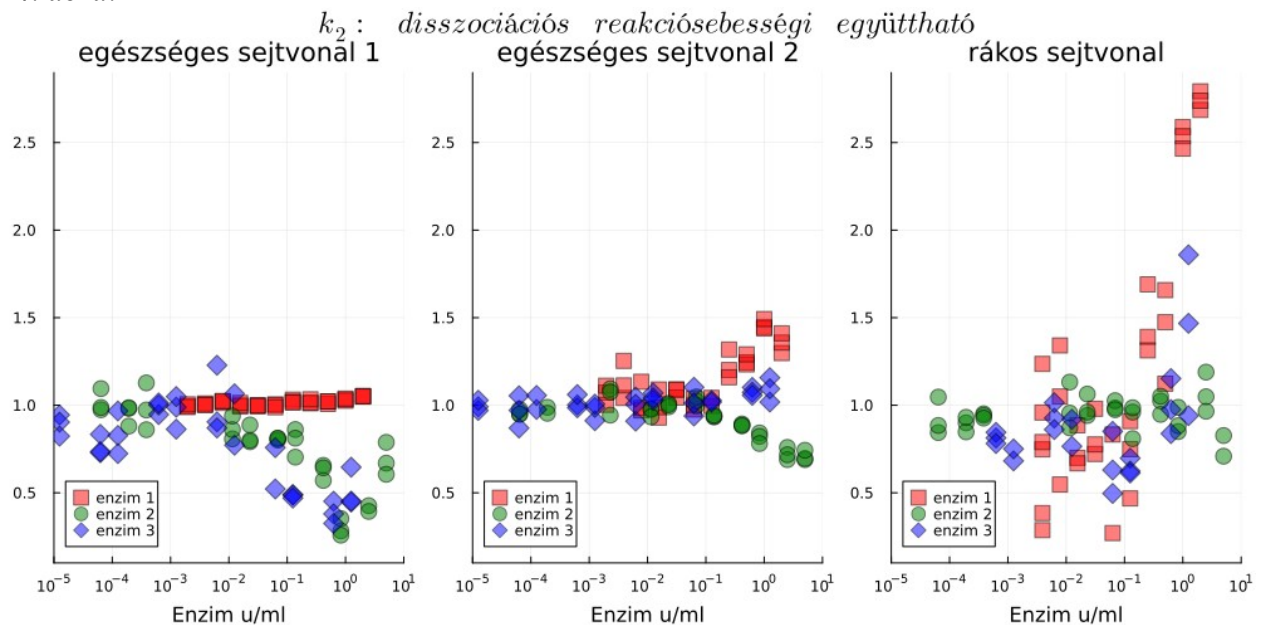


13. ábra:



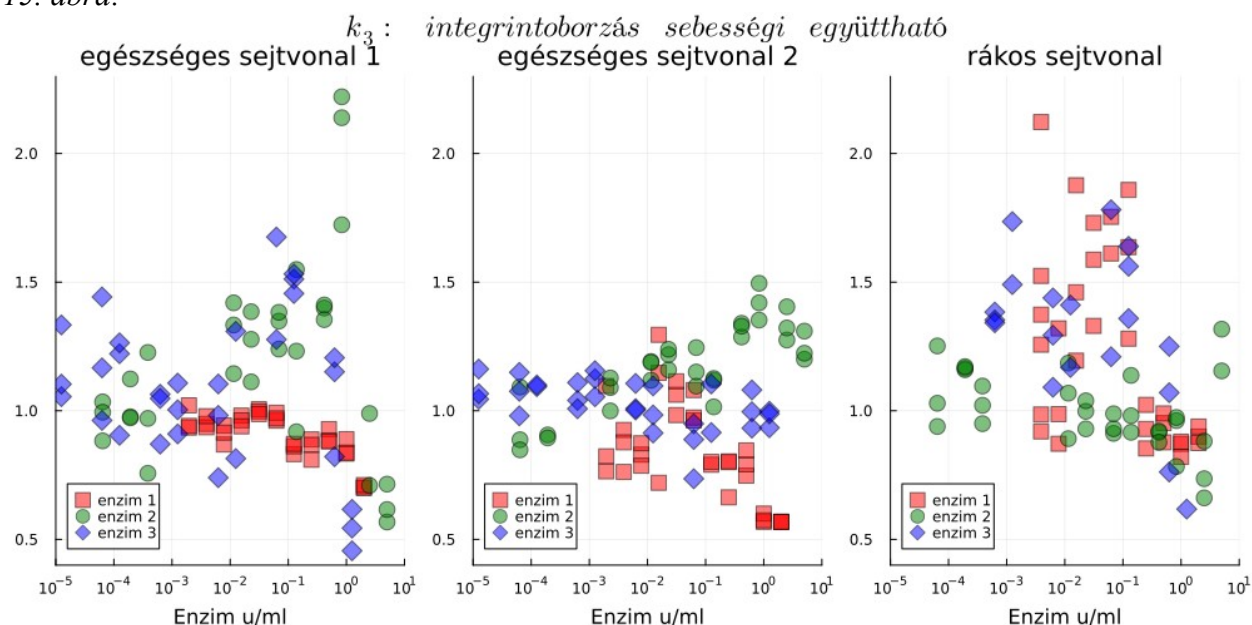
A k_1 asszociációs sebességi együttható minden sejtvonal – enzim kombinációnál egyértelmű tendenciát mutat (13. ábra). Enzim 1 hatására k_1 enyhén nő az egészséges sejteknél, a rákosaknál pedig nagy mértékben csökken. Enzim 2 k_1 -et az összes sejtvonal esetében csökkentette.

14. ábra:



A k_2 disszociációs és a k_1 asszociációs sebességi együtthatók megváltozása általában azonos tendenciát mutat az egészséges sejteknél (13. és 14. ábra). k_1 és k_2 között ez a viszony rákos sejteknél nem áll fenn, tendenciájuk lehet ellentétes. Ez leginkább látványos az enzim 1 esetében, amire a kitapadásuk nagyon érzékeny. Enzim 1 hatására a k_1 csökken és a k_2 nő az enzimkoncentráció növekedésével. Ezek hányadosa a disszociációs állandó, ami ebben az esetben radikális növekedést mutat. Az egészséges sejtvonal – enzim kombinációnál nemcsak a k_1 és a k_2 , hanem ez a két paraméter a maximális kitapadás mértékével is megegyező tendencia szerint változik. Tehát az egészséges sejteknél az adhézió csökkenése során az integrin-RGD asszociáció és disszociáció is lelassul, adhézió növekedés esetében pedig felgyorsul. Ez a jelenség rákos sejtek esetében nem volt megfigyelhető.

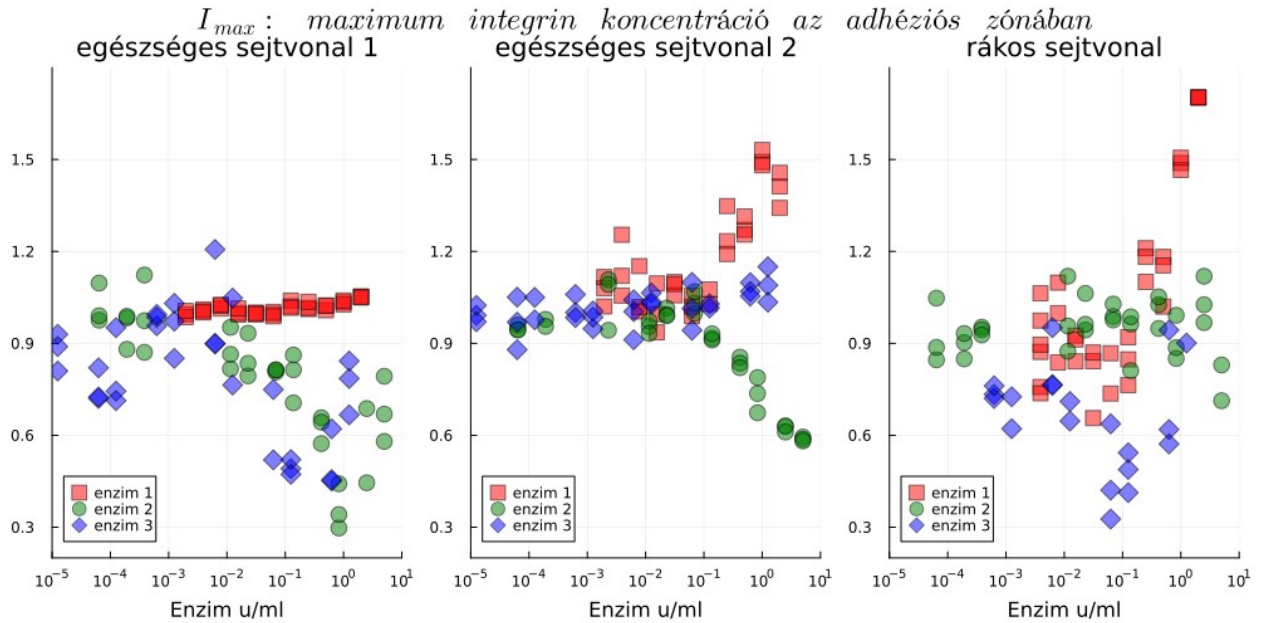
15. ábra:



A k_3 integrintoborzás sebességi együttható változásában a legtöbb esetben nem lehet egyértelmű trendet megfigyelni az enzim koncentráció növekedésének függvényében (15. ábra).

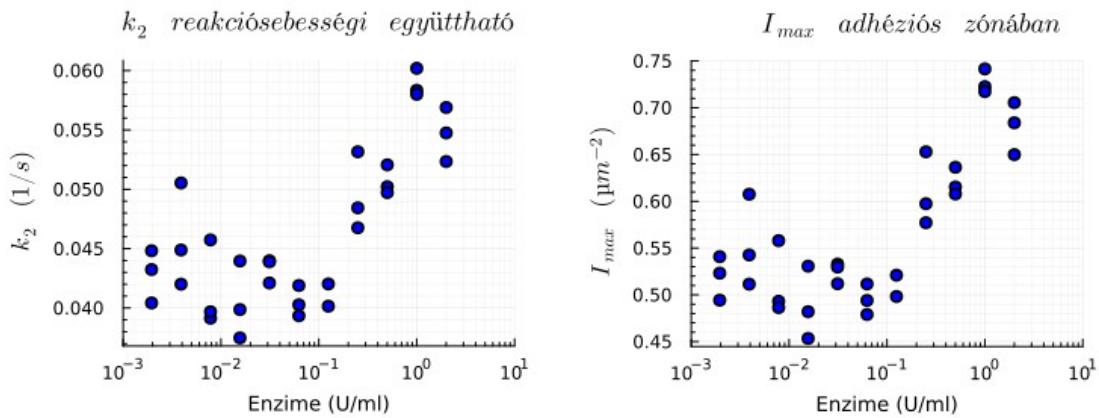
A maximális felszíni integrin koncentráció az adhéziós zónában enzim 1 hatására mindig nő, akkor is amikor az adhézió csökken (16. ábra).

16. ábra

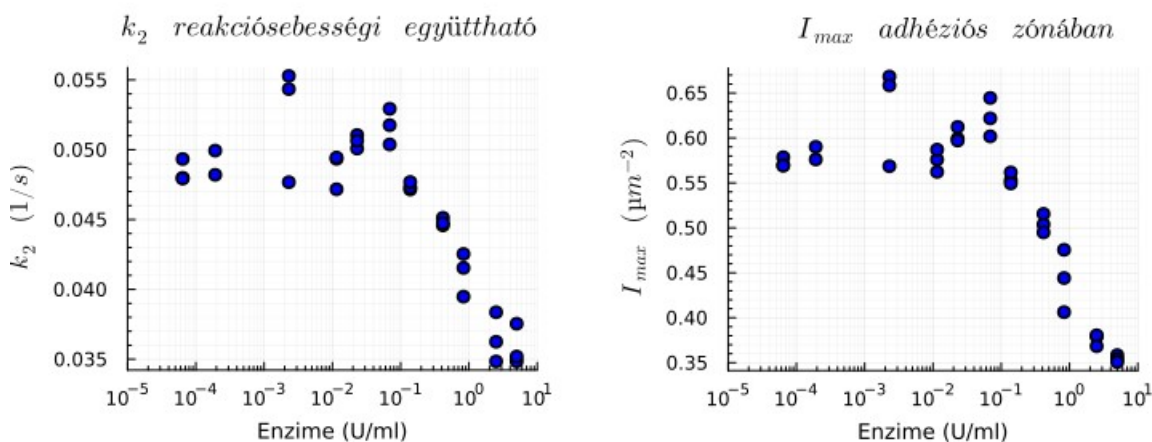


A paraméterek közötti kapcsolat

Az egészséges és rákos sejtvonalaknál is megfigyelhető, hogy az enzimek hatására az I_{max} és a k_2 azonos trend szerint változik. Ez magas enzim 1 koncentrációknál I_{max} és a k_2 növekedését jelenti (17.ábra).



17. ábra: egészséges sejtvonal 2 és enzim 1 esetében látványos az azonos tendencia k_2 és I_{max} esetében. Alacsonyabb koncentrációknál mindkét paraméter értéke csökken. Magasabb, 0,1 U/ml feletti koncentrációknál mindkét paraméter növekvő tendenciát mutat.



18. ábra: Egészséges sejtvonal 2 és enzim 2 illesztésekor kapott k_2 és I_{max} értékeken is megfigyelhető az azonos tendencia

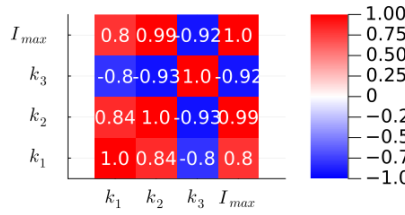
Ezzel szemben a nagy enzim 2 koncentrációknál az I_{max} és a k_2 együttes nagy mértékű csökkenése figyelhető meg az egészséges sejtvonalaknál (14., 16. és 18. ábra).

A paraméterek közötti szoros összefüggések könnyebb vizualizálásáért készítettem egy hőtérkép diagramot a paraméterek közötti korrelációról minden méréshez (19. ábra). A kiszámolt korrelációból is látszik az I_{max} és a k_2 közötti szoros összefüggés. Egy mérés kivételével I_{max} és a k_2 korrelációja +0.9 feletti érték. Kicsit kisebb pozitív korrelációja az I_{max} és a k_1 paramétereknek is van, de csak az egészséges sejtek esetében.

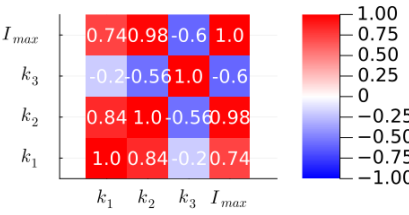
A k_3 esetében az enzimkoncentráció függvényében nem volt látható olyan látványos trend mint a többi illesztett paraméter esetében. Viszont a vizsgált egészséges sejteknél a k_3 és a többi paraméter változó nagyságú negatív korrelációja figyelhető meg. A vizsgált rákos sejteknél ez a viszony a k_1 és k_3 paraméterek esetében nem áll fenn.

A 19. ábrán látható, hogy az egészséges sejtek esetében kapott hőtérkép diagramok hasonlóak. Ez igaz az egészséges sejtekre leginkább enzimenként lebontva, és bizonyos mértékig általánosságban is.

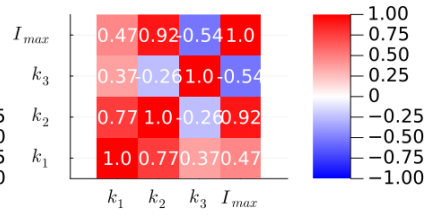
egészséges sejt vonal 1 + enzim 1



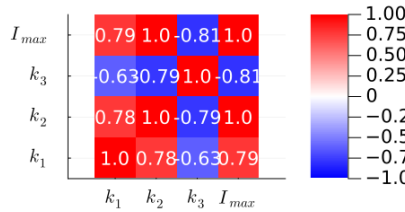
egészséges sejt vonal 1 + enzim 2



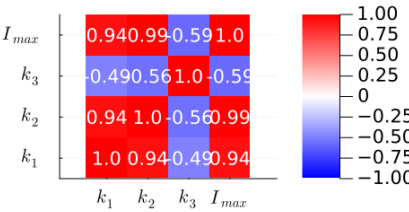
egészséges sejt vonal 1 + enzim 3



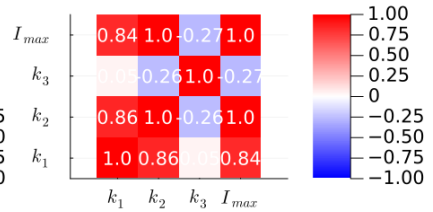
egészséges sejt vonal 2 + enzim 1



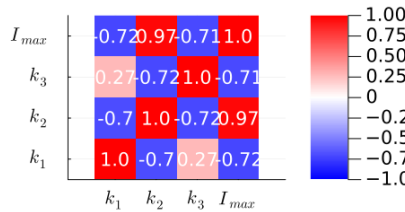
egészséges sejt vonal 2 + enzim 2



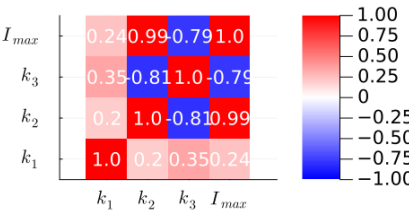
egészséges sejt vonal 2 + enzim 3



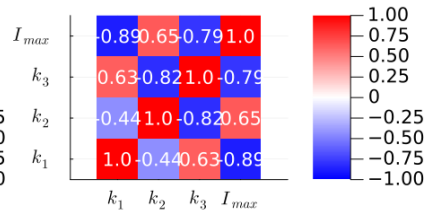
rákos sejt vonal + enzim 1



rákos sejt vonal + enzim 2



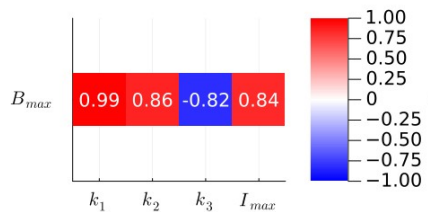
rákos sejt vonal + enzim 3



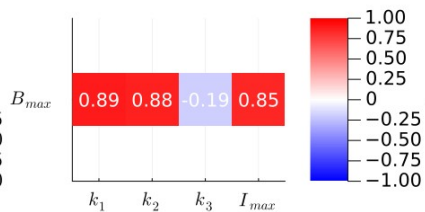
19. ábra: A paraméterek korrelációja hőtérkép diagramon ábrázolva minden sejt vonal - enzim párosítás esetében

Ábrázoltam a paraméterek és a B_{max} korrelációját is hőtérkép diagramokon. A 20. ábrán látható, hogy a rákos sejtek esetében az illesztett paraméterek és a B_{max} korrelációja sokkal kisebb, mint az egészséges sejtek esetében, ez alól kivétel a k_1 . A k_1 és a B_{max} rákos sejteknél az enzimkoncentráció növelésével mindig együtt csökken (10. és 13. ábra).

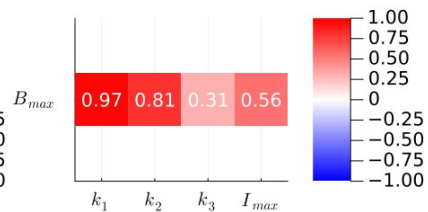
egészséges sejt vonal 1 + enzim 1



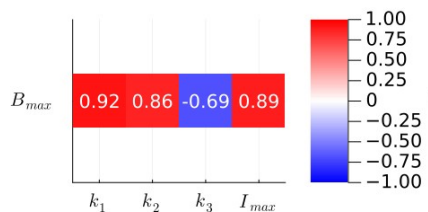
egészséges sejt vonal 1 + enzim 2



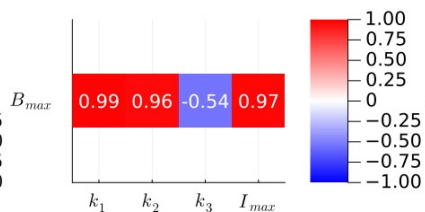
egészséges sejt vonal 1 + enzim 3



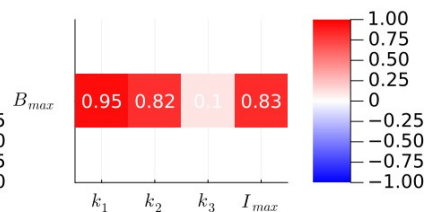
egészséges sejt vonal 2 + enzim 1



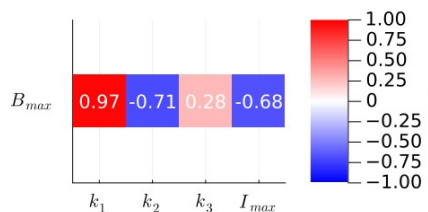
egészséges sejt vonal 2 + enzim 2



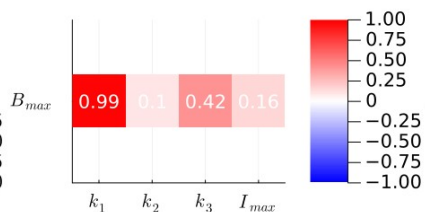
egészséges sejt vonal 2 + enzim 3



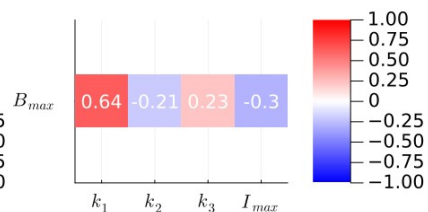
rákos sejt vonal + enzim 1



rákos sejt vonal + enzim 2



rákos sejt vonal + enzim 3



20. ábra: A paraméterek és a kitapadás során mért maximális integrin-RGD komplex felszíni sűrűség korrelációja hőtérkép diagramon ábrázolva minden sejt vonal - enzim párosítás esetében

Eredmények értelmezése

A kísérletek egyértelműen demonstrálják, hogy a glikokálixnak szignifikáns hatása van az integrin-RGD komplexek által kialakított sejtadhézióra. A legtöbb vizsgált enzim és sejtvonal párosítás esetében megfigyelhetők trendek a reakciókinetika megváltozásában.

A megváltozott sejtadhéziót okozhatja az integrin glikozilációjának módosulása, hiszen glikozilációjuk befolyásolja a receptor működését. Alulglikoziláltságuk megnehezíti a sejtek kiterülését. Ez a sejtadhézió csökkenésére nagy enzim koncentrációk esetén egy lehetséges magyarázat. Az enzimes emésztés kis mértékben segítheti is az asszociációjukat az RGD-vel, mert a glikoziláció csökkenése megszüntetheti az asszociáció szterikus gátlását. A k_1 asszociációs sebességi együttható növekedése csak az enzim 1 esetében megfigyelhető, így ez a potenciális asszociációt segítő mechanizmus jelentős mértékben valószínűleg csak enzim 1 esetében érvényesül.

A vizsgált enzimek által emésztett glikánok megtalálhatók a legtöbb glikolipiden, glikoproteinen és proteoglikánon. Mivel az enzimek nem specifikusan bizonyos fehérjék glikozilációját módosítják, így a kimutatott adhézióbeli változás kiváltó oka nem feltétlen csak az integrin glikozilációjának megváltozása, hanem a glikokálix egészének biofizikai tulajdonságainak megváltozása.

Az enzimes kezelés megváltoztathatja a glikokálix töltéssűrűségét negatív töltésű komponensek emésztése által. A glikokálix töltése nem csak a sejt-sejt interakció szempontjából fontos, hanem a negatív töltésű poliszacharid oldalláncok közötti taszításban is, ami szerepet játszik a glikokálix makromolekuláinak térbeli elrendeződésének kialakításában.

Az glikokálix vastagsága is megváltozhat az enzimes emésztéskor. A vastag glikokálix csökkentheti az integrin-RGD komplexek kialakulásának k_1 sebességi együtthatóját, viszont kedvezhet a fokális adhéziós korongok létrejöttének, ezáltal segítve a sejt kiterülését és az integrintoborzást.

Az integrinek maximális felszíni sűrűsége az adhéziós zónában nagy mértékben változik az enzimek hatására. Ez az érték nőhet sejtek kiterülése és az integrin transzfer által. A sejtmembránban a legnagyobb integrin sűrűség maximális kitapadáskor az aktív adhéziós

zónában van. Az integrinek maximális felszíni sűrűsége az adhéziós zónában enzimkezelés hatására általában változik, ennek az oka lehet az adhézió csökkenésekor a szenzorfelülettel való kisebb érintkezés. Enzim 1 viselkedése abban is eltérő, hogy ezt a felszíni integrin sűrűséget mindig növeli attól függetlenül, hogy a kitapadást segítette vagy gátolta az adott sejtvonal esetében. Ezt kiválthatja a glikokálix megváltozott biofizikai tulajdonságaiból eredő módosult integrin transzport.

A megillesztetett paraméterek korrelációja sok esetben 1-hez vagy -1-hez közeli. Ennek egy lehetséges oka a háttérben zajló biológiai folyamat, ami szoros összeköttetést teremt a paraméterek között. Egy ilyen biológiai rendszernél meglepő lenne, ha a megillesztett paraméterek korrelációja 0-hoz közeli lenne. A biológiai kapcsoltságon kívül a kapott korreláció oka lehet még az egyenletrendszer és az optimalizálás numerikus jellege is. Mivel egyelőre nem tudjuk bizonyítani, hogy a kapott korrelációk biológiai kapcsoltságból vagy az egyenletrendszer és optimalizációs módszerek numerikus jellegéből fakadnak, ezért az alábbiakban felsorolt mechanizmusok csak lehetséges hipotézisek, bizonyításuk célzottabb kísérletek elvégzését igényli.

A rákos és az egészséges sejtek esetében is megfigyelhető, hogy a k_2 disszociációs sebességi együttható és az $I_{\max}$ maximális integrin felszíni koncentráció az aktív adhéziós zónában azonos trend szerint változik. Ez igaz a vizsgált rákos és a vizsgált egészséges sejtek esetében is. A k_2 és $I_{\max}$ közötti szoros összefüggést igazolja ezen paraméterek 0.9 feletti korrelációja a legtöbb mérés esetében. Az az észrevétel, hogy az $I_{\max}$ és a k_2 értékek azonos trend szerint változnak felveti azt az érdekes hipotézist, hogy a sejtek érzékelik az integrinek kötéseinek stabilitását és ennek megfelelően ezzel arányos mértékben juttatnak integrineket az adhéziós zónába. Ennek oka az lehet, hogy az integrin transzport energiaigényes folyamat és emiatt a sejt nem szállít több integrint az adhéziós zónába, mint amennyit feltétlen szükséges.

Az egészséges sejtekben az $I_{\max}$ -al és k_2 -vel azonos tendenciát mutat a k_1 viselkedése minden enzimikus emésztés esetében. A rákos sejtekben viszont a k_1 korrelációja k_2 és $I_{\max}$ paraméterekkel is negatív. Ez az ellentétes tendencia a rákos sejtek esetében minden enzim hatására csökkenő k_1 és növekvő k_2 és $I_{\max}$ paramétert jelent. Ezt az eltérést a rákos és egészséges sejtek között fakadhat a rákos sejtek vastag, erősen glikozilált, sok mucint és hialuronánt tartalmazó sűrű glikokálixából. Ezek az elváltozások enzimkezelés nélkül a sejtek számára lehetnek előnyösek, ellenállóvá és

adherenssé teszik őket. Viszont a negatív töltésű komponensek elemészése által csökkent taszítás a hosszú szénhidrát oldalláncok között egy eleve makromolekulákat nagy sűrűséggel tartalmazó glikokálixban az integrin mikrokörnyezetében még nagyobb makromolekula sűrűség általi szterikus gátlást képezhet. Ez a potenciálisan kialakuló szterikus gátlás eredményezheti az integrin-RGD komplexek kialakulásának csökkent sebességi együtthatóját.

Továbbá megfigyelhető a rákos sejtvonal esetében az az érdekes jelenség, hogy az enzimkezelés hatására változó paraméterek korrelációja a $B_{\max}$ -al k_1 kivételével 0-hoz közelebb van, mint az egészséges sejtvonalaknál. Amennyiben azt feltételezzük, hogy a nagyobb korrelációkat a háttérben zajló biológiai folyamatok általi kapcsoltság teremti meg, akkor elképzelhető, hogy a rákos sejtek esetében meghatározott kisebb nagyságú korrelációk a glikokálix emészés hatására leromló regulációs folyamatok következménye.

Konklúzió

Munkám során azt találtam, hogy a glikokálix enzimes emésztése mindegyik sejtvonal esetében befolyásolta az adhézió kialakulásának reakciókinetikáját. Ez a jelenség rávilágít a glikokálix biofizikai tulajdonságainak és a sejtfelszín glikozilációjának jelentős sejtadhéziót befolyásoló szerepére.

A modellillesztés során meghatározott paraméterek és a maximális adhézió között megfigyelhető összefüggések rámutatnak az adhézió megváltozásának lehetséges mechanizmusaira. Az integrinek glikozilációjának emésztése a sejtadhézióváltozás egyik elképzelhető oka. Nagy mértékű alulglikoziláltságuk miatt sérülhet funkciójuk, ami a kitapadást megnehezítheti. Ezzel ellentétben a receptor működését nem ellehetetlenítő változás a glikozilációban kedvezhet az integrinek és az RGD asszociációjának a szterikus gátlás csökkentése által.

Továbbá, megfigyelhetők különbségek az enzimek rákos és az egészséges sejtekre gyakorolt hatásában. A vizsgált rákos sejtek adhézióját csökkentette az összes vizsgált enzim, a legnagyobb mértékben az enzim 1. Ez az enzim enyhén segíti a vizsgált egészséges sejtek adhézióját, a vizsgált rákos sejtekét pedig csökkenti.

A vizsgált rákos és a vizsgált egészséges sejtek kitapadásában tapasztalt eltérést valószínűleg a rákos sejtekre jellemző megváltozott glikokálix szerkezet okozza, melynek biofizikai tulajdonságait az enzimek módosítják. Az enzimekkel emésztett glikokálix megváltozott vastagsága, töltéssűrűsége és a benne található makromolekulák egymáshoz képesti elrendeződése hatással van az adhézió reakciókinetikájára. Feltételezésem szerint, ez a hatás a membránban történő receptordiffúzió és az integrinek szterikus gátlásának megváltozásán keresztül érvényesül.

Ezeknek a kimutatott hatásoknak a részletesebb megértése kiemelten fontos az integrin közvetített sejtadhézió és a rákos sejtek viselkedésének glikokálixtól való függésének értelmezésében. Jövőbeli tervem a kapott jelenségek mélyebb megértése további célirányosabb kísérletek által.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet a Nanobioszenzorika labor tagjainak, akiktől rengeteget tanultam. Szeretném megköszönni Dr. Horváth Róbertnek a lehetőséget, hogy egy ilyen nagyszerű laborban dolgozhassak. Külön köszönet illeti témavezetőmet, Dr. Kovács Boglárkát, aki nagy segítséget nyújtott a dolgozatom megírásában és a nyári gyakorlatom során is. Szeretném kifejezni köszönetemet Magyaródi Beatrixnak, amiért csatlakozhattam a méréseihez. Szeretném megköszönni Balogh Annának is a segítségét, aki szintén részt vett a betanításomban. Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok szeretteim támogatásáért.

Irodalomjegyzék

- [1] N. Orgovan, B. Peter, S. Bősze, J. J. Ramsden, B. Szabó, and R. Horvath, “Dependence of cancer cell adhesion kinetics on integrin ligand surface density measured by a high-throughput label-free resonant waveguide grating biosensor,” *Sci. Rep.*, vol. 4, no. 1, Art. no. 1, Feb. 2014, doi: 10.1038/srep04034.
- [2] N. Kanyo *et al.*, “Glycocalyx regulates the strength and kinetics of cancer cell adhesion revealed by biophysical models based on high resolution label-free optical data,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, Art. no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-80033-6.
- [3] S. A. Kamranvar, B. Rani, and S. Johansson, “Cell Cycle Regulation by Integrin-Mediated Adhesion,” *Cells*, vol. 11, no. 16, p. 2521, Aug. 2022, doi: 10.3390/cells11162521.
- [4] J. M. Staddon and L. L. Rubin, “Cell adhesion, cell junctions and the blood—brain barrier,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 6, no. 5, pp. 622–627, Oct. 1996, doi: 10.1016/S0959-4388(96)80094-8.
- [5] L. E. Reynolds *et al.*, “Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking $\beta 3$ integrin or $\beta 3$ and $\beta 5$ integrins,” *Nat. Med.*, vol. 8, no. 1, Art. no. 1, Jan. 2002, doi: 10.1038/nm0102-27.
- [6] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Garland Science, 2002.

- [7] C. Chothia and E. Y. Jones, “THE MOLECULAR STRUCTURE OF CELL ADHESION MOLECULES,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 66, no. 1, pp. 823–862, Jun. 1997, doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.823.
- [8] R. O. Hynes, “Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion,” *Cell*, vol. 69, no. 1, pp. 11–25, Apr. 1992, doi: 10.1016/0092-8674(92)90115-S.
- [9] R. D. Burke, “Invertebrate integrins: structure, function, and evolution,” *Int. Rev. Cytol.*, vol. 191, pp. 257–284, 1999, doi: 10.1016/s0074-7696(08)60161-8.
- [10] A. Nayal, D. J. Webb, and A. F. Horwitz, “Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 16, no. 1, pp. 94–98, Feb. 2004, doi: 10.1016/j.ceb.2003.11.007.
- [11] R. O. Hynes, “Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines,” *Cell*, vol. 110, no. 6, pp. 673–687, Sep. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00971-6.
- [12] I. D. Campbell and M. J. Humphries, “Integrin Structure, Activation, and Interactions,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 3, p. a004994, Mar. 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a004994.
- [13] N. Beglova, S. C. Blacklow, J. Takagi, and T. A. Springer, “Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation,” *Nat. Struct. Biol.*, vol. 9, no. 4, pp. 282–287, Apr. 2002, doi: 10.1038/nsb779.
- [14] J. A. Askari, P. A. Buckley, A. P. Mould, and M. J. Humphries, “Linking integrin conformation to function,” *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. 2, pp. 165–170, Jan. 2009, doi: 10.1242/jcs.018556.
- [15] Y. Su *et al.*, “Relating conformation to function in integrin $\alpha 5\beta 1$,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 27, pp. E3872–E3881, Jul. 2016, doi: 10.1073/pnas.1605074113.
- [16] Z. Sun, M. Costell, and R. Fässler, “Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 21, no. 1, pp. 25–31, Jan. 2019, doi: 10.1038/s41556-018-0234-9.
- [17] P. Moreno-Layseca and C. H. Streuli, “Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression,” *Matrix Biol.*, vol. 34, pp. 144–153, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.matbio.2013.10.011.

- [18] P. Zsolt and K. Zoltán, “Sejtbológia alapjai.” [Online]. Available: http://physiology.elte.hu/eloadas/bev_biol_kornytan/jegyzet/2011-0073_sejtbologia.pdf
- [19] P. H. Weigel and P. L. DeAngelis, “Hyaluronan Synthases: A Decade-plus of Novel Glycosyltransferases*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 51, pp. 36777–36781, Dec. 2007, doi: 10.1074/jbc.R700036200.
- [20] L. Möckl, “The Emerging Role of the Mammalian Glycocalyx in Functional Membrane Organization and Immune System Regulation,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, p. 253, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.00253.
- [21] A. Varki and P. Gagneux, “Multifarious roles of sialic acids in immunity,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1253, no. 1, pp. 16–36, Apr. 2012, doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06517.x.
- [22] M. von Itzstein, “The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 6, no. 12, Art. no. 12, Dec. 2007, doi: 10.1038/nrd2400.
- [23] J. C. Paulson, M. S. Macauley, and N. Kawasaki, “Siglecs as sensors of self in innate and adaptive immune responses,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1253, no. 1, pp. 37–48, Apr. 2012, doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06362.x.
- [24] B. S. Blaum, J. P. Hannan, A. P. Herbert, D. Kavanagh, D. Uhrin, and T. Stehle, “Structural basis for sialic acid-mediated self-recognition by complement factor H,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 11, no. 1, pp. 77–82, Jan. 2015, doi: 10.1038/nchembio.1696.
- [25] C. Büll, M. H. den Brok, and G. J. Adema, “Sweet escape: Sialic acids in tumor immune evasion,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer*, vol. 1846, no. 1, pp. 238–246, Aug. 2014, doi: 10.1016/j.bbcan.2014.07.005.
- [26] S. Ghosh, “Sialic acid and biology of life: An introduction,” *Sialic Acids Sialoglycoconjugates Biol. Life Health Dis.*, pp. 1–61, 2020, doi: 10.1016/B978-0-12-816126-5.00001-9.
- [27] Y. Zhuo, R. Chammas, and S. L. Bellis, “Sialylation of β 1 Integrins Blocks Cell Adhesion to Galectin-3 and Protects Cells against Galectin-3-induced Apoptosis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 32, pp. 22177–22185, Aug. 2008, doi: 10.1074/jbc.M8000015200.

- [28] M. A. Dragovich *et al.*, “Mechanotransduction of the endothelial glycocalyx mediates nitric oxide production through activation of TRP channels,” *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 311, no. 6, pp. C846–C853, Dec. 2016, doi: 10.1152/ajpcell.00288.2015.
- [29] S. Reitsma, D. W. Slaaf, H. Vink, M. A. M. J. van Zandvoort, and M. G. A. oude Egbrink, “The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization,” *Pflugers Arch.*, vol. 454, no. 3, pp. 345–359, Jun. 2007, doi: 10.1007/s00424-007-0212-8.
- [30] C. R. Shurer *et al.*, “Physical Principles of Membrane Shape Regulation by the Glycocalyx,” *Cell*, vol. 177, no. 7, pp. 1757–1770.e21, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.04.017.
- [31] M. J. Paszek *et al.*, “The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival,” *Nature*, vol. 511, no. 7509, Art. no. 7509, Jul. 2014, doi: 10.1038/nature13535.
- [32] M. R. Morgan, M. J. Humphries, and M. D. Bass, “Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 12, Art. no. 12, Dec. 2007, doi: 10.1038/nrm2289.
- [33] J. Gu and N. Taniguchi, “Regulation of integrin functions by N-glycans,” *Glycoconj. J.*, vol. 21, no. 1–2, pp. 9–15, 2004, doi: 10.1023/B:GLYC.0000043741.47559.30.
- [34] T. Isaji, Y. Sato, T. Fukuda, and J. Gu, “N-Glycosylation of the I-like Domain of $\beta 1$ Integrin Is Essential for $\beta 1$ Integrin Expression and Biological Function,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 18, pp. 12207–12216, May 2009, doi: 10.1074/jbc.M807920200.
- [35] T. Endo, “New era of glycoscience: intrinsic and extrinsic functions performed by glycans. Foreword,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 32, no. 5, pp. 765–766, May 2009, doi: 10.1248/bpb.32.765.
- [36] M. A. Hollingsworth and B. J. Swanson, “Mucins in cancer: protection and control of the cell surface,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 1, Art. no. 1, Jan. 2004, doi: 10.1038/nrc1251.
- [37] J. C.-H. Kuo, J. G. Gandhi, R. N. Zia, and M. J. Paszek, “Physical biology of the cancer cell glycocalyx,” *Nat. Phys.*, vol. 14, no. 7, Art. no. 7, Jul. 2018, doi: 10.1038/s41567-018-0186-9.
- [38] F. G. Giancotti, “Deregulation of cell signaling in cancer,” *FEBS Lett.*, vol. 588, no. 16, pp. 2558–2570, 2014, doi: 10.1016/j.febslet.2014.02.005.

- [39] D. H. Dube and C. R. Bertozzi, “Glycans in cancer and inflammation — potential for therapeutics and diagnostics,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, no. 6, Art. no. 6, Jun. 2005, doi: 10.1038/nrd1751.
- [40] Kovács B., “Flagellin alapú biomimetikus felületek jellemzése és élő sejtek adhéziójának nyomon követése jelölésmentes optikai bioszenzorokkal = Characterization of flagellin-based biomimetic coatings and monitoring of cell adhesion with label-free optical biosensors,” 2017, doi: 10.18136/PE.2017.670.
- [41] Orgovan N., Székács I., Szabó B., and Horváth R., “Jelölésmentes optikai bioszenzorok a sejtadhézió vizsgálatában,” presented at the XLV. Membrán-Transzport Konferencia, 2015. Accessed: Oct. 08, 2023. [Online]. Available: <http://real.mtak.hu/26671/>
- [42] J. Ramsden and R. Horvath, “Optical biosensors for cell adhesion,” *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, vol. 29, pp. 211–23, Feb. 2009, doi: 10.1080/10799890903064119.
- [43] X. Wang, M. Sieger, and B. Mizaikoff, “Toward on-chip mid-infrared chem/bio sensors using quantum cascade lasers and substrate-integrated semiconductor waveguides,” *Proc SPIE*, vol. 8631, Feb. 2013, doi: 10.1117/12.2010872.