

4. félévi beszámoló

Kovács Kinga Dóra (kovacskingadora@gmail.com)

Statisztikus Fizika, Biológiai Fizika és Kvantumrendszerek Fizikája PhD program

Témavezetők: Horváth Róbert, Szabó Bálint

A dolgozat címe: Single cell experiments using novel biophysical tools

Bevezetés

Jelölésmentes bioszenzorok jelölőmolekula nélkül képesek a biológiai folyamatok nyomon követésére. A rezonáns rácsos hullámvezető alapú bioszenzorok kiválóan alkalmasak a felület feletti rétegben érzékelni a törésmutató változást nagyon jó térbeli és időbeli felbontással. A biomolekulák vagy élő sejtek felülethez történő adszorpciója során megváltozik a lokális törésmutató, így ezek a folyamatok vizsgálhatók. Egyedi sejtek vizsgálata is lehetséges ezekkel a bioszenzorokkal ennek a jelentősége abban rejlik, hogy eddig főként csak sejtpopulációkra léteznek ilyen mérések. Az utóbbi években kutatócsoportunk számos fontos lépést tett a fenti módszerek kiterjesztésében nagyszámú egyedi sejtek párhuzamos vizsgálatára.

A kutatásom egyik célja a biomolekulák szenzor-felülethez történő adszorpciójának és a sejtadhézió folyamatának vizsgálata különböző biofizikai módszerekkel, mint FluidFM, számítógépezérelt mikropipetta, holomonitor és rezonáns rácsos hullámvezető alapú bioszenzor, hangsúlyt fektetve a jelenségek egyedi sejt és populáció szintű vizsgálatára. Kutatásom másik célja egyedi sejtek manipulációja és vizsgálata volt.

Az előző három félévben elért kutatási eredmények összegzése

A PHSRN szinergiapeptid oldatban kifejtett hatását vizsgáltam RGD-vel funkcionális felületen jelölésmentes optikai bioszenzorral (Epic BT). Tervezem a peptid felületre való kikötésével vizsgálni, hogyan befolyásolja PHSRN-PHSRN távolság a sejtek adhézióját.

Annak érdekében, hogy a sejtadhéziós folyamatot molekuláris szinten is elemezni tudjuk kifejlesztettünk egy kinetikai modellt, ami figyelembe veszi az adhézió alatt lejátszódó legrelevánsabb biomolekuláris kölcsönhatásokat. A modell egy csatolt közönséges differenciálegyenlet rendszerrel leírható, így a bioszenzoros méréseket meg lehet illeszteni és többlet információ nyerhető a mérések során lejátszódó folyamatokról. Tervezem már elvégzett mérések kielemezését, a mindig az adott problémához igazított modell segítségével.

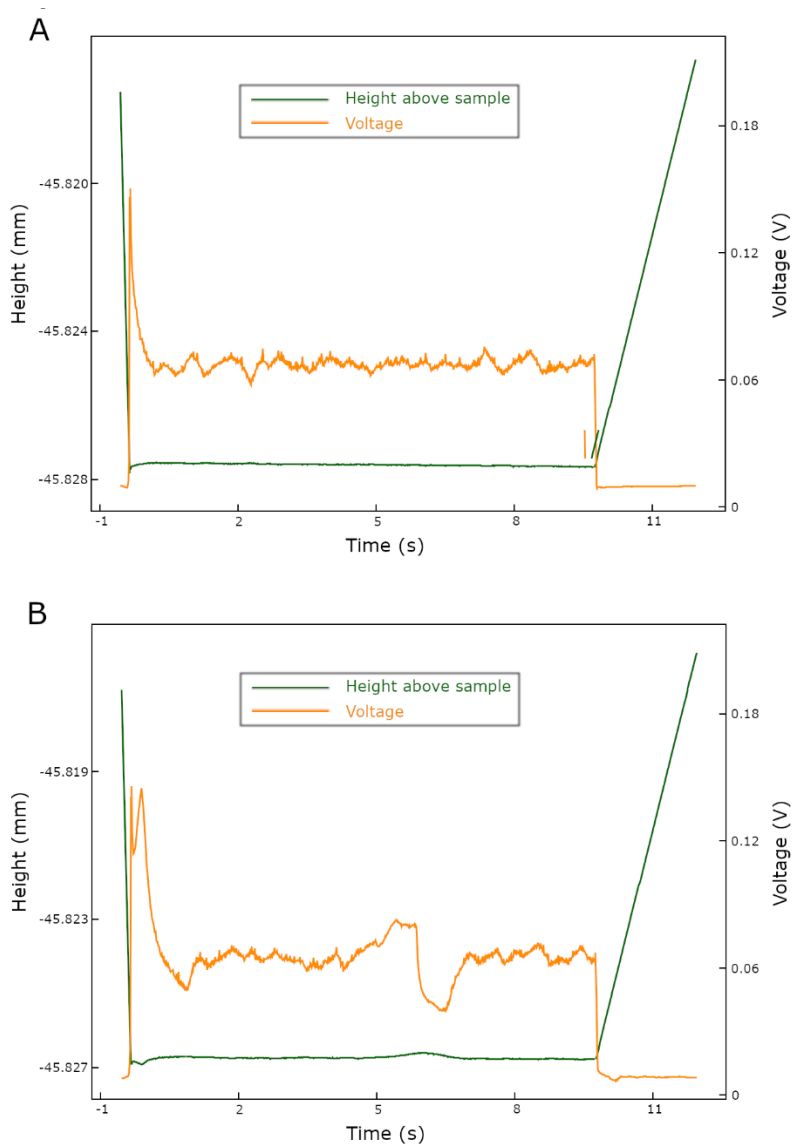
A fentebb említett jelölésmentes optikai bioszenzor nagyobb felbontású változatával (Epic Cardio), képesek vagyunk egyedi sejtek adhéziós görbéjének mérésére. Ennek az eszköznek a segítségével több különböző esetekben vizsgáltam a sejtadhézió nagyságának eloszlását adott sejtpopulációban, többek között nyolc különböző sejt vonalat két különböző felületen, három különböző sejt felszedési módszer hatását három különböző felületen és a ChrABC enzim hatását.

Folytattam a diplomamunkámként elkezdett kutatást is, ahol egy olyan mérőberendezést fejlesztettem és teszteltem, ami kompatibilis a laborban megtalálható optikai bioszenzorral és képes a felületre kitapadt sejtek és a szenzorfelület felett áramoltatni a puffert. Részletesebben kiértékeltem a diplomamunkámhoz végzett méréseket, illetve eszközfejlesztés is történt: az eddigi elrendezés egy referencia wellből és egy 'mérő' wellből állt, amiben az áramlást létrehoztuk, a továbbfejlesztés lényege az volt, hogy az egy nagy térfogatú 'mérő' wellre három kisebb térfogatú 'mérő' wellre cseréljük.

Az aktuális félévben elvégzett kutatások ismertetése

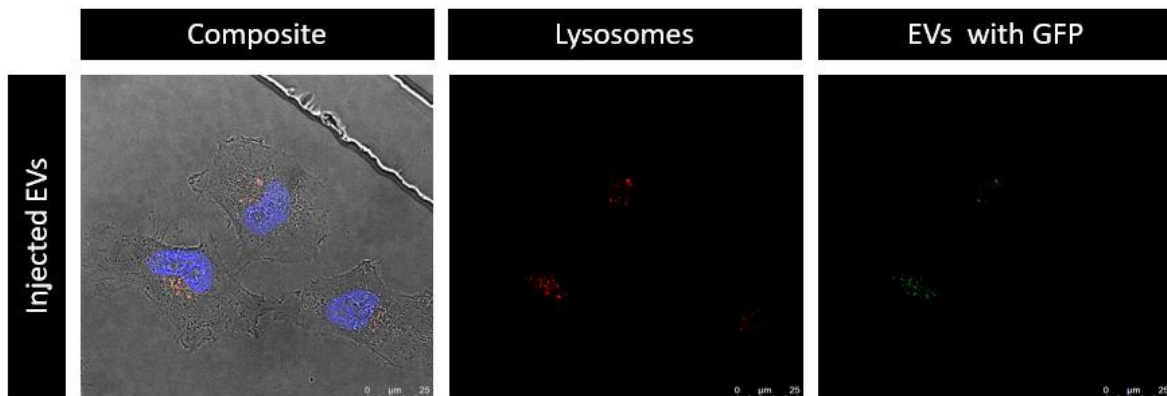
Ebben a félévben HeLa sejtek injektálásával foglalkoztam. A mérésekhez egy mikrofluidikai csatornával ellátott AFM tűt használtam a FluidFM nevű műszerrel. A módosított tű végén egy a rugólapka végénél a lapka alján egy piramis található, aminek a lehetővé teszi a sejtmembrán átszúrását. Ennek a piramisnak a hegyénél található egy 200 nm átmérőjű nyílás, amin keresztül jut a sejtbe a tűbe töltött oldat.

A félév során két fajta injektálást végeztem. Az egyiknél GFP-vel jelölt extracelluláris vezikulákat injektáltam a sejtekbe, majd fixálás nélkül az élő sejteket vizsgáltuk konfokális mikroszkóppal 20 órán keresztül. A sejteket előző nap 20.000 sejt/csésze számban raktam ki egy 35 mm-es rácsozott Ibidi Petri-csészébe, így csak pár sejt jut egy négyzetbe a rácson, ami megkönnyíti a sejtek későbbi azonosítását és nyomon követését. A vezikula oldatnál úgy garantáltuk, hogy 200 nm-nél nagyobb vezikula kerüljön a tűbe és eltömítse azt, hogy 10.000 × g-n 20 percig centrifugáltuk majd a felülúszóból töltöttük a tűbe. A mérés során a sejtek végig tápban voltak 5% CO₂ szint mellett 37 °C-on. Egy mérés során 20-60 sejtet sikerült injektálni, amiket festés után mikroszkóppal vizsgáltunk.



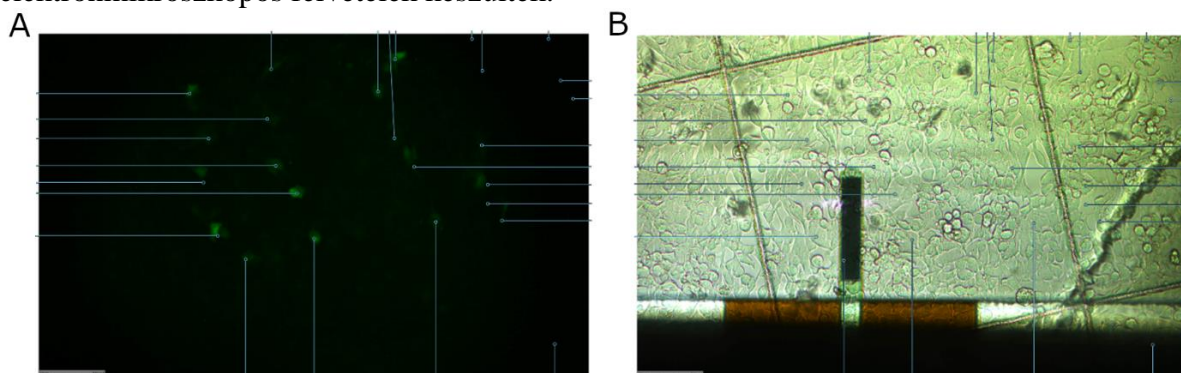
1. ábra: a) A távolság (zöld) és a feszültség (narancssárga) az idő függvényében ábrázolva egy a) sikeres és b) sikertelen injektálásnál. A sikertelen injektálás ebben az esetben a sejt kipukkadását jelenti.

Az mérés során rögzítettem és megvizsgáltam, hogy egy sejt injektálása során, hogyan változik a tű magassága és a mért feszültség. Ezek alapján kiderült, hogy a feszültség-idő görbék segítségével megállapítható, hogy a sejt injektálása sikeres volt-e. Az 1.-es ábrán látható egy kezdeti csúcs a feszültség-idő görbén, ez jelenti a membrán átszúrását majd, ha a jel nem marad stabil (1.b ábra), akkor a sejt kipukkadt az injektálás során. Régebbi mérésekben talákoztunk olyan görbével, ahol a kezdeti csúcs hiányzott, ebben az esetben is sikertelen az injektálás, mert ilyenkor a tű át sem lyukasztotta a sejtet. A konfokális mikroszkópos képen (2. ábra) pedig jól láthatók a lizoszómák és vezikulák a sejtben.



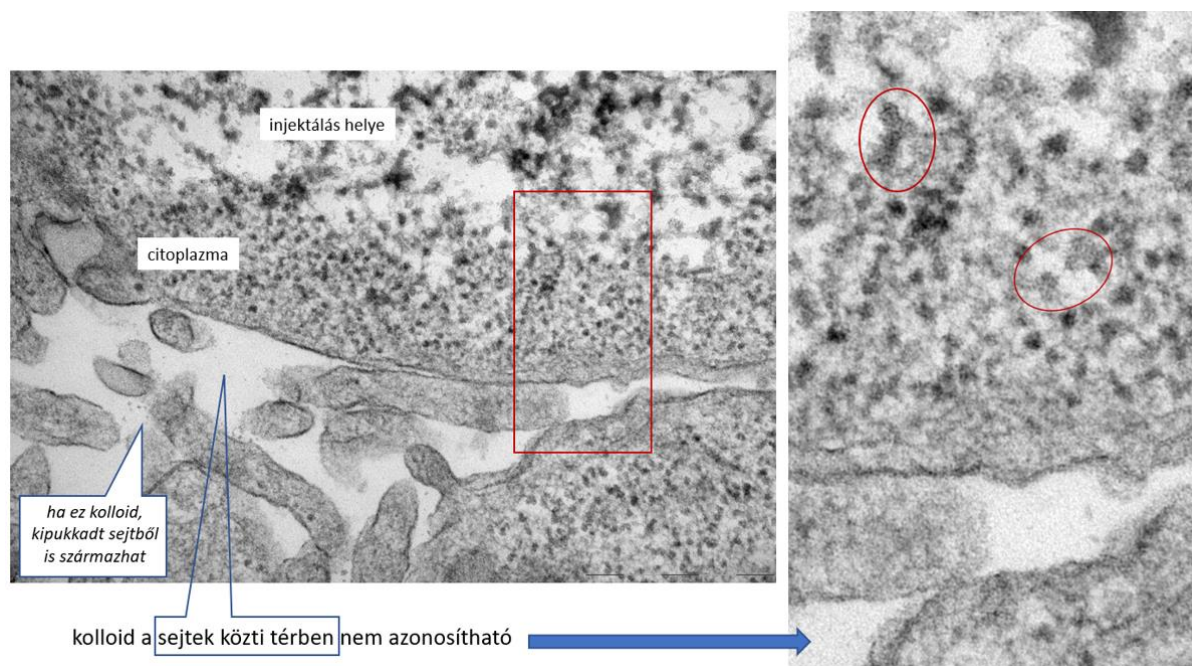
2. ábra: Konfokális mikroszkópos kép injektált HeLa sejtekről. Kékkel a DNS festés, pirossal a lizoszóma festés és zölddel az extracelluláris vezikulák láthatók.

A félév során végzett másik fajta injektálásnál pedig arany nanorészecskéket injektáltunk HeLa sejtekbe. A sejteket itt is előző nap kikészítettük a Petri-csészébe (amibe egy rácsozott üveglemezt ragasztottunk szilikonszírral), amibe másnap az injektálás zajlott, viszont most sokkal nagyobb sejtsűrűség volt a cél, hogy a TEM-es mintában minél nagyobb valószínűséggel legyen injektált sejt. Ennél a mérésnél a sejtek pufferben voltak szobahőmérsékleten az injektálás során. A nanorészecske oldatot 220 nm-es centrifugaszűrőn szűrtük át és 1:1 arányban kevertük 2 mg/ml-es Lucifer Yellow oldattal a tűbe töltés előtt. A Lucifer Yellow oldattal szemmel is nyomon követhető volt az injektálás, mivel a sikeres injektálásnál a sejtek fluoreszcens megvilágításnál zölden világítottak, ahogy az a 3.a ábrán látható. Az injektálás után a sejteket rögtön vagy 24 óra elteltével fixáltam, majd elektronmikroszkópos felvételek készültek.



3. ábra: a) Fluoreszcens mikroszkóppal készült kép az injektált HeLa sejtekről injektálás után. A kék vonalak az injektált sejteket jelölik. b) Fáziskontraszt mikroszkópos kép az injektált sejtekről. A kék vonalak az injektált sejteket jelölik. A kép közepén a FluidFM tű látható.

A 4-es ábrán egy ilyen elektronmikroszkópos kép látható a rögtön fixált mintáról. Jól láthatók a nanorészecskék a citoplazmában, viszont nincsenek jelen a sejt közötti térben.



4. ábra: Elektronmikroszkópos kép az injektált HeLa sejtekről. A sejtek rögtön az injektálás után lettek fixálva.

Publikációk

Kanyo, Nicolett, Kovacs, K. D., Saftics, A., Szekacs, I., Peter, B., Santa-Maria, A. R., Walter, F. R., Dér, A., Deli, M. A., & Horvath, R. (2020). Glycocalyx regulates the strength and kinetics of cancer cell adhesion revealed by biophysical models based on high resolution label-free optical data. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80033-6>

Kovács, K. D., Novák, M., Hajnal, Z., Hős, C., Szabó, B., Székács, I., Fang, Y., Bonyár, A., & Horvath, R. (2021). Label-free tracking of whole-cell response on RGD functionalized surfaces to varied flow velocities generated by fluidic rotation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 599, 620–630. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.04.091>

Kanyo, N., Kovács, K. D., Kovács, S. V., Béres, B., Peter, B., Székács, I., & Horvath, R. (2022). Single-cell adhesivity distribution of glycocalyx digested cancer cells from high spatial resolution label-free biosensor measurements. *Matrix Biology Plus*, 14, 100103. <https://doi.org/10.1016/J.MBPLUS.2022.100103>

Farkas, E., Tarr, R., Gerecsei, T., Saftics, A., Kovács, K. D., Stercz, B., Domokos, J., Peter, B., Kurunczi, S., Szekacs, I., Bonyár, A., Bányai, A., Fürjes, P., Ruszkai-Szanişzló, S., Varga, M., Szabó, B., Ostorházi, E., Szabó, D., & Horvath, R. (2022). Development and In-Depth Characterization of Bacteria Repellent and Bacteria Adhesive Antibody-Coated Surfaces Using Optical Waveguide Biosensing. *Biosensors*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/BIOS12020056>

Gerecsei, T., Visnovitz, T., Kovács, K. D., Peter, B., Kurunczi, S., Koncz, A., Németh, K., Vukman, K. V., Lőrincz P., Szekacs, I., Buzás, E. I., & Horvath, R. Nanoinjection of extracellular vesicles to single live cells by robotic fluidic force microscopy. *Journal of Extracellular Vesicles*, revízió alatt

Peter, B., Kanyo, N., Kovács, K. D., Kovács, S. V., Szekacs, I., Pécz, B., Nakanishi H., Lagzi, I., & Horvath, R. The role of glycocalyx in nanoparticle penetration into cells monitored by label-free biosensor. kéziratban

Sztilkovics, M., Kovács, K. D., Kanyo, N., Szekacs, I., Szabó, B., Horvath, R. Machine learning can classify single mammalian cells based on label-free optical biosensor data. kéziratban

Tanulmányi tevékenység az aktuális félévben

Polimerek és membránok statisztikus fizikája EA, Modern képkalkotó technikák a biológiában, Gráfok a bioinformatikában, A gépi tanulás új eredményei szeminárium

Konferenciák a képzés alatt

Cytosurge FluidFM conference: Novel applications of FluidFM OMNIUM in combination with high resolution label-free biosensors (előadás)

Elismerések a képzés alatt

MFA Intézeti Publikációs Díj (Kovács, K. D. et al.: Label-free tracking of whole-cell response on RGD functionalized surfaces to varied flow velocities generated by fluidic rotation.)

Kooperatív Doktori Program Doktori Hallgatói Ösztöndíj

Oktatási tevékenység az aktuális félévben

Klasszikus fizika laboratórium, heti 4 óra

Témavezetés az aktuális félévben

Magyaródi Beatrix, BME Egészségügyi mérnök MSc hallgató, Diplomamunka

Balogh Anna, ELTE Fizika BSc hallgató, Szakdolgozat