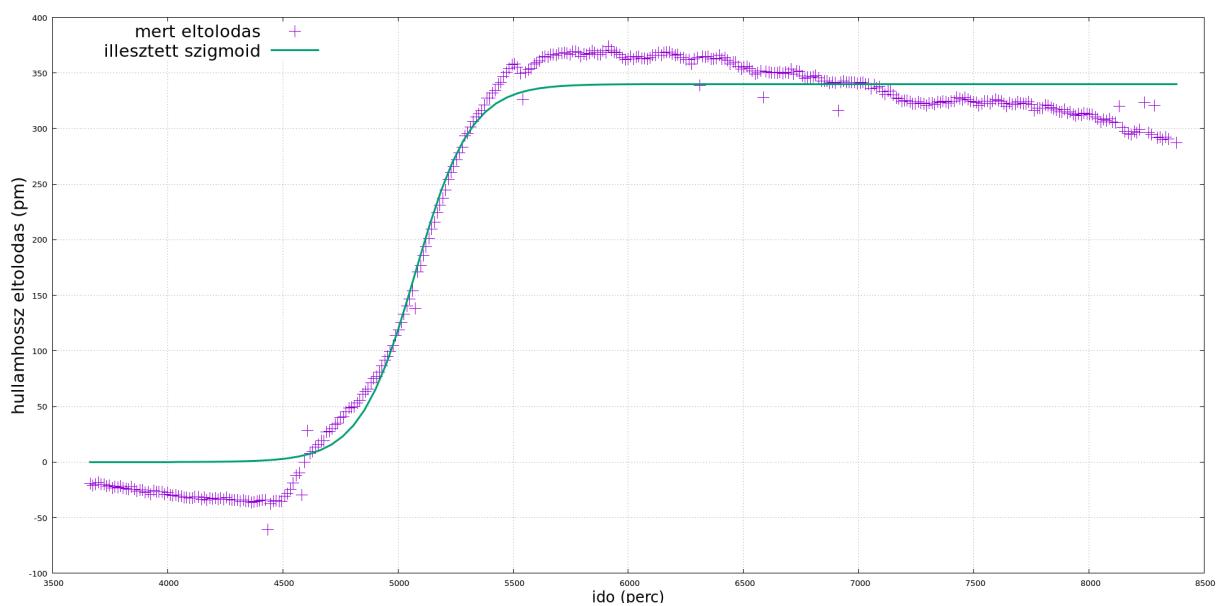
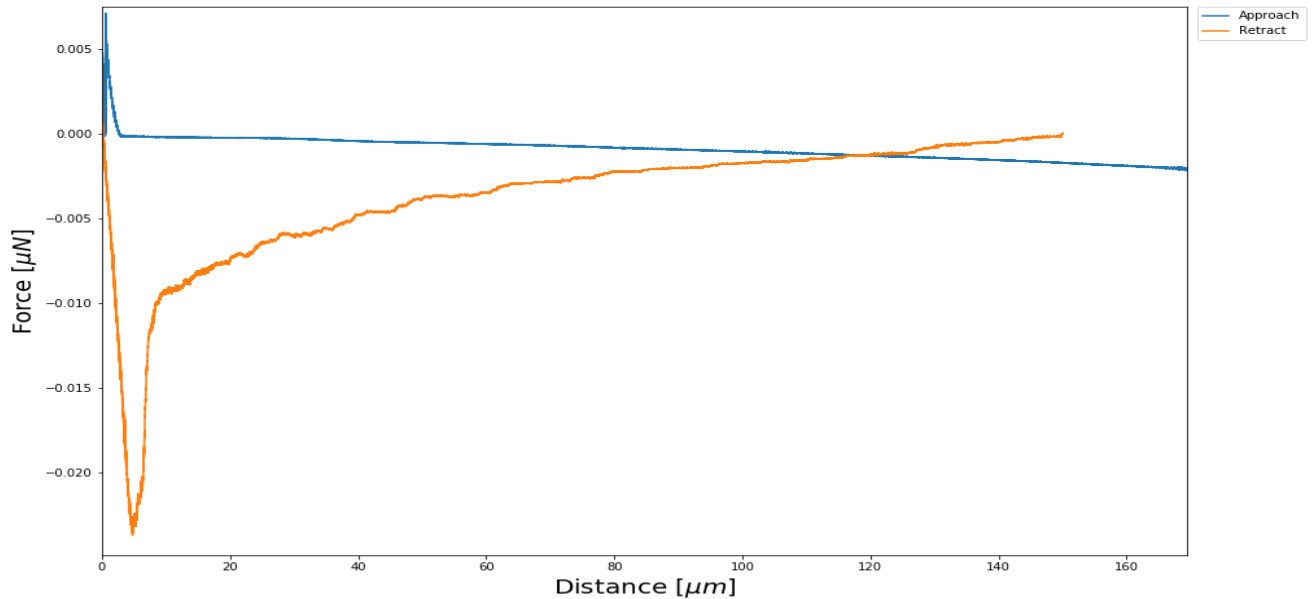


Doktori munkám során az ELTE TTK Biológiai Fizika Tanszéke és az MTA EK Nanobioszenzorika Lendület kutatócsoportja közötti együttműködés keretében egyedi sejtek adhéziós tulajdonságait vizsgálok optikai, mikrofluidikai és nanomechanikai technikák segítségével. Nanomechanikai oldalról a FluidFM BOT mikrofluidikai oldalról pedig a CellSorter automatizált mikropipetta az a két eszköz amellyel élő sejtek adhézióját egyedi sejt felbontással és nagy áteresztőképességgel lehet mérni. Az előbbi módszer egy olyan AFM tűn alapul amelybe egy nanofluidikai csatorna van vezetve, amire pozitív nyomást illetve vákuumot lehet kapcsolni. A tű végén elhelyezett lyuk segítségével egy adott sejtet vákuummal meg lehet fogni, majd a felülettől felemelve a hagyományos AFM elvét követve fel lehet venni a kitapadás erőgörbét. Ezzel a módszerrel tehát kvantitatíve vizsgálhatjuk az egyedi sejtek kitapadását. Munkám során, az erőgörbéből kinyert információ és egy egyedi sejt felbontású optikai bioszenzor kinetikai jelének összehasonlításán is dolgoztam. A különböző elven működő eszközök összehasonlításának következő lépésében az automatizált mikropipetta és a Fluid FM által szolgáltatott információ korrelációjának felderítése a cél. A mikropipetta erőmérése numerikus szimulációkon alapszik amelyek a sejtet egyszerű gömbként (vagy félgömbként) kezelik, ezért a kalibrálás szempontjából élő sejtek helyett célszerűbb 10 mikrométer átmérőjű polisztirol gyöngyökkel dolgozni. Ehhez egy új felületkezelési eljárás bevezetése szükséges aminek segítségével a gyöngyöket a felülethez tudjuk kötni egy ismert és kontrolálható erősségű molekuláris kapcsolaton keresztül. Erre a biotin-avidin kémiai rendszert választottuk ki melynek előnye, hogy a későbbi munkám során a gyöngyök felszínére különböző biológiai szempontból érdekes fehérjéket vagy szénhidrát láncokat köthetünk ki. A többkomponensű felület létrejöttét az Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy (OWLS) módszerével lehet monitorozni, amely a lokális törésmutatóváltozások követésével mutatja meg a molekuláris rétegek egymásraépülését.

A Fluid FM illetve optikai bioszenzor élő sejteken mért jelének összehasonlítása meglehetősen bonyolult eljárás, így szükséges volt egy egységesített kísérleti és adatfeldolgozási protokoll létrehozása. Az általam véglegesített protokoll alapján sikeres méréseket végeztünk, amelyek eredményeit a következő ábrák illusztrálják:



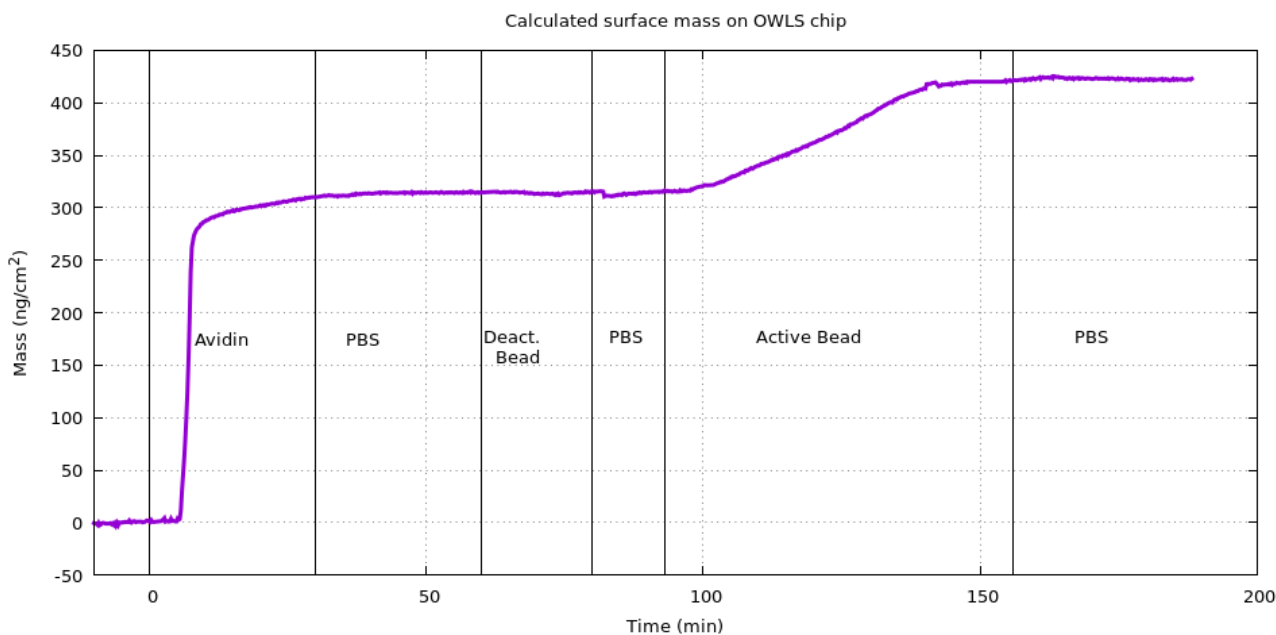
1. Ábra: Az optikai bioszenzor által mért hullámhossz-eltolódás időbeli alakulása egyedi HELA sejten. A jel egyenesen arányos a sejt kitapadása miatt létrejött törésmutatóváltozással. Alakja jól illeszthető szigmoid görbével, amelynek paraméterei (maximuma, illetve meredeksége) a sejt kitapadásának dinamikáját jellemzik.



2. Ábra: Az 1. ábrán jellemzett egyedi sejt adhéziós görbéje. A kék vonal a Fluid FM hegy közelítését jelenti, míg a sárga a felülettől való távolodást. A görbéből kinyerhető két legfontosabb paraméter a maximális adhéziós erő (a sárga görbe minimuma) illetve az adhéziós energia (a görbe integrálja).

Egy mérés során tehát különböző elven (optikai és mechanikai) működő módszereket kombinálunk a sejtek kitapadásának jellemzésére. Egy mérés folyamán 10-20 sejtet sikerült lemérni, ami meghaladja a hagyományos AFM alapú mérések áteresztőképességét. A technikai áttörés abban rejlik, hogy a kétféle mérést ugyanazon a sejten tudjuk elvégezni, a kapott adatokat tehát közvetlenül tudjuk korreláltatni. A munka következő szakaszában ezen eredményekre építve szeretnénk meghatározni a leglényegesebb paraméterkombinációkat és azok korrelációját. Az eredmények alapján a cikk írását elkezdtük, az elkövetkezendő hónapokban szándékozzuk beadni a kéziratot.

Az első féléves projektem másik irányvonala az automatizált mikropipetta Fluid FM BOT segítségével történő kalibrációja. Kísérleti rendszernek a biotin-avidin kölcsönhatást választottuk, amely a természetben előforduló legerősebb nem kovalens molekuláris kölcsönhatás. Az avidin egy 66 kDa-os fehérje míg a biotin egy kis szerves molekula amelyet kémiai úton kovalensen lehet hozzákötni polisztirol gyöngyök felületéhez. Amennyiben ezeket a gyöngyöket egy avidinnal kezelt felületre helyezük, azok a biotinnal való kölcsönhatás miatt kitapadnak. Az avidin adszorpcióját kezeletlen üvegfelületen OWLS segítségével lemértem, melynek eredményét a 3. ábra mutatja. Az így létrehozott avidinréteg specifikusan képes kötni a biotint gyöngyöket, azaz a fehérje natív állapotában, szabad kötőhelyekkel tapad ki az üvegre. A specifitást olyan gyöngyökkel ellenőriztem amelyek egy éjszakán keresztül avidinoldatban álltak, így a biotinjaik kötött állapotba kerültek, inaktiválódtak. Az ezt követő mikropipettás mérések tanulsága szerint az így létrejött fehérjeréteg nem tapad erősen az üveghez, így a gyöngyök immobilizására nem alkalmas. Ezen problémát megoldandó, a következő lépésben az üvegre elsőként egy PLL-PEG-biotin réteget viszünk fel, majd erre kerül az avidin. Mivel egy avidin fehérje 4 kötőhellyel rendelkezik, ezzel a felépítéssel is marad szabad kapacitás a biotin gyöngyök megkötésére. Ezen rétegfelépítés OWLS-sel történő elemzése jelenleg is folyamatban van.



3. Ábra: OWLS optikai jeléből számolt tömegsűrűség kezeletlen üvegfelületen. Az első lépésében az avidin tapad ki az üvegre, majd mosást követően a deaktivált biotinnal bevont gyöngyök kerülnek a rendszerbe ezek azonban láthatóan nem adnak jelet. A nem deaktivált gyöngyök viszont kitapadnak a felszínre, így bizonyítva a felületi rendszer specificitását.

Ezen irányvonal következő lépése a PLL-PEG-biotint tartalmazó rétegen a gyöngyök adhéziójának mérése elsőként automatizált mikropipettával, majd FluidFM-el. A kapott erőértékek összehasonlítása fontos információval szolgál majd a két technika komplementer alkalmazásáról valamint a mikropipettára vonatkozó numerikus fluidikai szimulációk megbízhatóságáról. A biotinnal bevont gyöngyök a jövőben további felhasználásra találnak majd. Terveink között szerepel egy baktériumadhéziós modell kialakítása, amelyben a biológiailag fontos fehérjéket a gyöngyök felszínére kötve szimulálunk egyes biológiai folyamatokat. Ezen kutatást a 2018 júniusában esedékes Biosensors 2018 nemzetközi konferencián szeretném bemutatni, melyre az absztrakt leadása „Single cell adhesion force measurements using computer controlled micropipette, Fluid FM BOT and optical biosensors to model the interactions of bacterial and mammalian cells” címmel megtörtént.

A fenti két fő kutatási területen kívül további projektekben is részt vettem, ezeket ismertetem röviden a következőkben. Az ELTE Biológiai Fizika Tanszékén felállított automatikus mikropipettával az Immunológiai Tanszékkel folytatott kollaboráció keretein belül sejtadhéziós méréseket végzek immunsejtek integrin receptorait vizsgálva. A diplomamunkám alapjául szolgáló mikrofluidikai emulziók stabilitásának felderítését célzó kísérleti és elméleti kutatást is folytatok. Ezen témából szintén kéziratot tervezünk leadni a következő félév során. A Nanobioszenzorika csoportban FluidFM méréseket végeztem a glifozát növényvédőszer sejtadhézióra gyakorolt hatásának kimutatása céljából. Sikertült egy óra alatt akár 60 sejtet lemérni ami a módszer különösen nagy áteresztőképességét bizonyítja.

A 2017 tavaszán Erasmus program keretében a University of Montpellier laborjában végzett munkám eredményeiről szóló publikáció kézírata jelenleg elkészítés alatt áll „Effect of pore size on hydroxapatite crystallization on porous silicon scaffolds” címmel. Ennek beadását a következő hónapban tervezük a Journal of Physical Chemistry C folyóiratba. Ezen munkát 2018 márciusában

Le Grand Motte-ban a Porous Semiconductors Science & Technology konferencián poszter formájában mutatom be.

A kutatási tevékenységek mellett az ELTE-n folyó oktatásba is bekapcsolódtam a Biológiai Fizika Tanszék által meghirdetett Modern Fizika Laboratórium Optikai spektroszkópia c. mérésének vezetésével. A labort 12 alkalommal tartottam a félévben. A munkához tartozik a hallgató jegyzőkönyvek és beugró ZH-k értékelése is.

A doktori iskola kurzusa keretében részt vettem, december elején a „Modern Light Sources and Applications” 3 napos nemzetközi iskolán a szegedi ELI központban.

Gerecsei Tamás
2018.01.09.