

Szegedi Tudományegyetem  
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar  
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

# Mikrofluidikai egysejt csapdák tervezése, modellezése és alkalmazása baktérium- és algasejtek vizsgálatára

Ph.D. értekezés tézisei

**Ábrahám Ágnes**

*Supervisors:* Dr. Galajda Péter  
Dr. Nagy Krisztina

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Biofizikai Intézet  
Biofotonika és Biomikrofluidika Kutatócsoport

Szeged  
2024

# Közlemények listája

## A Ph.D. dolgozat alapját képező közlemények listája:

- I. **Á. Ábrahám**, L. Dér, E. Csákvári, G. Vizsnyiczai, I. Pap, R. Lukács, V. Varga-Zsíros, K. Nagy and P. Galajda. Single-cell level LasR-mediated quorum sensing response of *Pseudomonas aeruginosa* to pulses of signal molecules. *Scientific Reports*, 14:16181, 2024.
- II. E. Széles, K. Nagy, **Á. Ábrahám**, S. Kovács, A. Podmaniczki, V. Nagy, L. Kovács, P. Galajda and S. Z. Tóth. Microfluidic platforms designed for morphological and photosynthetic investigations of *Chlamydomonas reinhardtii* on a single-cell level. *Cells*, 11:285, 2022.
- III. F. Bashir, S. Kovács, **Á. Ábrahám**, K. Nagy, F. Ayaydin, I. Valkony-Kelemen, Gy. Ferenc, P. Galajda, S. Z. Tóth and L. Sass et al. Viable protoplast formation of the coral endosymbiont alga *Symbiodinium* spp. in a microfluidics platform. *Lab on a Chip*, 22:2986-2999, 2022.

**Összesített impakt faktor: 15.9**

# 1. Bevezetés

## 1.1. Fenotípus heterogenitás mikrobák esetében

Az a tény, hogy a mikroorganizmusok a Föld majdnem minden pontján megtalálhatók, figyelemreméltó rugalmasságra és alkalmazkodóképességre utal. A mikrobák által benépesített helyek rendkívül változatosak lehetnek. Egyes élőhelyek hosszabb ideig stabilak maradnak, de jellemzőbbek a dinamikusan változó mikrokörnyezetek (változás a tápanyagellátottságban, hőmérsékletben, ozmolaritásban, pH-ban, stb.). A túlélés érdekében a mikrobáknak adaptálódniuk kell az új körülményekhez.

A biológiai diverzitás nem csak többféle mikroorganizmusból álló, komplex rendszerekben alakulhat ki, hanem alacsonyabb szintű biológiai szerveződés esetén is. Genetikailag azonos sejteknek, melyek ugyanazon környezeti hatásoknak vannak kitéve, gyakran eltérő a fenotípusuk. Ez a variabilitás biztosítja a populáció alkalmazkodását és túlélését kedvezőtlen körülmények között. A sejtek fenotípusának megváltozása rövid távon biztosítja a populáció túlélését, a hosszútávú adaptációhoz genetikai mutációk szükségesek.

A fenotípusos heterogenitás kialakulását több dolog is befolyásolhatja. Az egyik, a sejtekben lezajló sztochasztikus molekuláris folyamatok: a sejtek molekuláris összetétele és génexpressziós mintázata időben nem állandó és egyedről-egyedre is változhat. A másik ilyen jelenség, mely befolyásolja a sejtek közti különbségek kialakulását, az öregedés. A baktériumok esetében az öregedést a pólusok korával jellemzik, és a folyamat során az öregedő pólusnál feltehetően káros anyagok halmozódnak fel.

A mikroorganizmusok komplex rendszereket alkotnak, melyben a sejt-kommunikáció aktívan jelen van. Ez a kommunikáció többféle módon is megvalósulhat: például direkt fizikai kontaktussal, vagy közvetítő molekulákon keresztül (ilyen például a quorum érzékelés a baktériumoknál). Ezek az interakciók is kiválthatják az egyes sejtek fenotípusának megváltozását.

## 1.2. Mikroorganizmusok egysejt-szintű vizsgálata

A hagyományos mikrobiológiai vizsgálati módszereknek (pl. rázatott lombik tenyészet) két hátránya is van: az egyik, hogy túlságosan leegyszerűsít

rűsítik (homogenizálják) a környezetet, amivel a sejtek találkoznak. A természetben a mikroorganizmusok nagyon változatos felületi topológiákkal (kövek, levelek, vagy akár a bélbolyhok) és folyamatos vagy periodikus folyadékáramlással (eső, árvíz, vizelet, stb.) kerülnek szembe. Egy másik hátránya a folyadékkultúrákon végzett kísérleteknek, hogy egy adott paraméter mérése során a kapott eredmény a paraméter populációra számolt átlaga, mely elfedi a sejtek közötti különbségeket.

Az elmúlt két évtizedben az élettudományok terén jelentősen megnőtt a mikro- és nanotechnológia alkalmazása. A mikrofluidika és a mikrofabrikációs technológia lehetővé teszi folyadékok mikroszkopikus skálán történő manipulációját. Ezekben a rendszerekben már kis mennyiségű minta is elegendő a részletes analízishez.

A mikrofluidikai eszközök felépítésüket tekintve kamrákból, az őket összekötő csatornákból, membránokból, résekből és egyéb integrálható elemekből állnak. Ezek a rendszerek kiválóan alkalmasak a természetben előforduló változatos környezet modellezésére. Ezek a fizikailag és kémiaiilag is jól kontrollálható környezetek lehetővé teszik a mikroorganizmusok vizsgálatát nemcsak populációs, de egysejt szinten is.

A mother machine (MM) mikrofluidikai platform lehetővé teszi folyamatosan osztódó baktérium kolóniák korlátlan ideig történő vizsgálatát. Ebben az eszközben több száz generáción keresztül csapdázhatjuk a sejteket. Ezáltal tanulmányozható a baktériumok öregedése és a leszármazási viszonyok is nyomon követhetők egysejt szinten. A rendszer több száz, egyik oldalán zárt végű oldalcsatornát tartalmaz, melyek nyitott végükkel a főcsatornába torkollanak. Ezek az oldalcsatornák a sejtek csapdázására szolgálnak, ebből kifolyólag a szélességük és a magasságuk összemérhető a baktériumok átmérőjével, viszont hosszabbak, ezzel biztosítva a sejtosztódást követően a leánysejtek begyűjtését. A főcsatornán keresztül történik a folyamatos tápanyag utánpótlás. Ennek a méretei jelentősen nagyobbak az oldalcsatornákénál.

### 1.3. Algák egysejt-szintű vizsgálata

A zöldalgák szerepe a biotechnológiai kutatásokban és alkalmazásokban egyre jelentősebb. Kiváló modell organizmus a *Chlamydomonas reinhard-*

*tii* (*C. reinhardtii*). Függetlenül attól, hogy ez egy sokat tanulmányozott mikroorganizmus, a morfológiája, sejtciklusa és a fotokémiája közötti kapcsolat még mindig feltáratlan.

A *Symbiodinium* spp. a korallak nélkülözhetetlen szimbiontája. Ahogy az jól ismert, a klímaváltozás negatívan hat a korallzátonyokra, ezért fontos ezen mikroorganizmus stressz toleranciájának részletes vizsgálata. A protoplaszt technológia remek eszköz az oxidatív stressz tanulmányozására, de az életképes protoplaszt előállítása kihívást jelent.

A mikrofluidikai lehetőséget nyújt ezen biológiai problémák egysejt- és populáció-szintű vizsgálatára is.

## 1.4. Quorum érzékelés

A mikrobiális közösségekben a sejt-sejt kölcsönhatások igen gyakoriak és különböző formában jelennek meg. Az egyik ezek közül a quorum érzékelés (QS), ami egy sejtsűrűségeen alapuló sejtek közti kommunikációs rendszer, mely során az információ közvetítésében jelmolekulák vesznek részt. Gram-negatív baktériumok esetében ez a jelmolekula általában az acil-homoszerin-lakton molekulák családjába tartozik, melyek az acil oldalláncok összetételében és hosszában különböznek egymástól. A Gram-pozitív baktériumok oligopeptideket használnak.

Amikor a sejtsűrűség alacsony, a jelmolekulák termelése alapszinten történik. Ahogy a populáció nő, a jelmolekula koncentráció eléri egy küszöbszintet. Ekkor a jelmolekula hozzáköt a megfelelő intracelluláris receptorhoz és a receptor-jelmolekula komplex transzkripciós faktorként a sejtek szinkronizált viselkedését indukálja a génexpressziójukon keresztül.

A QS-nek jelentős szerepe van a sejtek összehangolt viselkedésében, például a biofilm kialakulásában, illetve különböző virulencia faktorok termelésében. Ez a folyamat lehetővé teszi a baktériumok számára, hogy többsejtű organizmusként funkcionáljanak, ezzel olyan előnyökre szert téve, melyre különálló sejtekként nem lenne lehetőségük. Egyes elméletek szerint a bakteriális QS volt az első lépés a többsejtű szervezetek kifejlődésében.

Az elsőként komolyabban tanulmányozott QS rendszer a *Vibrio fischeri* és *Vibrio harveyi* tengeri baktériumokban megtalálható LuxI-LuxR rend-

szer volt. Ezekben a fajokban a sejtsűrűségeen alapuló biolumineszcencia volt megfigyelhető. Később megmutatták, hogy ez a viszonylag egyszerű folyamat alkalmazható a legtöbb Gram-negatív baktérium QS rendszereinek leírására is.

#### 1.4.1. *Pseudomonas aeruginosa* quorum érzékelése

A *P. aeruginosa* egy Gram-negatív opportunistá patogén, a nozokomiális fertőzések leggyakoribb forrása. Ez a baktériumtörzs rendkívül ellenálló a hagyományos antibiotikumokos kezelésekkel szemben, ezért a virulencia faktorok termelése mögött álló folyamatok megértése kardinális lehet az új, alternatív kezelések kidolgozásában. Emiatt a *P. aeruginosa* lett a QS egyik modellorganizmusa. Komplex quorum érzékelő rendszerrel rendelkezik, mely négy, hierarchikusan felépülő rendszerből tevődik össze, ezek a *las*, *rhl*, *pqs* és *iqs*.

Az elsőként felfedezett QS rendszerek a LuxI-LuxR homológ LasI-LasR és RhlI-RhlR voltak az *N*-(3-oxododekanoil)-homoszerin-lakton (3O-C12-HSL) és *N*-(butiril)-homoszerin-lakton (BHL) jelmolekulákkal. A következő a PQS rendszer volt, melynek jelmolekuláját, a 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone-t eredetileg antibakteriális molekulaként tanulmányozták. A negyedik kommunikációs rendszer az IQS, melynek jelmolekulája a 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde.

A négy rendszer hierarchikusan épül egymásra, a hierarchia csúcán a *las* rendszer áll. A LasR-3O-C12-HSL komplex aktiválja az *rhlR*, *rhlI*, *lasI* (pozitív visszacsatolás) és egyéb virulencia faktorok átíródását. Az RhlR-BHL komplex aktiválja az *rhlI* (második pozitív visszacsatolás) átíródását és szabályozza a PqsR-t. A PQS jelmolekulájának termelődése hatással van az *rhl* rendszer kifejeződésére. Az *iqs* rendszert is a *las* szabályozza, meglepő módon azonban, alacsony foszfátkoncentráció esetén ez a rendszer képes átvenni a központi *las* szerepét.

Az említett QS hálózatból a *las* és az *rhl* rendszerekről már sok információt találunk az irodalomban, ugyanakkor még mindig vannak ismeretlen részletek, melyek feltárásához további vizsgálatok szükségesek.

## 2. Célkitűzés

Kollaborációs munkám során két, biológiailag jelentős algafaj tanulmányozása volt a célunk egysejt szinten. Ezek közül az egyik a zöld algák modell-organizmusaként számon tartott *C. reinhardtii*, míg a másik, a *Symbiodinium* volt, mely létfontosságú szimbiontája a koralloknak. Ebben a projektben különböző mikrofluidikai platformok kialakításában vettem részt, melyek lehetővé teszik egyes sejtek csapdázását, illetve, szükség esetén az osztódáskor keletkezett leánysejtek begyűjtését is. Ezen felül az eszközök jól kombinálhatók mikroszkópiás módszerekkel, fluoreszcencia mérések is végrehajthatók a csapdázott sejteken, illetve azok környezetének kémiai összetétele is precízen kontrollálható. Munkám során a következőket tűztem ki célul:

- Egysejt csapdázásra alkalmas mikrofluidikai eszköz tervezése és modellezése a sejtek rövid távú megfigyelése céljából ("Tulipán" csapda). A modellszámolásokkal meghatározhatók az eszközön belüli folyadékáramlás jellemzői, valamint, a csapdázott sejtek áramlásra gyakorolt hatása is.
- Különböző mikrofluidikai platformok tervezése és szimulálása egyes algasejtek és utódaik csapdázásához hosszú távú megfigyelés céljából ("Csésze" és *Symbiodinium* csapdák). A folyadékáramlás mellett céлом volt a sejtekre ható nyírófeszültség modellezése is.

Munkám második felében *P. aeruginosa*  $\Delta lasI$  mutáns quorum érzékelését vizsgáltam egysejt-szinten MM mikrofluidikai eszközben. A következő kérdésekre kerestem a választ:

- Mi a Las quorum válasz kinetikája egysejt és populáció szinten? A legtöbb tanulmány csak a felfutásra fókuszál, bár a kikapcsolás (quorum-be  $\rightarrow$  quorum-ki átmenet) ugyanúgy fontos, hisz enélkül a populáció quorum aktív állapotban ragadna.
- A jelmolekula külsőleg történő hozzáadása és eltávolítása a rendszerből hogyan befolyásolja a fenotípus heterogenitás kialakulását?
- Hogyan befolyásolja a sejt vonal története a sejtek közti különbségeket?

- A sejtek quorum állapota milyen hatással van az egyes sejtparaméterekre?
- Ismétlődő jelmolekula impulzusok esetén mennyire hasonló a populáció quorum válasza?

## 3. Anyagok és Módszerek

### 3.1. Az eszközök tervezése és modellezése

Az eszközök 2D tervei a KLayout nyílt forráskódú CAD szoftverrel készültek.

A folyadékáramlás karakterisztikus tulajdonságainak meghatározása céljából numerikus szimulációkat futtattam Comsol Multiphysics 4.3a szoftverrel. A sebességprofilok meghatározásához "Laminar Flow" modellt és időfüggő (time-dependent) study-t használtam.

A "Tulipán" és a *Symbiodinium* sejtekhez készített csapdák esetében 2D modellt és "shallow channel" közelítést alkalmaztam. A pontosabb eredmények érdekében a beimportált geometriába, a csapdákon belülré kerek modell sejteket helyeztem. A "Csésze" platform szimulációjához 3D modellt építettem, mivel ez az eszköz két rétegből épült fel. A szimulációkat egy Intel® Core™ i9-10900 processzorral és 32 GB RAM-mal rendelkező gépen futtattam.

### 3.2. A mikrofluidikai eszközök készítése és elektronmikroszkópos vizsgálata

Az itt bemutatott eszközök fotolitográfias, lézerírási és szoftlitográfias technikák kombinálásával készültek. A negatív öntőforma elkészítéséhez egy szilícium lemezt egy vagy két rétegben fényérzékeny anyaggal vontam be. A "Tulipán" csapdázórendszer esetében 7  $\mu\text{m}$  magas SU-8 2005 réteget, míg a *Symbiodinium* csapdákhöz 13  $\mu\text{m}$  magas SU-8 2015 réteget használtam. A "Csésze" alakú csapdáknál a fabrikáció három lépésben történt, két, különböző magasságú SU-8 réteg összeillesztésével: az első SU-8 2005-ből készült (4  $\mu\text{m}$  magas réteg), ez tartalmazta a csapdákat a keskeny átfolyónyílásokkal, míg a második réteg, melyhez SU-8 2007-et



használtam (7.5  $\mu\text{m}$  magasságú) a csapdák zárt falait tartalmazta. Az eszközök tervezett mintázatát ezután lézeríróval beleírtam a fotorezisztbe. Az előhívást követően az öntőformákat egy éjszakán keresztül szilánizáltam (tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl), majd polideimetilsziloxánnal (PDMS) öntöttem ki, melyet 1:10 iniciátor:monomer arányban kevertem ki. A PDMS-t egy éjszakán keresztül 40 °C-on hőkezelttem, majd lehúztam az öntőformáról, kisebb egységekre vágtam és kilyukasztottam a be- és kimeneteket (1,5 mm átmérő). A PDMS darabokat oxigénplazmás kezeléssel fedőlemezhez ragasztottam.

Az eszközök méreteinek ellenőrzése pásztázó elektronmikroszkóppal (JSM-7100F) történt. Ehhez a PDMS csipeket vékony aranyréteggel (15 nm) vontam be. Az elektronmikroszkóp gyorsítófeszültsége 5 kV volt.

### 3.3. Sejtenyésztés, mintakészítés, a csip feltöltése

A MM kísérletekhez mutáns *P. aeruginosa* PUPa3  $\Delta\text{lasI}$  törzset használtam, mely gyorsan bomló GFP fehérjét kódoló riporter plazmidot tartalmaz. A törzs GFP expressziója QS szabályozás alatt áll.

Ez a mutáns nem képes jelmolekula termelésre, de külsőleg hozzáadva érzékeli azt, és a GFP termelésén keresztül a sejt quorum állapota nyomon követhető. A QS-be/ki terminológia az egyes sejtek quorum állapotának leírására szolgál, míg a quorum-be/ki a populáció quorum állapotára vonatkozik. A PUPa3 törzsnél megmutatták, hogy a Las és az Rhl rendszerek nem hierarchikusan csatoltak.

A kísérletekhez egy-egy *P. aeruginosa* kolóniát tenyésztőcsőben, 3 ml LB tápoldatban egy éjszakán át rázóinkubátorban növesztettem (200 rpm, 30 °C). A tápoldat 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  kanamicint és gentamicint is tartalmazott. Másnap reggel a kultúrát 1:1000 hígítottam. Amikor a sejtek optikai denzitása ( $\text{OD}_{600}$ ) elérte a 0,1-et, 10 nM/1  $\mu\text{M}$  3O-C12-HSL-t adtam a médiumhoz, hogy indukáljam a QS-t. A kísérlet akkor kezdődött, amikor a sejtek OD-je elérte a 0,6-ot. Ekkor 1,5 ml-t a baktérium szuszpenzióból lecentrifugáltam és 300  $\mu\text{l}$  médiumban vettem fel, mely nem tartalmazott jelmolekulát. A sejteket a MM eszközbe egy fecskendő segítségével töltöttem bele, majd 16 órán át jelmolekula nélküli médiumot áramoltattam rajta keresztül. A folyadékáramlást egy fecskendőpumpával biztosítottam,

az áramlási sebesség 200  $\mu\text{l/h}$  volt. A fluoreszcencia képkészítést akkor kezdtem, amikor az oldalcsatornák megteltek QS-ki állapotban lévő sejtekkel.

A 10 nM 3O-C12-HSL jelmolekula koncentrációval végzett kísérletek 20 h hosszúak voltak (6 h-n keresztül jelmolekulát áramoltattam keresztül a rendszeren, amit egy 14 h-s jelmolekulamentes időszak követett), míg az 1  $\mu\text{M}$  koncentráció esetén 44 h-ig tartottak (6 h-ig jelmolekulával, 16 h-ig jelmolekula nélkül, 6 h jelmolekulával, 16 h jelmolekula nélkül). Mindkét koncentráció esetében 3 biológiai replikával készült kísérlet.

### 3.4. Mikroszkópia

A sejtek GFP expressziójának követése fluoreszcencia time-lapse mikroszkópiával történt. A kísérletekhez Nikon Eclipse Ti-E inverz mikroszkópot használtam. A sejtek számára a megfelelő hőmérsékletet (30 °C) a mikroszkóp köré épített inkubátor biztosította. A felvételek elkészítéséhez 40X Nikon Plan Fluor objektívet, GFP fluoreszcens szűrőt, Prior Proscan II motorizált asztalt és Prior Lumen 200 Pro lámpát használtam. A képfelvétel Andor NEO sCMOS kamerával történt. A kamera és a mikroszkóp vezérlését a NIS Elements Ar szoftver végezte. A képkészítés 5 percnként történt.

### 3.5. Képanalízis

A képanalízis a Fiji nyílt forráskódú program egy plugin-jének (BACMAN: BACteria in Mother Machine ANalyzer) felhasználásával történt. Az átlagos pixelintenzitás mellett a sejtek osztódási ideje és a leszármazási viszonyok is nyomon követhetők voltak. Az adatok további analizálása R nyelven írt kóddal történt. Az ábrakészítéshez a ggplot2 R függvénycsomagot használtuk.

## 4. Eredmények

### 1. Terveztem és modelleztem egy mikrofluidikai eszközt, mely egyes algasejtek vizsgálatát teszi lehetővé rövid távon.

A *C. reinhardtii* sejtek rövid távú csapdázására alkalmas "Tulipán" mikrofluidikai eszköz kifejlesztésén és modellezésén dolgoztam, melyet Chl *a* fluoreszcencia mérésekhez szeretett volna felhasználni az egyik kollaborációs csoport (Molekuláris Fotobioenergetikai Csoport). Az eszköz három párhuzamos csatornából áll, melyek mindegyike egysejt csapdázására alkalmas konstrukciókat tartalmaz, ezek egymáshoz képest elcsúsztatva helyezkednek el. Összesen 216 darab csapda található a rendszerben, melyek mindegyike egy szélesebb (28  $\mu\text{m}$ ), tölcsérszerű bemenettel, és egy keskenyebb (3  $\mu\text{m}$ ) kimenettel rendelkezik. A kimenet lehetővé teszi, hogy a csapdán a folyadék keresztül tudjon áramolni, de megakadályozza a sejtek kijutását. A csapdázó rész szélessége 8.4  $\mu\text{m}$ , a teljes eszköz magassága 7 – 8  $\mu\text{m}$  közötti.

A folyadékáramlás jellemzése az eszköz egyik ágában, egy 500  $\mu\text{m}$  x 600  $\mu\text{m}$  méretű részen történt, a modellhez a "shallow channel" közelítést alkalmaztam.

Az eredményeim azt mutatták, hogy üres csapdák esetén, magukon a csapdákon a teljes áramlás 10 %-a halad át. Ez lehetővé teszi, hogy a folyadékáramban található sejtek bejussanak a csapdákba. A folyadék sebessége magasabb a szomszédos csapdák között és alacsonyabb a csapdák bejáratánál. Kör alakú modell algasejtekkel szimuláltam, hogy a csapdázott sejtek hogyan befolyásolják a médium áramlását a csipben. Az eredmény azt mutatta, hogy a sejtek teljesen eltorlaszolják a csapda kijáratát, ezzel megakadályozva a folyadék keresztülhaladását a csapdán és ezáltal további sejtek bejutását. A kísérletek során (melyet a Molekuláris Fotobioenergetikai Csoport tagjai végeztek) a csapdák 65 – 71 %-a csapdázott egyes sejteket.

A modellszámolások és a kísérletek is megerősítették, hogy a tervezett "Tulipán" csapdaelrendezés alkalmas *C. reinhardtii* sejtek pár órán keresztül történő egy helyben tartására és fluoreszcenciájának vizsgálatára különböző kémiai fixálás nélkül.

## 2. Mikrofluidikai eszközöket terveztem és modelleztem, melyek egyes algasejtek és azok leszármazottainak hosszabb távú vizsgálatára alkalmasak.

Annak érdekében, hogy egyes algasejteket és azok leszármazottait hosszabb távon vizsgálni tudjuk, kétféle mikrofluidikai platformot terveztem, modelleztem és készítettem el mikrofabrikációs eljárással.

Az egyik eszköz, mely a *Symbiodinium* spp. algák vizsgálatát teszi lehetővé, három darab, egymással párhuzamos csatornából épül fel, melyek különböző méretű csapdákat tartalmaznak: a legnagyobb csapdáknál a bemenet 60  $\mu\text{m}$ , a közepes méretűeknél 40  $\mu\text{m}$ , míg a legkisebeknél 30  $\mu\text{m}$  széles volt. Mindhárom csapdatípus három darab 5  $\mu\text{m}$  széles átfolyó nyílással rendelkezik.

A folyadékáramlás jellemző tulajdonságainak meghatározásához a "shallow channel" közelítést alkalmaztam és különböző térfogatáramokkal (20  $\mu\text{l/h}$ , 60  $\mu\text{l/h}$ , 100  $\mu\text{l/h}$ ) teszteltem a rendszert. Az áramlási sebesség a három párhuzamos csatornában, mely a különböző méretű csapdákat tartalmazta, kevesebb, mint 10 %-ban különbözött. A csapdák bejáratánál az áramlási sebesség 400  $\mu\text{m/s}$  körüli volt, míg a szomszédos csapdák között ez az érték elérte a 2000  $\mu\text{m/s}$ -ot is. A sejtekre ható nyírófeszültség kiszámításához 10  $\mu\text{m}$  átmérőjű modell részecskéket helyeztem a csapdákra belülről, olyan tipikus helyekre, ahol a kísérletek során gyakran előfordultak. A nyírófeszültség az átfolyónyílásoknál elhelyezett objektumok esetén adódott a legnagyobb, értéke 0.4 Pa volt, ami jóval kisebb, mint amit ezek az algák a természetes közegükben tapasztalnak (élőhelyeiken, szélsőséges esetben ez az érték akár 600 Pa is lehet). A Növényi Stressz, Lipid és Fenomika Csoport munkatársai sikeresen alkalmazták az eszközt protoplasztok készítésére.

A másik mikrofluidikai platform, a "Csésze" eszköz, *C. reinhardtii* sejtek begyűjtésére szolgált. Az eszköz első változata hétféle csapdatípust tartalmazott, melyek a bemenetük geometriájában és a keskeny átfolyónyílások számában különböztek egymástól. Ezeknek a konstrukcióknak a csapdázóképességét a Molekuláris Fotobioenergetikai Csoport munkatársai kísérletekkel ellenőrizték és kiválasztották a két leghatékonyabbat. A részletes szimulációkat ezeken végeztem.

Az eszköz geometriáját két rétegből építettem fel, ezek magassága  $5\ \mu\text{m}$  és  $7\ \mu\text{m}$  volt. Az alacsonyabb réteg tartalmazta a csapdákat az átfolyónyílásokkal, a magasabb pedig a zárt csapdafalakat. Így tudtam elérni, hogy a kisebb leánysejtek, melyek átmérője kb.  $3 - 4\ \mu\text{m}$  ne tudjanak kijutni a csapdákba, de mindeközben a szükséges magasság a nagyobb ( $12\ \mu\text{m}$  átmérőjű) anyasejtek számára biztosítva legyen.

A szimulációkhoz 3D modellt készítettem és a teljes eszköznek csak egy részét ( $500\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$  terület) használtam fel. A folyadékáramlást két különböző magasságban értékeltem ki, ezek egyrészt az alacsonyabb réteg középső síkja ( $z_1 = 2\ \mu\text{m}$ ) és a teljes eszköz közepe ( $z_2 = 6\ \mu\text{m}$ ) voltak. A parabolikus sebességprofilból következik, hogy  $6\ \mu\text{m}$  magasságban az áramlási sebesség nagyobbak adódott, mint az alacsonyabb rétegben mindkét dizájn esetén. Mindkét sík esetén elmondható, hogy a csapdák között a sebesség mindig nagyobb volt, mint a csapdák bejáratánál.

Elsősorban az átfolyónyílások száma az, ami a folyadék átfolyásának mértékét (és ezáltal a csapdázás hatékonyságát) meghatározza, de a bemenet geometriájának is jelentős a szerepe. A szimulációimból is látszik, hogy a tölcészerű bemenet segíti a folyadék bejutását a csapdákba.

### **3. Sikeresen alkalmaztam a mother machine mikrofluidikai eszközt baktériumok quorum érzékelésének vizsgálatához.**

A QS-t elsősorban populáció-szintű jelenségként tartják számon, habár a génextpressziós mintázat változása egysejt szinten figyelhető meg. Annak érdekében, hogy egy populáció QS dinamikáját jobban megérthessük, egysejt-szintű vizsgálatokra van szükség.

Ebből a célból a mikrofluidikai MM eszközt alkalmazva vizsgáltam *P. aeruginosa*  $\Delta\text{lasI}$  QS-ét. Ez a törzs nem képes jelmolekula termelésre, de érzékeli azt, és a riporter plazmidnak köszönhetően a sejtek GFP termelése információval szolgál azok quorum állapotáról is.

Kísérleteim során a sejtek 6 h-n keresztül kaptak jelmolekulát (3O-C12-HSL), amit egy hosszabb, jelmolekula nélküli szakasz követett, amikor kiostam a jelmolekulát a rendszerből. Kétféle 3O-C12-HSL koncentrációt alkalmaztam:  $10\ \text{nM}$  (küszöbkoncentráció körüli érték) és  $1\ \mu\text{M}$  (a sejtválasz telítését okozó koncentráció). Összesen 9934 sejtet analizáltunk, 2444 db-ot a  $10\ \text{nM}$ -os kísérletekből és 7490-et az  $1\ \mu\text{M}$ -os kísérletekből.

Ezen kísérletek során lehetőségem volt a baktériumok viselkedését egyesjt és populáció szinten is vizsgálni. Meg tudtam határozni az egyes sejtek quorum állapotát minden időpillanatban. Kiszámoltam egy küszöb fluoreszcencia intenzitást az 1  $\mu\text{M}$  jelmolekula koncentráció alkalmazásakor kapott kísérleti adatokat felhasználva. Ehhez 0-tól 50 a.u.-ig végigszkenneltem 0,1 a.u. lépésközzel a lehetséges küszöbintenzitásokat és vizsgáltam azoknak a sejteknek a számát, amelyeknek az intenzitása elérte ezt az értéket:  $\frac{n_{be}(t)}{n_{össz}(t)}$ . Ezt a számolást elvégeztem a kísérlet teljes hosszára. Ábrázolva az így kapott, QS-be állapotban lévő sejtek számát az idő függvényében, (simítást követően) meghatároztam az egyes görbék minimumát és maximumát. A küszöb intenzitás meghatározásához maximalizáltam a QS-be állapotban lévő sejtek számának különbségét a jelmolekulát tartalmazó és jelmolekulamentes szakaszokban:  $\Delta = \left(\frac{n_{on}(t)}{n_{all}(t)}\right)_{max} - \left(\frac{n_{on}(t)}{n_{all}(t)}\right)_{min}$ . Az így kapott érték 23,1 a.u.-nak adódott. A sejtek, melyek fluoreszcencia intenzitása ezen érték alá esik, QS-ki állapotban van, míg a sejtek, melyek meghaladják ezt az értéket, QS-be állapotban vannak.

Az egyes sejtek statisztikájából meghatároztam a populáció quorum állapotát. Ehhez kiszámoltam a QS-be állapotban lévő sejtek arányát. Az általam meghatározott kritérium szerint a populáció akkor kerül quorum-be állapotba, amikor a QS-be állapotban lévő sejtek aránya eléri az 50 %-ot.

#### 4. Jellemeztem a *P. aeruginosa* quorum-válasz felfutásának és lecsengésének kinetikáját.

Az irodalomban fellelhető legtöbb munka a quorum állapot felépülésére fókuszál, pedig a folyamat lecsengése is egy meglehetősen fontos folyamat. A quorum-válasz reverzibilitása új lehetőségeket nyit meg a fertőzések kezelésében.

Kísérleteim során egyesjt szinten vizsgáltam jelmolekula jelenlétében és anélkül a quorum érzékelés kinetikáját, mely magába foglalja a felfutást és a lecsengést is. Mindkét jelmolekula koncentráció esetében (10 nM és 1  $\mu\text{M}$  3O-C12-HSL) a quorum válaszban heterogenitás volt megfigyelhető, de a sejtválasz (fluoreszcencia és quorum felfutás időzítése) minden esetben

jól definiált volt.

1  $\mu\text{M}$  3O-C12-HSL jelmolekula koncentráció hozzáadását követően egy rövid (0,7 h) felfutási késés volt megfigyelhető, melyet a QS-be állapotban lévő sejtek számában bekövetkezett meredek növekedés követett. A maximum elérése 1,5 h-ba telt, amikor is a sejtek majdnem 100 %-a QS-be állapotban volt. A jelmolekula megvonását követően 5,6 h-ba telt a baktériumpopulációnak, hogy reagáljon a jelmolekula eltávolítására, és a QS-be állapotban lévő sejtek száma azután kezdett csak el csökkenni. A populáció összesen 14 h-t töltött quorum-be állapotban. Ezen eredmények alapján arra a következtetésre jutottam, hogy 1  $\mu\text{M}$  jelmolekula koncentráció esetén a populáció stabilizálódik a quorum állapotban és nehezen hagyja el azt.

10 nM jelmolekula koncentrációt alkalmazva több időbe telt (2,5 h), mire a populáció reagálni kezdett a jelmolekula jelenlétére. Ezt egy lassabb felfutási szakasz követte, aminek a maximuma nem érte el az 50 %-ot, tehát a populáció nem volt quorum-be állapotban, csak megközelítette azt. A jelmolekula megvonását követően szinte azonnal (egy órán belül) elkezdett csökkenni a QS-be állapotban lévő sejtek száma.

## **5. Demonstráltam a sejtek quorum válaszában reprodukálhatóságát ismétlődő jelmolekula impulzusok esetén.**

A quorum válasz reprodukálhatóságának teszteléséhez a sejteket egymást követő jelmolekula impulzusoknak (6 h jelmolekulával, 16 h jelmolekula nélkül, 6 h jelmolekulával, 16 h jelmolekula nélkül) tettem ki. Ezeknél a kísérleteknél 1  $\mu\text{M}$  koncentrációjú 3O-C12-HSL-t használtam.

Összességében elmondható, hogy a sejtek válaszreakciója hasonló volt mindkét jelmolekula impulzus esetén. A QS-be állapotban lévő sejtek száma mindkét esetben majdnem 100 % volt, azonban a jelmolekula mentes szakaszok végén nem minden sejt váltott vissza QS-ki állapotba. Az első kikapcsolás végén a sejtek 9 %-a, míg a második kikapcsolás végén a sejtek 18 %-a maradt bekapcsolva.

Ezen eredmények alapján felmerül a kérdés, hogy ha folyamatosan ismétlődő jelmolekula impulzusoknak tesszük ki a populációt, elérhetjük-e, hogy az quorum-be állapotban maradjon. Ennek megválaszolásához további kísérletek szükségesek.

## 6. Bemutattam, hogy a sejt-sejt különbség testvérpárok között monoton növekedést mutat már egy sejtcikluson belül.

A fluoreszcencia intenzitások mérése mellett lehetőség volt az osztódási folyamatok nyomon követésére is, mely lehetővé tette a sejtek leszármazási viszonyainak vizsgálatát.

A sejt-sejt variabilitás megjelenésének feltérképezéséhez elsőként meghatároztam a normalizált fluoreszcencia intenzitás különbséget testvérpárok között egyetlen sejtciklus során. Mindkét jelmolekula koncentráció esetén monoton növekedést figyeltem meg. Ebből arra a következtetésre jutottam, hogy a folyamat mögött álló jelenség(ek) függetlenek a sejtciklustól és a jelmolekula koncentrációjától is. A heterogenitás gyorsan felépül és már a legközelebbi rokonok között is megjelenik.

A normalizált fluoreszcencia intenzitás különbséget minden lehetséges sejt pár esetében kiszámoltam, akik egyidejűleg jelen voltak egyazon oldalcsatornában. Ez a különbség közeli rokonok esetében kisebbnek, távolabbi rokonok esetén jelentősebbnek adódott.

Ezek az eredmények alátámasztják azt a feltevést, miszerint elsősorban a szomszédos sejtek rokoni kapcsolata felelős azok térben korreláló génextpressziós szintjéért.

## 5. Összefoglalás

Dolgozatom első felében kooperációkból született eredményeim kerültek bemutatásra. Algasejtek egysejt szinten történő csapdázására alkalmas eszközök tervezésében, modellezésében és elkészítésében vettem részt. Az irodalomban több, algasejtek csapdázására alkalmas eszköz is található, azonban ezek többnyire mikrokolóniák vizsgálatát teszik lehetővé és csak kevés esetben alkalmasak egyes sejtek csapdázására. Az általunk készített eszközt viszonylag egyszerű elkészíteni és használni, a folyadékáramlás szabályozásához egy fecskendőpumpára van szükség. A "Tulipán" mikrofuidikai eszköz alkalmas egyedi *C. reinhardtii* sejtek rövid távú csapdázására, míg a másik két platform lehetővé teszi a leánysejtek begyűjtését és követését egy vagy két sejtcikluson keresztül is.

Dolgozatom második felében mutáns *P. aeruginosa* quorum érzékelését



tanulmányoztam MM mikrofluidikai eszközben. Két különböző jelmolekula koncentrációt alkalmaztam: 10 nM (küszöbkoncentráció körüli érték) és 1  $\mu$ M (a sejtválasz telítését okozó koncentráció). Kísérleteim során egy jelmolekulát tartalmazó és egy jelmolekulamentes szakaszon belül vizsgáltam a sejtek quorum választ egysejt szinten (ez magába foglalja a felfutást és a lecsengést is) és kiszámoltam különböző, a QS kinetikáját jellemző paramétereiket. Az 1  $\mu$ M jelmolekula koncentrációt használva vizsgáltam a sejtek QS-ének reprodukálhatóságát is. Ebben az esetben egymást követő jelmolekula impulzusoknak tettem ki a sejteket. Mindezek mellett a sejtek quorum válasza során fellépő fenotípus heterogenitás megjelenését is tanulmányoztam.

# Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném kifejezni hálámat témavezetőimnek, Dr. Galajda Péternek és Dr. Nagy Krisztinának, akik már a mesterképzés óta segítettek és irányították tudományos pályafutásomat. Az ő ötleteik, türelmük és támogatásuk nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg.

Szeretném megköszönni a Biofotonika és Biomikrofluidika Kutatócsoport minden tagjának, különösen Dér Lászlónak, Dr. Vizsnyiczai Gasztonnak és Dr. Kelemen Lórándnak, akik kiváló, rendkívül kreatív tudósok és nem mellesleg remek emberek, akik mindig arra inspirálnak, hogy tovább fejlődjek.

Köszönöm továbbá a Biofizikai Intézet minden jelenlegi és korábbi munkatársának, akik támogattak és az itteni munkámat könnyebbé és vidámabbá tették. Külön köszönöm Dr. Dér Andrásnak, Dr. Valkai Sándornak, Dr. Petrovszki Dánielnek, Dr. Mathesz Annának, Dr. Sipos Orsolyának, Dr. Miles Wetherington-nak, Dr. Fábíán Lászlónak és Verebes Beátának.

Hálával tartozom Dr. Zimányi Lászlónak, a Biofizikai Intézet korábbi, illetve Prof. Dr. Deli Máriának a Biofizikai Intézet jelenlegi igazgatójának, akik lehetővé tették számomra, hogy az intézetben dolgozzak. Mindig figyelemmel kísérték és segítettek tudományos munkámat.

Szeretném megköszönni a Növénybiológiai Intézet munkatársainak, Dr. Tóth Szilvia Zitának, Dr. Vass Imrének, Dr. Széles Eszternek, Dr. Szabó Milánnak és Dr. Faiza Bashir-nak a támogatásukat. Nagyon sokat tanultam a közös munkánk során.

Rendkívül hálás vagyok az SZTE Neurológiai Klinika minden jelenlegi és korábbi munkatársának az áldozatos és hozzáértő munkájáért, mert enélkül ma nem lehetnék itt.

Végezetül pedig köszönöm a családomnak, páromnak, Magashegyi Istvánnak, édesanyámnak, Ábrahám Máriának, édesapámnak, Ábrahám Lászlónak és a testvéremnek, Ábrahám Tamásnak a bátorításukat és a türelmüket. A támogatásuk nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg.