

**Tudományos Diákköri dolgozat**

# **PHSRN polipeptid oldat hatása a HeLa sejtek adhéziójára**

Készítette:

**Magyaródi Beatrix**

Egészségügyi mérnök MSc hallgató

Témavezető:

**Kovács Kinga Dóra**

PhD hallgató

ELKH-EK MFA, Nanobioszenzorika Lendület

Kutatócsoport

Konzulens:

**Dr. Bonyár Attila**

Egyetemi docens, Elektronikai Technológia Tanszék  
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

**Dr. Horváth Róbert**

Tudományos főmunkatárs, csoportvezető

ELKH-EK MFA, Nanobioszenzorika Lendület

Kutatócsoport

**Budapest, 2020**

# Tartalomjegyzék

Absztrakt .....	3
Abstract .....	4
1. Rövidítések .....	5
2. Bevezetés .....	6
2.1 Sejtadhézió.....	6
2.2 Bioszenzorok .....	7
2.3 PHSRN .....	9
3. Célkitűzés.....	12
4. Anyagok és módszerek .....	13
4.1 HeLa .....	13
4.2 Epic Bench Top jelölésmentes optikai bioszenzor .....	13
4.3 Felület készítése.....	14
4.4 PHSRN oldatok készítése.....	16
4.4.1 Hígítási sor készítése:.....	16
4.5 Sejtfelvétel folyamata .....	17
4.6 EPIC BT-ben történő jelrögzítés .....	17
4.7 Sejtek fényképezése.....	18
5. Eredmények .....	19
5.1 Mérés RGD-vel kezelt felületen.....	19
5.2 Mérés fibronektinnel kezelt felületen.....	21
6. Összegzés.....	23
7. Köszönetnyilvánítás.....	24
8. Irodalomjegyzék .....	25
9. Internetes hivatkozások.....	26

## Absztrakt

A gyakran szinergiapeptidként is emlegetett PHSRN egy 5 aminosavból felépülő polipeptid szekvencia (prolin-hisztidin-szerin-arginin-aszparagin), amely a fibronektinen található. Ezen polipeptid, az RGD tripeptid jelenlétében a sejtek adhézióját segíti elő a kétféle motívumot kifejező felületeken, önmagában nem elég a sejtek letapadásának előidézéséhez. Ezzel szemben az RGD motívum felületi jelenléte önmagában is képes a sejtadhézió előidézésére.[1], [2]

A PHSRN peptid szinergikusan fokozza a sejtadhéziót, ha az RGD kis felületi koncentrációban van jelen, tehát amikor a sejtek csak gyengén tapadnak a felülethez. Nagy RGD koncentráció esetén a szinergiapeptid jelenléte negatívan befolyásolja a sejtek tapadását. A PHSRN lehetővé teszi a sejtek adhézióját és osztódását alacsony RGD sűrűségű felületeken.[1]

Szignifikánsan magasabb a sejtek osztódása PHSRN-G6-RGDS együttes használatával, amely közel kétszer akkora denzitást okoz, mint az RGDS vagy akár a PHSRN-RGDS együttes használata. Az RGDS és a PHSRN közötti távolság és orientáció is fontos tényező e két motívum számára a sejtosztódás fokozásának szempontjából.[2]

A PHSRN hatásait korábban kizárólag felületen alkalmazva, mikroszkóppal vizsgálták, ezzel szemben dolgozatomban fő célja különböző koncentrációjú PHSRN polipeptid oldatok HeLa sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata RGD motívumokat kifejező felületeken. A kísérletekhez jelölésmentes optikai bioszenzort használok, amely kitűnően alkalmas a sejtadhézió időbeni monitorozására.[3] Kutatómunkám fő kérdése, hogy a PHSRN peptid oldatban is ugyanazt a szinergikus hatást fejti-e ki, mint felületen alkalmazott formájában.

## Abstract

The PHSRN is also known as the synergy peptide, its sequence consists of 5 amino acids (proline-histidine-serine-arginine-asparagine) and can be found on the extracellular protein fibronectin. This peptide promotes cell adhesion in the presence of RGD; however, alone it is not enough to induce cellular adhesion. In contrast, pure RGD displaying surfaces trigger cellular adhesion.[1], [2]

The PHSRN peptide synergistically enhances cell adhesion when RGD is present in low surface concentrations, so cells adhere weakly to the surface. At high RGD concentrations, the presence of the synergy peptide negatively affects cell adhesion. PHSRN allows cells to adhere to surfaces with low RGD density.[1]

Cell division is significantly higher with the use of PHSRN-G6-RGDS on the surface, with nearly twice the cell density, than with only RGDS or with PHSRN-RGDS. The distance between RGDS and PHSRN and their orientation are also important factors for these two motifs in enhancing cell division.[2]

Until now, the effects of PHSRN on cell adhesion has only been studied under a microscope and with the peptides attached to a surface. The primary goal of my work is to study the effect of PHSRN solutions in different concentrations on HeLa cancer cell adhesion using RGD displaying surfaces. During my experiments, I will use a label-free optical biosensor, which is excellent for monitoring cell adhesion kinetics.[3] The main question is whether the PHSRN peptide has the same synergistic effect in solution as it has when attached to the surface.

# 1. Rövidítések

DMEM	Dulbecco's modified Eagles medium	Dulbecco módosított Eagle médium
DPBS	phosphate-buffered saline	foszfátpufferelt sóoldat
ECM	extracellular matrix	extracelluláris mátrix
FBS	fetal bovine serum	magzati borjúsérum
HBSS	Hanks' balanced saltsolution	Hanks' sóoldat
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav
PHSRN	proline-histidine-serine-arginine-asparagine	prolin-hisztidin-szerin-arginin-aszparagin
PLL	poly-L-lisine	poly-L-lizin
PEG	polyethilen glycol	polietilén-glikol
RGD	arginine-glycine-aspartic acid	arginin-glicin-aszparaginsav
PLL-PEG-RGD	PLL(20)-g(3.5)PEG(2)/PEG(3.4)-RGD (14.7%)	PLL(20)-g(3.5)PEG(2)/PEG(3.4)-RGD (14.7%)
RWG	resonant waveguide grating	rezonáns rácsos hullámvezető
TE	trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid	tripszin-etilén-diamin-tetraecetsav

## 2. Bevezetés

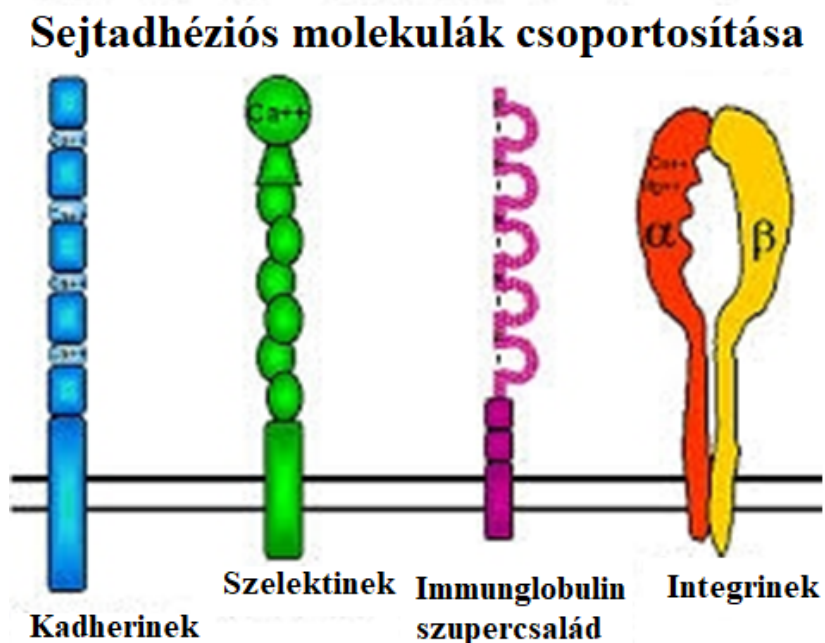
### 2.1 Sejtadhézió

Sejtadhézió az a folyamat, amely során az élő sejtek kapcsolatot alakítanak ki egymással vagy az extracelluláris mátrixszal (ECM) különböző fehérjekomplexek segítségével. [i2]

Kétféle sejtadhéziót különböztetünk meg, a sejt-sejt és sejt-mátrix adhéziót, melyekből az élő szervezetek felépülnek. Fontos szerepet töltenek be a sejt növekedésben, migrációban és a differenciálódásban is. Azok az adherens sejtek, amelyek nem képesek adhézió létrehozására egymás között vagy az ECM-el, anoikis során elpusztulnak. Ez a jelenség fontos szerepet tölt be a tumor kutatás területén. [4] Az adhézió kialakításában a transzmembránfehérjék vesznek részt.

A sejtadhéziós molekulákat csoportosíthatjuk (1. ábra) aszerint, hogy a kötés létrejöttéhez szükséges-e vagy nem  $Ca^{2+}$ . A  $Ca^{2+}$  függő fehérjék a kadherin, integrin és a szelektin.  $Ca^{2+}$  független fehérjék az immunglobulin szupercsaládba tartozó sejtadhéziós molekulák.

Az integrinek az adhéziós molekulák negyedik csoportját alkotják, melynek kiemelt szerepe van a sejtadhéziós molekulák között. Felépítését tekintve  $\alpha$  - és  $\beta$ - alegységből állnak, amely által heterodimerek jönnek létre. Az  $\alpha$  alegységnek 24 félé, a  $\beta$  egységnek 9 félé variációja ismert, melyekből nagyon sokféle integrin molekulaváltozat keletkezhet. Az  $\alpha_5\beta_1$  integrin és liganduma az RGD, amely motívum megtalálható az extracelluláris mátrixfehérjéken. [5], [6], [k1]

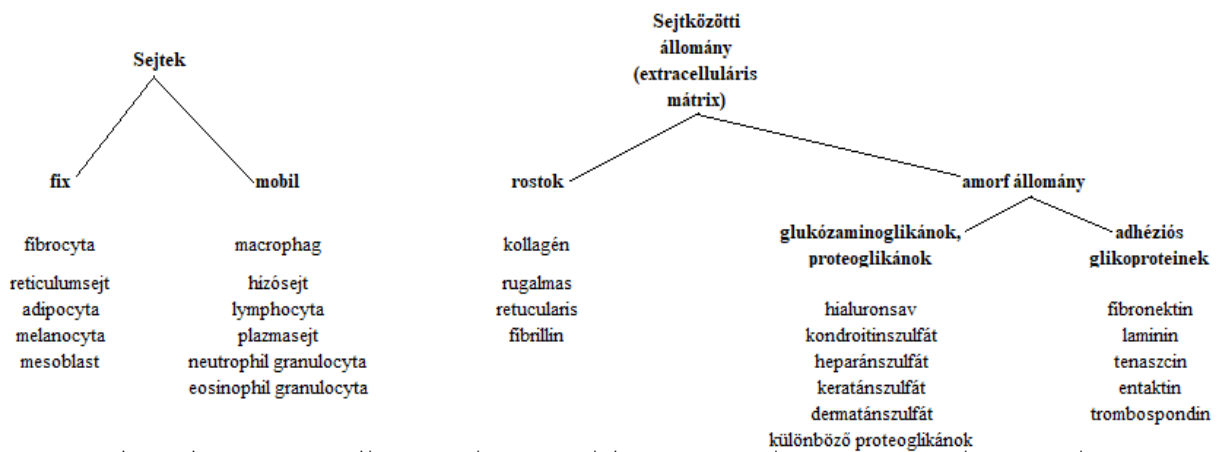


1. ábra. Sejt adhézióban részt vevő molekulák [i3]

A kötőszövetek (2. ábra), sejtekből és kötőszöveti állományból (ECM) felépülő szöveti struktúrák. Az extracelluláris mátrix kötőszöveti rostokból és amorf állományból tevődik össze. Az adherens sejtek az ECM-hez tapadva képesek szövet felépítésére.

Az amorf állományt két alaptípusba sorolhatjuk; glukózaminoglikánok, proteoglikánok és adhézios glikoproteinek. A proteoglikánok felelnek az ECM stabilitásáért, a sejtek differenciálódásáért és proliferációjáért. Az adhézioért felelős fehérjék a glikoproteinek, ahova a fibronectin és laminin sorolhatók.[k1] A rostok csoportjába az ECM struktúrájáért felelős elasztin, kollagén stb. tartozik.

## A kötőszövet alkotóelemei



2. ábra A kötőszövet alkotóelemeinek csoportosítása [k1]

## 2.2 Bioszenzorok

Az élő sejtek adhéziójának fontos szerepe van, mind a szövetképződés, mind a fejlődés során, ezért is kulcsfontosságú vizsgálni.[7]

A bioszenzorok olyan érzékelők, melyek működése az élő szervezetekre jellemző specifikus reakción alapul.[8] A hagyományos, jelöléses bioszenzorokkal történő vizsgálathoz szükséges különböző anyagok használata pl. fluoreszcens anyag (fluorofór festék), mágneses jelölő anyag vagy aktív enzim, hogy biológiai kölcsönhatásokat vizsgáljunk [9], szemben a jelölésmentes bioszenzorokkal. A jelölésmentes bioszenzorok térhódítása éppen ennek köszönhető, hogy

rendkívül költséghatékonyak, nem avatkozik bele a vizsgálni kívánt folyamatokba és nem szükségesek különböző jelölőmolekulák és anyagok a minta vizsgálatához. Ezen kívül a legmodernebb jelölésmentes szenzorok nagy áteresztőképességgel is rendelkeznek és valós időben képesek vizsgálni a biológiai folyamatokat.

A jelölésmentes bioszenzorok négy csoportba sorolhatók a jelátalakító alapján; elektrokémiai, optikai, akusztikus hullám alapú és félvezető alapú.

A sejtadhézió erőssége meghatározható a leválasztáshoz szükséges erőből, melyhez egy fokozatosan növekvő külső erőt (amely lehet mechanikai, hidrodinamikai vagy gravitációs) alkalmazunk a vizsgált sejten. Ez az erő korrelál a jelölésmentes optikai bioszenzoron mért jellel, hogy mennyire terül el a sejt az adhézió során.[10]

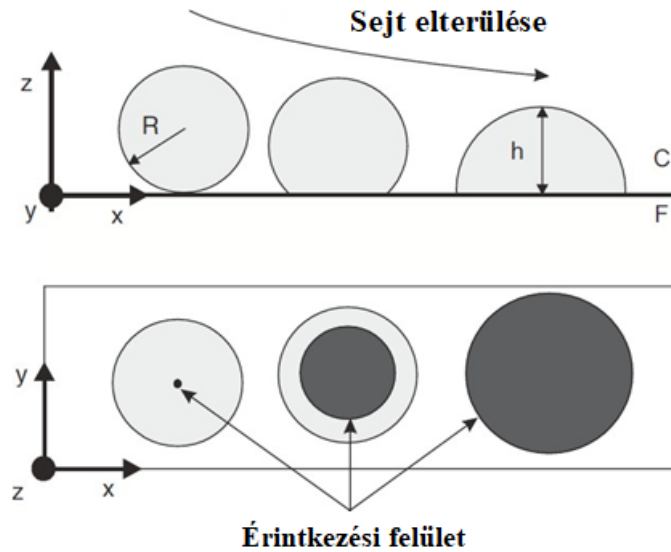
Geometriailag a sejtadhézió (3. ábra) a sejt átalakulása egy gömbszerű objektumból egy ellaposodott, kitapadt formába a térfogat megőrzésével. A folyamat során a sejt kiterülés mértéke jól jellemezhető a sejt–szubsztrát érintkezési felülettel.[11]

A felületérzékeny jelölésmentes optikai bioszenzorok közé sorolható az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (OWLS), felületi plazmonokat felhasználó eszközök (SPR), a rezonáns rácsos hullámvezető (RWG). Ezek a módszerek az evaneszcens hullám alapú érzékelést alkalmazzák a szenzor felületén elhelyezett biológiai mintán. [12],[13]

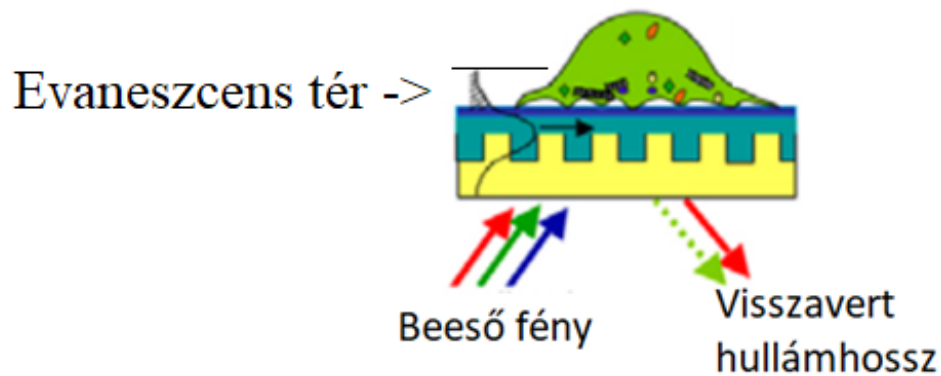
Ilyen RWG alapú jelölésmentes optikai bioszenzor az Epic® BenchTop (BT)-t (Corning Incorporated, Corning, NY, USA). A készülékkel több száz minta egyidejű mérése vált lehetővé a 96 és 384 lyukkal rendelkező mikrotálcák segítségével.

A szenzorra beeső fény (4. ábra) a rácson becsatolódik, ahol teljes visszaverődést szenved a hullámvezető belső felületein és fázisa minden egyes visszaverődésnél eltolódik. A fáziseltolódás a vizsgált réteg törésmutatójától is függ és ez által akár molekuláris biológiai változások is előidézhetik; pl. adhéziós kötés kialakulása és sejt szétterülése. RWG esetében a fázistolás következményeként létrejövő rezonáns hullámhossz eltolódását 0.25 pm-es érzékenységgel rögzíti az EPIC BT bioszenzor meghatározott időnként (min. 3 s).





3. ábra Adhézió során megváltozik a sejt geometriája [11]

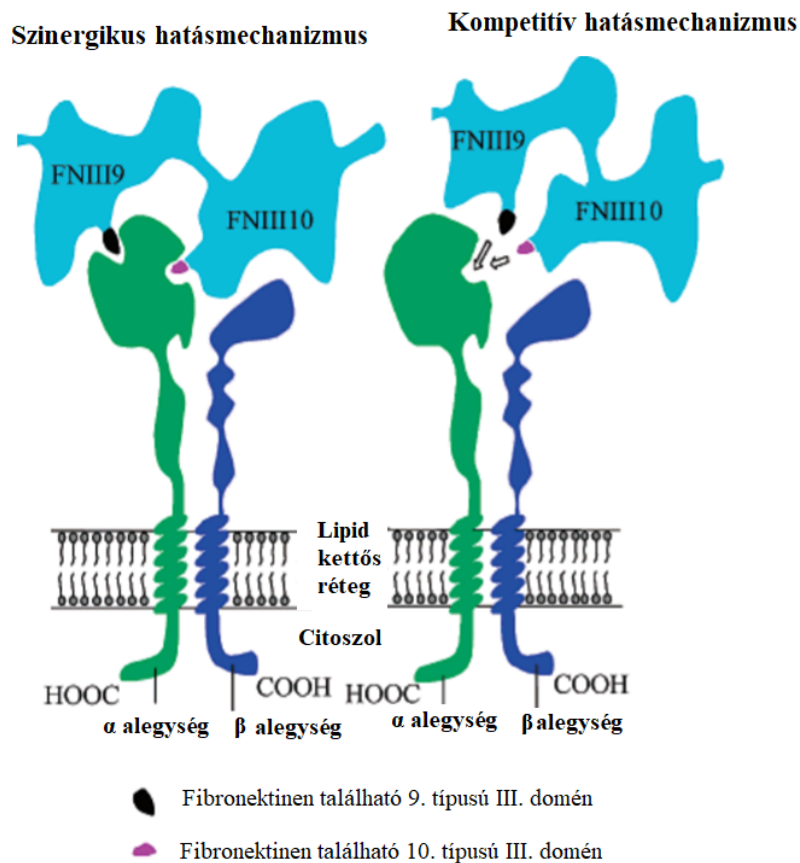


4. ábra Az Epic BT jelölésmentes optikai bioszenzor működési elvének vázlatos rajza. [i4]

## 2.3 PHSRN

A sejtadhézió kialakításában egyik nélkülözhetetlen aminosav szekvencia az RGD (arginin-glycin-aszparaginsav), amely elősegíti a sejt kapcsolódását az ECM-hez. Az integrinek fontos szerepet játszanak, ugyanis ezek felismerik és kötődnek az RGD-hez a specifikus RGD-kötő helyeik segítségével. Az RGD megtalálható az ECM-et alkotó fehérjéken, pl. a fibronektinen, fibrinogéneken, vitronektin és osteopontinen.[14]

Az RGD mellett felfedezhető még egy rövid peptidszekvencia, amely elősegíti a sejtek tapadását. A PHSRN (egy 5 aminosavból felépülő szekvencia: prolin-hisztidin-szerin-arginin-aszparagin), amely a fibronektinen található a 9. típusú III. domén, az RGD peptidet (10-14) tartalmazó 10. domén mellett.[15] Önmagában a PHSRN-hez a sejtek nem képesek hozzáköttni, viszont az RGD-vel együttműködve képes fokozni az adhéziót. A PHSRN hatásmechanizmusa még részletesen nem ismert, feltételezett működése az 5. ábrán látható. Az ábrán látható első modell szemlélteti, hogy egyetlen integrin  $\alpha$  alegységének egyik oldalán bekötődő PHSRN növeli az integrin RGD kötő affinitását az ECM felé. A második modellen, a versengő kötődés (kompetitív hatásmechanizmus) esetében, mindkét peptid egy és ugyanazon kötőhelyre szeretne beköttni.



5. ábra. A PHSRN és az RGD lehetséges kötődési helye és a lehetséges működési mechanizmus sematikus rajza. [15]

Mitsuhiro és m.társai által készített tanulmányban a PHSRN hatását összehasonlították az RGD-vel. Mikroszkópos mérések segítségével megállapították, hogy a PHSRN-nel bevont

felületen csekély, elhanyagolható mértékben volt adhézió ellentétben az RGD-vel bevont felülettel. Utóbbi esetében sokkal nagyobb mértékű sejtadhéziót tapasztaltak.

Abban az esetben, amikor PHSRN-RGD molekulával bevont felületet vizsgáltak, nem tapasztaltak a sima RGD-vel bevont felületen kiváltott sejtadhéziónál nagyobb mértékű sejt kitapadást. Viszont amikor a PHSRN és RGD molekulák közé még egy G6 spacer is beiktattak, akkor ezzel a PHSRN-G6-RGD molekulával bevont felületen közel kétszeres sejtadhéziót mértek a sima RGD-vel bevont felülethez képest. Ebből kiderült, hogy kiemelten fontos a motívumok közötti távolság és a konformáció is.[2]

### 3. Célkitűzés

Munkám célja volt megvizsgálni, hogy a PHSRN oldatban is ugyanazt a szinergikus hatást váltja-e ki az RGD-vel, mint amikor mindkét szekvencia a felületre van kikötve.

Mivel eddig a PHSRN peptid hatása csak mikroszkópos mérésekkel volt vizsgálva, ezért céлом volt megvizsgálni a PHSRN oldat hatását jelölésmentes optikai bioszenzor felhasználásával, fibronektinnel és RGD-vel kezelt felületen egyaránt.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1 *HeLa*

A legrégebbi és leggyakrabban használt immortalizált tumoros sejtvonal, melyet 1951-ben távolítottak el egy Henrietta Lacks nevű beteg cervix carcinoma-jából. Rendkívül jól szaporodó és ellenálló sejtvonal, ezért is használják világszerte széleskörűen a tudományos kutatások során.

A rutinszerűen tenyésztett sejtkultúrát polisztirol Petri-csészében, párásított inkubátorban (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) tároltam a felhasználásig DMEM médiumban, amely ki lett egészítve 10% magzati borjúsérummal (FBS), 4 mM L-glutaminnal, 100 U/mL penicillinnel és 100 µg/mL sztreptomomicinnel.

### 4.2 *Epic Bench Top jelölésmentes optikai bioszenzor*

A mérésekhez egy nagy áteresztőképességű új generációs rezonáns hullámvezető rácsos optikai bioszenzort használtam (6. ábra), az Epic® BenchTop (BT)-t (Corning Incorporated, Corning, NY, USA). Ez az optikai bioszenzor, a biológiai sejt válaszokat rögzíti a sejt morfológiájának változásáról a szenzorfelület fölötti 150-200 nm távolságban. Ehhez az eszközhöz tartozik 96-os és 384 lyukkal rendelkező mikrotálca is, melyek közül én a 384 lyukkal rendelkezővel dolgoztam.

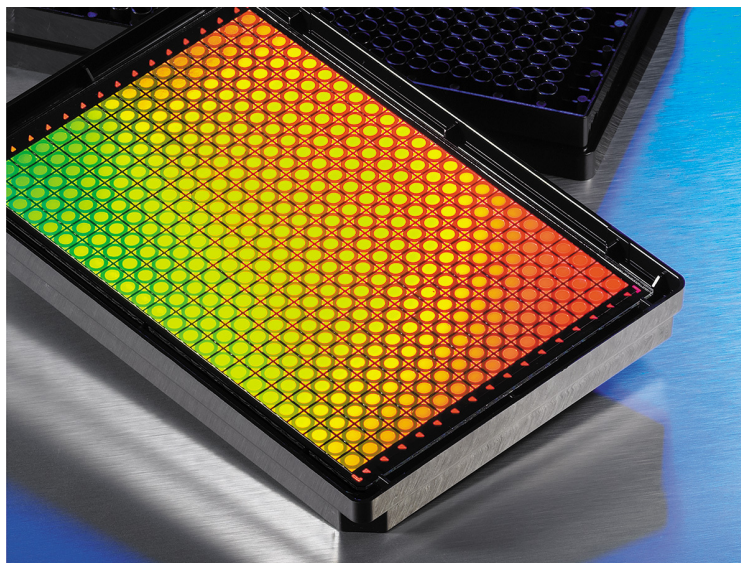
Minden egyes lyuk alja tartalmaz egy 2 × 2 mm-es rezonáns hullámvezető rács (RWG) érzékelőt. Alulról megvilágítva a rácsterületek a beeső szélesspektrumú fényt a Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> hullámvezető rétegbe (vékony, magas törésmutatójú réteg) csatolják, így létrejön egy olyan evanescens elektromágneses tér, amely exponenciálisan cseng le az érzékelő felületétől mért távolsággal és képes kölcsönhatni a hullámvezető felületére helyezett mintával.



6. ábra Epic® BenchTop (BT) (Corning Incorporated, Corning, NY, USA)

### 4.3 Felület készítése

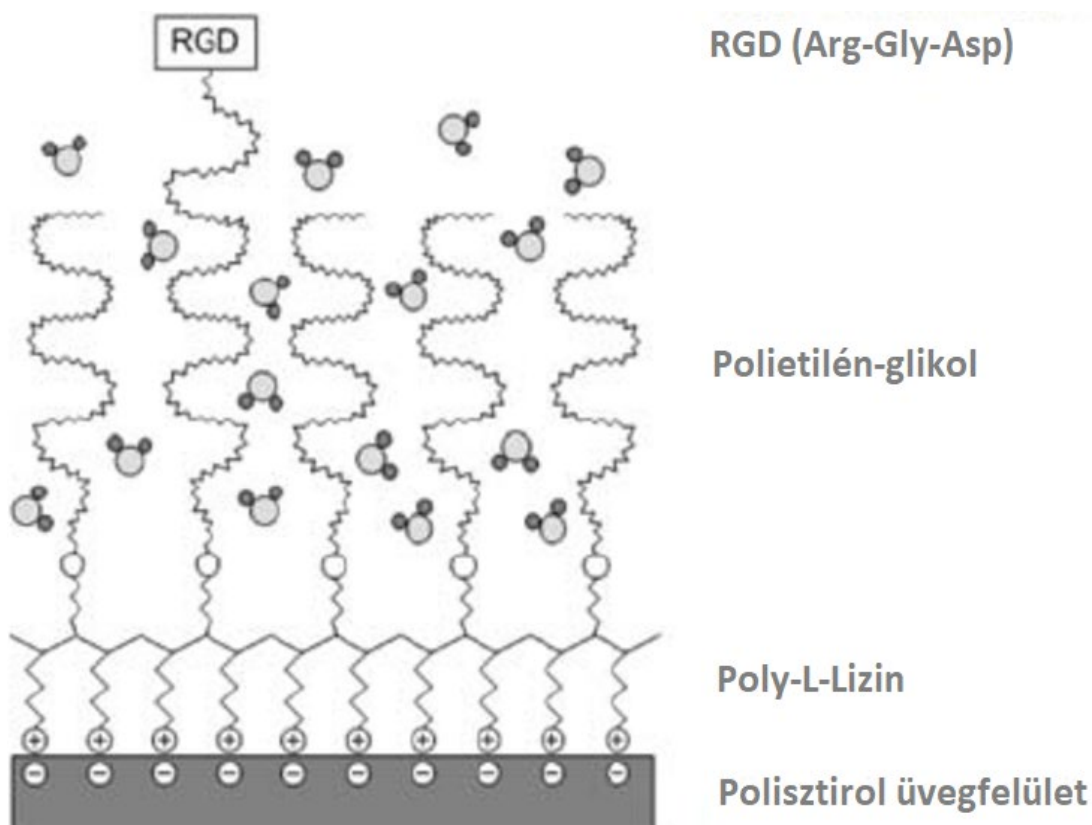
Kutatásom során kétféle felülettel dolgoztam; fibronectinnel és PLL(20)-g[3.5]-PEG(2)/PEG(3.5)-RGD-vel fedettel. A kísérleteim egy részében használt fibronectinnel kezelt felülethez a gyártó által értékesített 7. ábrán látható 384 lyukkal rendelkező változatot használtam (Corning® Epic® 384 Well Fibronectin Coated Cell Assay Microplate). Ez a mikrotálca kompatibilis a sejtekkel, lehetővé teszi többek között az adhézión sejtök kapcsolódását a felülethez és növekedésüket. [i1]



7. ábra Fibronectinnel bevont RWG mikrotálca [i1]

Kutatásom másik részében PLL(20)-g[3.5]-PEG(2)/PEG(3.5)-RGD szintetikus polimert használtam a felületek előkészítéséhez, amellyel elősegítettem a HeLa sejtek megfelelő adhézióját a szenzorfelülethez.

A PLL-PEG-RGD molekula (8.ábra) segítségével lehetőségünk adódik szimulálni az *in vivo* körülményeket. A PLL(poli-L-lizin) réteg vonja be a felületet, amelyhez jól tapadnak a sejtek. Viszont ez az anyag nem fordul elő a szervezetünkben, így nem célszerű vizsgálni. Az RGD (arginin-glicin-aszparaginsav) olyan aminosavszekvencia, amely számos sejtmatrix-alkotóban megtalálható, így alkalmas *in vivo* körülmények szimulálására. Szükséges egy újabb réteg létrehozása PEG(polietilén-glikol) molekulákkal. Ez taszítja a sejteket, ehhez nem képesek tapadni, csupán egy köztes segédréteget képez. A PEG a PLL-hez tapad, így meggátolja, hogy a sejtek a PLL-hez kössenek, így mi csak az RGD-vel történő kapcsolatot vizsgálhassuk.



8. ábra PLL-PEG-RGD szerkezete [2]

Az 1 mg/ml-es PLL-g-PEG-RGD törzsoldatot duplájára hígítottam 10mM pH:7,4 HEPES-el, így a lyukakba kerülő oldat 0,5 mg/ml-es volt.

A kutatáshoz 384 lyukkal rendelkező mikrotálcát (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) használtam, melynek megfelelő lyukjaiba hidratálás céljából 20  $\mu$ l 10mM pH:7,4 HEPES-t pipettáztam. Centrifugáltam a buborékok eltávolítása miatt 100 x g, 10 mp-ig, majd ezután kiráztam a HEPES-t a steril fülkében. Az első sort feltöltöttem 30  $\mu$ l 10mM pH:7,4 HEPES -el. Minden további lyukba PLL-g-PEG-RGD felületet készítettem 30  $\mu$ l 0.5 ml/ml-es PLL-g-PEG-RGD oldat lyukakba pipettázásával. Ismét centrifugáltam a mikrotálcát 100 x g-n, 10 mp-ig, a buborékok eltávolítása érdekében, majd 30 percig billegtetőre helyeztem. 30 perc után kiütöttem az oldatokat és átmostam a lyukakat először 30  $\mu$ l 10 mM pH:7,4 HEPES -el, majd 30  $\mu$ l 20 mM pH: 7,4 HBSS-HEPES-el.

#### *4.4 PHSRN oldatok készítése*

Elkészítettem a peptid oldatokat különböző koncentrációban. PHSRN port beoldottam 500  $\mu$ l 20mM pH:7,4 HEPES-HBSS-ben. Ez megfelelt a 2000  $\mu$ g/ml-es PHSRN koncentrációnak, ezt használtam a többi koncentráció hígításának kiinduló pontjának.

##### 4.4.1 Hígítási sor készítése:

Kihelyezett Eppendorf csövekbe készítettem el a hígítási sort, először az előző koncentrációjú PHSRN oldat hozzáadásával, majd a megfelelő mennyiségű 20 mM pH: 7,4 HBSS-HEPES pipettázásával.

A felületkezelés végeztével kiütöttem az oldatokat, majd az adott mérésnek megfelelően feltöltöttem a lyukakat a PHSRN oldatokkal, a legmagasabb koncentrációjú oldattól kezdve haladtam a legalacsonyabb koncentrációk felé. Centrifugáltam a mikrotálcát 100 x g, 9 mp beállítással, majd az EPIC BT-be helyezve elindítottam az alapvonal mérést. Addig vártam az alapvonallal, míg párhuzamosan kezdtek el futni a lyukakból érkező jelek egymással.



## 4.5 Sejtfelvétel folyamata

Az inkubátorban tárolt (37,5°C; 5 % CO<sub>2</sub>) HeLa sejteket először 10x-es nagyítás segítségével megvizsgáltam fénymikroszkóp alatt. A csésze konfluenciáját ellenőriztem, illetve a sejtek morfológiáját. Miután egészségesnek találtam őket, megkezdtem a munkát velük.

Elsőként eltávolítottam a sejtekről a tápoldatot, amely a sejteknek a folyamatos tápanyag utánpótlást biztosította az inkubálás ideje alatt. A sejtörmelékek eltávolításának céljából 2 ml 1x DPBS-el (Dulbecco fiziológias foszfát puffer) mostam át a sejteket. 1 ml 1x tripszin-EDTA-t adtam a sejtekhez pontosan 2 percig, majd eltávolítottam. A tripszin felhasítja a sejtek és a felület közötti kapcsolatot, mivel meggyengíti a fokális adhézis kötést a Petri-csésze és a sejtek között. Az EDTA kelátképző; a Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup> ionokkal képez kelátot. Ez szükséges a sejt-sejt kapcsolatok megszakítására, a sejtek ionigényes folyamatainak gátlására van hatással, főként a Ca<sup>2+</sup> és Mg<sup>2+</sup> ionok eltávolítása miatt.

1 ml DMEM-et adtam a sejtekhez, mellyel lemostam a sejteket a Petri-csészéről és belepipettáztam egy 15 ml-es Falcon-csőbe és centrifugába helyeztem és 200 x g-n 5 percig centrifugáltam.

A felülúszó leöntését követően 2 ml 20 mM pH 7.4 HEPES-HBSS-t adtam a sejtekhez, majd szuszpendálást követően ismét centrifugába helyeztem őket 200 x g beállítással 5 percre. Ismét leöntöttem a felülúszót, majd 1 ml 20 mM pH 7.4 HEPES-HBSS-ben felsuszpendáltam a sejteket.

A sejtszámolást Bürker-számláló segítségével végeztem és úgy hígítottam a sejtes szuszpenziót, hogy egy-egy lyukba 8000 sejt kerüljön.

## 4.6 EPIC BT-ben történő jelrögzítés

Miután a PHSRN oldatokat ráhelyeztem a felületkezelésekre, elindítottam a mérést, felvettem az alapvonalat. Addig vártam az alapvonallal, míg párhuzamosan kezdtek el futni a lyukakból érkező jelek egymással. Ezt elérve újraindítottam a jel rögzítését a sejtfelvétel megkezdésekor, hogy a mérés során párhuzamos jelekkel dolgozhassak.

A megfelelő mennyiségű sejthez a kiszámított mennyiségű 20 mM pH 7.4 HEPES-HBSS hozzáadását követően ráhelyeztem a sejteket (8000sejt/lyuk) oszloponként egyszerre az EPIC BT szenzor lyukjaiba. A mérést mindaddig folytattam, amíg a szigmoid görbe, minden egyes lyukból érkező jele párhuzamosan futott a többivel. Ez 202 és 217 percig tartott.

#### *4.7 Sejtek fényképezése*

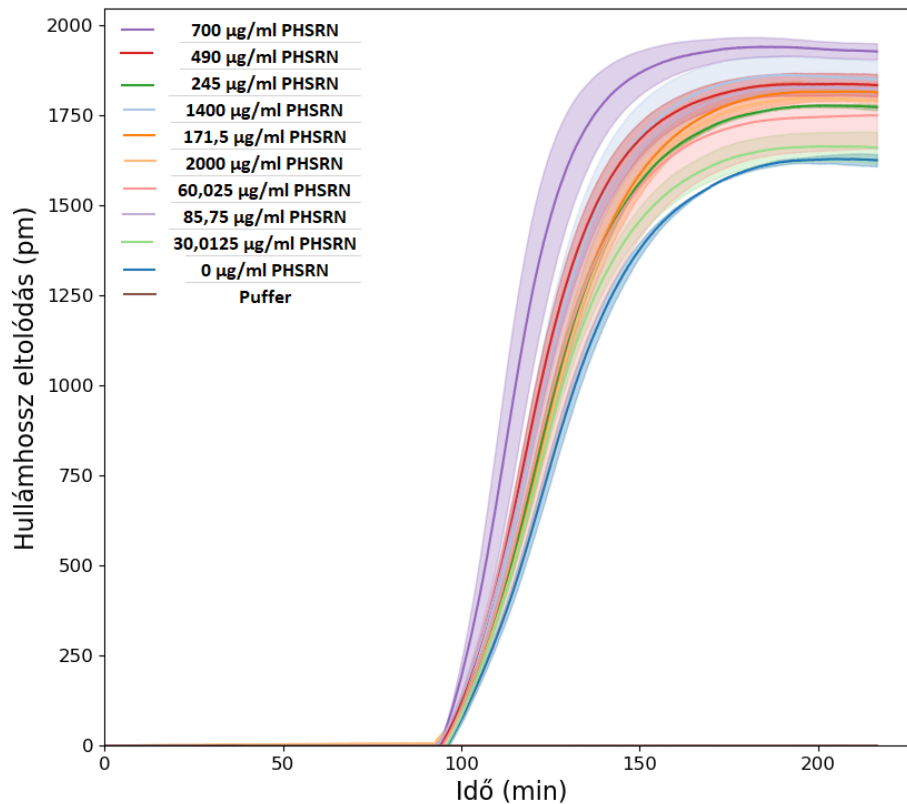
Miután a sejtek adhéziós görbéjének a mérését leállítottam, áthelyeztem őket a fénymikroszkópba (Axio Observer Z1 mikroszkóp (Carl Zeiss) inverz fénymikroszkóp) és Cellsorter program segítségével 10 x nagyítás alatt képeket készítettem róluk.

## 5. Eredmények

A PHSRN mérés célja volt megvizsgálni, hogy hogyan tapadnak a sejtek különböző felületeken, így külön megmértem a fibronektinnel bevont felületen, illetve RDG-vel készíttetten egyaránt.

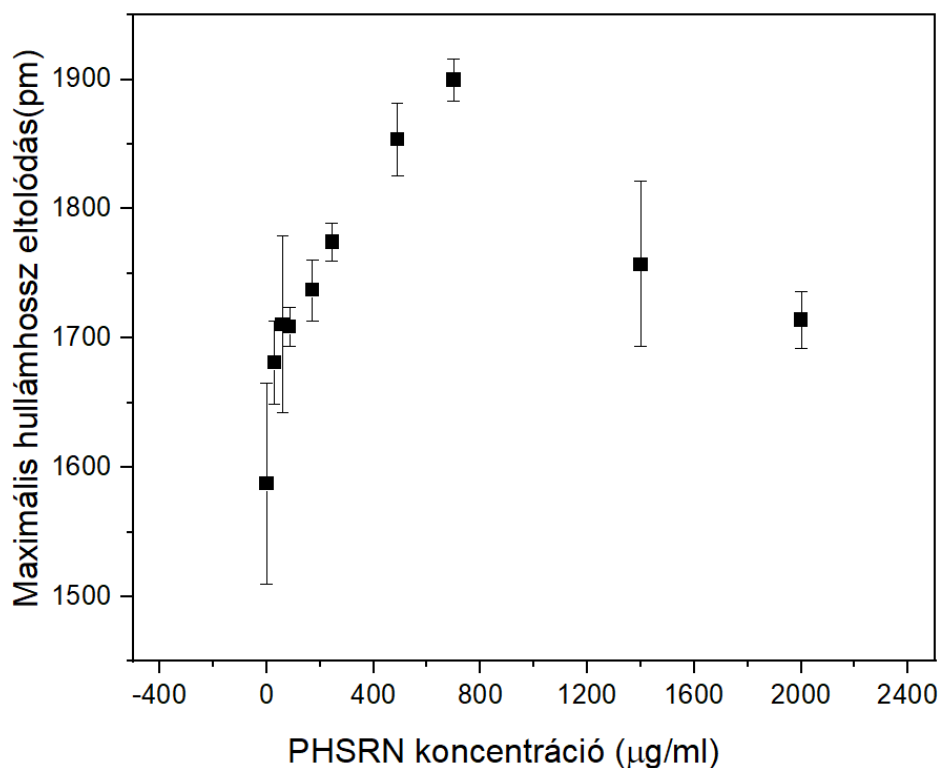
### 5.1 Mérés RGD-vel kezelt felületen

A jelölésmentes optikai bioszenzorral mért adatokat ábrázoltam az átlag, illetve a szórás szerint (9. ábra). Minden koncentrációnál 3 párhuzamos lyukból érkező adattal dolgoztam. Legmagasabb adhézió a 700  $\mu\text{g/ml}$ -es PHSRN érték esetében, míg legalacsonyabb érték a 0  $\mu\text{g/ml}$ -es PHSRN-t kapott kontroll sejtek mutattak. A kontroll sejteknél minden időpillanatban, minden PHSRN-t kapott HeLa sejt magasabb hullámhossz eltolódást mutat a 217 perces mérés során.



9. ábra A HeLa sejtek bioszenzoros jelének átlaga és szórása (3 párhuzamos mérésből) RGD-vel bevont felületen különböző PHSRN koncentrációknál

A dózis-maximális hullámhossz eltolódás grafikonján (10. ábra) egyértelmű trend ábrázolódik. Látható, hogy az adhézió növekedik a 700  $\mu\text{g/ml}$ -es PHSRN koncentrációig, ezt követően az adhézió lecsökken.



10. ábra Dózis-maximális hullámhossz eltolódás grafikon ábrázolása RGD-vel kezelt felület esetén (3 párhuzamos mérésből)

Mivel a hullámhossz eltolódás korrelál a sejtadhézió mértékével, így a bioszenzoros jelből következtetni lehet a sejt és a felület között lejátszódó folyamatokra.

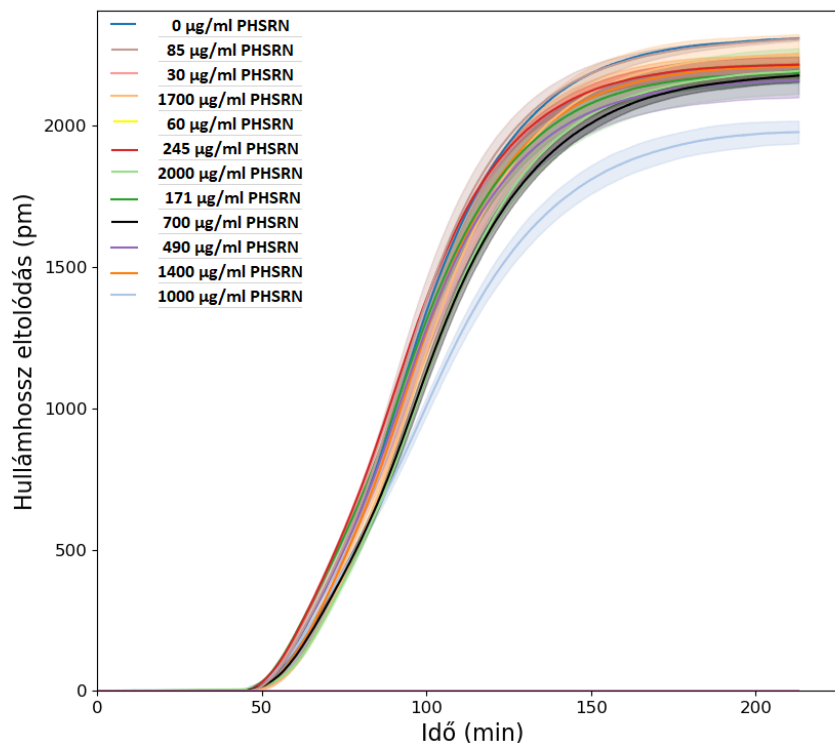
A fenti dózis-maximális hullámhossz eltolódás grafikonon látható trend egyik lehetséges magyarázata az, hogy a felületen lévő RGD motívumok nem foglalják el az összes integrint. Tehát maradnak üres integrinek, ahova a PHSRN molekulák be tudnak szabadon kötődni. Kis PHSRN koncentráció esetén azért van a maximális hullámhossz eltolódásban jelnövekedés, mert a PHSRN bekötődés növeli az adhéziót, viszont a kompetíció még elhanyagolható az RGD és PHSRN között. A nagy koncentráció esetén viszont a PHSRN elkezd jelentős mértékben kiszorítani a kötőhelyekről az RGD-t, így az adhézió csökkenni kezd egy maximális értékhez képest (700

$\mu\text{g/ml}$ -es PHSRN koncentráció). Ez a kísérlet a kompetitív hatásmechanizmust támasztja alá (5. ábra).

## 5.2 Mérés fibronektinnel kezelt felületen

Legmagasabb adhéziót a  $0 \mu\text{g/ml}$ -es PHSRN érték (kontroll sejtek) esetében mértem, míg legalacsonyabb értéket az  $1000 \mu\text{g/ml}$ -es PHSRN-t kapott sejtek mutatták (11. ábra).

A kontroll sejteknél minden időpillanatban, minden PHSRN-t kapott HeLa sejtek esetében kisebb hullámhossz eltolódást mutattak a 202 perces mérés során.



11. ábra A HeLa sejtek bioszenzoros jelének átlaga és szórása (2-3 párhuzamos mérésből) fibronektinnel bevont felületen különböző PHSRN koncentrációknál

A dózis-maximális hullámhossz eltolódás grafikonján (12. ábra) látható, hogy az adhézió a kis koncentrációk esetében csökken az  $1000 \mu\text{g/ml}$ -es PHSRN koncentrációig, majd ezt követően növekszik a magasabb PHSRN koncentrációknál.



## 6. Összegzés

Munkám során jelölésmentes optikai bioszenzor felhasználásával megvizsgáltam, hogy a PHSRN oldatban is szinergikus hatást vált-e ki az RGD-vel, mint amikor mindkét molekula a felületre van kikötve.

A méréseim során kétféle felülettel dolgoztam; fibronektinnel és RGD-vel bevonttal. A fibronektines felületet a gyártótól vásároltuk kész állapotban, ezzel szemben az RGD-s felületet a mérés előtt készítettem el.

Az RGD-vel kezelt felület esetében egyértelmű trendet tapasztaltam a maximális hullámhossz eltolódásban, a dózis függvényében. A 700 µg/ml-es PHSRN koncentrációig adhézió növekedést, ennél magasabb koncentráció esetében adhézió csökkenést tapasztaltam.

A fibronektinnel kezelt felület esetében az adhézió a kis koncentrációk esetében csökken az 1000 µg/ml-es PHSRN koncentrációig.

Ezek a mérések arra engednek következtetni, hogy a PHSRN és az RGD peptideknek ugyanaz a kötőhelye és kompetíció lép fel közöttük ha mindkettő jelen van.

A nem teljesen egybehangzó eredmények miatt, további mérések szükségesek, a PHSRN hatásmechanizmusának pontos megértésének érdekében.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Kovács Kinga Dórának a kutatásom során nyújtott rengeteg szakmai segítségért, támogatásért és tanácsért. Köszönöm, hogy nagy türelemmel segítettél bele tanulni a laboratóriumban folyó munkába, hogy bármikor fordulhattam hozzád, amennyiben kérdésem volt.

Szeretném megköszönni konzulenseim kiemelkedő segítségét Dr. Bonyár Attilának, illetve Dr. Horváth Róbertnek, a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított, hogy a kísérleteimet ilyen magas színvonalú közegben, kiváló szakemberek között végezhessem.

Szeretnék köszönetet mondani a Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport minden tagjának, akikhez bármikor fordulhattam kérdéseimmel, illetve Dr. Bősze Szilviának és munkacsoportjának a peptidek előállításáért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családom és barátaim lelkes támogatását és segítségét.



## 8. Irodalomjegyzék

- [1] F. C. Schenk, H. Boehm, J. P. Spatz, and S. V. Wegner, “Dual-functionalized nanostructured biointerfaces by click chemistry,” *Langmuir*, 2014, doi: 10.1021/la500766t.
- [2] M. Ebara, M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai, and T. Okano, “A novel approach to observing synergy effects of PHSRN on integrin-RGD binding using intelligent surfaces,” *Adv. Mater.*, 2008, doi: 10.1002/adma.200702308.
- [3] N. Orgovan, B. Peter, S. Bosze, J. J. Ramsden, B. Szabó, and R. Horvath, “Dependence of cancer cell adhesion kinetics on integrin ligand surface density measured by a high-throughput label-free resonant waveguide grating biosensor,” *Sci. Rep.*, 2014, doi: 10.1038/srep04034.
- [4] S. Malagobadan and N. H. Nagoor, “Anoikis,” in *Encyclopedia of Cancer*, 2018.
- [5] F. Li, S. D. Redick, H. P. Erickson, and V. T. Moy, “Force measurements of the  $\alpha 5 \beta 1$  integrin-fibronectin interaction,” *Biophys. J.*, 2003, doi: 10.1016/S0006-3495(03)74940-6.
- [6] H. J. Mardon and K. E. Grant, “The role of the ninth and tenth type III domains of human fibronectin in cell adhesion,” *FEBS Lett.*, 1994, doi: 10.1016/0014-5793(94)80137-1.
- [7] T. Gerecsei *et al.*, “Adhesion force measurements on functionalized microbeads: An in-depth comparison of computer controlled micropipette and fluidic force microscopy,” *J. Colloid Interface Sci.*, 2019, doi: 10.1016/j.jcis.2019.07.102.
- [8] G. Harsányi, “Sensor Technologies,” in *Sensors in Biomedical Applications*, 2000.
- [9] J. S. Daniels and N. Pourmand, “Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges,” *Electroanalysis*. 2007, doi: 10.1002/elan.200603855.
- [10] M. Sztilkovics *et al.*, “Single-cell adhesion force kinetics of cell populations from combined label-free optical biosensor and robotic fluidic force microscopy,” *Sci. Rep.*, 2020, doi: 10.1038/s41598-019-56898-7.
- [11] J. J. Ramsden and R. Horvath, “Optical biosensors for cell adhesion,” *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2009, doi: 10.1080/10799890903064119.
- [12] Y. Fang, A. M. Ferrie, N. H. Fontaine, J. Mauro, and J. Balakrishnan, “Resonant waveguide grating biosensor for living cell sensing,” *Biophys. J.*, 2006, doi: 10.1529/biophysj.105.077818.
- [13] N. Orgovan, B. Peter, S. Bosze, J. J. Ramsden, B. Szabó, and R. Horvath, “Label-free profiling of cell adhesion: Determination of the dissociation constant for native cell membrane adhesion receptor-ligand interaction,” in *Label-Free Biosensor Methods in Drug Discovery*, 2015.
- [14] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, and J. W. Smith, “Ligand binding to integrins,” *Journal of Biological Chemistry*. 2000, doi: 10.1074/jbc.R000003200.
- [15] Y. Feng and M. Mrksich, “The synergy peptide PHSRN and the adhesion peptide RGD mediate cell adhesion through a common mechanism,” *Biochemistry*, 2004, doi: 10.1021/bi049174+.
  
- [k1] Röhlich, P. (2006). *Szövektan*. Semmelweis kiadó

## 9. Internetes hivatkozások

- [i1] <https://ecatalog.corning.com/life-sciences/b2c/US/en/Microplates/Assay-Microplates/Label-Free-Microplates/Corning%C2%AE-Epic%C2%AE-384-well-Microplates/p/5040>
- [i2] <https://www.nature.com/subjects/cell-adhesion>
- [i3] <https://sites.google.com/site/chsanatomyphysiology27/home/cellular-adhesion-molecules-cam>
- [i4] <https://www.corning.com/media/worldwide/cls/documents/CLS-ES-038%20REV4%20DL.pdf>