

2. félévi beszámoló

Balogh Anna (baloghanna42@student.elte.hu)

Statisztikus Fizika, Biológiai Fizika és Kvantumrendszerek Fizikája PhD program

Témavezető: Derényi Imre, Horváth Róbert

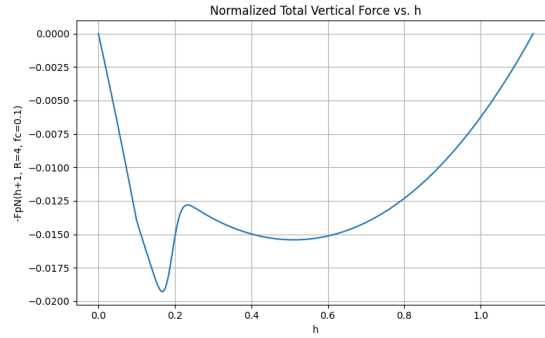
A dolgozat címe: A sejtadhézió kísérletes és elméleti biofizikai vizsgálata

Bevezetés

Az egyedi sejtek adhéziója kulcsfontosságú tényező a biológiai és orvosbiológiai kutatásokban, azonban ennek pontos mérése nagyszámú sejt esetén továbbra is kihívást jelent. A sejtek adhézióját jól jellemzi az az erő, amely szükséges a tapadó sejtek leválasztásához a felületről. Ez az erő mérhető közvetlenül és közvetetten is. A közvetett erőméréshez jól alkalmazhatók a jelölésmentes, felületérzékeny optikai bioszenzorok. Az általuk mért jel intenzitása arányos az adhéziós zónában lévő anyagmennyiséggel, és az eredményekhez kinetikai görbék illeszthetők. Az optikai jelek egyedi sejtekre történő erőkalibrálása révén a módszer alkalmassá vált nagy sejtszám mellett is az adhéziós erőgörbék pontos meghatározására. A közvetlen erőmérés egyik eszköze a mikrofluidikai csatornával és nyomáskontrollerrel kombinált atomerő-mikroszkóp (FluidFM). Nincs szükség hosszú várakozási időre a sejt-felület kapcsolatok kialakulásához, mivel már tapadt sejtek is mérhetők rövid időn belül. Az így nyert erő-távolság görbék lehetővé teszik az adhéziós erők nagy pontosságú meghatározását. Kutatásom célja az adhéziós folyamatok vizsgálata a fenti módszerek alkalmazásával: mérések tervezése és kivitelezése, valamint optikai és biofizikai modellek kidolgozása.

Az aktuális félévben elvégzett kutatások ismertetése

A félév során egy mechanikai modellt fejlesztettem tovább, amely a sejtek és a felszín közötti adhéziós kölcsönhatásokat írja le geometriai és fizikai paraméterek alapján. A cél az volt, hogy a sejt felszínére ható tapadási erőket numerikusan jellemezzem, különös tekintettel azokra a kötési erőhatásokra, amelyek a sejt felszín és az aljzat között alakulnak ki különböző kötési sűrűség és rugalmassági eloszlások mellett. A modellben a sejtet egy félgömbszerű testként értelmeztem, amely különböző sugarak mentén rugókkal kapcsolódik az adhéziós felszínhez. Ezek a rugók a sejt és a felszín közötti kötések reprezentálják. A rugók nyújtása és a hozzájuk tartozó erő kiszámítása a geometriai paraméterek (sejtméret, nyugalmi hossz, deformációs magasság) és a rugóállandók függvényében történik. A tapadási erő vertikális komponensét numerikus integrálással határoztam meg, figyelembe véve az adott sugaraknál fellépő rugóerőket és kötési sűrűségeket. A modell fontos jellemzője, hogy képes figyelembe venni különböző eloszlásokat, mind a kötéshelyek sűrűségében ($\rho(r)$), mind a rugók merevségében ($f_0(r)$). Különböző eloszlási függvényekkel – például lineáris, kvadratikus, vagy Gauss-jellegű – vizsgáltam, hogyan változik az adhéziós erő távolság függvényében. Emellett bevezettem egy kritikus erő (f_c) paramétert is, amely felett a kötések elszakadnak, ezáltal a modell a teljes kütés felszakadásának hatásait is képes szimulálni. A számítások végén a teljes tapadási erőt normalizált formában ábrázoltam a sejt deformációs magasságának függvényében, így jól láthatóvá vált az erő-távolság (vagy erő-deformáció) kapcsolat különböző adhéziós és mechanikai eloszlások mellett. A modell jól használható az adhéziós zónák mechanikai jellemzésére, és potenciálisan illeszthető kísérleti erő-távolság görbékhez is.



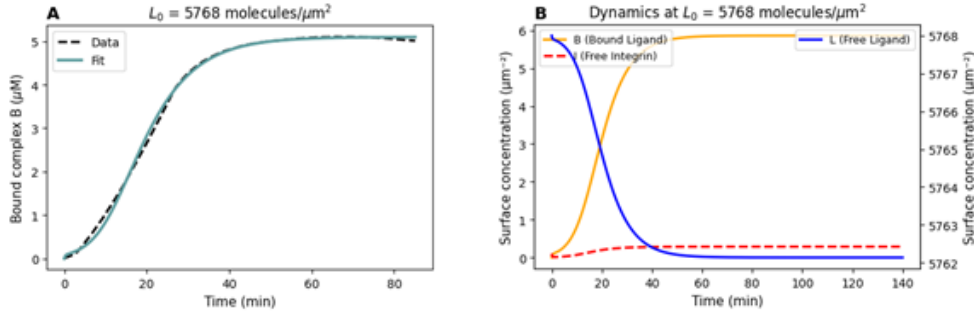
A félév során sejtes bioszenzoros kísérletekből származó kinetikai adatok elemzésével is foglalkoztam, különös tekintettel a SARS-CoV-2 tüskefehérje S1 alegysége és a HeLa sejtek felszínén természetesen jelen lévő RGD-specifikus integrinek közötti kölcsönhatás modellezésére. Ehhez egy korábban publikált kinetikai modellt használtam, amely egy differenciálegyenlet-rendszer segítségével írja le az integrin–ligand kapcsolatok időbeli alakulását a sejtek és a S1-gyel borított felszín között. A modell három fő változót tartalmazott: a szabad integrinek (I), a szabad ligandok (L), valamint a kötött komplexek (B) koncentrációját az adhéziós zónában. Ezt az alábbi egyenletrendszer írja le:

$$\frac{dB}{dt} = k_1 \cdot I \cdot L - k_2 \cdot B$$

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

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

A paraméterek közül a k_1 és k_2 az asszociációs és disszociációs sebességi állandók, k_3 pedig az adhéziós zónába történő integrin-rekrutációt jellemzi, míg $I_{\max}$ az elérhető szabad integrinek maximális felszíni sűrűsége. A modellillesztés során a HeLa sejtek valós idejű adhézióját követő optikai bioszenzoros (RWG) jelekből kiindulva alakítottam át az adatokat kötött komplex koncentrációkká, kihasználva a kalibrációs összefüggést: 1 pm eltolódás $\approx$ 0.005 kötött integrin/ μm^2 . A numerikus illesztést Pythonban végeztem, a `scipy.integrate.odeint` segítségével szimuláltam a dinamikus folyamatokat, míg a paraméterillesztést a `scipy.optimize.curve_fit` függvénnyel végeztem el, többszöri illesztéssel, különböző kezdőértékek melletti rácsalapú kereséssel. Az egyes illesztések közül azt választottam legjobbnak, amelyik a R^2 értéket adta. A modell segítségével meghatároztam a SARS-CoV-2 S1–integrin kölcsönhatás kétdimenziós disszociációs állandóját ($^2D K_d$), amely 276.96 ± 0.252 molekula/ μm^2 értéket adott. Ezt a koncentrációt egy feltételezett 100 nm vastag adhéziós zónával és az Avogadro-számmal $^3D K_d$ -vé ($4.62 \pm 0.03 \mu\text{M}$) konvertáltam, amely jól összehasonlítható más mérésekkel. Az eredmények nemcsak kvantitatív módon jellemezték az S1–integrin kötést, hanem rávilágítottak arra is, hogy a teljes hosszúságú S1 alegység sejt felszíni kötődése jelentős affinitással történik, annak ellenére, hogy az RGD motívum véletlenszerű orientációban van a felszínen. Ez alátámasztja az integrinek szerepét a SARS-CoV-2 alternatív sejt felvételi útvonalaiában, és lehetőséget nyújt új antivirális stratégiák kifejlesztésére, amelyek ezen kölcsönhatás gátlására irányulnak.



A továbbiak során célom a PHSRN peptid és sejtfelszíni integrinek közötti kötési dinamika kvantitatív jellemzése volt egy optikai bioszenzoros rendszer (resonant waveguide grating – RWG) adatai alapján. A mért bioszenzoros jelek a sejt-felület adhéziós kölcsönhatásának időbeli változását tükrözik, és egy többkomponensű kinetikai modell segítségével értelmezhetők, amely figyelembe veszi az RGD- és PHSRN-ligandumokat, valamint az integrinek szabad és kötött formáit. A használt modell ismételten egy differenciálegyenlet-rendszer, amely az alábbi fő komponenseket követi: szabad integrinek (I), szabad RGD-ligandumok (L_{RGD}), szabad PHSRN-ligandumok (L_{PHSRN}), kötött RGD-komplexek (B_{RGD}), kötött PHSRN-komplexek (B_{PHSRN}). A modell illesztése során a PHSRN oldatkonzentrációját először egyenértékű felszíni ligandum-sűrűséggé konvertáltuk, figyelembe véve az adhéziós zóna feltételezett vastagságát (10 nm), az Avogadro-számot és a térfogat–felület átváltási tényezőket. Ez lehetővé tette, hogy az RWG-mérésekből származó kinetikai görbéket közvetlenül felhasználjuk a kötési dinamikát leíró egyenletek illesztéséhez. A paraméterillesztés egy iteratív lépéssorozatban történt. Az illesztéshez használt modell:

$$\frac{dB^{RGD}}{dt} = k_1 L^{RGD} I^{RGD} - k_2 B^{RGD}$$

$$\frac{dB^{PHSRN}}{dt} = k_4 L^{PHSRN} I^{PHSRN} - k_5 B^{PHSRN}$$

$$\frac{dL^{RGD}}{dt} = -k_1 L^{RGD} I^{RGD} + k_2 B^{RGD}$$

$$\frac{dL^{PHSRN}}{dt} = -k_4 L^{PHSRN} I^{PHSRN} + k_5 B^{PHSRN}$$

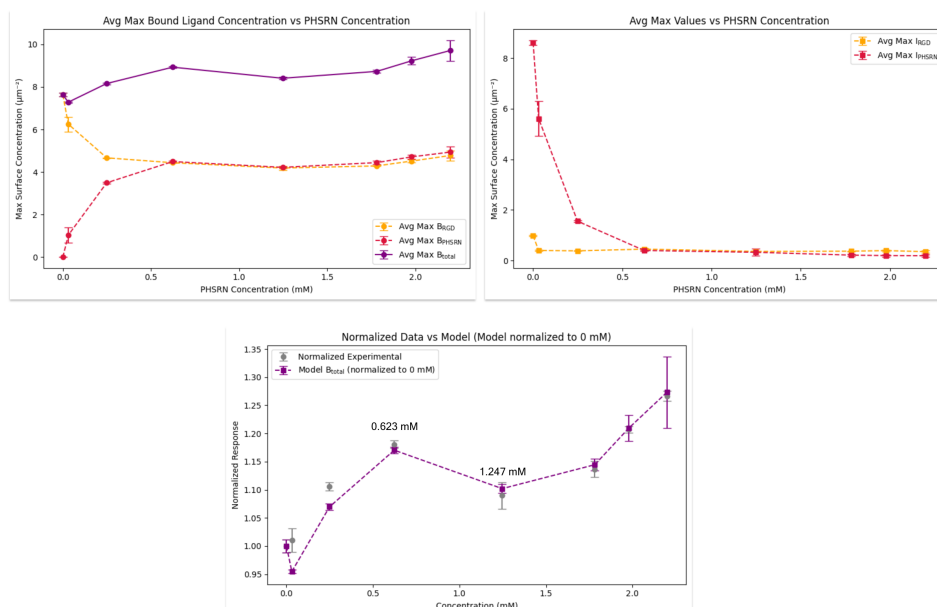
$$\frac{dI^{RGD}}{dt} = -k_1 L^{RGD} I^{RGD} + k_2 B^{RGD} + k_3 (I_{\max} - I^{RGD}) B^{RGD}$$

$$\frac{dI^{PHSRN}}{dt} = -k_4 L^{PHSRN} I^{PHSRN} + k_5 B^{PHSRN} + k_3 (I_{\max} - I^{RGD}) B^{RGD}$$

$$B_{\text{measured}} = B^{RGD} + \epsilon B^{PHSRN} B^{RGD}$$

$\epsilon = 0,232$ értékkel. Az ϵ paraméter értékét iteratív illesztési eljárással határoztuk meg. Kezdetben az ϵ -t szabad paraméterként kezeltük az illesztési folyamat során, míg a többi modellparamétert rögzítettük. Ezen illesztésekből több adathalmazra kiterjedően ϵ értékek halmazát kaptuk, és ezek átlagát vettük előzetes becslésként. Ezt az előzetes ϵ átlagot felhasználva a fennmaradó modellparamétereket meghatározott paraméterhatárokon

illesztettük. Ezen eredményekből a nagy változékonyságot mutató illesztéseket, nevezetesen azokat, amelyek paraméterértékei egy nagyságrendnél nagyobb mértékben eltértek a többségtől, a szórásuk alapján kizártuk. Ezt követően a modellt a frissített ϵ átlag felhasználásával újra illesztettük, amelyet most rögzítettünk. A fennmaradó modellparaméterek illesztési értékeit elmentettük és rögzítettük a következő lépéshez. Az utolsó szakaszban az ϵ értéket ismét szabad paraméterként kezeltük, de ezúttal egyetlen legjobban illeszkedő értéket határoztunk meg az összes koncentrációra egyidejűleg. A modellt ezután ezzel a végső, globálisan optimalizált ϵ értékkel újra illesztettük, amelyet végig rögzítettünk. A megfelelő eredményeket végső paraméterkészletként mentettük. Az így kapott eredmények:



Publikációk

Kinetic analysis of label free cellular adhesion signals. Anna Balogh, Kinga Dóra Kovács, Beatrix Magyaródi, Boglárka Kovács, Nicolett Kanyo, Inna Szekacs, Robert Horvath. Kéziratban.

Quantifying Cellular Heterogeneity: Unraveling Log-normal Dynamics in Single Adherent Cells on Label-Free Optical Biosensor. Kinga Dora Kovacs, Nicolett Kanyo, Bálint Béres, Anna Balogh, Beatrix Peter, Inna Szekacs, Robert Horvath. Kéziratban.

The synergistic role of PHSRN in modulating HeLa cell adhesion: A real-time analysis of soluble and surface-bound interactions using label-free optical biosensor. Beatrix Magyaródi, Kinga Dóra Kovács, Enikő Farkas, Anna Balogh, Boglárka Kovács, Ildikó Szabó, Szilvia Bősze, Inna Székács, Robert Horvath. Kéziratban.

Charge-dependent intracellular pathways of functionalized gold nanoparticles: nanoinjection using robotic FluidFM versus passive and endocytic uptakes" has been received by journal Advanced Materials. Nicolett Kanyo, Kinga Dora Kovacs, Anna Balogh, Imola Rajmon, Beatrix Peter, Inna Szekacs, Istvan Lagzi, Kinga Molnar, Monika Truszka, Hideyuki Nakanishi, Robert Horvath. (Manuscript ID: adma.202511257)

Nanofluidikai csatornával ellátott fluidikai erőmikroszkóp (FluidFM) biofizikai és biológiai alkalmazásai. Balogh Anna, Rajmon Imola, Kovács Kinga Dóra, és Horváth Róbert. Beküldve.

Quantitative analysis of SARS-CoV-2 S1–integrin binding using live-cell label-free optical biosensing. Nicolett Kanyo, Kinga Dora Kovacs, Anna Balogh, Imola Rajmon, Beatrix Peter, Inna Szekacs, Istvan Lagzi, Kinga Molnar, Monika Truszka, Misao Fuji, Tomaso Zambelli, Hideyuki Nakanishi, Robert Horvath. Biosensors (Manuscript ID: biosensors-3706066). Beküldve.

Tanulmányi tevékenység az aktuális félévben

Gráfok a bioinformatikában (EA), Modern képalkotó technikák (EA)

Konferenciák az aktuális félévben

Sümeg, Membrán-Transzport Konferencia. FUNKCIONALIZÁLT NANORÉSZÉKEK ÉS ÉLŐ SEJTEK KÖLCÖNHATÁSAINAK JELÖLÉSMENTES VIZSGÁLATA A GLIKOKALIX ENZIMATIKUS EMÉSZTÉSÉVEL Balogh Anna, Kovács Kinga Dóra, Péter Beatrix, Molnár Kinga, Truszka Mónika, Lagzi István, Székács Inna, Horváth Róbert. Poszter.

Oktatási tevékenység az aktuális félévben: Modern fizika laboratórium (fizlab3f191a) heti 2 óra.

Elismerések: Egyetemi Doktori Kutatói Ösztöndíj 2024 (EKÖP-24-3-I-ELTE-525)