

## 1. 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. Az 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 évben kutatócsoportunk számos fontos lépéseket tett a fenti módszerek kiterjesztésében nagyszámú egyedi sejtek párhuzamos vizsgálatára.

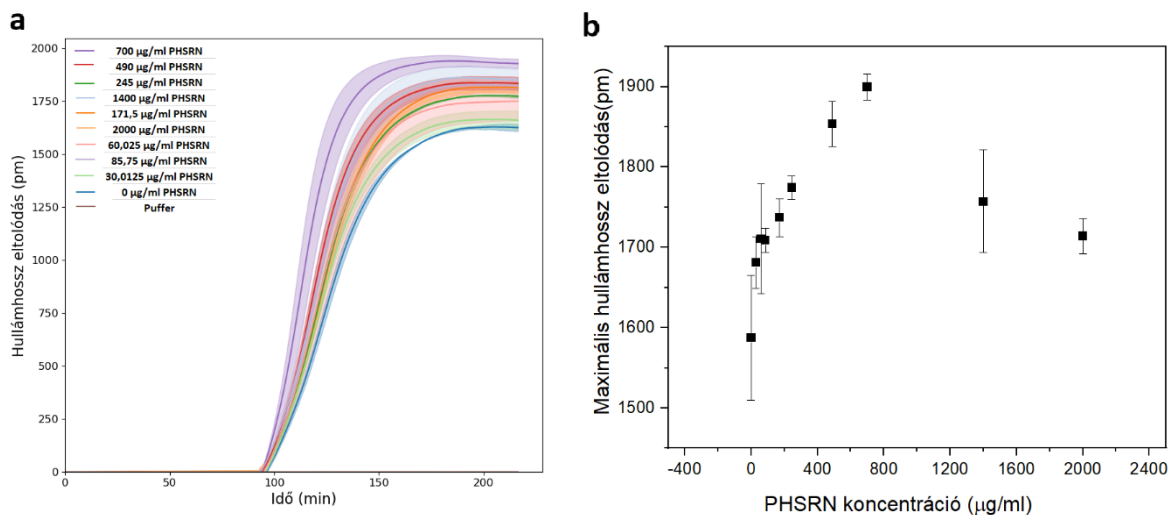
A kutatásom célja a biomolekulák szenzor-felülethez történő adszorpciójának és a sejtadhézió folyamatának vizsgálata különböző biofizikai módszerekkel, mint FluidFM, számítógépvezérelt mikropipetta, holomonitor és rezonáns rácsos hullámvezető alapú bioszenzor, hangsúlyt fektetve a jelenségek egyedi sejt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

### Az aktuális félévben elvégzett kutatások ismertetése

Az irodalomban ismert az effektus, hogy ha a PHSRN szinergiapeptid is jelen van RGD-vel funkcionizált felületen akkor gyengén tapadó sejteknél a szinergiapeptid növeli az adhézió mértékét, viszont magában nem képes az adhézió létrehozására. Ez a megállapítás mikroszkópos képek alapján történt, mi részletesebben szeretnénk a folyamatot vizsgálni jelölésmentes optikai bioszenzor segítségével. Első kísérleteim során nem a felületre kötöttem ki a PHSRN-t hanem oldatban adtam a sejtekhez különböző koncentrációban míg a felületet RGD-vel funkcionizáltam, majd lemértem a sejtek adhézióját. A méréseket HeLa sejteken végeztem.

Az 1a. ábrán láthatóak a bioszenzor által mért adhéziós görbék, míg az 1b. ábrán látható a görbék maximuma az alkalmazott PHSRN koncentráció függvényében. A bioszenzoros jelek a sejtadhézió jól ismert szigmoid alakúak voltak. A görbék maximuma jól láthatóan nőtt 700  $\mu\text{g/ml}$  PHSRN koncentrációig, onnantól pedig csökkent. Ez azt jelenti, hogy kisebb koncentrációknál a PHSRN növelte a sejtadhéziót, majd egy adott koncentráció felett az adhézió elkezdett csökkenni. Ezt az effektust úgy lehet magyarázni, ha feltesszük, hogy az RGD-nek és a PHSRN-nek ugyanaz a kötőhelye az integrinen, mert ha nincs elég RGD a felszínen, hogy minden kötőhelyet elfoglaljon akkor a maradék helyekre a PHSRN be tud kötni erősítve az adhéziót, viszont ha a PHSRN nagy koncentrációban van jelen, akkor elkezd kiszorítani a kötőhelyekről az RGD-t így csökkentve az adhéziót.

Tervezek további méréseket főleg a 700  $\mu\text{g/ml}$  feletti koncentráció tartományban, hogy jobban alá tudjam támasztani ezt a fenti mérést, illetve tervezek olyan méréseket végezni, ahol a PHSRN-t az RGD-vel együtt a felületre kötöm ki.



1. ábra: a) Optikai bioszenzor által mért kitapadási görbék HeLa sejtek esetén különböző PHSRN koncentrációknál. b) Az optikai bioszenzor által mért görbék maximális értéke a PHSRN koncentráció függvényében ábrázolva [Magyaródi Beatrix: PHSRN polipeptid oldat hatása a HeLa sejtek adhéziójára]

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 az integrin-ligand kötés asszocióján és disszociációján kívül figyelembe veszi a az integrinek toborzódását az adhéziós zónába kinetikus sebességi állandók segítségével. A csatolt közönséges differenciálegyenlet rendszerben az egyenletek a ligand (L), a szabad integrin (I), és az integrin-ligand komplex (B) időbeli változására lettek felírva:

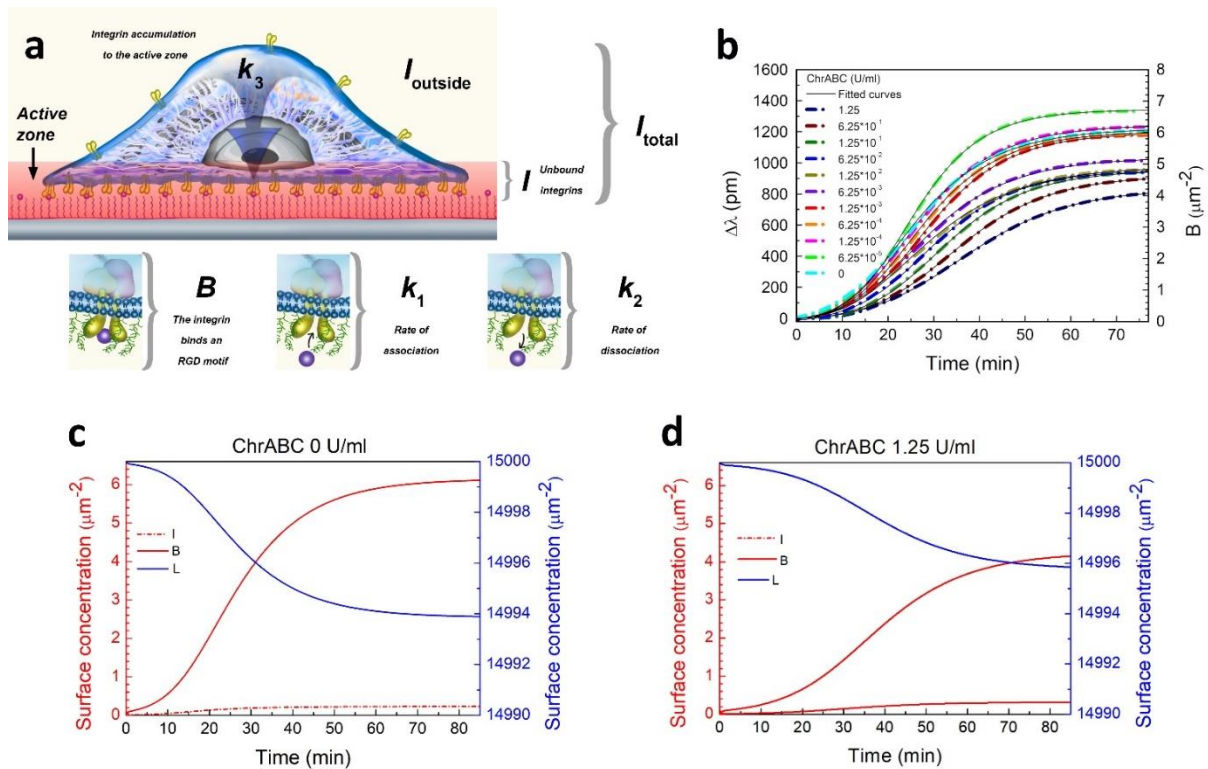
$$\frac{dB}{dt} = k_1 L * I - k_2 B \quad (1)$$

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

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

ahol  $k_1$ , és  $k_2$  az integrinek és a ligandnak az egymáshoz történő ki- és bekötődésének a sebességi állandója,  $k_3$  az integrinek toborzódásának sebességi állandója az adhéziós zónába.  $I_{\max}$  az integrinek maximális lehetséges felületi koncentrációja az adhéziós zónában, ezt azt jelenti, hogy amikor az integrin koncentráció eléri ezt az értéket akkor leáll az integrinek toborzódása. (2a. ábra)

Ahhoz hogy a modellel a bioszenzoros adatokat ki lehessen értékelni el kellett végezni egy kalibrációt, mivel az általunk használt optikai bioszenzor a beeső és visszaverődött fény hullámhossz eltolódását méri, ami arányos a hullámvezető réteg feletti 150-200 nm-es rétegben létrejövő sűrűségváltozással, míg a modellt felületi koncentrációra írtuk fel. Mivel a bioszenzoros jel maximuma 1200 pm körül szokott lenni HeLa sejtek esetén, így ez felel meg az integrinek maximális felületi sűrűségének. A HeLa sejteknek kitapadt állapotukban a területük mikroszkópos képek alapján  $1000 \mu\text{m}$ , és úgy becsültük, hogy ekkor az adhéziós zónában 6000 kötött integrin van jelen. Ezek alapján kiszámoltuk, hogy 1 pm hullámhossz eltolódás nagyjából  $1/200 \mu\text{m}^{-2}$  kötött integrin felületi sűrűségnek felel meg HeLa sejtek esetén.

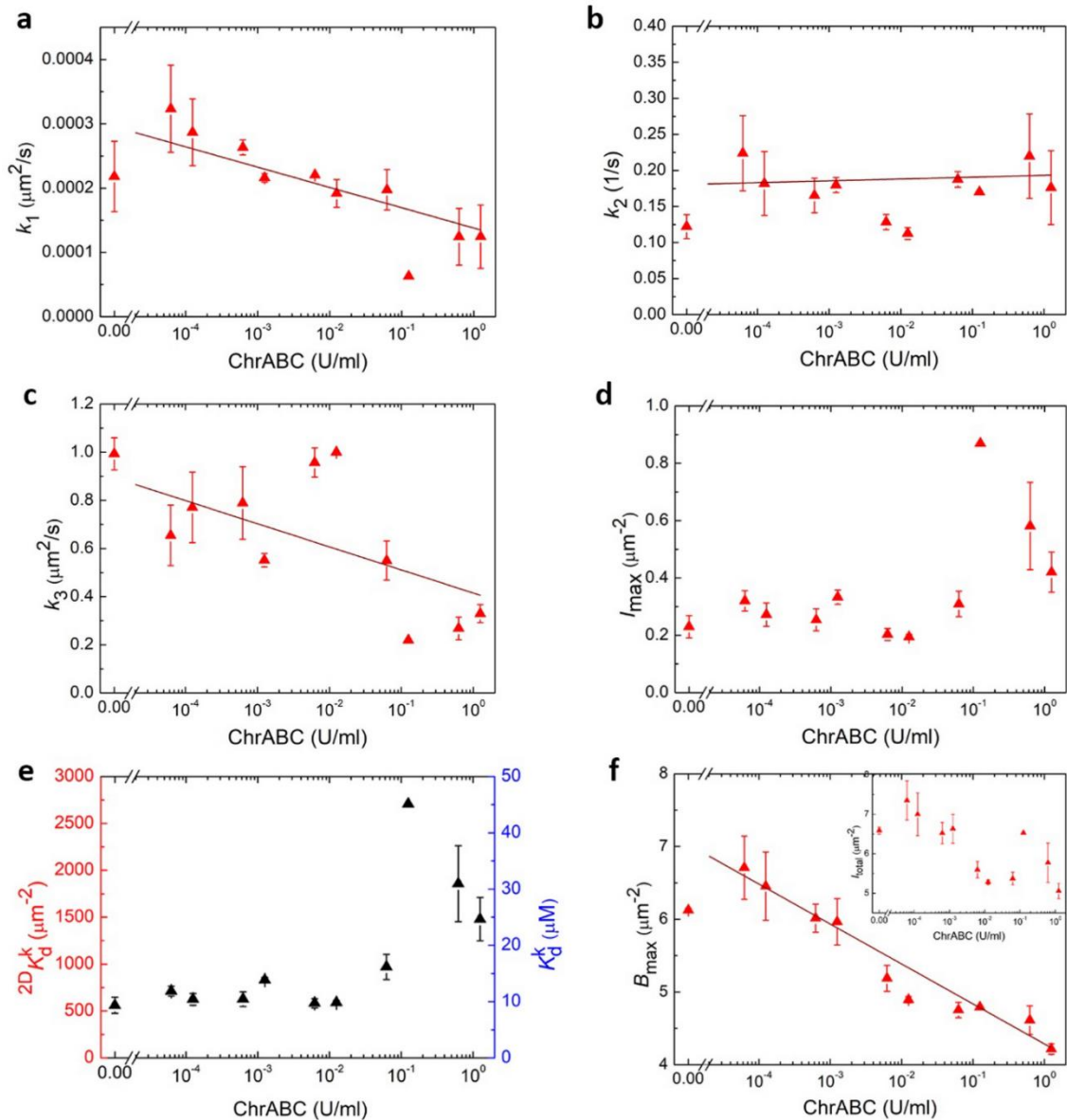


2. ábra: a) A sejtadhéziót leíró kinetikai modell szemléltetése. b) Optikai bioszenzorral mért kitapadási görbék különböző enzim koncentrációknál (színessel) illetve a modell illesztése az adatokra (fekete). c-d) Az integrin, ligand illetve integrin-ligand komplex felületi sűrűségének változása az adhézió során két különböző enzim koncentráció mellett. [1]

Az első alkalmazása a modellnek HeLa sejtek adhéziójának változását vizsgálta különböző koncentrációjú ChrABC enzim jelenlétében. Ez az enzim a glikokálixt emésztí, így lehetővé téve annak vizsgálatát, hogy a glikokálix milyen hatással bír a sejtadhézió során. A bioszenzoros adatokra MatLab kód segítségével illesztettem meg a modellt (2b. ábra). Az illesztett paraméterek a  $k_1, k_2, k_3$  és  $I_{max}$  voltak, a kezdeti feltételek pedig a következők: a ligand felületi sűrűsége  $15000 \mu\text{m}^{-2}$  (a mérés során alkalmazott felületkezelésre jellemző), az integriné  $0,1 \mu\text{m}^{-2}$  és kötött integrin-ligand komplex pedig nem volt jelen. Az integrin, ligand illetve integrin-ligand komplex felületi sűrűségének változása az adhézió során két különböző enzim koncentráció mellett a 2c. illetve 2d. ábrán látható.

Az illesztett paraméterek értékei az enzim koncentráció függvényében a 3a-d. ábrákon láthatóak, a  $K_d^k$  és  ${}^{2D}K_d^k$  értékei a 3e. ábrán valamint az adhézió során a kötött integrin-ligand komplex maximális felületi sűrűsége a 3f. ábrán látható. Az enzim koncentráció növelésével, tehát glikokálix emésztésével az integrin és ligand asszociáció, az integrinek toborzódása és a kötött integrin-ligand komplex maximális felületi sűrűsége csökkent, míg az integrin-ligand komplex disszociációja nem változott. A disszociációs állandó nagy koncentrációknál megnőtt.

A fenti eredmények alapján arra lehet következtetni, hogy a glikokálix regulációs szerepet tölt be az integrin és ligand asszociációjában és hatással van az integrinek toborzódására is.



3. ábra: a-d) A kinetikai modell paramétereinek illesztett értékei az enzim koncentráció függvényében. e) A  $K_d^k$  és  $2D K_d^k$  értékei illetve f) az adhézió során a kötött integrin-ligand komplex maximális felületi sűrűsége az enzim koncentráció függvényében. [1]

### Publikációk

1. Kanyo, N., Kovacs, K.D., Saftics, A. *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* **10**, 22422 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80033-6>

Kinga Dóra Kovács, Martin Novák, Zoltán Hajnal, Csaba Hős, Bálint Szabó, Inna Székács, Ye Fang, Attila Bonyár and Robert Horvath. Label-free tracking of whole-cell response on RGD functionalized surfaces to varied flow velocities generated by fluidic rotation (Journal of Colloid and Interface Science, bírálat alatt)

### Tanulmányi tevékenység az aktuális félévben

Evolúciós játékelmélet, Az érzékelés biofizikája EA

### Témavezetés

Magyaródi Beatrix, Egészségügyi mérnök MSc hallgató, BME Kari TDK I. hely