

Szegedi Tudományegyetem

Orvosi multidiszciplináris doktori iskola

**Egyedi sejtek biofizikai vizsgálata optikai
manipulációval mozgatott mikroeszközökkel**

Fekete Tamás

tézisfüzete

Témavezető

Dr. Kelemen Lóránd

Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biofizikai intézet



Szeged

2021

I. Bevezető és célkitűzések

A biológiai barrierек targetálásához, mint amilyen a véragyágát is, kulcsfontosságú megismerni és megérteni a viselkedését és a működését. A targetálást nagyban megkönnyítené, ha több információ állna rendelkezésünkre a barrier mechanikai, illetve a fizikokémiai tulajdonságairól.

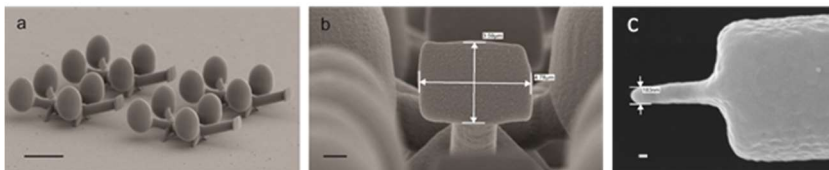
A disszertációmban bemutatom, hogy optikai csipesz alapú mikromanipulációs technikákkal véragyágát alkotó sejtek releváns tulajdonságait lehet a megismerni. Ehhez speciálisan erre a célra fejlesztett mikrostruktúrákat használtam, melyeket kétfotonos-polimerizációval készítettem SU-8 fotopolimerből, és mozgattam optikai csipesszel.

1. Munkám első részében élő humán agyi mikrovaszkuláris endothél (hCMEC/D3) sejtek Young modulusát határoztam meg nagy pontossággal. Az így kapott optikai csipesszel mért eredmények párhuzamba állíthatók az irodalomban publikáltakkal. A munka során a következő célokat tűztem ki:
 - Sejtbenyomódás vizsgálatához speciális mikrostruktúra tervezése és kivitelezése kétfotonos-polimerizációval
 - Kísérleti elrendezés fejlesztése, ahol a sejtek egy függőleges falra növeszthetők
 - hCMEC/D3 sejtek Young modulusának meghatározása az általunk fejlesztett optikai csipesszel manipulált mikroeszköz segítségével
2. Munkám második részében azt vizsgáltam, hogy a glutation (GSH) ami egy hatásos nanopartikulum targetáló ligand, milyen adhéziós erővel tapad elő endothél sejtek felszínéhez
 - PEG-alapú funkcionizációs protokoll fejlesztése, mellyel a GSH kovalens módon immobilizálható SU-8 felületeken
 - GSH borítottság meghatározása fluoreszcens mikroszkópia segítségével
 - Kitapadási valószínűség vizsgálata GSH-funkcionizált optikai csipesszel mozgatott ellipszoidok segítségével négy különböző sejt típuson
 - Adhéziós erő mérése GSH-funkcionizált SU-8 mikrostruktúra segítségével az általunk fejlesztett új optikai csipeszes módszerrel

II. Anyagok és módszerek

1. SU-8 struktúrák és kétfotonos polimerizáció

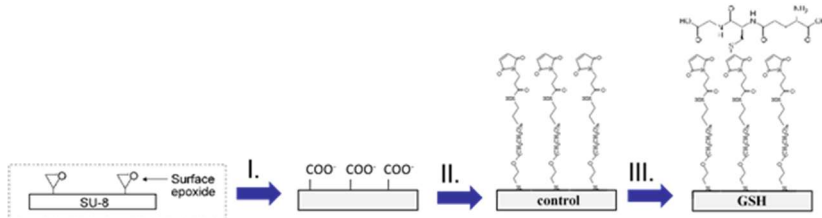
Az elvégzett kísérletek során használt mikrostruktúrák SU-8 fotopolimer vékonyrétegekből készültek. Az SU-8 egy biokompatibilis, kémiaailag inert műgyanta, mely nagy mechanikai erősséggel és törésmutatóval rendelkezik, és ezen tulajdonságai miatt kiváló választás optikai csipeszes mérésekhez. A függőleges, sejt növesztésre használt falak elkészítéséhez SU-8 2075-öt használtam, melyből UV-maszk litográfiával megközelítőleg 100 μm magas struktúrák készültek. Az ellipszoidiok, manipulátorok, illetve a blokkok $\sim 16 \mu\text{m}$ vastag SU-8 2007 vékonyrétegekből készültek, kétfotonos polimerizációval (TPP). A TPP egy megbízható módszer fényérzékeny anyagok mikrofabrikációjához, amely nagy precizitású 3D megmunkálást tesz lehetővé.



1. ábra: Pásztaó elektronmikroszkópos képek a mikromanipulátorokról. (a) Mikromanipulátorok, skála: 10 μm . (b) Adhéziós erőmérések során használt struktúra érintkező felülete, skála: 1 μm . (c) A tűvégi mikrostruktúra hegye, skála: 100 nm

2. Mikrostruktúra funkcionalizáció

Az adhéziós erő méréséhez a sejtek és az optikailag mozgatott és előzetesen funkcionalizált mikrostruktúrák között, ki kellett dolgoznom egy olyan protokollt, mely segítségével kovalens módon köthető ki a vizsgálni kívánt ligandum (GSH). Ahhoz, hogy a SU-8 kovalens módon módosítható legyen, első lépésként a felületi epoxy-gyűrűket fel kell nyitni, oxidatív kezelésekkel, mely eredményül egy aktivált karboxil-csoportokkal borított felületet eredményez (**I. lépés**). A következő lépésben az *amino-PEG-maleimid* elsődleges aminjét reagáltatjuk el a felületi karboxil-



2. ábra: Jelentősegteljes lépései a GSH-funkcionalizációs protokollnak

csoportokkal így a linker egy pszeudo-peptid kötéssel immobilizálódik (**II. lépés**). Az eddig a lépésig kezelt felületű SU-8 struktúrákat használtam kontrollként az erőmérés és a tapadási-megoszlás vizsgálata során. A GSH kikötéséhez a tripeptiden belüli cisztein tiol-csoportját reagáltattam el a linker maleimid részével, oxim-éter kötést hozva létre közöttük (**III. lépés**).

A felületi GSH borítottság meghatározásához CY-5 asszociált amin reaktív fluoreszcens festéket használtam, mely a glutation elsődleges aminját tudja megfesteni. Ehhez TPP-vel készített blokkokat funkcionalizáltam a fenti protokoll 3 főbb lépéséig, ezeket megfestettem a CY-5 festékkel, majd megvizsgáltam széles látóterű és konfokális fluoreszcens mikroszkóppal. Valamint *PEG-bisamin* kezelt felületet is megfestettem CY-5-tel és ezt is megvizsgáltam pozitív kontroll gyanánt.

3. Sejtkultúrák

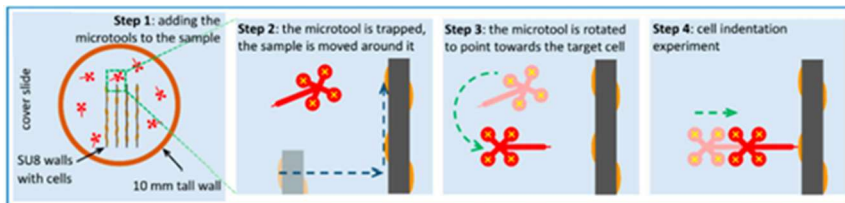
A kísérletek során használt primer patkány agyi asztrocita, pericita és endothél sejtek (RBEC), mind részt vesznek a véragygát felépítésében. Ezenfelül humán hCMEC/D3 sejtvonal sejtjeit használtuk. Ahhoz, hogy elősegítsük a sejtek tapadását mind az SU-8 falakhoz, mind az üveg hordozóhoz, valamint ahhoz, hogy konfluens réteget alkossanak, a megfelelő adhéziós promótert használtuk: Matrigélt, patkányfarok kollagént vagy *poli-L-lizint*. Ezenfelül egy PID-vezérelt fűtőelem garantálta a mintatér 37 °C-os hőmérsékletet a kísérletek során.

4. Holografikus optikai csipesz (HOT) és optikai erőmérés

A sejtelaszticitás vizsgálatához, a tapadási valószínűség meghatározáshoz, illetve az adhéziós erőmérésekhez a kutatócsoportunk HOT rendszerét használtam. A tapadási valószínűség vizsgálatok során az ellipszoidok csapázáshoz csak egy fókuszot használtam, viszont az elaszticitás és az adhéziós erőmérések során 4 fókuszot használtam, mellyel a mikromanipulátor 4 gömbjét lehetett csapdázni és ezzel a struktúrát nagy pontossággal mozgatni. Ezen fókuszok egy térbeli fázismodulátorral (SLM) lettek létrehozva, melyek 6 szabadsági fok mentén manipulálhatóak. Az optikai csapdával történt erőmérésekhez először meg kellett határozni a mikrostruktúrák csapdaállandóit, melyek a sejtelaszticitás vizsgálatához használt manipulátorra 16.49 ± 2 pN/ μm -nak adódott, az adhéziós erőmérésekhez használtira pedig 25.8 ± 2 pN/ μm -t mértünk. A nagy különbség a két struktúra csapdaállandója között valószínűleg a csapdázott gömbjeik átmérő-különbségéből adódik.

4.1: Sejtelaszticitás vizsgálata

Ezen kísérletekhez a hCMEC/D3 sejteket UV-maszk litográfiával készült SU-8 falakra növesztettük, amelyek egy kerek fedőlemez szubsztráton voltak elkészítve. Így a manipulátorok merőleges irányból közelíthették meg a vertikális falakon levő sejteket. Első lépésként a mikromanipulátorokat pipettahegy segítségével letörtük az üveghordozóról és átpipettáztuk őket a sejteket is tartalmazó mintába (3. ábra, 1. lépés). Ezen a ponton a mikrostruktúrák véletlenszerűen voltak szétszóródva a mintatérben. Egy individuális struktúrát csapdáztam a HOT nyalábjaival és elemelem a hordozó üveg felszíntől megközelítőleg $\sim 10\text{ }\mu\text{m}$ -rel, a csapdázó mikroszkóp objektívjét mozgatva. Mindezek után a csapda pozíciók manipulálásával a struktúra 4 golyója által kifeszített síkot merőlegesbe hoztam az optikai tengellyel, a struktúra hossz tengelyét pedig a sejteket is hordozó fallal. Ezenfelül megközelítettem a kiszemelt sejtet kb $1\text{--}2\text{ }\mu\text{m}$ -re a tárgyasztal mozgásával (2. lépés). Ezután a pozíciók finomhangolása történt a nyalábok manipulálásával, valamint az objektívvel való fókuszálással a sejt sziluettjét fókuszba hoztam úgy, hogy a mikrostruktúra hegye folyamatosan fókuszban maradjon (3. lépés). Az utolsó (4.) lépésben a sejtbenyomást hajtottam végre, mely során a manipulátor pozícióját már csak a HOT segítségével mozgattam 10 nm -es lépésekben $0.05\text{ }\mu\text{m/s}$ -os átlagsebességgel, és minden lépés után egy világos látóterű képet vettem fel.



3. ábra: Sejtrugalmasság mérésének vázlata: Manipulátorok a mintatérbe lettek pipettázva (1.lépés) a célsejt megközelítése a tárgyasztal mozgásával (kék nyílak, sárga keresztek az optikai csapdákat reprezentálják) (2.lépés) a zöld nyílak pedig a csapda pozíciók mozgását mutatják (3-4.lépés)

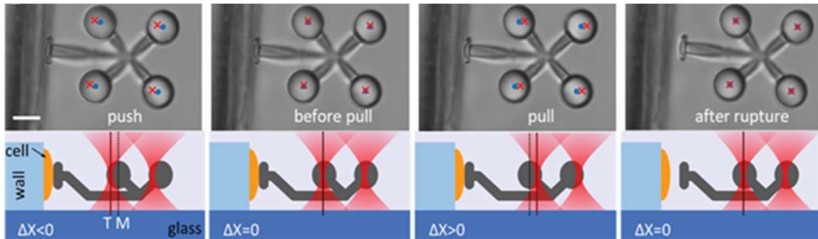
Mielőtt a struktúra hegye hozzáért volna a sejt felszínéhez vagy a falhoz (a kontroll kísérletek során), a mikroszköz csapdázott gömbjeinek középpontja és a csapda pozíció azonos volt. Amikor a hegy elérte a 'célpontot' a csapda pozíciók mozgása folytatódott kb. $1\text{ }\mu\text{m}$ -en, míg a manipulátor ehhez képest lemaradt.

A sejtek Young modulusának meghatározásához mind azt az erőt, amivel a mikrostruktúra nyomja a sejtet mind pedig a sejt benyomódását mérni szükséges. Mindkét erő meghatározásához a manipulátor pozíciójának precíz ismerete szükséges. Az erő a struktúrának az öt csapdázó nyalábokhoz képesti eltéréseivel arányos. A sejtek benyomódását úgy tudtuk meghatározni, hogy a kontroll kísérletek során mért csapdakitéréshez viszonyítottunk. Az így kapott különbségből tudtuk kiszámolni a Young modulust, melynek módját a későbbiekben ismertetem.

4.2 Adhéziós erőmérés

Ezen kísérletek során RBEC és hCMEC/D3 sejteket növesztettünk SU-8 falakra az előbbiekben leírt módon, valamint az előkészületek és a célsejt megközelítése (itt 100 nm-es lépésekkel) is hasonlóképpen történt. Miután a sejt és a manipulátor érintkező felületei összeérték (ezt vizuálisan határoztuk meg) a struktúrát még tovább mozgattam a sejt irányába a csapdázó nyalábokkal kevesebb mint egy mikront úgy, hogy pár 10 pN-os erőt fejtsen ki a sejttel szemben. Amikor a manipulátor hozzá lett nyomva a kiválasztott sejt felszínéhez ΔX (a különbség T csapda pozíciók és M a csapdázott gömbök tömegközéppontjai között) negatív. 10 másodperc kontaktidő után hátrafelé mozgattam a mikromanipulátort a nyalábok segítségével 250 vagy 50 nm-es lépésekkel, melyek: 0.5 $\mu\text{m/s}$ és 0.1 $\mu\text{m/s}$ sebességnek felelhetnek meg.

A visszahúzás elején a struktúra nem mozdul meg, valamint ΔX továbbra is negatív, de lassan növekszik, ahogy a csapdapozíciók távolodnak a sejttől. Ha nincs adhézió a sejt és a manipulátor között, ΔX nulla marad és a csapdázott manipulátor követi az őt tartó csapda pozíciókat. Ha van a sejt és a manipulátor között adhézió, akkor egy idő után ΔX pozitívvá válik, és észlelhető húzóerőt fejtenek ki az optikai csipesz csapdái a manipulátorra. Amikor az optikai erő nagyobbá vált, mint az adhéziós erő a sejt és a manipulátor között, akkor a struktúra elválik a sejt felszínétől és a csapdázott gömbök tömegközéppontjai újra egybe fognak esni a csapdapozíciókkal, azaz ΔX nulla lesz. Ezek után vagy ugyanaz a mikrostruktúrát, vagy egy másikat használtam a következő sejt vizsgálatához (maximum 3-szor használtam ugyanazt a manipulátort erőmérésre).



4. ábra: Képsorozat egy tipikus adhéziós erőmérésről (a visszahúzás menete). A piros keresztek a csapda pozícióit mutatják, a kék pöttyök pedig a struktúra gömbjeinek tömegközéppontját (skála: 5 μm). Minden kép alatt egy hozzátartozó sématis oldalirányú nézet, mely mutatja a csapdázó nyalábok relatív pozícióját a mikrostruktúrához viszonyítva. A vörös vonal mutatja a csapda pozíciót (T), a fekete viszont a manipulátor gömbjeinek tömegközéppontját (M).

5. Adatok kiértékelése

5.1. Sejtelaszticitási mérések kiértékelése

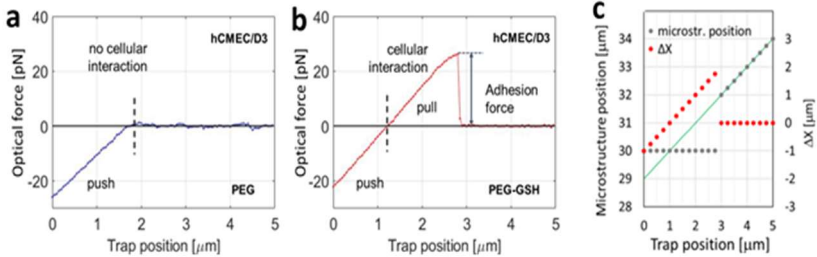
A mikromanipulátor pozíciója az endothél sejt vagy fal közelítése során készült videó minden egyes képen egy korrelációs módszerrel lett meghatározva, ahol a referencia az első képen meghatározott pozíció volt. A manipulátor csapdázott 4 gömbjének pozícióit egymástól függetlenül determináltam úgy, hogy az első képből készítettünk minden gömbre egy-egy templátot, melyek a felvétel összes további képeivel lettek összehasonlítva. Ez egy korrelációs mátrixot adott eredményül, melynek a maximuma a gömbök helyének közelében van, de amelyek pozícióit csak egy pixel pontossággal tudtuk meghatározni, ami jelen esetben 120 nm volt. Ahhoz, hogy szub-pixel pontossággal meg tudjuk határozni a csapdázott gömbök pozícióit a mátrixok maximumainak környékeit 2D Gauss függvénnyel illesztettük meg, és a Gauss függvény maximumának helye adta meg a gömbök pozícióit. Ezek után a mikrostruktúra hegyének a pozícióját határoztuk meg a gömbjeinek helyzetait alapul véve (rigid egységként tekintve a manipulátorra). Mivel a hegy képe erősen torzulhat a sejttel való érintkezés során, emiatt közvetve határoztuk meg a pozícióját az előbb leírtak alapján. A struktúra hegyének pozícióját ~5.5 nm-es pontossággal tudtuk meghatározni.

Végezetül a kiértékelés minden sejt benyomásra egy hegy pozíció versus csapda pozíció görbét adott, melyek két jól elkülöníthető részre bonthatóak: az első a struktúra mozgása a sejttel való kontaktus előtti szakaszon, ahol a csapdázott struktúra folyamatosan követi a csapda pozíciókat és a görbe meredeksége 1. Miután a manipulátor hozzáért a sejthez elkezd lemaradni a pozíciója a csapdapozíciókhoz képes, és a görbe meredeksége itt kisebb, mint 1. A kiértékelést követően kétféle görbe együttesel rendelkezünk, egy a sejtelaszticitás mérésekből, a másik pedig a későbbiekben referenciaként használt sejtek nélküli falhoz való hozzányomásokból származott. Mindkét görbecsoportnál kiválasztottunk egy-egy referencia görbét és ahhoz igazítottuk a többi.

5.2. Adhéziós erőmérések kiértékelése

Az elkészült képsorozatokot egy másik, szintén általunk írt Matlab kóddal értékeltük ki. Minden képen a program egy-egy kört illesztett a manipulátor csapdázott gömbjeire, és ezen körök középpontjait tekintettük az egyes gömbök tömegközéppontjainak. Ezután kiszámítottam a négy illesztett kör középpontjának átlagos helyzetét, és ábrázoltam az optikai csapda mozgásának irányára menti pozícióját az őket tartó csapdapozíciók átlagos helyzetének függvényében. A sejtfelszín és a mikromanipulátor szétválása után minden adhéziós erőmérés során az körök átlagolt középpontja egybeesett az őket csapdázó nyalábok pozíciójával és lineárisan növekedett (5. *ábra/c* szürke

pöttyök). Ezt követően egy egyenest illeszttem a lineárisan növekvő részére a görbének, melyet extrapoláltam a nulla csapda pozícióhoz, majd a körök átlagolt pozíciót kivontam belőle, így kaptam meg a ΔX értékeket (5. ábra /c piros pöttyök).



5. ábra: (a) és (b) egy-egy tipikus adhéziós erőmérés görbéjét mutatja (a) egy PEGilált /kontroll funkcionizált (b) GSH-funkcionizált mikrostruktúra egy hCMEC/D3 sejtek 50 nm-es lépésközökkel vizsgálva, melyen látható az erős adhézió kettejük között (c) ΔX meghatározását illusztrálja, melyen a mikrostruktúra pozíciója a csapdázó nyalábok helyének függvényében vannak (0 pozíció a struktúra visszahúzásának kezdetét mutatja). A szürke pöttyök a kép koordináta -rendszerben a visszahúzás irányában a modellezett mikromanipulátor pozícióját mutatják. A példában a 0-3 μm tartományban a manipulátor nem mozdul a sejt és közte ható adhézió miatt. Viszont 3 mm-nál elválnak a sejttől és folyamatosan követi a csapdázó nyalábok pozícióját. A zöld vonal illeszkedik ehhez az utolsó, 3-5 μm szakaszhoz. ΔX úgy számítjuk ki, hogy kivonjuk a manipulátor pozícióit az illesztett vonalból.

Az optikai erőt úgy kaptam meg, hogy a kapott ΔX értéket megszoroztam a struktúra rugóállandójával ($k_{\text{str}} = 25.8 \pm 2 \text{ pN}/\mu\text{m}$). Az adhéziós erő az a hirtelen csökkenése az optikai erőnek, ami a sejtmembrán és a struktúra közötti kapcsolata szakadáskor lép fel (5. ábra /b).

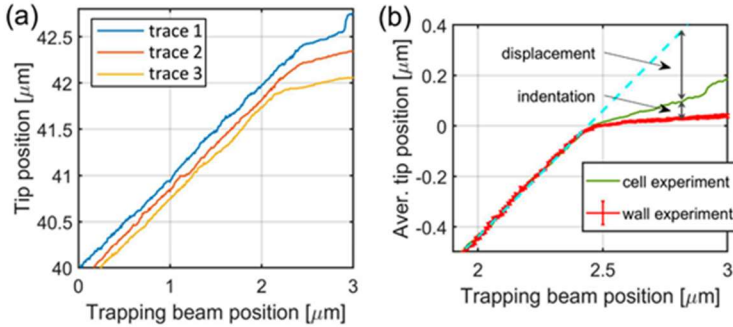
3. Eredmények és diszkusszió

1. Endothél sejtek Young modulusának meghatározása

Az endothél sejtek Young modulusának meghatározásához az optikai csapdázásos és atomerő-mikroszkopiás eljárásoknál széleskörben használt Hertz modellt használtuk. A modellt leíró egyenletben a Young modulus kiszámolásához a sejt membránján ejtett benyomódás mértékét, az ehhez használt erőt és a benyomó felület geometriáját kell ismerni.

Az sejt-elaszticitás mérésekor az erők meghatározásához a mikrostruktúra pozícióját ábrázoltuk a csapda pozíciók függvényében. A sejt és a manipulátor kontaktusa előtt a szerkezet követi a csapdák pozícióját, utána azonban a struktúra mozgása folytatódik ugyan tovább közel lineárisan a csapda pozíció következő 500-800 nm-es régiójában, a szerkezet hegye azonban itt már csak kevesebb, mint 150 nm-t mozog. A struktúra hegye ritkán oldal irányba is elmozdult a

sejtmembránon ~100 nm-t. Az átlagolt görbék, amiket a kontroll kísérletekből kaptunk (sejt nélküli SU-8 falakhoz nyomtuk a manipulátor hegyét, **piros** görbe) és egy ehhez igazított görbe amikor sejt elaszticitást mértünk (**zöld görbe**) a 6/b ábrán láthatók.

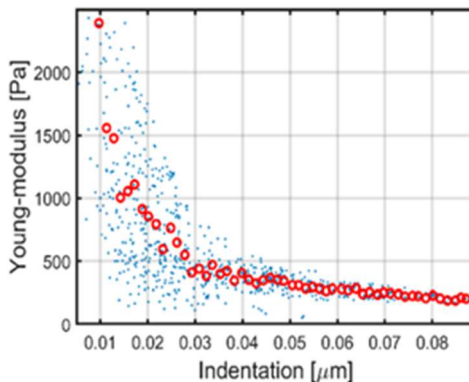


6. ábra: Manipulátor hegyének pozíció görbéi és az endothél sejtek Young modulusának meghatározása (a) hegy pozíció görbék a csapda pozíció függvényében ábrázolva még az összerendezés előtt. Az összerendezés utáni állapotot a (b) mutatja, valamint a falhoz nyomott referencia mérések görbéje pirossal van ábrázolva, a sejtelaszticitás mérések pedig zölddel

Mivel a hegy oldalirányú mozgást is tud végezni ezért a hegy pozícióját csak az első 400 nm-en értékeltük ki a kontaktus után, mivel ebben a régióban ez a mozgás elhanyagolhatóan kicsi. Ez az az effektus akkor is megfigyelhető volt, amikor a manipulátor hegyét az SU-8 falnak nyomtuk, ezért az érintkezés után a szerkezet még mozgott a fal irányába. Mivel ez a sejtelaszticitás mérése közben is előfordulhat, ezt a megfigyelt többletmozgást korrekcióként használtuk a sejtes mérésnél. Az 6/b ábrán két tipikus pozíció görbét láthatunk melyeket a Hertz modellhez használtunk az optikai erők meghatározásához. A hegy pozíciójának különbsége a falhoz és sejthez nyomás között határozza meg a benyomódás nagyságát. Ezt követően minden sejtes pozíció görbe lineáris szakaszára egyenest illesztettünk (6. ábra /b **cián** szaggatott vonal). A hegy pozíciójának különbsége ehhez a görbéhez képest a kontaktus után, adja meg a manipulátor csapda pozíciókból való kitérését. A benyomáshoz szükséges erőt a kitérés és a csapdaállandó (k_{sr}) szorzataként kaptuk meg, és az így kapott erők 1-5 pN közé estek, mely az AFM-mel minimálisan mérhető erő értéke alatt van. Mind a kitérés, mind a benyomódási görbéknek 2,5 μm körül van a töréspontjuk, de 400 nm-el a kontaktpont után már nagy hibákat produkálnak, így megbízhatóan a Young modulus csak a 2,5-2,9 μm tartományon belül határozható meg. A 7-es ábra a meghatározott Young modulusokat mutatja, melyek a 220 Pa és 1,5 kPa tartományba estek, viszont a 2,5-2,6 μm (benyomódások 0,01 és 0,02 μm között) közötti csapdapozíciókra meghatározott értékek nagymértékű zajt tartalmaznak. A kapott adatokat 4 mikrostruktúrával, 6 sejten összesen 19 mérés eredményeként kaptuk.

Ezen eredményeink párhuzamba vonhatóak AFM technikával meghatározott Young modulusokkal: például pulmonáris artéria endothél sejteinek 400-1500 Pa, borjú artéria endothél sejteknek 700-2700 Pa, valamint ugyanezen sejteken mágneses csipesz technikával 400 Pa értékek adódtak. Érdekes módon az AFM alapú méréseknél a Young modulus egy nagyságrenden belül változhat ugyanazon sejteknél. A legvalószínűbb okok a mért modulusok széles tartományára a mérési kondíciókra vezethetők vissza, úgy, mint az alkalmazott a benyomódás mértéke és sebessége és a struktúra formája, ami a sejttel érintkezik a mérés során. Az irodalomban ismert, hogy a benyomási rátával növekszik a mért Young modulus a viszkózus hatások miatt, valamint a viszkózus disszipáció alsó határa megközelítőleg 0,25 $\mu\text{m/s}$ szondasebesség. Az általunk végzett optikai csipeszes mérések általában 1 percre tartottak és csak a csapdázó fókuszok mozgásának utolsó hatodában érte el a struktúra hegye a sejtet, amikor is az benyomódik a sejtmembránba kb. 60 nm-el; mivel a benyomási erő 6 pN körül alakult, ami 1 pN/s loading rate-nek (az irodalomban ez az odanyomás sebességének feleltethető meg) felel meg, mely érték jóval kisebb, mint az AFM-es technikák esetén. A kísérleteink során az alacsony benyomási ráta miatt, úgy gondoljuk, hogy a viszkózus hatások elhanyagolhatóak

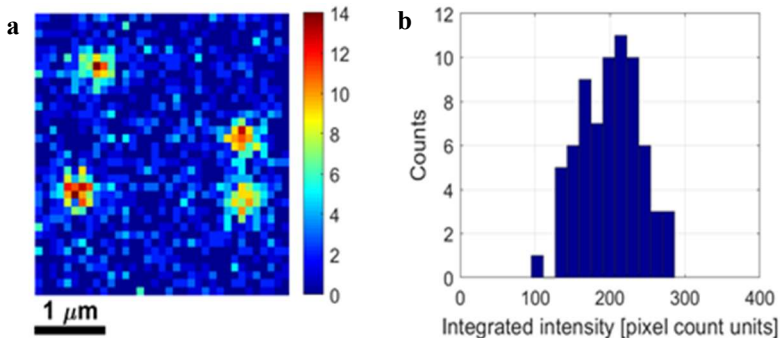
a Young modulus mérésekor. Ezenfelül, amikor a benyomódás túl nagy mértékű akkor a citoskeleton is befolyásolja a mérést, és nem csak a membrán elasztikus tulajdonságait mérjük. A kísérleteink során a rendelkezésünkre álló optikai erővel és a 300 nm-es görbületi sugarú mikrostruktúrákkal maximálisan 90 nm-es benyomódást tudunk elérni, ez a tartomány azonban a későbbiekben bővíthető, amennyiben nagyobb intenzitású csapdázó nyalábokat vagy kisebb átmérőjű gömböket használnánk a mikrostruktúra csapdázásához.



7.ábra: Az összes hCMEC/D3 sejteken mért Young modulus. A kék pöttyök mind a 800 pontpárt reprezentálják (40 csapdapozíció x 19 kísérlet) míg a piros körök az átlagaikat jelölik 60 régióan a 0-0,09 μm benyomódási tartományon belül

2. GSH borítottság meghatározása SU-8 felszínen

Ahhoz, hogy meghatározzuk a SU-8 GSH-val való borítottságát, elsőként meghatároztuk az integrált fluoreszcens intenzitását egy individuális CY-5 molekulának (8. ábra /a); a részletes leírása a módszerek a tézisem Anyagok és módszerek fejezetében található. Az integrált fluoreszcens intenzitása egy individuális CY-5 molekulának 200 ± 39 pixel intenzitás egységnek adódott ($n=71$) (8. ábra /b). Ezt követően meghatároztuk az átlagos fluoreszcencia intenzitást minden pixelre (ahová a mintátér 100×100 nm-es területét képeztük le) a GSH-val funkcionizált mintán, amire 6727 ± 349 ($n=7$) értéket kaptunk, illetve a PEGilált mintákon, ahol 1794 ± 224 ($n=21$) értéket. A PEGilált és a GSH funkcionizált minták közötti pixel intenzitás különbség egy μm^2 ra vetítve és osztva az individuális CY-5 molekula intenzitásával adta eredményül a GSH borítottságát, ami 2464 ± 770 molekula/ μm^2 -nak adódott. Azt feltételezván, hogy egy CY-5 fluorofór egy GSH-hoz köt, egy négyzet mikron SU-8 felületen megközelítőleg 2500 GSH molekula immobilizálható kovalens kötéssel.

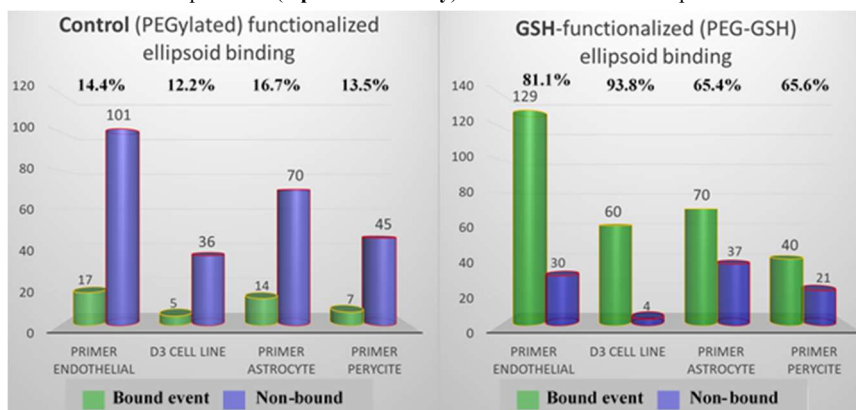


8. ábra: Individuális CY-5 molekula integrált intenzitása fluoreszcens képekből (a) melyet a homogén módon funkcionizált SU-8 felületek CY-5 borítottságának meghatározásához használtunk (a színskála a fluoreszcens intenzitást mutatja pixel szám egységekben) Mivel az individuális CY-5 molekula intenzitása uniform, így egy jól meghatározott átlag intenzitás értéket kaptunk (b)

3. Tapadási valószínűség vizsgálata 4 különböző sejt típuson

Az adhéziós erőmérések előtt, előzetes kísérletként egyszerű, TPP-val készített SU-8 ellipszoidokkal tapadási valószínűséget vizsgáló kísérleteket hajtottam végre 4 különböző sejt típuson; primer patkány agyi asztrocita, pericita, endothél (RBEC) és humán agyi endothél sejtvonal (hCMEC/D3) sejtein, hogy demonstráljam, hogy a GSH-val funkcionizált ellipszisek nagyobb hatékonysággal tapadnak ki a sejtek felszínéhez, mint a PEGiláltak. (Ezen kísérletek során a sejteket az üveg hordozóra növesztettük a falak helyett.) A kísérletek során azt vártuk,

hogy a GSH-val funkcionalizált SU-8 ellipszisek jóval nagyobb tapadási arányt érnek majd el, mint a PEGiláltak. Minden sejt típussal legalább 2 mérést hajtottam végre különböző napokon és kultúrákon. Egy tapadási esemény a következőképpen zajlott; egy individuális, előzetesen funkcionalizált ellipszoidot (PEGilált vagy GSH-val bevont) az optikai csapda fókuszával a sejt felszínhez nyomtam a sejtmag közelében oda, ahol már viszonylag lapos volt a sejt. 10 másodperc kontaktidő után az optikai csapda lassú felfelé irányuló mozgásával megpróbáltam az ellipszoidot eltávolítani a sejttől. Ennek bináris kimenete lehetett; ha nem volt elég adhézió a sejt és az ellipszoid között akkor az eltávolítható volt a membrántól (**nem-tapadási esemény**), ha elég nagy adhézió volt a struktúra és a sejt felszín között akkor, akkor optikai erővel nem lehetett eltávolítani az ellipszoidot (**tapadási esemény**). A 9-es ábrán az ellipszoidos kísérletek



9. ábra: Ellipszoid tapadási valószínűségei 4 különböző sejt típuson, bal oldalon a kontrollként használt PEGilált struktúrákkal végzett kísérletek eredményei láthatóak, míg a jobb oldalon GSH-nal funkcionalizáltaké

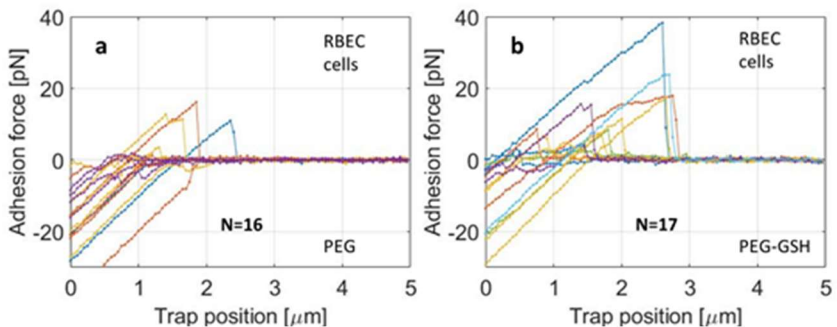
eredményei láthatóak, ahol a tapadási valószínűségek százalékértékként jelenítettem meg (tapadási események osztva az összes eseménnyel). Minden sejttípusra nézve jól látható módon a GSH-val funkcionalizált ellipszoidok jóval nagyobb valószínűséggel tapadtak ki, mint a kontrollként használt PEGilált struktúrák.

Ezen kísérletek két fontos tényre világítottak rá: egyik, hogy a GSH egy hatékony targetáló ligandum a véragy-gátat alkotó sejtek számára, a másik pedig, hogy a végső adhéziós erőmérések során a periciták és asztrociták nem lesznek használhatóak a kiterjedt térbeli alakjuk miatt, ami nagyban megnehezítené a megközelítésüket, amikor az SU-8 falakon lennének. A másik két endothél sejttípus sokkal laposabb, így őket jóval könnyebb vizsgálni a végső kísérleti elrendezéssel. Amikor a GSH jelen volt az SU-8 felületen az ellipszoidok 81%-os eséllyel tapadtak hozzá primer endothél sejtek felületéhez, míg a PEGiláltaknak (kontroll) csak a 14%-a. Hasonló

eredményeket értünk el hCMC/D3 sejteken is, ahol a GSH funkcionális struktúrák 93%-a tapadt a sejtekhez, a PEGiláltaknak pedig csak a 12%-a. Ezenfelül hasonló módon funkcionális (GSH/PEGilált) hegyes szilícium AFM szondákkal végeztünk méréseket hCMC/D3 sejteken, mely alátámasztotta az ellipszoid tapasztásos kísérletek során látottakat.

4. Adhéziós erőmérés GSH-nal funkcionális mikrostruktúrákkal

Ezekhez a kísérletekhez TPP-vel készített, optikailag mozgatott mikromanipulátorokat használtam, melyek lapos kontaktfelülettel rendelkeztek, valamint a sejtek hasonlóan az elaszticitás-mérésnél bemutatott elrendezéshez, egy függőleges falra voltak növesztve. Minkét sejtípussal legalább két mérést hajtottam végre, más napokon és más kultúrákon. Az egyes mérések elején a csapdázott szerkezetet a sejt felszínéhez nyomtam, és az adhézió mérése a szerkezet eltávolítása során történt. A manipulátorok eltávolítása a sejtekkel való kontaktus után (10 mp kontaktidő elteltével) a csapdázó fókuszok automatizált léptetésével történt. Ezek az eltávolítások kétféle lépésközzel történtek: 50 és 250 nm-es lépésekkel, melyek 0,1 $\mu\text{m/s}$ és 0.5 $\mu\text{m/s}$ sebességeknek feleltek meg. Amennyiben volt adhézió a manipulátor és a sejt között, úgy a kezdeti nyomó erő húzó erővé válik az eltávolítás során, ellenkező esetben a manipulátor elválik a sejt felszíntől és nem alakul ki húzóerő. Amikor volt adhézió, akkor a sejtmembránra egy bizonyos csapdapozícióig húzóerőt fejtett ki a struktúra, ahol pedig a kapcsolat megszűnt kettejük között, az optikai erő visszatért nullára. A szétváláskor megfigyelt optikai erő definiálja az adhéziós erőt a struktúra és a sejtmembrán között. Érdekes módon nem találtunk semmilyen korrelációt a kezdeti nyomó erő és a mért adhéziós erő között.



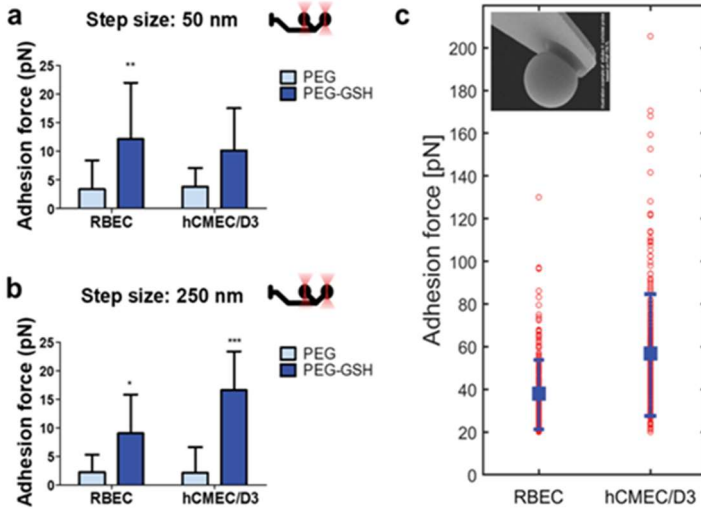
10. ábra: Adhéziós erő görbék az összes 50 nm-es lépésközzel RBEC sejteken végzett kísérletekből (a) PEGilált mikromanipulátorokkal (b) GSH funkcionális mikromanipulátorokkal

A 10-es ábra a és b része az összes RBEC sejtek vizsgálatából származó adhéziós erőgörbét tartalmazza melyeket GSH, illetve PEGilált mikromanipulátorokkal végeztem 50 nm lépésközzel.

Megfigyelhető, hogy az adhéziós erő mindig szignifikánsan nagyobb, amikor a GSH jelen volt az SU-8 felszínen, a kontroll csoporthoz képest akár nyolcszoros is lehet az eltérés. A GSH funkcionális mikrostruktúrák esetén a két különböző lépésköz (50 ill. 250 nm) közötti adhéziós erőkülönbségek nem tekinthetők statisztikailag szignifikánsnak.

A 250 nm-es lépésközzel végrehajtott mérések során 9 ± 6.6 pN átlagos adhéziós erőt mértem az RBEC sejteken és 16.4 ± 6 pN-t a hCMEC/D3 sejteken amikor a GSH jelen volt, míg a PEGilált mikrostruktúrákkal csak 2.2 ± 3 pN-t az RBEC, valamint 2 ± 4.3 pN átlagos erőket a hCMEC/D3 sejtekre.

Amikor a kisebb 50 nm-es lépésközt használtam, az átlagos adhéziós erő a GSH-val bevont struktúrákra 12.1 ± 9.5 pN-nak adódott RBEC sejteken és 10.2 ± 7.2 pN a hCMEC/D3-on, ezzel szemben a PEGilált struktúráknál 3.4 ± 4.9 pN az RBEC sejtekre és 3.8 ± 3.2 pN átlagot kaptunk a hCMEC/D3-ra. A hCMEC/D3 sejteknél megfigyelhetők voltak nagy platószerű görbék, míg ezt a tendenciát nem láttam sem a másik sejtnél, sem a nagyobb sebességnél.



11. ábra: Összegzése az adhéziós erőméréseknek GSH illetve PEGilált struktúrákkal agyi endothél sejteken, két különböző lépésköz használatával (a) és (b), a feltüntetett értékek átlagok ahol a standard deviációt is ábrázoltuk. Valamint a (c) az adhéziós erőmérés a GSH bevonatú kolloidális AFM szonda és az endothél sejtek felszíne között: A kék négyzetek az átlagaik, a bajuszok pedig az SD.

Hasonló módon GSH-val funkcionális kolloidális AFM szondával is végrehajtottunk méréseket agyi endothél sejteken, ahol egy $5 \mu\text{m}$ sugarú mikrogömb volt a tű végére erősítve (11. ábra /c részlet). Azért választottuk ezt a speciális AFM szondát, mivel hasonló méretű kontakt felülettel rendelkezik, mint az általunk használt mikromanipulátor. Az AFM mérések során 3-6-

szor nagyobb adhéziós erőket mértünk, mint az optikai alapú módszerünkkel (HOT); az RBEC sejtekre (38 ± 18 pN), és a hCMC/D3 sejtekre (57 ± 28 pN) (a mérések száma mindkét esetben 247 volt).

Erre az eltérésre az lehet a magyarázat, hogy az AFM mérések során a sejthez a szondát 100 pN-os erővel nyomtuk oda, ami majd egy nagyságrenddel nagyobb, mint a HOT-os méréseink során alkalmazott (10-30 pN-t használtunk átlagosan), így több kötés tud létrejönni a szonda és a sejt felszíne között. Ezenfelül az AFM mérési határa 10 pN körül mozog, emiatt csak azon mérések kerültek bele a végső számításba melyek ezt a limitet meghaladták.

A HOT méréseinkkel kapott 10-15 pN-os adhéziós erő a GSH bevonattal rendelkező mikromanipulátorok esetén azt sugallja, hogy ez egyetlen kötés felhasadásból származó esemény. Ezenfelül a sejtek és a GSH közötti interakció specifikusnak tűnik, mivel nélküle az adhézió csak 2-4 pN volt. A funkcionizáció során a GSH tripeptid középső cisztein tiol csoportját használtuk arra, hogy a PEG-linker maleimid funkciócsoportjához kössük kovalens kötéssel, melyből azt a következtetést vontuk le, hogy az nem játszik szerepet az adhézió kialakítása során.

Az általunk újonnan kifejlesztett adhéziós erőmérési módszerrel a jövőben szeretnénk különböző ligandumok tesztelését elvégezni, habár előfordulhat, hogy ha nagyobb számú kötés jön létre a mikrostruktúra és a sejtek között, akkor az alkalmazott optikai erő már nem lesz elég a kötések felszakításához. Ebben az esetben vagy a funkcionizációs protokollt vagy a manipulátor kontakt felületének méretét, formáját könnyen tudnánk adaptálni a célnak megfelelően. Kisebb módosításokkal az általunk fejlesztett módszer kiterjeszthető több tucat ligandum vagy targetáló molekula vizsgálatára, köszönhetően a PEG-linkerek széles választékának.

4. Konklúzió

Tézisemben bemutattam, hogy optikai csipeszen alapuló technikák hogyan használhatóak élő sejtek fizikai, illetve biokémiai tulajdonságaik vizsgálatára. A módszer segítségével élő endothél sejtek Young modulusa is meghatározható, ezekhez a kísérletekhez precízen mozgatott TPP-vel készült feladatorientáltan tervezett SU-8 mikromanipulátorokat használtam. A sejtelaszticitás mérési technikák nagy szórással adnak eredményeket a kísérlet paramétereitől függően. Ha nagy görbületi sugárral rendelkező felülettel és kis loading rate-tel (ami kis erőket is jelent) vizsgálunk egy sejtet akkor specifikusabban tudjuk vizsgálni a tisztán lineáris elaszticitását a sejteknek. Az általunk kidolgozott módszer teljességgel beleillik ezen vizsgálati körbe

Valamint munkám során megmértem GSH-nal kezelt felületek adhéziós erejét agyi endothél sejteken (hCMEC/D3 and RBEC), az általunk bemutatott HOT mérési technikánkat adaptálva a tapadási erő mérésére. A kísérletek során használt SU-8 mikromanipulátorok, képesek minimalizálni a csapdázó lézer sejtet károsító hatásait, továbbá a lézeres mikrofabrikáció lehetővé teszi, hogy a kísérleti elrendezéshez a legmegfelelőbb geometriájú szondát készítsünk. Mindkét kísérlet sorozatban olyan elrendezést használtunk, melyben a sejtek egy maszk-litográfiával készült falakra voltak növesztve, mely lehetővé tette, hogy az optikai tengelyre merőlegesen tudjuk mérni az elaszticitásukat vagy az adhéziós erőt, a csapdázott mikromanipulátorokat laterálisan mozgatva.

A méréseink során 10-15 pN-os adhéziós erőket mértünk GSH-nal funkcionalizált struktúrák és a sejtek között, ami annak fényében, hogy a targetáló ligand nélkül a kontroll (PEGilált) mérések során 3-8-szor kisebb erőket mérve specifikus kölcsönhatásnak tekinthető. Az általunk mért adhéziós erők egy nagyságrendbe esnek azokkal erővel, melyet az szakirodalomban publikáltak receptor ligandum párokra optikai csipeszes mérésekből. Az általunk bemutatott módszer kiterjeszthető lesz, hogy megkülönböztethetőek legyenek egyes és dupla tapadási események, mellyel információt kaphatunk a vér-agyátat targetáló ligandumok adhéziós erejéről élő sejteken. Valamint a funkcionalizációs protokollban szereplő PEG-linker módosításával könnyűszerrel több tucatnyi célmolekula immobilizálható a mikrostruktúra felületére.

Publikációs lista

MTMT azonosító: 10061212

Kumulatív hatástényező: 19,19

Tézisemhez kapcsolódó publikációim:

I. Tamás Fekete, Mária Mészáros, Zsolt Szegletes, Gaszton Vizsnyiczai, László Zimányi, Mária A. Deli, Szilvia Veszelka, Lóránd Kelemen; Optically manipulated microtools to measure adhesion of the nanoparticle targeting ligand glutathione to endothelial cells; *ACS Applied Materials & Interfaces*; 39018-29 Vol. 13, (2021); IF: 9,23

II. István Grexa, **Tamás Fekete**, Judit Molnár, Kinga Molnár, Gaszton Vizsnyiczai, Pál Ormos, Lóránd Kelemen; Single-Cell Elasticity Measurement with an optically Actuated Microrobot; *Micromachines*; 2072-2085: 11 9 Paper 882. 13 p. (2020); IF: 2,89

Tézisemhez nem kapcsolódó publikációim:

I. Gaszton Vizsnyiczai, András Búzás, Aekbote Badri Lakshmanrao, **Tamás Fekete**, István Grexa, Pál Ormos, Lóránd Kelemen; Multiview microscopy of single cells through microstructure-based indirect optical manipulation; *Biomedical Optics Express* 11: 2 pp. 945-962, 18 p. (2020); IF: 3,73

II. Aekbote Badri Lakshmanrao, **Fekete Tamás**, Jacak Jaroslav, Vizsnyiczai Gaszton, Ormos Pál, Kelemen Lóránd; Surface-modified complex SU-8 microstructures for indirect optical manipulation of single cells; *Biomedical Optics Express* (2156-7085): 7 1 pp 45-56 (2016); IF: 3,34