



Szegedi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

**Polimerizált 3D mikroszerkezetek funkcionálizálása  
biológiai alkalmazásokhoz**

Ph.D. értekezés tézisei

**Aekbote L Badri Prashad**

Témavezető: Dr. Kelemen Lóránd

Magyar Tudományos Akadémia  
Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Biofizikai Intézet  
Szeged

2015

## **Bevezetés**

Napjainkban egyre nagyobb igény mutatkozik komplex, mikrométer alatti részletekkel bíró 3D funkcionizált mikroeszközökre számos biológiai mikro- és nanotechnológias alkalmazásban. Ezek anyagi minőségétől függően különböző módszerek léteznek arra, hogy felületüket egyszerű kémiai csoportokból, biológiai makromolekulákból vagy szerves nanorészecskékből (NanoParticle, NP) álló funkcionális réteggel bevonjunk. A legmodernebb mikrotechnológiai eljárásokkal mikrométeres szerkezetek már viszonylag egyszerűen készíthetők. A fényérzékeny anyagok litográfias eljárással való megmunkálása intenzíven kutatott terület, lévén a megvilágítás a viszonylag egyszerűen elérhető elektromágneses sugárzással történik. A kétfotonos polimerizáció (Two-Photon Polymerization, TPP) is ezek közé sorolható módszer, ahol a fény-anyag kölcsönhatás nemlineáris jellege miatt a szerkezetek alkotóelemeinek mérete jóval a mikrométer alá csökkenthető. Munkám során kétfotonos polimerizációval készített 3D mikroszerkezetek funkcionizálását és biológiai alkalmazásuk lehetőségeit tanulmányozom.

TPP-vel készített 3D mikroeszközök optikai csipeszt alkalmazó rendszerekben is használhatók biológiai kísérletekhez, pl. fehérjék, DNS vagy egyedi sejtek nagy pontosságú, lokalizált manipulációjára, vizsgálatára. A szerkezetek hatékony használatához elengedhetetlen azonban azok felületének funkcionizálása. Dolgozatomban TPP mikroeszközöknek fehérjével és fém nanorészecskékkel történő, amin csoportokkal rendelkező kötőmolekulákon alapuló bevonását mutatom be. A szerkezetek fehérjével való bevonásának elsődleges célja egyedi sejtek indirekt optikai manipulációjában való alkalmazásuk volt, míg a nanorészecskékkel való bevonással fém-erősített fluoreszcencia megfigyelést valósítottunk meg. Dolgozatomban mindkét alkalmazásra mutatok példákat.

## **Az értekezés célkitűzései**

Munkám célja az volt, hogy az SU-8 fotopolimerből, TPP-vel készített mikroszerkezeteket, felületük funkcionizálásával alkalmassá tegyem olyan biológiai mérésekben való használatra, mint pl. fém-erősített fluoreszcencia vagy közvetett sejtmanipuláció. Ehhez a következő célokat tűztem ki:

a) TPP-vel készített 3D mikroszerkezetek szilán-alapú funkcionálizálása sztreptavidin fehérjével és arany nanorészecskékkel.

- A bevonási eljárás egyes paramétereinek hatásának vizsgálata az SU-8 szerkezetek minőségére, geometriájára és felületi morfológiájára.
- Biotinnak az SU-8 felületekhez való kovalens rögzítésével hatékony biotin-sztreptavidin kötéseket hozni létre a mikroszerkezetek felületén.
- Arany nanorészecskékkel bevinni a polimer szerkezetek felületét kontrollálható felületi sűrűség mellett.

b) Arany nanorészecskékkel funkcionizált, polimerizált 3D mikroszerkezetekkel elért fluoreszcencia erősítés.

- Annak meghatározása, hogy a bevont polimer szerkezetekkel milyen mértékű lokalizációval valósítható meg fluoreszcencia erősítés.
- A nanorészecskék felületi sűrűsége hatásának meghatározása az erősítés mértékére.
- Az erősítés megvalósíthatósága egy általánosabb, döntött geometriai elrendezésben.
- Az erősítés mértékének meghatározása különböző gerjesztő hullámhosszak mellett.
- Az erősítés eredetének vizsgálata.

c) Élő egyedi sejtek indirekt optikai manipulációja fehérjével bevont, polimerizált 3D mikroszerkezetekkel.

- Egyedi sejtek hatékony rögzítése komplex 3D mikroszerkezeteken biotin-sztreptavidin kötés segítségével.
- Egyszerű manipulációs műveletek demonstrálása a bevont mikroeszközzel, pl. egyedi sejt transzlációja a mintatérben.

## **Anyagok és módszerek**

### **1. SU-8 rétegek készítése UV litográfiával és mikroszerkezetek készítése kétfotonos polimerizációval**

2–3  $\mu\text{m}$  vastag SU-8 réteget készítettem UV litográfiás levilágító készülékkel (365 nm-es vonal). A réteget vagy maszk nélkül, vagy 1, vagy 4 mm átmérőjű maszkon keresztül világítottam meg. A TPP szerkezetek egy Zeiss Axiovert 40 CFL mikroszkóp köré épített

polimerizáló rendszerrel készültek, a fényforrás egy 100 fs impulzushosszú szállezer volt ( $\lambda=785$  nm, Menlo C-Fiber A). Valamennyi kísérlethez olyan szerkezeteket készítettünk, melyek mérete minden irányban 20  $\mu\text{m}$ -nél kisebb volt. A fehérje bevonásos kísérletekhez téglatesteket, spirálokat és optikai csipeszhez használható komplex mikroeszközöket (OT mikroeszköz) polimerizáltunk. A fém-erősített fluoreszcencia mérésekhez erősítő szerkezeteket készítettünk: egyenes és görbült sima lapokból állókat és olyanokat, melyeknek 2 vagy 4 tüskéje volt. A sejtek indirekt csapdázásához ellipszoidokat, kereszteteket és OT mikroeszközöket készítettünk.

## **2. SU-8 funkcionálizálása fehérjével**

Célom fehérjék specifikus (biotinnal) és nem specifikus (glutáraldehiddel) hozzákötése volt a polimer szerkezetekhez. Az eljárás során először a felületi epoxi gyűrűk felnyitásával -OH csoportokat hoztam létre, majd megfelelő molekula hozzákötésével -NH<sub>2</sub> csoportokat alakítottam ki, ezután pedig a mintát biotináló reagensben vagy glutáraldehiddel inkubáltam. Minden egyes lépés után megvizsgáltam a létrejött felület sztreptavidin kötő képességét.

### ***Szilán-alapú kötőmolekulával létrehozott sztreptavidin (STA) réteg***

A polimerizált SU-8 szerkezeteket először 1 M salétromsav és 0.1 M CAN (cérium ammónium nitrát) keverékével kezeltem. Ezután 2% APTES (3-Aminopropil trietoxiszilán) alkoholos oldatában inkubáltam, mely során felületi amin csoportok jöttek létre, melyekhez aztán biotint kötöttem sulfo-NHS Biotin vizes oldatában (1 mg/mL) való inkubálással. A sztreptavidint annak 10-100 nM-os vizes oldatában való kezeléssel kötöttem a felülethez.

### ***PEG-alapú kötőmolekulával létrehozott fehérje réteg***

Az eljárás az előzőekhez hasonlóan a minta savas kezelésével kezdődik. Ezután PEG-diamin 15 mM metanolos oldatából 10  $\mu\text{L}$ -t cseppentettem a mintára majd hagytam az oldószert elpárologni. A mintát további 20 percig inkubáltam szobahőmérsékleten, majd desztillált vízzel lemostam és megszáritottam. A specifikus fehérje kötés kialakításához biotint kötöttem a felületre sulfo-NHS Biotin vizes oldatában (1 mg/mL) való inkubálással. Végül desztillált vízzel lemostam, a sztreptavidint annak 10 vagy 100 nM-os vizes oldatában való kezeléssel kötöttem a felülethez, ismét lemostam és PBS-ben tároltam további felhasználáshoz. A nem-specifikus bevonáshoz a PEG-gel kezelt mintát 2.5%-os

glutáraldehidben inkubáltam, majd pedig vagy sztreptavidin (10 nM) vagy IgG antitest (7 nM) vizes oldatában.

### ***Szilán és PEG-alapú kötőmolekulával létrehozott arany nanorészecske réteg***

Arany nanorészecskéket készítettem citrát redukció módszerével. Az elkészült nanorészecskék átmérője 80 nm, 41 nm, 24 nm és 16 nm volt, amit transzmissziós elektronmikroszkópiával ellenőriztünk; az szuszpenziók abszorpciós maximumai 545 nm, 530 nm, 525 nm és 519 nm-nél voltak.

Amikor szilán-alapú kötőmolekulákat használtunk, az APTES kezelés a fentiekhez hasonlóan történt, de a szilánnal kezelt réteget 120°C-on tartottuk 10 percig. A mintát ezután inkubáltuk az nanorészecske szuszpenzióban szobahőmérsékleten 5, 20 vagy 60 percig, majd vízzel lemostuk. A NP réteg meglétét és állapotát pásztázó elektronmikroszkópiával és látható hullámhosszú spektroszkópiával ellenőriztük.

A fém-erősített fluoreszcencia mérésekhez az erősítő szerkezeteket a nanorészecske inkubáció előtt APTES és PEG-diamin kötőmolekulákkal kezeltem, a fent bemutatottak szerint. A tüskékkel rendelkező erősítő szerkezeteket mindig PEG-diaminnal kezeltem és 60 percig inkubáltam a 80 nm-es nanorészecskéket tartalmazó szuszpenzióban. A sima felszínű erősítő szerkezeteket vagy APTES-sel kezeltem és 80 nm-es aranyat tartalmazó szuszpenzióban inkubáltam 10 és 30 percig, vagy PEG-diaminnal kezeltem, miután 5, 10, 20 vagy 30 percig vagy 6 órán keresztül inkubáltam a 80 nm-es szuszpenzióban. Készítettem sima felületű erősítő szerkezeteket 16 nm és 41 nm átmérőjű nanorészecske bevonattal is. A bevont erősítő szerkezeteket végül egy mikrofluidikai csatornába helyeztük, melynek alsó felülete fluoreszcens sztreptavidinnel bevont üveglemez volt.

### **3. Az SU-8 felületek jellemzése**

Az SU-8 szerkezetek minőségét, geometriáját és felületi morfológiáját kontaktszög méréssel, FTIR-rel, AFM-mel, SEM-mel és optikai mikroszkópiával vizsgáltam. A polimerizálás után megmaradt epoxi csoportok relatív mennyiségét IR spektroszkópiával vizsgáltam; ehhez az UV polimerizált rétegek és a TPP-vel készített szerkezetek spektrumaiban a 914 cm<sup>-1</sup>-es sávokat hasonlítottam össze, miután a spektrumokat az 1608 cm<sup>-1</sup> sáv segítségével normáltam.

Az SU-8 rétegek savas kezelésének hatásait két szempont alapján tanulmányoztam: először, a felületi –OH csoportok jelenlétét kontakt szög méréssel vizsgáltam, azok felületi sűrűségét pedig a toluidin-kék módszerrel mértem. Másodszor, a savas kezelésnek a TPP szerkezetek mikrométer alatti részleteire kifejtett roncsoló hatását vékony teszt-oszlopokon vizsgáltam. Ennek során ugyanazokat az oszlopokat figyeltem meg 30 perces, 2 órás és 4 órás savas kezelés előtt és azt követően.

A kezeletlen, a savval kezelt és a sztreptavidinnel bevont SU-8 felületek morfológiáját atomerő mikroszkópiával vizsgáltam (AFM, Asylum MFP-3D); a mintákat felületi érdességük (roughness) alapján hasonlítottam össze.

Az SU-8 bevonatát képező fehérjeréteg felületi sűrűségét egy, az együttműködő partner által kifejlesztett, epi-fluoreszcens mikroszkópra épített egymolekula szkener berendezéssel vizsgáltam. A felületen lévő, DyLight650 és Alexa 568 festékekkel konjugált sztreptavidint  $Kr^+$  lézerrel (647 nm) és  $Ar^+$  lézerrel (514 nm) világítottam meg; az emittált fluoreszcenciát egy 100x-as olaj immerziós objektív segítségével egy CCD kamerával figyeltem meg (NTE/CCD-1340/100-EMB, Roper Scientific).

#### **4. Fluoreszcencia erősítés mérése**

A nanorészecskékkel bevont, sík erősítő szerkezetek extinkciós spektrumát az együttműködő partnerünk által fejlesztett, Olympus BX43 mikroszkópra épített mikrospektroszkópiás elrendezéssel mértem, melyen a detektor egy QE6500 (Ocean Optics) spektrométer volt.

A fluoreszcencia erősítés és reflektancia méréseket egy invertált lézeres konfokális pásztázó mikroszkópon végeztem (Olympus Fluoview FV 1000), amelyen egy Olympus LUMPLFL 60X W (NA=0.9) és egy 10x (NA=0.4) objektívet használtam.

#### **5. Sejtek indirekt optikai csapdázása**

Ezekben a kísérletekben a TPP mikroeszközöket PEG-diamin kötőmolekulával és biotinnal rögzített sztreptavidinnel vontam be, ahogy azt korábban leírtam. K562 sejtvonalat használtam, a sejtek membránját pedig a kísérletek előtt biotináltam (1 mg/mL sulfo-NHS biotin HEPES oldata, 20 perc inkubálás). Egy holografikus optikai csipesz elrendezéssel végeztem a kísérleteket, amit egy Zeiss Axio Observer A1 invertált mikroszkópra építettünk,

aminek a fényforrása egy folytonos üzemű szállézer volt (IPG-YLM-10, IPG Photonics), a nyalábosztást pedig egy SLM végezte (PLUTO NIR, Holoeye). A sejtek és a mikroszerkezetek közötti kapcsolat hatékonyságának vizsgálatához tesztméréseket végeztem, melynek során a csapdázott kereszt vagy ellipszoid alakú szerkezeteket legfeljebb 2 másodpercig a sejtekhez érintettük, majd feljegyeztük, hogy összetapadtak-e. Továbbá négy gömbszerű fogantyúval ellátott komplex szerkezetekkel is manipuláltunk egyedi sejteket. A szerkezetek sík részéhez kötöttük a sejteket és ily módon mozgattuk azokat a mintatérben mindhárom tengely mentén. Ismereteink szerint ez az első demonstrációja annak, hogy egy kétfotonos polimerizációval készített, specifikus bevonattal ellátott komplex 3D objektummal, optikai csipesz segítségével élő sejtet mozgattak volna.

## **Eredmények és tárgyalás**

### **1. SU-8 felületi funkcionizálás jellemzése**

#### *Az SU-8 rétegben maradt epoxi csoportok mennyiségének összehasonlítása*

Az UV fényel és a TPP-vel polimerizált SU-8 szerkezetekben maradt epoxi csoportok mennyiségét FTIR spektroszkópia segítségével hasonlítottuk össze; ahhoz, hogy az UV-polimerizált rétegeket megbízható modellként tudjuk használni, a két rendszerben ennek hasonlónak kell lennie. Az UV-polimerizált rétegekben az UV dózist 170 és 16320 mJ/cm<sup>2</sup> között változtattam. A polimerizált mintákon mért spektrumok 914 cm<sup>-1</sup>-es sávjának integrálját hasonlítottam össze a meg nem világított SU-8 réteg azonos sávjával. A kapott arány érték a TPP szerkezetekre 0.446 volt, a 170 mJ/cm<sup>2</sup> dózissal UV-polimerizált mintáé 0.464, az 510 mJ/cm<sup>2</sup> dózisú mintáé pedig 0.318. A 170 mJ/cm<sup>2</sup> dózissal kezelt minták meglehetősen sérülékenyek voltak, ezért a TPP felületek modelljeként a 340 mJ/cm<sup>2</sup> dózissal készített rétegeket használtam.

### **2. A savas kezelés hatásai**

Az SU-8 felületén megjelenő –OH csoportok azt az eredetinel hidrofílabbá teszik, amit kontakt szög méréssel ellenőriztünk: az eredetileg 82°-os kontakt szög 42°-ra csökkent 2 óra savas kezelés után. A felületi hidroxil csoportok mennyiségét toluidin kék reakcióval

vizsgáltam, és azt láttam, hogy több mint 10-szeresére,  $0.39 \times 10^{-9}$ -ról  $3.89 \times 10^{-9}$  molekula/cm<sup>2</sup>-re emelkedett a savas kezelés hatására.

A savas kezelés esetleges károsító hatását az SU-8 felületi morfológiájára AFM-mel, a mikroszerkezetek geometriai egységére pedig optikai mikroszkópiával vizsgáltuk az erre a célra készített mikrométernél vékonyabb oszlopokon. Az AFM gyakorlatilag változatlan morfológiát regisztrált: a kezeletlen SU-8 durvasága 2.6 nm, a 30 percig savval kezelté 1.8 nm, a sztreptavidinnel bevonté pedig 2.5 nm. Ez azt jelenti, hogy a savas kezelés utáni fehérje vagy nanorészecske kezelést az eredetivel gyakorlatilag megegyező simaságú felületen lehet elvégezni. Az optikai mikroszkópia szerint a 30 perces savas kezelés a mikrométernél vékonyabb szerkezeti elemeket változatlanul hagyta, 2 órás kezelés után már elváltozásokat lehet rajtuk látni, 4 órás kezelés pedig eltávolítja őket a szubsztrátról.

### **3. Az SU-8 rétegen lévő fehérje mennyiségének meghatározása**

#### ***Szilán kötőmolekulával elért sztreptavidin bevonás***

Az egyes bevonási lépések után elvégzett fehérjebevonás az összes lépés elvégzésével kapott felületen eredményezte a legnagyobb fehérje sűrűséget: ekkor  $4544 \pm 520$  fehérje/ $\mu\text{m}^2$  sűrűséget kapunk az UV polimerizált rétegeken és  $8156 \pm 1496$  fehérje/ $\mu\text{m}^2$  sűrűséget a TPP szerkezeteken; ez 1–2.5 nagyságrenddel nagyobb, mint azokban az esetekben, amikor valamelyik lépést kihagyom. Ezek a számok kb. 20%-os felületi borítottságot jelentenek az UV polimerizált rétegeken és kb. 35%-ot a TPP szerkezeteken. Az UV polimerizált rétegeken és a TPP szerkezeteken mért viszonylag kis eltérés utólag igazolja a modell rendszer helyes megválasztását. Az eljárást sikeresen demonstráltuk mikroméretű spirál és optikai csipesz szerkezetek bevonásával.

#### ***PEG-alapú kötőmolekulával elért sztreptavidin bevonás***

A PEG kötőmolekulán alapuló eljárások összehasonlítása azt mutatta, hogy a legnagyobb felületi fehérjesűrűség a biotinnal specifikusan létrehozott sztreptavidin bevonással érhető el, ami kb.  $1.6 \times 10^5$  fehérje/ $\mu\text{m}^2$  volt. Ez nagyságrendekkel nagyobb, mint a többi, biotint használó bevonat, és kb. 20-szor nagyobb, mint a glutáraldehiden alapuló bevonás. A biotint használó bevonás esetében nem volt számottevő különbség az UV-vel és a TPP-vel



polimerizált rétegek között, de a glutáraldehiden alapuló bevonás esetében a TPP-vel készített szerkezetekre kb. 5-ször több sztreptavidin tapadt ki.

A glutáraldehiden alapuló bevonást Alexa 568 fluorofórral konjugált IgG antitesttel is elvégeztük a sztreptavidin mellett. Azt figyeltük meg, hogy a teljesen kezelt felületekre több, mint 20-szot több fehérje tapad ki, mint a nem kezelt SU-8-ra.

#### **4. Nanorészecskékkel bevont SU-8 rétegek és mikroszerkezetek jellemzése**

Átlagosan 24 nm átmérőjű arany nanorészecskéket kötöttünk APTES kötőmolekulával SU-8 felületére. A SEM felvételek szerint a kezelés nélkül átlagosan 4 NP jelent meg  $1 \mu\text{m}^2$  területen, de azt elvégezve  $446 \pm 25 \text{ NP}/\mu\text{m}^2$  felületi sűrűséget értünk el. A nanorészecskék mennyisége növekedett az inkubációs idővel, ami megmutatkozott a száraz, bevont rétegeken mért abszorpciós spektrum 530 nm-nél látott sávja amplitúdójának növekedésében. A spektrumban 600 nm felett nem volt látható sáv, ami az aggregált nanorészecskék hiányára utal.

Nagyobb felületi sűrűségű részecske bevonathoz PEG-diamin kötőmolekulát használtunk. A nanorészecske rétegek látható extinkciós spektrumának, felületi sűrűségének és reflektanciájának méréséhez különbözőképpen bevont TPP mikroszerkezeteket használtunk. A 80 nm-es nanorészecskékkel bevont felültek extinkciós spektruma erőteljes sávot mutatott 550 nm körül, a részecskék plazmonikus frekvenciájánál, valamint egy szélesebb sávot 650 nm felett. A nanorészecskék sűrűsége kb.  $47 \text{ NP}/\mu\text{m}^2$  értéktől növekedett kb.  $120 \text{ NP}/\mu\text{m}^2$ -ig. A megfelelő erősítő szerkezetek túske része is nagy sűrűséggel volt nanorészecskével bevontva, és a csúcs görbületi sugara így kb. 350 nm lett. A szerkezetek reflektanciája a nanorészecskék sűrűségével növekedett: 6.6%-ról 26.7%-ra változott.

#### **5. Funkcionalizált TPP szerkezetek alkalmazása**

##### ***Fluoreszcencia erősítés***

Fluoreszcens sztreptavidin rétegeken, arany nanorészecskékkel bevont TPP szerkezetek tuskéje által megvalósított fluoreszcencia erősítés egyértelműen csak azokra a területekre korlátozódott, ahol a szerkezetek hegye a réteghez ér. Az erősítés mértéke 2.5 és 4 között változott, átlagosan  $3.16 \pm 0.46$  volt, és  $1 \mu\text{m}^2$ -nél kisebb területeken jelentkezett.

Az erősítést lapos erősítő eszközökkel nagy felületeken is megfigyeltük. Az erősítés mértéke  $5.05 \pm 0.58$  volt a legnagyobb felületi sűrűségű szerkezetekkel és  $2.3 \pm 0.2$  a legkisebbekkel. A megvalósított teljes nanorészecske sűrűség tartományt tekintve az erősítés mértéke a nanorészecske extinkciós spektrumának 633 nm-nél (a fluoreszcencia gerjesztés hullámhossza) kapott amplitúdójával növekedett, egy telítési görbét adva ki. A megfigyelt fluoreszcencia minden esetben egy erős intenzitás mintázatot mutatott. Ezt a jelenséget a fluoreszcens fehérje és a nanorészecske réteg közti távolság változásának tulajdonítottuk.

Tanulmányoztuk továbbá a fluoreszcencia erősítést a legnagyobb felületi sűrűséggel bevont erősítő szerkezetekkel két olyan esetben is, amikor a minta meg volt döntve. Az elsőben a fluoreszcens réteg merőleges volt az optikai tengelyre, és olyan szerkezetet használtunk, ami  $15^\circ$ -os szöget zár be vele. Ekkor minden szerkezet oly módon erősítette a fluoreszcenciát, ami egy intenzív, párhuzamos csíkrendszert eredményezett, ahol a csíkok átlagos távolsága  $990 \pm 67$  nm volt. A második esetben a fluoreszcens réteg és az erősítők felülete párhuzamos volt, egymással érintkeztek, de mindkettő meg volt döntve az eredeti helyzetéhez képest  $30^\circ$ -kal. Ebben az esetben nem figyeltem meg csíkrendszert és az erősítés az eredeti szögben megfigyelthez képest valamelyest kisebb volt. Az erősítést kisebb átmérőjű nanorészecskékkel is megvalósítottam: az intenzitás eloszlás a nagy részecskékkel elérthez hasonló periodikus jelleget mutat, az értéke pedig a 16 nm-es részecskénél  $3.23 \pm 0.38$ , a 41 nm-eseknél pedig  $4 \pm 0.46$ .

### ***A fluoreszcencia erősítés eredete***

A megfigyelt fluoreszcencia erősítés térbeli mintázatot mutatott. A görbült felületű erősítő szerkezeteknél a maximum a szerkezet közepe alatt volt megfigyelhető, a második maximum pedig laterális irányban kb.  $5 \mu\text{m}$ -re helyezkedett el. A nanorészecske és fluorofór rétegek távolsága itt kb. 250 nm az erősítés pedig kb. 3-4-szeres. A megdöntött erősítők esetében a periodikus intenzitás vonalak ott is megfigyelhetők, ahol ez a távolság több mikrométer. Ráadásul a mintázat sötétebb tartományaiban az intenzitás sok esetben a háttérénél kisebb. Ezért véleményem szerint az erősítés elsősorban állóhullámok kialakulásával magyarázható. Az elrendezésünkben az állóhullámok az erősítő szerkezetek alsó, reflektáló felületéről való visszaverődés miatt jönnek létre. A 633 nm-nél mért reflektancia értékekből (6.6% és 26.7% között) kiszámolható, hogy az interferencia maximumokban a gerjesztő nyaláb intenzitás

növekedése várhatóan 1.58–2.3-szoros. A megfigyelt 2.3–5-szörös erősítés azonban nem magyarázható csak a gerjesztő nyaláb visszaverődése általi intenzitás-növekedéssel. Feltehető, és ez egybevág a szakirodalommal, hogy az emittált fény is visszaverődik és interferencia maximumokat hoz létre. Ez azt jelenti, hogy a megfigyelt erősítés a gerjesztő nyaláb és az emittált fény önmagukkal létrejövő interferenciája által áll elő. Nem zárhatjuk ki azonban a plazmonikus erősítés meglétét azokban a régiókban, ahol a nanorészecske réteg megfelelő közelségbe (10–30 nm) kerül a felületi fluorofórokkal.

## **6. Indirekt sejtmanipuláció**

### ***Sejtek és TPP szerkezetek kötésének hatékonysága***

Ahhoz, hogy a TPP szerkezetekkel hatékonyan megvalósíthassuk az egyedi sejtek indirekt manipulálását, közöttük erős kötések gyors és reprodukálható létrejötte szükséges. Ennek ellenőrzéséhez végeztünk kapcsolódási tesztekot biotinnal bevont K562 sejtekkel és sztreptavidinnel bevont mikroszerkezetekkel. A célsejtek vagy szabadon lebegtek vagy a felülethez voltak kötve. A létrejövő kapcsolat sikerességét különböző bevonat-kombinációkkal ellenőriztük. A biotínált sejtek a sztreptavidinnel bevont kereszt alakú szerkezetekhez az esetek 88.4%-ában, míg az ellipszoidokhoz az esetek 97.5%-ában kapcsolódtak sikeresen; amikor a sejtek nem voltak biotínálva, ez a szám 30%-ra esett, mutatva a sztreptavidin nem elhanyagolható kötődési képességét a sejtmembránhoz. A mikor a TPP szerkezeteket nem vontam be sztreptavidinnel, a kapcsolódás valószínűsége 10% alá esett.

### ***Sejtek indirekt manipulációja***

A TPP szerkezeteknek egyedi sejtek indirekt manipulációjában való sikeres alkalmazhatóságának bemutatásához olyan komplex szerkezetet készítettünk, amit egy többsapdás optikai csipesz rendszerben lehet használni. Az ilyen szerkezetek két fő előnye az, hogy a sejt és az intenzív csapdázó nyaláb közötti távolság több mikrométer is lehet, valamint lehetőséget nyújt hat szabadsági fokú mozgásra. Bemutattam, hogy ilyen szerkezettel sikeresen lehet a hozzá rögzített sejtet mozgatni a mintatérben a tér mindhárom irányába akár 10-20  $\mu\text{m/s}$  sebességgel anélkül, hogy bármelyiket elveszítenénk. Ismereteink szerint ez az első alkalom, hogy kétfotonos polimerizációval készített, specifikusan bevont,

optikai csipessel mozgatott komplex mikroszerkezetet használnak egyedi élő sejtek mozgatására.

## Összefoglalás

Munkám betekintést enged SU-8-ból készült 3D mikrostruktúrák különböző felületkezelési módszereibe és az ilyen struktúrák lehetséges biológiai alkalmazásaiba.

Először olyan, sztreptavidinnel és arany nanorészecskékkel való bevonást mutattam be, ami a felület savas, és az ezt követő aminoszilán kezelésén alapszik. A módszer biztonságosan alkalmazható bármely, tetszőleges alakú mikroszerkezeten, mivel a savas kezelés idejének helyes megválasztása esetén nem sérül sem a szerkezetek mikrométer alatti részletekkel bíró geometriája sem felületi morfológiája. A fehérjék felületi sűrűségének vizsgálatával kiderült, hogy a szerkezeteket 20–35%-os borítottsággal lehet fehérjével bevonni, ami olyan optikai csipesz kísérletekben való alkalmazhatóságukat teszi lehetővé, ahol a biotin-sztreptavidin kötést szükséges kihasználni. Egyenletes eloszlású arany nanorészecske réteget is elő lehet állítani a szerkezetek felületén a módszerrel, ahol a felületi sűrűséget egyetlen paraméterrel, az inkubáció idejével lehet változtatni. A nanorészecskék sűrűségének kontrollálása kulcsfontosságú a szerkezetek olyan alkalmazásaiban, mint pl. az optikai csipesz vagy a felület-erősített Raman spektroszkópia.

Másodszor, demonstráltam, hogy a TPP módszerével sikeresen lehet olyan mikroméretű, tetszőleges alakú platformot előállítani, amelyek fém nanorészecskékkel bevonva fluoreszcencia erősítésre használhatók. Megmutattam, hogy az ilyen nanorészecskékkel bevont mikroszerkezetekkel valóban lehetséges erősített fluoreszcencia detektálás. Az erősítést  $1 \mu\text{m}^2$ -nél kisebb területre lehetett lokalizálni, és a mértéke nagyobb volt, mint 3. A mikroszerkezetekkel nagy felületeket alkalmazva akár 6-szoros erősítést is el lehet érni. Az erősítés a nagyobb felületi sűrűséggel bevont szerkezetek esetében volt a nagyobb. Véleményem szerint az erősítés oka állóhullámok létrejötte, ami akkor következik be, amikor a gerjesztett és az emittált fény a bevont szerkezetek reflektív felületéről visszaverődik; a fluorofórhoz nagyon közel lévő nanorészecske rétegek esetében plazmonikus erősítés is létrejöhet. Polimer mikroszerkezeteknek erősítő eszközként való használata lehetővé teheti a jövőben az optikai csipesz által segített fluoreszcencia erősítést.

Utolsóként élő sejtek indirekt optikai manipulációját mutattam be. Ahhoz, hogy az egyszerű mikrogyöngyökkel elérhető mozgásoknál bonyolultabb manipulációkat végre lehessen hajtani, speciális alakú testeket kell polimerizálni. Továbbá ahhoz, hogy a sejteket és a szerkezeteket gyorsan és stabilan össze lehessen kapcsolni, az utóbbiak felületét funkcionálizálni kell. Megmutattam, hogy PEG-diamin kötőmolekulán alapuló eljárással az aminoszilános eljáráshoz képest tízszer több fehérjét lehet a 3D mikroszerkezetekhez kötni. Az így bevont mikroszerkezetekhez kb. 90%-os hatékonysággal kötöttem a sejteket; az így bevont, optikailag csapdázott szerkezetekkel azután sikeresen demonstráltam egyedi élő sejtek indirekt optikai mikromanipulációját.

## Köszönetnyilvánítás

Jelen doktori értekezés nem jöhetett volna létre többek segítő közreműködése, így különösen a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézetének segítségével nélkül.

Elsősorban Istennek köszönöm meg, hogy erőt és vezetést adott az eltelt években. Nélküle nem bírhattam volna azzal a bölcsességgel, vagy fizikai képességgel, hogy eddig eljuthassak.

Örökké hálás leszek Dr. Lóránt Kelemen témavezetőmnek, aki megismertetett a mikro- és nanotechnológia területével. A PhD munka során elengedhetetlen volt a folyamatos türelmes vezetése, és értem tett erőfeszítései. Túlhaladva tanácsadói szerepének kereteit kollégaként és barátként volt jelen nem csupán a különböző nézőpontokat jelentő elméletek ismertetésével, hanem ösztönző légkör kialakításával, fontos visszajelzésekkel, hasznos megbeszélésekkel is. Irányításával kutatói képességeim fejlődtek, és a projekteket érintő napi szakmai viták bővítették ismereteimet és segítették a munkavégzést.

Szeretném kifejezni szívből jövő hálámat és őszinte elismerésemet Prof. Ormos Pálnak, a Biofizikai Intézet vezetőjének, aki megadta nekem a lehetőséget, hogy az ő csoportjában végezzem a PhD kutatói munkát. Hálás vagyok a mindig időszerű támogatásáért és útmutatásáért. Az ő segítségével, és irányítása nélkül jelen doktori értekezés nem készülhetett volna el.

Szintén szeretném kifejezni mély hálámat kollégáim Vizsnyiczai Gaszton, Dr. Valkai Sándor, Buzás András és Dr. Szegletes Zsolt felé a felbecsülhetetlen értékű egyeztetésekért és támogatásért. Hálával tartozom a technikai stáb tagjainak is, így Kissné Domonkos Máriának, Egri Izabellának és az adminisztratív stáb tagjainak, így Hrk Anikónak, Verebes Beátának és Melczer Zsófiának.

Elismeréssel tartozom a Bécsi Műszaki Egyetem, Bécs, Alkalmazott Fizikai Intézetének, és a Johannes Kepler Egyetem, Linz, Biofizikai Intézetének munkatársai Prof. Schütz GJ és Dr. Jacak J felé az általuk a protein sűrűség számszerűsítéséhez nyújtott segítségért. Szintén hálás vagyok a Szegedi Tudományegyetem, Ásványtani, Geokémiai és Közöttani

Tanszékének, Szeged, munkatársának, Dr. Schuber Félixnek a mikrospektroszkópiához nyújtott segítségéért.

Szintén köszönöm tágabb gyülekezeti családomnak (Golgota), unokatestvéreimnek, ITC barátaimnak, és Dr. Sajith O T, Dr. Hima Bindu Gali, Dr. Yathish A J, Pradeep Reddy, Soujanya Kuntam barátaimnak, a kis indiai közösségnek és még sokaknak itt Szegeden.

Jelen értekezést nem tudtam volna befejezni szüleim állandó támogatása és a tőlük érkező egész életemre, és PhD munkámra szóló biztatás nélkül. Jelen értekezést szívből ajánlom nekik, és az én gondoskodó, szerető, és támogató feleségemnek Dr. Joseph Mary Prathibanak, akinek napi bátorítása és imái nélkül nem tudtam volna a munkát befejezni. S végül ajánlom leányomnak Nivedya Badri Aekbote-nak aki új reményt és az örömet hozott az értekezés befejezéséhez.

## Publikációs lista

### A dolgozathoz köthető megjelent publikációk

I. **Aekbote B L**, Jacak J, Schütz G J, Csányi E, Szegletes Z, Ormos P, Kelemen L. Aminosilane-based functionalization of two-photon polymerized 3D SU-8 microstructures. *European Polymer J* 48 (2012) 1745–1754. IF:2.562

II. **Aekbote B L**, Ormos P, Kelemen L. Gold nanoparticle-mediated fluorescence enhancement by two-photon polymerized 3D microstructures. *Optical Materials* 38 (2014) 301–309. IF:2.075

### A dolgozathoz köthető konferencia kiadvány

I. **Aekbote B L**, Kelemen L, Buzas A, Ormos P. Optical Tools For Localized Fluorescence Enhancement and Single Cell Studies. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 42, (2013) S139-S139. IF: 2.47

### A dolgozathoz nem köthető megjelent konferencia kiadványok és kézirat

I. Vizsnyiczai G, Kelemen L, **Aekbote B L**, Buzas A, Ormos P. Indirect optical manipulation of live cells with functionalized polymer microtools. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 42, (2013), S114-S114. IF: 2.47

II. Kelemen L, **Aekbote B L**, Buzas A, Ormos P. Microtools made by two-photon polymerization for optical tweezers systems used in biological manipulation experiments. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 40, (2011), 228. IF: 2.1



III. Vizsnyiczai G, Lestyán T, Joniova J, **Aekbote B L**, Ormos P, Miskovsky P, Kelemen L, Bánó G. Optically trapped surface-enhanced Raman probes prepared by silver photo-reduction to 3D microstructures (under Review).

### **Konferenciák (Előadások és poszterek)**

- **Aekbote B L**, Ch Hrvat D, Ormos P and Kelemen L ‘Optical tools for localized fluorescence enhancement and cell studies’ at PolyNano Summer School in collaboration with COST Action MP1205, Denmark, 2014
- **Aekbote B L**, Kelemen L, Buzás A and Ormos P, ‘Optical tools for localized fluorescence enhancement and single cell studies’ at 9th European Biophysics Congress, EBSA, Lisbon, 2013
- **Aekbote B.L**, Jacak J, Schütz G J, Szegletes Z, Kelemen L and. Ormos P, ‘Two-photon polymerized and functionalized 3D microstructures for biological applications’ at the 11th Greta Pifat-Mrzljak International School of Biophysics, Primosten, Croatia, 2012
- **Aekbote B L**, Vizsnyiczai G, Kelemen L, Buzas A, Ormos P, ‘Indirect optical manipulation of live cells with functionalized polymer microtools’ at the COST action TD0906 school on Nanomechanics of biomolecular adhesion, Venice, Italy, 2014
- **Aekbote B L**, Jacak J, Schütz G J, Szegletes Z, Kelemen L and. Ormos P, ‘Two-photon polymerized and functionalized 3D microstructures for biological applications, at the 11th Greta Pifat-Mrzljak International School of Biophysics, Primosten, Croatia, 2012
- **Aekbote B L**, Jacak J, Schütz G J, Szegletes Z, Kelemen L and Ormos P ‘Functionalization of 3D photopolymerized microtools for biological applications’ at the ‘ Joint ICTP-KFAS conference on Nanotechnology for biological and biomedical applications’ at ICTP ( The Abdus Salam International Centre for Theoretical physics), Trieste, Italy, 2011