Pannon Egyetem

Műszaki Informatikai Kar

Molekuláris- és Nanotechnológiák Doktori Iskola



Egyedi sejtek automatizált válogatása és manipulációja

számítógépes látás alapján

DOI:10.18136/PE.2016.619

Doktori (PhD) értekezés

Készítette:

Ungai-Salánki Rita Zsanett

Témavezetők:

Dr. Szabó Bálint

Dr. Horváth Róbert

Budapest, 2016

Egyedi sejtek automatizált válogatása és manipulációja számítógépes látás alapján

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Írta:

Ungai-Salánki Rita Zsanett

Készült a Pannon Egyetem – Molekuláris- és Nanotechnológiák Doktori Iskolájában

Témavezetők: Dr. Szabó Bálint és Dr. Horváth Róbert

Az értekezést témavezetőként elfogadásra javaslom:

Dr. Szabó Bálint:	igen / nem	(aláírás)	
Dr. Horváth Róbert	igen/nem	(aláírás)	
A jelölt a doktori szigorlaton	. %-ot ért el.		
Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:			
Bíráló neve:	igen / nem	(aláírás)	
Bíráló neve:	igen / nem	(aláírás)	
A jelölt az értekezés nyilvános vitájá	in %-ot ért el.		
		Bíráló Bizottság elnöke	
A doktori (PhD) oklevél minősítése		 EDT elnöke	
X 7 /			

Veszprém,....

Tartalomjegyzék

PhD értekezés kivonata6
Egyedi sejtek automatizált válogatása és manipulációja számítógépes látás alapján 6
Automated sorting and manipulation of single cells controlled by computer vision8
Automatische Sortierung und Manipulation der individuellen Zellen kontrolliert mit Computer Vision
Előszó10
1. Bevezetés: A számítógép-vezérelt mikropipetta jelentősége, alkalmazási területei 11
2. Irodalmi áttekintés
2.1. Egyedi sejtek molekuláris vizsgálata
2.2. Egyedi sejtek izolálása14
2.2. Egyedi sejtek adhéziós erejének mérése
3. Célkitűzés
4. Anyagok és módszerek
4.1. Egyedi adherens sejtek automatizált válogatása és kis térfogatban történő lerakása
4.2. Egyedi sejtek izolálása szuszpenzióból
4.3. Egyedi sejtek izolálása mikrostruktúrából41
4.4. Egyedi sejtek adhéziós erejének mérése43
4.4.1. Immunsejtek adhéziós erejének vizsgálata sejtadhéziós molekulákkal bevont felületeken
4.4.2. CD11b/CD18 és CD11c/CD18 integrinek vizsgálata immunsejteken 49
4.4.3. Sejt-sejt adhéziós erő vizsgálata mikropipettával
5. Eredmények
5.1. Egyedi adherens sejtek automatizált válogatása és kis térfogatban történő lerakása
5.2. Egyedi sejtek izolálása szuszpenzióból58

5.3. Egyedi sejtek izolálása mikrostruktúrából	67
5.4. Egyedi sejtek adhéziós erejének mérése	71
5.4.1. Immunsejtek adhéziós erejének vizsgálata sejtadhéziós molekulákk	al bevont
5 4 2 CD11b/CD18 és CD11c/CD18 integrinek vizsgálata immunseiteken	
5.4.3. Sejt-sejt adhézió vizsgálata mikropipettával	
6. Összefoglalás	
7. Új tudományos eredmények	94
7.1. Tézispontok	94
7.2. Thesis points	96
8. Köszönetnyilvánítás	
9. Saját publikációk jegyzéke	99
9.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk	99
9.2. A disszertációhoz közvetlenül nem kapcsolódó publikációk	99
9.3. Konferencia szereplések, előadások	100
10. Irodalomjegyzék	103

PhD értekezés kivonata

Egyedi sejtek automatizált válogatása és manipulációja számítógépes látás alapján

Az egyedi sejtek válogatása és manipulálása komoly kihívást jelent az ép sejteket igényelő vizsgálatokban. A számítógép-vezérelt mikropipetta lehetővé teszi, hogy a Petri csészében lévő sejteket egyenként tudjuk manipulálni és válogatni.

A szerző felületre kitapadt neuroektodermális egér progenitor és humán vérből izolált monocita sejteket használva 15-20 mp/sejt válogatási sebességgel 0,4–0,7 µl térfogatú cseppekben egyedi sejteket tudott automatikusan izolálni. A mikroliter alatti térfogat elérése a további vizsgálatok szempontjából fontos paraméter volt.

Az adherens sejtek felvétele során az erősen felülethez tapadó sejtek megsérülhetnek, illetve a mikropipetta által keltett hidrodinamikai felhajtóerő sokszor nem elegendő a sejtek felületről történő felvételére. A nem adherens sejttípusok felületen történő rögzítése pedig nem kívánt módon perturbálja a sejteket, megváltoztatva azok génexpressziós mintázatát is. Mivel az eddig alkalmazott robotok csak a felülethez rögzített sejteket tudták használni, ezért kifejlesztettünk egy új eljárást, mely képes automatikusan izolálni egyedi sejteket szuszpenzióból, anélkül, hogy a sejteket a felülethez rögzítenénk. 75%-os válogatási hatékonyságot sikerült elérni egyedi sejtek vékony rétegbe szorított szuszpenzióból történő izolálása során egér fibroblaszt és monocita sejteket alkalmazva. Mikro-kutakban csapdázott egyedi sejtek válogatásának ~50%-os hatékonyságával összehasonlítva megállapítható, hogy a sejtek kinyerési aránya jelentősen javult a szuszpenzióból történő válogatáskor. A mikro-kutakban történő rögzítéskor a sejtek jelentős része elvész a mosási lépések során, azonban az új módszerrel az elvesző sejtek számát sikerült nullára leszorítani.

A sejtadhézió alapvető jelenség a többsejtű élőlények számára. Azonban az egyedi sejtek adhéziós erejének közvetlen meghatározására alkalmas technikák alacsony áteresztőképességűek: kísérletenként kisszámú sejt tanulmányozható. A számítógépvezérelt mikropipetta lehetőséget kínált egyedi humán fehérvérsejtek és specifikus makromolekulák kölcsönhatásának tanulmányozására. A módszert alkalmazva több száz sejt egyenként történő vizsgálata vált lehetővé rövid idő (~30 perc) alatt. Az

eredmények mikrofluidikai áramlási csatornában történt mérésekkel is megerősítésre kerültek.

A disszertáció tanulmányozza a CD11b/CD18 és CD11c/CD18 integrinek monociták, makrofágok és dendritikus sejtek kitapadásához való hozzájárulását. Az eredmények azt mutatják, hogy a CD11b/CD18 receptor blokkolása (meglepő módon) növeli a sejtek adhéziós erejét. A hipotézis az, hogy a kétféle receptor verseng a mindkettőjük által köthető ligandumokért.

Az automatizált mikropipetta lehetőséget nyújtott a sejt-sejt kapcsolatok adhéziós erejének vizsgálatára is. Különbséget tudott tenni három különböző kezelésnek kitett, endotél sejtrétegre kitapadt egyedi neutrofil sejtek adhéziós erejében.

Automated sorting and manipulation of single cells controlled by computer vision

Automated manipulation and sorting of single cells is challenging. The computer-controlled micropipette allows the automated manipulation and sorting of single cells. It could be gently deposited single cells inside tiny drops (0.4–0.7 μ l) with a sorting speed of 15-20 seconds/cell. Both the volume of the drop and the speed of isolation are crucial technical parameters.

Since current robots can manipulate only surface-attached cells, it has been developed a new method that can automatically detect and isolate individual cells from a thin (~100 μ m) layer of suspension covered by oil without immobilizing cells on the surface. It was compared the efficiency of this new method to that of single cell entrapment in microwells and subsequent sorting with micropipette. It can be concluded that the recovery rate of single cells was greatly improved when sorting from a thin layer of cell suspension.

Cell adhesion is a fundamental phenomenon vital for all multicellular organisms. The adhesion force of human leukocytes was investigated on specific macromolecule coatings. Using our methodology, hundreds of cells were measured one by one in a short period of time (~30 min). Our results were reinforced in standard microfluidic shear stress channels.

It was studied the contribution of the CD11b/CD18 and CD11c/CD18 integrins to the adhesion of monocytes, macrophages and dendritic cells. The hypothesis is that: the similar integrin receptors compete for ligand binding resulting in competitive inhibition, when the number of available ligands is limited.

The automated micropipette was also applied to investigate the strength of cell-cell adhesion. The technique was sensitive enough to make difference between the impacts of medically relevant drugs.

Automatische Sortierung und Manipulation der individuellen Zellen kontrolliert mit Computer Vision

Automatische Sortierung und Manipulation der individuellen Zellen ist eine große Herausforderung. Die computergesteuerte Mikropipette ermöglicht die Manipulation und Sortierung der individuellen Zellen. Wir können individuelle Zellen in kleinen Tropfen (0,4 – 0,7 μ l) mit 15-20 Sekunde/Zell Sortiergeschwindigkeit automatisch isolieren. Das Volumen des Tropfens und die Geschwindigkeit der Isolation sind wichtige technische Parameter.

Wir haben eine neue Methode entwickelt, die die einzelnen Zellen aus Suspension automatisch detektiert und isoliert, ohne die Zellen auf der Oberfläche zu befestigen. Die neue Methode war auf folgende Weise getestet: wir haben die Isolation der einzelnen Zellen aus Suspension mit der Isolation der Zellen aus Mikrostruktur verglichen. Es wurde festgestellt, dass sich die Wirksamkeit der Auswahl der einzelnen Zellen verbessert hat, wenn diese Auswahl in der Zellsuspension vorgefallen ist.

Zelladhäsion ist ein fundamentales Phänomen für die multizellulären Organismen. Die Adhäsionskraft der menschlichen Leukozyten war auf der Beschichtigung der spezifischen Makromoleküle gemessen. Unsere Methode ermöglicht, Hunderte von Zellen einzelweise binnen 30 Minuten zu messen. Wir haben unsere Ergebnisse mit Messungen in mikrofluidischen Scherspannung-Kanälen bestätigt.

Wir haben den Beitritt der CD11b/CD18 und CD11c/CD18 Integrine zu Adhäsion von Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen studiert. Laut unserer Hypothese konkurrieren die ähnlichen Integrinrezeptoren für Ligandbindung durch kompetitive Hemmung.

Die automatisierte Mikropipette hatte das Potenzial, um die Stärke der Adhäsionskraft zwischen den Zellen zu untersuchen. Die Methode ist empfindlich genug, um zwischen den Wirkungen von drei medizinisch wichtigen Medikamenten zu unterscheiden.

Előszó

PhD tanulmányaimat a Pannon Egyetem Molekuláris- és Nanotechnológiák Doktori Iskolájában, kutatásaimat Dr. Szabó Bálint és Dr. Horváth Róbert témavezetése mellett az ELTE Biológiai Fizika Tanszékén és a Magyar Tudományos Akadémia Energiatudományi Kutatóközpont Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézetének Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoportjában végeztem. Kutatómunkám során részt vettem az ELTE Biológiai Fizika Tanszékén kifejlesztett számítógép-vezérelt mikropipetta fejlesztésében, sikeresen alkalmaztam a PhD munkám során tökéletesített műszert a modern biológiai kutatásokban; egyedi sejtek izolálására, felületi adhéziós erők meghatározására. PhD disszertációmban a fenti munkából származó eredményeket kívánom bemutatni.

Doktori éveim alatt részt vettem egyéb, elsősorban a jelölésmentes optikai bioszenzorika területét érintő kutatásokban és együttműködésekben is, de ezen eredményeimet terjedelmi okokból nem tudom itt bemutatni.

1. Bevezetés: A számítógép-vezérelt mikropipetta jelentősége, alkalmazási területei

Az egyedi sejtek az élet alapegységei, melyek önmagukban is hihetetlenül komplex rendszert képeznek, így megismerésük biológiai, orvosi és biofizikai szempontból egyaránt rendkívül fontos. Tanulmányozásuk nemcsak a betegségekre való hajlam megértésében és a megfelelő kezelés kiválasztásában segít, hanem lehetővé teszi a hasonló sejtek közötti heterogenitás és a szövetek felépítésének, működésének mélyebb megértését is¹.

Mostanra a DNS és RNS vizsgálatok java részét már elvégezték nagyobb sejtpopulációkon, azonban a sejtek dinamikájának, heterogenitásának megértése további vizsgálatokat igényel az egyedi sejtek szintjén. Az elmúlt években a kutatók figyelme egyre inkább az egyedi sejtek DNS-ének és RNS-ének elemzése felé irányult². Hiszen számos tanulmány bebizonyította már, hogy az egyedi sejtek genetikai és transzkripciós szempontból is nagyon variábilisak lehetnek, még a látszólag homogén populációk esetén is^{3,4,5}. Ahhoz, hogy egy embrió fejlődését vagy a tumor kialakulását mélyebb szinten is megérthessük, szükséges a genetikai és transzkripciós információ minél részletesebb kinyerése az egyedi sejtekből⁶. Az őssejt-populációkra szintén jellemző a heterogenitás, mely lényeges funkcionális következményekkel jár⁷.

Az egyedi sejteken végzett vizsgálatok elvégzésének egyik legfőbb technikai nehézsége a sejtek megfelelő izolálása és manipulálása DNS, RNS szekvenáláshoz, fehérjeszintű vizsgálatokhoz vagy egyéb molekuláris analízishez. Manapság a DNS, RNS szekvenálási eljárások nagyrészt automatizálhatók. Ezzel szemben az egyedi sejtek izolálására alkalmas technikák nagyon alacsony áteresztőképességűek. A CellSorter Kft. által kifejlesztett és az ELTE Biológiai Fizika Tanszékén üzembe helyezett számítógépvezérelt mikropipetta^{8,9,10} azonban lehetővé teszi, hogy az előzetesen szoftverrel vagy manuálisan detektált, Petri csészében lévő sejteket egyenként tudjuk manipulálni és válogatni.

A sejtadhézió alapvető jelenség a többsejtű élőlények számára. Mivel a legtöbb emlős sejt képes a kitapadásra és a kitapadás folyamata, fenntartása létfontosságú, az adhéziós erősség vizsgálata biofizikai és orvosi szempontból egyaránt indokolt. Többek közt a fejlődésbiológiában, daganatok növekedésében, áttétek képződésekor és az immunológiában központi jelentőségű a sejtadhézió. Azonban az egyedi sejtek adhéziós erejének közvetlen meghatározására alkalmas technikák alacsony áteresztőképességűek: kísérletenként kisszámú sejt mérhető le velük.

A számítógép-vezérelt mikropipettával egyedi humán fehérvérsejtek és specifikus makromolekulák^{11,12},valamint sejt-sejt közötti kapcsolat kölcsönhatását is tanulmányoztuk¹³. A módszert alkalmazva több száz sejt egyenként történő vizsgálata vált lehetővé rövid idő (~30 perc) alatt. A 30 perces mérési időtartam azért volt fontos, mert a mérések szobahőmérsékleten történtek, ugyanakkor a sejtek fenntartásához szükséges optimális környezet a 37°C és 5% CO₂. A sejtek ezt a 30 perces mérési időtartamot szobahőmérsékleten, a pH széndioxiddal történő pufferelése nélkül még túlélik, maradandó károsodást általában nem szenvednek el. Ennél hosszabb idő alatt azonban a sejtek életképessége jelentősen csökkenne, a sejtek károsodnának.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Egyedi sejtek molekuláris vizsgálata

Egyedi sejtek DNS, RNS elemzése

A teljes genom felerősítése az új generációs szekvenáló technikákkal együtt lehetőséget biztosít az egyedi sejtmagon belül a genomi kópiaszám meghatározására¹⁴. Az egyedi sejtek kópiaszám profilozása szekvenálási eljárást vagy microarray-t használva betekintést ad többek közt a tumorok természetébe. Ismert, hogy a DNS, RNS heterogenitás jelentős a rákos szövetekben. Ahhoz, hogy korai állapotban a tumor sejteket detektálni tudjuk, a keringő tumor sejteket (circulating tumor cells, CTCs) monitorozva, illetve a szétterjedt tumor sejteket (disseminated tumor cells, DTCs) elemezve, szükség van az egyedi sejtek izolálására¹⁵. Ezt követően az egyedi sejteken elvégzett szekvenálás segítséget nyújthat a rák kifejlődésének pontosabb/mélyebb megértésében. Az egyedi sejtek jelátviteli hálózati térképe biomarkereket nyújthat a rák diagnózishoz¹⁶. Integrált mikrofluidikai eszközök haplotipizálási megközelítéssel képesek felerősíteni és genotipizálni az egyedi kromoszómákat, melyeket egyedi sejtből izoláltak¹⁷.

Az egyedi sejtes, ún. "transzkriptom" technikák³ széles körben alkalmazhatóak génexpressziós elemzésekhez, illetve használhatóak a génszabályozó hálózatok azonosításához teljes genomi szinten. Emellett az embriógenezisben és a szöveteink közti különbségek feltárásában is központi jelentőségű az egyedi sejtek transzkripciós mintázata. Az embriógenezis során az őssejtek specifikus sejttípusokká differenciálódnak, hogy felépítsék a teljes élőlényt. Az egyedi sejtek "transzkriptom" elemzése segít felderíteni ezt a folyamatot, valamint a szövetek regenerációját is. A reverz transzkripciós kvantitatív valós idejű PCR-t (reverse-transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR)^{6,18} sikeresen alkalmazták egyedi sejtek mRNS¹⁹ és mikroRNS (miRNS) vizsgálatára.

Az immunsejtek egymástól különböző alpopulációkból állnak. Az egyedi sejteken végzett "transzkriptomika" segítségével az immunsejtek különböző populációi detektálhatóak²⁰.

13

Az új generációs DNS szekvenálási módszerek²¹ képesek akár egyedi sejtből meghatározni a DNS vagy RNS szekvenciáját. Ezek a módszerek gyorsak, pontosak és viszonylag költséghatékonyak. A legújabb technológiák annyira érzékenyek, hogy ma már az egyedi sejtek ún. mély-szekvenálása is lehetővé vált és rohamosan terjed. Ezek a módszerek továbbra is drága reagenseket igényelnek, így nemcsak az ép, egyedi sejtek izolálása a követelmény, hanem az is, hogy ezeket a sejteket minél kisebb térfogatban nyerjük ki.

Egyedi sejtek fehérjéinek és anyagcsere termékeinek elemzése

Míg a különböző szekvenáló technikák, melyek biztosítják az egyedi sejtek DNS-ének és RNS-ének elemzését, számos labor számára rendelkezésre állnak, a kis mennyiségben izolált fehérjék analízise sokkal nehezebb feladat. Vannak azonban ígéretes technikák erre vonatkozóan is, mint pl. a multiparaméteres áramlási citometria és a mikrofluidika²². Az egyedi sejtekben a metabolitok nem invazív kimutatására az NMR (magmágneses rezonancia) és a Raman spektroszkópia alkalmazhatóak¹. A tömegspektroszkópia más invazív technikákkal együtt alkalmazva szintén képes az egyedi sejtek molekuláris összetételéről információt adni²³.

2.2. Egyedi sejtek izolálása

Egyedi sejtek izolálására alkalmazható technikák

Az utóbbi évek eredményei azt mutatják, hogy az egyedi sejtek vizsgálata rendkívüli mértékben fejlődik, nagy szükség van új technikák bevezetésére, melyek további lendületet adhatnak ennek az új tudományágnak. A Nature Methods, a legrangosabb metodikai folyóirat a 2013-as év módszerének választotta az egyedi sejtek szekvenálását. A szakterületen megjelenő publikációk számának rendkívüli növekedése arra utal, hogy egy új tudományág születésének vagyunk tanúi, melyben rejlő biológiai és orvosi lehetőségek még jó részt kihasználatlanok.

Léteznek olyan protokollok, melyek enzimatikus kezelést (proteázt vagy DNázt) használnak az agyból, izomból, májból történő sejt izolálására. Az enzimatikus emésztés több ezer milliónyi sejtet képes előkészíteni a nagy áteresztőképességű sejtválogató technikák, így pl. az áramlási citometria²⁴ számára. Az egyedi sejteket izolálhatják mikroaspirációs technikával, mikromanipulációval, lézer katapult mikrodisszekcióval²⁵ vagy áramlási citometriával^{3,26,27}. Ugyanakkor az egyedi sejtek preparálásakor^{28,29} követhetjük a klasszikus, Otto Friedrich Karl Deiters által leírt protokollt, mely egy hegyes tűt alkalmaz a sejtek izolálására a szövet enzimatikus előkezelése nélkül²². Napjainkban továbbra is az a jellemző, hogy a kutatók manuálisan, szájpipettával izolálják az egyedi sejteket. Ez kézenfekvő lehetőség^{30,31}, ám az eljárás időigényes és nagy szakértelmet, ügyességet igényel³².

A *lézer mikrodisszekció* (LMD)³³ vagy a *fluoreszcencia aktivált sejtválogató berendezés* (FACS) lehetőséget nyújtanak a sejtek egy alpopulációjának kiválogatására. Ezek a technikák sejtfelszíni markereken vagy más fluoreszcens jelölőkön alapulnak²⁴. A lézer mikrodisszekció alkalmazása lehetővé teszi a szöveti minták néhány sejttől pár ezer sejtig terjedő részleteinek elemzését biológiailag homogén sejtcsoportok gyűjtésével. Tehát az LMD segítségével izolálhatjuk a kiválasztott sejteket akár szövetszeletből is, ami alkalmassá teszi a módszert a klinikai alkalmazásokra. Mindazonáltal, nagy áteresztőképességű megoldás egyedi sejtek izolálására lézer alapú manipulációval ez idáig nem valósult meg.

Az áramlási citometrián alapuló FACS-ot több évtizede használják és mára az egyenként történő sejtválogatás egyik alapvető technikájává vált^{34,35} (1. ábra). A modern FACS műszerek 10000 sejt/mp-es vagy akár ennél is nagyobb válogatási rátára képesek. Ha azonban kisszámú vagy akár egyedi sejtek külön-külön térfogatba történő izolálását célozzuk meg, az ezzel a technikával nem hatékony.



1. ábra: A FACS működési elve³⁶

Integrált mikrofluidikai rendszerek egyedi sejtek elemzéséhez

Az újfajta mikrofluidikai sejtválogató berendezések^{37,38} lehetővé teszik a sejtek gyűjtését, lízisét, elválasztását, detektálását akár egyetlen eszközön¹⁵. Számos új fejlesztés jelent meg az elmúlt évtizedekben beleértve a miniatűr FACS-ok "lab-on-a-chip" (laboratórium egy csipen) verzióit,^{35,39,40} az ún. μFACS-okat, melyek bizonyos szempontból új távlatokat nyitnak, azonban ezek sem effektívek egyedi sejtek külön-külön térfogatba történő izolálásakor.

Léteznek mikrofluidikai *RT-qPCR* eszközök, melyek lehetővé teszik a sejt csapdázását, lízisét, cDNS szintézist, és a qPCR elemzést akár 300 sejt/munkaciklus áteresztőképességgel⁴¹. A *Fluidgm* nevű cég egy integrált mikrofluidikai eszközt kínál az egyedi sejtek 96-lyukú "plate"-en történő izolálására, és a sejtek ezt követő vizsgálatára⁴². Ez jelenleg a legelterjedtebb mikrofluidikai megoldás⁴³ egyedi sejtek csapdázására és izolálására viszonylagosan nagy áteresztőképessége miatt. Azonban a nagyfokú integráció hátulütője, hogy a felhasználó mozgástere rendkívül szűk. Nincs lehetőség a beavatkozásra, egyedi optimalizálásra, ha az adott kísérlet ezt egyébként igényelné. A gyárilag optimalizált mikrofluidika rendkívül érzékeny a sejt méretére és keménységére, ami példának okáért növényi sejtek válogatását kizárja. A sejtek fluoreszcens mikroszkópos képe alapján történő sejtválogatás és az ezt követő DNS/RNS szekvenálás sokkal több információt adhat az egyedi sejtek molekuláris fenotípusáról és genotípusáról.

Digitális kamerával felszerelt fluoreszcens mikroszkóp a megfelelő képalkotó szoftver segítségével különösebb nehézségek nélkül képes automatikusan detektálni a sejttenyésztő edényben lévő élő sejteket⁴⁴. A sejttenyésztek Petri csészében vagy sejttenyésztő lemezen ("plate"-en) történő manipulációja azonban sokkal nagyobb technikai kihívás, különösen, ha egyedi sejtekre van szükség. A sejtek úgy is rögzíthetők egy felületen, ha apró, a sejteknél kisebb elszívó lyukakon keresztül folyamatosan szívjuk el a folyadékot, melyekhez odatapadnak a sejtek. Az így immobilizált sejtek mikroszkópos képalkotást követően izolálhatók mikropipettával⁴⁵. Az ilyen típusú, ún. "microcavity array", azaz átmenő mikro-csatornákból álló rácsok egy továbbfejlesztett változata⁴⁶, amikor egy lyukasztó tűvel nyomják át az egyedi sejteket egy vékony membránon keresztül az izolálásuk érdekében. Azonban az (optikai tengellyel párhuzamos) átmenő mikro-csatornák zavarják a képalkotást, mely a technika egyik hátulütője, ha a vizsgálat a teljes sejtről nagyfelbontású képet igényel. Ezen felül a speciális mikrostruktúrák gyártása fejlett mikromegmunkálási technológiát igényel, mely jelentősen akadályozhatja a széles körű alkalmazását.

Egyedi sejtek csapdázása

A sejtek nano- vagy akár pikoliteres térfogatú emulziós cseppekbe zárása^{47,48,49} rendkívül ígéretes megoldást kínál az egyedi sejtek mikrofluidikai manipulációjára, válogatására. A víz az olajban típusú emulziót megfelelő felületaktív anyaggal stabilizálják, így az egyedi sejteket tartalmazó vízcseppek nem olvadnak össze és nem tapadnak ki az edény falára. Ennek ellenére azonban ez a technológia még nem terjedt el, valószínűleg a mikrofluidikai chipek üzemelése kapcsán felmerülő technikai nehézségek miatt.

Mikro-kutakban csapdázott sejtek kinyerésére bevethető az optikai manipulációk azon fajtája, amikor infravörös lézerrel emelik fel a sejteket a fény sejteken történő szóródását kihasználva⁵⁰. A sejtméretű specifikus mikro-kutakat gyakran használják az egyedi sejtek csapdázására, azonban a sejtek hajlamosak arra, hogy túl erősen tapadjanak a felülethez, így a válogatás során megsérülhetnek vagy az alkalmazott emelő erő nagysága nem elegendő a sejtek felületről történő felvételére.

Egyedi sejtek izolálása mikropipettával

A *CellCelector*⁵¹ és az *MMI CellEctor Plus* (Molecular Machines & Industries) képesek kiválasztani és összegyűjteni a sejteket egy mikroszkópra helyezett sejttenyésztő edényből, mikropipetta használatával. A CellCelector esetében a mikropipetta a korábban detektált sejttelepek felett helyezkedik el egy robot karban és ennek alkalmazásával veszi fel a kolóniát, vagy a kolónia egy hányadát. Majd a robot kar mozgatásával a mikropipetta a felvett sejteket egy másik sejttenyésztő edénybe helyezi. A robot kar alkalmazása azonban lassú válogatási folyamatot eredményez. Az eszköz képes sejtcsoportok izolálására, azonban az elfogadható sebességű és hatékonyságú egyedi sejtválogatás nehézkes ezen berendezésekkel.

A mikropipettával történő sejtválogatást alkalmazva, a CellSorter Kft. által kifejlesztett és az ELTE Biológiai Fizika Tanszékén beüzemelt *számítógép-vezérelt mikropipetta*^{8,9} képes a Petri csészében immobilizált fluoreszcens és jelöletlen sejteket is automatikusan detektálni fluoreszcens mikroszkóp és számítógépes látás ("computer vision") segítségével. A módszer rutinszerűen és nagy szelektivitással alkalmazható FACS-ként egészen az egyedi sejtek szintjéig. A válogatás felbontása az a legkisebb távolság két sejt középpontja között, amely esetén még az egyik sejt izolálható a másik elmozdítása nélkül. Ennek értéke esetünkben 50 - 70 µm volt. Az eljárás kézenfekvő, egyszerű volta, a mikropipetta nagypontosságú 3D-s pozicionálása, valamint a viszonylag magas válogatási frekvenciája alkalmassá teszi az egyedi sejtek automatizált manipulációjára.

A sejt felvételére szolgáló mikropipettát egy vertikálisan motorizált, horizontálisan manuális mikromanipulátorhoz rögzített, forgatható kar tartja. A rendszer képes egyedi sejtek felvételére egy 35 mm-es Petri csészéből, valamint a sejtek felvételét követően az egyedi sejtet tartalmazó parányi, µl-nél is kisebb térfogatú cseppek üveg fedőlemezre, vagy PCR csövekbe történő helyezésére 15 - 20 mp/sejt válogatási sebességgel. A sejtek adhéziós erejét a manipulációk sikere érdekében hangolni kell, így nincs szükség a sejteket csapdázó mikrostruktúrák alkalmazására sem.

Mások is fejlesztettek hasonló robotot egyedi sejtek automatizált tenyésztésére⁵². Ez az integrált eszköz mikro-kutakból álló rácsot, "microwell array"-t alkalmaz, hogy a sejteket a felületen immobilizálja a válogatás során.

A jelenleg forgalomban lévő robotok az egyedi sejtek manipulációjára csak a felületen valamiképpen rögzített sejteket képesek detektálni és izolálni^{8,45,47,51,52,53}, korlátozva ezzel az ilyen robotok felhasználási területeit és elterjedését. Bár a természetesen kitapadó, ún. adherens sejtek spontán módon hozzátapadnak a csupasz műanyag vagy üveg felületre, a felület módosítása vagy biokémiai előkezelés (tripszin) és megfelelő, pontosan beállított adhéziós erő alkalmazása szükséges ezen sejtek sérülésmentes felvételéhez^{8,9}. Ellenkező esetben, a túl erősen felülethez tapadó sejteket csak a sejt károsításával tudnánk izolálni.

Kezdetben a számítógép-vezérelt mikropipetta is csak felületen rögzített sejteket tudott kezelni. A technikánk tovább fejlesztett változata azonban képes egyedi sejteket izolálni még nagyon sűrű sejtkultúrából is anélkül, hogy a sejteket a felületen rögzítenünk kellene. A mikropipetta hegyét az adott sejttípus méretének megfelelően megválasztva és a kísérleti paramétereket optimalizálva ez az új eljárás alkalmazható gyakorlatilag bármilyen szöveti sejt esetén a sejt keménységére vagy adhéziójára való érzékenység nélkül.

2.2. Egyedi sejtek adhéziós erejének mérése

A sejt-sejt és a sejt-extracelluláris mátrix kapcsolatok szerepe és jelentősége

A sejtadhézió a biológia egyik alapvető jelensége, amely létfontosságú az egyés többsejtű élőlények számára is⁵⁴. A többsejtű szervezetekre jellemző a sejtek adott funkcióra specializált szövetekbe rendeződése. Ehhez a folyamathoz viszont elengedhetetlen a sejtek egymáshoz és/vagy az extracelluláris mátrix (ECM) elemeihez történő kapcsolódása. A szöveti struktúra fenntartása mellett ezek a dinamikusan változó kölcsönhatások nélkülözhetetlenek a sejtek közötti kommunikációban, a sejtmigrációban, a differenciálódásban, az embriófejlődés során, a gyulladásos folyamatokban⁵⁵ és a tumor metasztázisban^{56,57,58}. Ismert, hogy a sejtadhéziót sejtfelszíni receptor makromolekulák: integrinek, kadherinek, szelektinek és az immunglobulin (Ig) szupercsalád tagjai közvetítik⁵⁴. A sejtadhéziós fehérjék specifikusan kötődnek az ECM molekuláihoz, a kollagénhez, elasztinhoz, glükozaminoglikánokhoz, proteoglikánokhoz, multiadhéziós fehérjékhez (például fibronektin, laminin) vagy a szomszédos sejtek receptor molekuláihoz.

A közvetlen sejt-sejt adhézióban játszanak szerepet a kadherinek, szelektinek és az Ig szupercsalád (N-CAM, I-CAM) tagjai. Míg a kadherinek és a szelektinek által közvetített sejt-sejt kölcsönhatások a Ca²⁺ ionok jelenlététől függenek, addig az Igcsaládba tartozó fehérjék Ca²⁺ nélkül is kialakíthatnak kötéseket⁵⁹. A kadherinek homofíl adhéziós molekulák, négy extracelluláris doménjük Ca²⁺ iont köt; a membrántól legtávolabb elhelyezkedő doménje vesz részt a sejt-sejt adhézióban. A szelektinek a molekula végén elhelyezkedő lektin doménjük által heterofíl kölcsönhatásban vesznek részt; az egyik sejt felszínén expresszálódó szelektin a másik sejt felszínén lévő fehérje glikozilált részéhez kötődik⁵⁹. Az Ig-szupercsalád fehérjéi homo- és heterofíl kölcsönhatásokban vesznek részt, fibronektin és Ig-doménekből állnak. Az egyik elsőként leírt molekulája az N-CAM (idegsejt-adhéziós molekula, nerve-cell adhesion molecule) volt, míg egy másik az I-CAM (intercelluláris adhéziós molekulák, intercellular adhesion molecules) csoport, melynek fehérjéi leginkább endotél- és fehérvérsejteken expresszálódnak.

A multiadhéziós fehérjék legnagyobb csoportját alkotó sejtfelszíni receptorok, az integrinek

Az integrinek fő funkciója a sejt-extracelluláris mátrix kapcsolat kialakítása, de egyes sejttípusok között sejt-sejt kölcsönhatást is közvetítenek. Két nem kovalensen kapcsolódó, α és β alegységből állnak (2. ábra). A sejtek a két alegység több változatát is képesek előállítani, ezért számos α/β heterodimer kombináció alakulhat ki. A különböző kombinációk más és más ligandumot köthetnek meg. A dimer összetétel változtatásával a sejt szabályozni tudja, hogy környezetének mely komponensével létesítsen kapcsolatot.



2. ábra: Az integrin molekula sematikus szerkezete⁶⁰

A ligandumot megkötött integrinek foltszerű képletekbe aggregálódnak, majd az intracelluláris kötőhelyekhez számos más fehérje kezd el asszociálódni. Így alakul ki az ún. fokális adhéziós korong, melyben többek közt a jellegzetesen jelen lévő fokális adhéziós kináz (FAK) mutatható ki.

Az ECM-hez kötődő integrinek nagy részének a kötőhelye az RGD (arginin-glicinaszpartát) tripeptidet ismeri fel⁵⁹. Ez a tripeptid nemcsak az ECM makromolekulákban (kollagén, fibronektin, laminin, vitronektin) fordul elő, de plazmafehérjékben (albumin, globulin, fibrinogén) és sejtfelszíni fehérjékben is megtalálható. Az integrinek viszonylag kis energiájú kötéseket létesítenek az ECM-hez, de igen nagy számban fordulnak elő, így végül erős kötődés alakul ki a sejt és az ECM között. Az egyedi molekuláris kötéseket könnyű felszakítani, melyet a sejt a migrációja során kihasznál cipzárra vagy tépőzárra emlékeztető mechanizmus révén.

Az integrin molekulák közül a leukocita-specifikus β_2 integrinek alapvető szerepet játszanak a sejt-sejt, sejt-mátrix kapcsolatokban. A legnagyobb mennyiségben neutrofil granulociták, monociták, makrofágok, dendritikus sejtek és az NK (natural killer, természetes ölő sejtek) sejtek expresszálják. A felsorolt sejttípusok közül kísérleteinkben monocitákat, makrofágokat és dendritikus sejteket vizsgáltunk, így a továbbiakban ezekre fókuszálok.

A monociták a hemopoetikus őssejtből (hematopoietic stem cell, HSC) alakulnak ki a csontvelőben⁶¹. A hemopoézis során aztán a mieloid progenitor sejtből differenciálódó monociták elhagyják a csontvelőt és a véráramba jutnak. Később különböző stimulusok hatására a vérpályából kilépve különböző szövetekben telepszenek meg, miközben véglegesen differenciált makrofágokká érnek (3. ábra). A makrofágok az immunválasz

kialakulása során fontos szerepet töltenek be; bekebelezik a különböző eredetű részecskéket, patogén mikrobákat, elpusztult testi sejteket, fertőzött vagy tumoros sejteket.



3. ábra: A monociták makrofágokká érése61

A makrofágok fontos szerepet játszanak a kórokozók elpusztításában. Megakadályozzák a fertőzés terjedését. Emellett az immunfolyamatok szabályozásában is igen szerteágazó feladatot látnak el.

A dendritikus sejtek (dendritic cell, DC) mieloid és limfoid előalakokból egyaránt kialakulhatnak. A mieloid és a limfoid eredetű DC-k két, elkülönült sejtpopulációt alkotnak. Az mieloid DC-k differenciálódása a csontvelőben, a monocitákkal közös prekurzor sejtből történik. Az itt tárgyalt háromféle immunsejt közül ezek a leginkább mozgékonyak. Az éretlen DC-k folyamatos "őrjáratot" végeznek a perifériás szövetekben, ahol a szervezetbe kerülő patogént azonnal felismerik és bekebelezik. A patogén felvételét követően a DC-k egy közeli nyirokcsomóba vándorolnak, miközben számos változáson mennek keresztül, míg végül érett DC-vé differenciálódnak (4. ábra). Ezen túl fontos szerepet játszanak az apoptotikus sejtek eltávolításában is.



4. ábra: A dendritikus sejtek differenciálódása⁶¹

Az adhézió és a sejtmozgás kulcsfontosságú momentumok számos betegség, köztük az akut- és krónikus gyulladás, autoimmun rendellenességek, rákos és kardiovaszkuláris betegségek esetén⁶². A β_2 integrinek különösen fontosak a leukocita adhéziós deficiencia (LAD) során, melyet a CD18 lánc hibája okoz⁶³. Az ilyen fajta genetikai betegségben szenvedők nem képesek a β_2 alegységeket szintetizálni.

A sejt β_2 integrineken keresztüli adhéziós képessége több tényezőtől is függ; az egyedi integrin molekulák affinitása, a receptorok expressziós szintje és a receptorcsoportosulás (clustering) mind hozzájárulnak az átlagos affinitáshoz^{64,65}. A monociták, makrofágok és dendritikus sejtek által legnagyobb mennyiségben expresszált receptorok a már említett leukocita-specifikus β_2 integrinek. A β_2 integrin család négy tagból áll: CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (CR3, Mac-1), CD11c/CD18 (CR4, p150/95) és CD11d/CD18. Míg az LFA-1 szerepe viszonylag jól tanulmányozott, addig a CD11d/CD18 szerepéről keveset tudunk. A CD11b/CD18 és CD11c/CD18 tagokat már régóta vizsgálják, azonban az egyedi szerepük meghatározása technikailag kihívást jelent. Az említett immunsejtek különböznek a CD11b/CD18 és CD11c/CD18 expressziójukban; a monociták fejezik ki a legkevesebbet, míg a dendritikus sejtek expresszálják a legtöbb ilyen típusú receptort⁶⁶.

Legfőbb és leggyakoribb ligandjaik az inaktivált C3b fragment (iC3b), a fibrinogén és az ICAM-1⁶⁷. Irodalmi adatok alapján elfogadott nézet, hogy a CD11b/CD18 és a CD11c/CD18 funkciói hasonlóak, azaz az adhéziót és az iC3b opszonizált fagocitózist közvetítik. Azonban evolúciós szempontból nem értelmezhető az, hogy ugyanazon a sejten két receptor ugyanazt a funkciót lássa el. Továbbá különböznek az intracelluláris doménjeikben is, mely a CD11b/CD18 és CD11c/CD18 közötti alapvető funkcionális különbségre utal. Ez az alapvető különbség párosulva azzal a ténnyel, hogy ezek igen közeli sejttípusok, alkalmassá teszi őket a CD11/CD18 integrineken keresztüli sejtadhézió tanulmányozására.

Sejtek adhéziós erejének mérésére alkalmas technikák

Az immunsejtek példájánál maradva, a specifikus makromolekulák felismerése és a hozzájuk való kötődés a fehérvérsejtek nélkülözhetetlen feladata az immunválasz kiváltása során. Ahhoz, hogy statisztikai értelemben megbízható információt nyerjünk a sejtadhézióról, nagyszámú sejtet kell lemérnünk. Ugyanakkor az egyedi sejtek adhéziós erejének direkt mérése komoly technikai kihívást jelent.

A sejtek adhéziós erejének legdirektebb mérőszáma az az erő (vagy munka), ami ahhoz szükséges, hogy a sejtet az adhezív felszínről vagy egy másik sejttől eltávolítsunk. Számos technika alkalmazható az adhézió erejének meghatározására⁶⁸. Ezek a technikák két nagy csoportba sorolhatóak: sejtpopulációkat vizsgáló módszerek és egyedi sejteket mérő technikák. Míg az egész populációt vizsgáló módszerek jó statisztikájú adatokat nyújtanak, addig az egyedi sejteket megcélzó technikák a sejtadhézió közvetlen és érzékenyebb meghatározását biztosítják⁶⁸.

a) Sejtpopulációk vizsgálatára használt módszerek

Egy sejt szubsztráthoz való kitapadási ereje egyszerű sejtleválasztásos eljárásokkal, úgy, mint a centrifugális erőt vagy nyíró erőt alkalmazó folyadékáramlási kamrákkal vizsgálható, melyek általában csak a gyengén kitapadó sejteket képesek eltávolítani a felületről^{69,70}. Míg a centrifugális erő mind a sejteket hordozó felületre merőleges irányban, mind azzal párhuzamos irányban hathat, addig a folyadékáramlás nyíróereje mindig párhuzamos a hordozó felszínével. Az egyszerű lemosási

kísérletekben a nyíró feszültség értékét ugyan nehéz pontosan szabályozni, azonban az ilyen eljárások megfelelőek a kulcsfontosságú adhéziós fehérjék azonosítására. Ezek a technikák biztosítják számunkra a könnyen kinyerhető kvalitatív adhéziós adatokat. A hidrodinamikai nyíró feszültségen alapuló, kifinomultabb vizsgálatok jól szabályozott alkalmaznak a kitapadt sejtek vizsgálatára, áramlást mely a sejtadhézió számszerűsítésének leggyakoribb módja (5. ábra). Ugyanakkor a nyíró erő nagysága ezeknél a módszereknél is olyan paraméterektől függ, mint a sejt mérete és alakja^{69.} A legelterjedtebb módszerek közé a forgó tárcsás mérés⁷¹, a radiális áramlási kamrák⁷² és a párhuzamos síkokkal határolt áramlási kamrák tartoznak^{73,74}. Bár ezek a módszerek alkalmasak sejtpopulációk vizsgálatára, de nem teszik lehetővé egyetlen sejt megcélzását. Továbbá a maximálisan alkalmazható nyírófeszültség csak gyenge sejtadhézió mérésre korlátozódik. A maximális nyírófeszültség még a mikrofluidikai csatornákban is csupán néhány száz Pa.



5. ábra: Nyíró áramlás alkalmazása a felületre kitapadt sejtek adhéziós erejének vizsgálatára⁷⁵

b) Egyedi sejtek adhéziós erejét meghatározó technikák

Az egyedi sejtek adhéziós erejének közvetlen meghatározására leggyakrabban AFM (atomi erő mikroszkóp) tűt^{70,76,77,} vagy mikropipetta aspirációs technikákat^{78,79,80,81} választhatunk. Azonban ezen technikák áteresztőképessége igen alacsony: tipikusan napi 5-10 sejt mérhető le a segítségükkel, mely a mérés statisztikai megbízhatóságát jelentősen csökkenti.

Az atomi erő mikroszkóp egy nagy pontosságú és sokoldalú erőmérő eszköz. Szondája egy igen hegyes tű, melynek anyaga leggyakrabban szilícium vagy szilíciumnitrid. A tű egy rugólapkához van rögzítve, melynek meghajlásából következtethetünk a tű és a minta között ébredő erőre. A rugólapka elhajlását általában lézer sugárral detektálják, melyet a rugólapka szabad végére fókuszálnak, amely aztán egy fotodiódába tükröződik⁸² (6. ábra). Számos eljárást fejlesztettek már ki, hogy a sejtet az AFM rugólapkájához rögzítsék és lehetővé tegyék a sejt-sejt vagy sejt-szubsztrát kölcsönhatások erejének kvantitatív mérését. Ilyen eljárások a specifikus receptorligand kölcsönhatások^{83,84}, az elektrosztatikus kölcsönhatás⁸⁵, ragasztók alkalmazása⁸⁶ vagy kémiai fixációs eljárások⁸⁷. Fontos, hogy az adherens sejtek felszíne ezen kezelések hatására ne módosuljon. A technika kitűnő térbeli és erőbeli felbontással rendelkezik: pN-os tartományba eső érzékenysége és nm-es pozícionálási pontossága van. Ezeknek köszönhetően az AFM hatékony eszközként szolgál az egyedi ligandok és receptorok közötti kölcsönhatások dinamikájának és erősségének vizsgálatára. Az AFM méréseknek azonban vannak hátrányai is; az egyedi sejtek adhéziójának mérése időigényes és költséges. Egyszerre csak egy sejt vizsgálható és minden sejt külön rugólapkát igényel, amelyet funkcionalizálni kell. Ezért a technika áteresztőképessége igen kicsi. A sejtek (bio)kémiai úton történő rögzítése időigényes (~30 perc) és módosíthatja a sejt fiziológiáját.



6. ábra: Az atomi erőmikroszkóp működési elve⁸⁸

Az AFM ötletes módosítása a *FluidFM*⁸⁹, melyben a rugólapka egy mikrofluidikai csatornán keresztül szívja magához a sejteket, amely által kiküszöböli a sejtek nehézkes biokémiai rögzítését. A FluidFM használatával hozzávetőleg 10 sejt mérhető le fél óra alatt, így ennek a technikának már nagyobb az áteresztőképessége a hagyományos AFM-hez képest.

Az *optikai csipesz*⁹⁰ is alkalmazható erőmérésre, de a maximálisan pN-os nagyságrendű erőtartománya miatt inkább csak a sejten belüli erők meghatározására használják.

A sejten belüli molekuláris erőszenzorok⁹¹, melyek Förster-féle rezonáns energia transzferen (*FRET*) alapulnak, kiváló eszközt kínálnak az élő sejten belül az erőeloszlás nagyfelbontású térképezésére. A módszer rövid hatósugarú, sugárzásmentes energiatranszferen alapul egy (általában mesterséges) donor és egy akceptor molekula (vagy molekularész) között, melyek önmagukban fluoreszcens fény kibocsájtására képesek. A folyamat során fény hatására először gerjesztődik a donor, ezt követően az akceptor molekula, amely által kibocsájtott fényt detektálni lehet. Az akceptor által kibocsájtott fény intenzitása erősen függ a donor és akceptor közti távolságtól. Ha a donort és akceptort egy molekuláris (mesterséges) "rugó" köti össze, akkor a "rugóban" fellépő erőre lehet következtetni a kibocsátott fény intenzitásából.

A FRET szenzort egy transzgénikus sejttípusban a citoszkeleton egy specifikus fehérjéjébe is beépítethetik. Az extra gént úgy alakítják ki, hogy kifejezzen két fluoreszcens fehérjét, melyeket egy elasztikus linker régió segítségével különítenek el. Amikor az elasztikus linker régió mechanikai erő általi húzás révén egy rugóhoz hasonlóan megnyúlik, a fluoreszcens fehérjék, vagyis a FRET donor és akceptor távolsága megváltozik.

Egy érdekes alternatívát nyújtanak a sejtadhézió mérésére a nagy érzékenységű és nagy időbeli felbontású evaneszcens mező alapú *optikai bioszenzorok*^{92,93,94}. Ezen technikák esetén a bioszenzor jel arányos a sejt-szubsztrát kontaktterülettel és korrelál az adhézió erősségével is⁹⁵. Ezek a jelölésmentes módszerek képesek monitorozni a sejtadhézió dinamikáját, azonban a mérés indirekt volta miatt az adhéziós erő meghatározására jelenleg nem alkalmasak.

*Mikropipettával történő manipulációs technikák*at szintén használhatunk sejtek adhéziós erejének a méréséhez. A mikropipettás manipulációk használata 1954-re, Mitchison és Swann⁹⁶ munkásságáig vezethető vissza. Tíz évvel később Rand és Burton⁹⁷ tovább finomították a módszert. Az 1970-80-as években a mikropipetta manipuláció már jelentősen javult és számos tanulmány alkalmazta, például vörösvérsejtek, fehérvérsejtek, endotél sejtek, lipid vezikulák és liposzómák esetén. Ezek a tanulmányok pontszerű erőt vagy szívó erőt gyakoroltak az egyedi sejtekre vagy

liposzómák felszínére. A '90-es években a technika fejlődésének köszönhetően a mikropipetta manipulációk kiterjedtek más tanulmányokra is, így tumor metasztázisra, illetve a sejt-sejt kölcsönhatások 2-dimenziós kinetikai vizsgálatára⁸⁰.

A tipikus mikropipetta alapú technikák közé sorolható az ún. "step-pressure" technika⁹⁸, a biomembrán erőmérés⁹⁹ és a mikropipetta aspirációs technika¹⁰⁰.



7. ábra: Az ábra a tipikus mikropipetta alapú manipulációs technikákat mutatja be. (a) "Strep-pressure" technika, (b) biomembrán erőmérés, (c) mikropipetta aspirációs technika⁸¹.

A *"step-pressure" technika* - melyet Sung és munkatársai fejlesztettek ki 1986-ban¹⁰¹ – volt az első mikropipetta alapú technika, melyet a sejtadhézió erősségének kvantifikálására alkalmaztak. A 7. ábra (a) része mutatja a technika működését. Az ábra jobb oldalán lévő sejtet erősen tartják egy mikropipettával (nagy szívó nyomással), míg a baloldalon lévő másik sejtet egy másik mikropipettával tartják (kisebb szívó nyomással). Először a bal oldali sejtet a jobb oldali sejtel érintkezésbe hozzák, így lehetővé válik, hogy egy bizonyos ideig a két sejt egymáshoz tapadjon. Majd ezt követően a bal oldali sejtet elkezdik húzni. Ha a két sejt között az adhézió kialakult és nem elegendő a bal oldali pipettában lévő szívó nyomás, akkor ezt a nyomást lépcsőzetesen addig kell növelni és a folyamatot addig kell ismételni, amíg a bal oldali sejt elválik a jobb oldalitól. A két sejt szétválasztásához szükséges minimális nyomást hívjuk kritikus elválasztási nyomásnak.

A *biomembrán erőmérést* Evans és mtsai. fejlesztették 1995-ben⁹⁹. Egy lipid vezikulát (liposzómát) vagy vörösvértestet tartanak mikropipetta segítségével szívó nyomás mellett, miközben egy latex gyöngyöt szorosan a vezikulához vagy a vörösvértesthez kapcsolnak erő transzducerként (7. ábra b). A gyöngy fehérjékkel is bevonható, amely kölcsönhatásba kerülhet a 7. ábra jobb oldalán elhelyezett sejttel. A rendszer úgy működik, mint egy rugó és a rugóállandó a megfelelő képlet segítségével kiszámítható. A *mikropipetta aspirációs technika (MAT)*¹⁰⁰ a Shao és Hochmuth nevéhez fűződik.

Egy gömb alakú objektum - mely lehet egy sejt vagy egy gyöngy – szolgál a MAT transzducereként. A gyöngy- transzducer és a pipetta fala között szükséges egy kis tér hagyása ahhoz, hogy a transzducer szabadon mozoghasson a mikropipettán belül. A gyöngyre (melyet fehérjékkel vonhatnak be) pozitív nyomást alkalmaznak, hogy az az ábra jobb oldalán lévő sejttel kontaktusba kerüljön és hozzátapadjon.

Az inverz mikroszkópra épített számítógép-vezérelt mikropipetta^{8,9,10} is bevethető egvedi seitek specifikus makromolekulákkal kialakított kölcsönhatásának vizsgálatára^{11,12}. A mikropipettában kialakuló áramlás számítógépes szimulációja segítségével kiszámolható a célzott sejtekre ható hidrodinamikai emelő erő értéke. A felületre kitapadt sejtek adhéziós ereje nagy pontossággal mérhető úgy, hogy lépésenként megnövelt vákuum mellett próbáljuk felkapni a pipetta alá pozícionált vizsgálandó sejtet. Az egyedi sejtek adhéziós ereje viszonylag nagy áteresztőképességgel vizsgálható: akár több száz egyedi sejt mérhető le a technikával rövid idő alatt, mely kísérleteink során átlagosan ~30 percnek bizonyult. Számítógépes látást (computer vision) alkalmazva kerülnek a sejtek kiválasztásra. A technika határozott előnye, hogy az erőmérés végén a vizsgált egyedi sejtek könnyedén izolálhatók a mikropipettával, és más technikákkal tovább vizsgálhatók.

A nagyszámú egyedi sejt adhéziós folyamatának érzékeny monitorozása a biomolekulákkal borított, finoman kézben tartott felületeken várhatóan olyan minőségű információt fog nyújtani a ligand kötésről, receptor funkcióról és jelátviteli útvonalakról, mely a korábbi sejtadhéziós vizsgálatokkal eddig elérhetetlen volt.

29

3. Célkitűzés

A PhD tanulmányaim megkezdése előtt már bemutatásra került a számítógépvezérelt mikropipetta⁸, mely képes a Petri csészében lévő fluoreszcens vagy jelöletlen sejteket automatikusan detektálni mikroszkóp és számítógépes látás segítségével, majd ezt követően lehetővé teszi a sejtek izolálását.

Munkám egyik célja az volt, hogy egy számítógép-vezérelt mikroszkópot és mikropipettát használva, 80 db PCR (polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció) műanyag csövet tudjunk feltölteni egyedi sejtekkel egyetlen működési ciklus alatt, hogy aztán további vizsgálatokat, DNS/RNS szekvenálást lehessen rajtuk végezni. Fontos volt az is, hogy az egyedi sejteket minél kisebb térfogatú cseppekben nyerjük ki, hiszen az izolálást követő (pl. szekvenálási) vizsgálatok költséges reagenseket igényelnek. Feladatom volt egy olyan, egyedi sejteket izoláló rendszer tesztelése élő sejtekkel, mely lehetővé teszi, hogy az egyedi sejteket mikroliternél kisebb térfogatban izoláljuk.

Az adherens sejtek izolálására kifejlesztett eljárás esetén kritikus volt a sejtek felületre történő kitapadása. Ezért nagy jelentőséget tulajdonítottunk annak, hogy a sejteket a felülethez történő rögzítés nélkül is képesek legyünk nagy hatékonysággal izolálni. A folyadék konvekciójának megszűntetése érdekében arra volt szükség, hogy olajjal lefedett vékony vízrétegbe szuszpendáljuk a sejteket. Így a sejtek passzív mozgása jelentősen lecsökkent, amely az egyedi sejtek pontos célzásához nélkülözhetetlen volt.

További céljaink között szerepelt, hogy az inverz mikroszkópra épített számítógép-vezérelt mikropipettát az egyedi sejtek specifikus makromolekulákkal való kölcsönhatásának vizsgálatára is bevessük. Az ELTE Immunológiai Tanszékével együttműködve tanulmányozni kívántuk a különböző emberi immunsejtek kölcsönhatását fibrinogénnel és más makromolekulákkal. Fontosnak tartottuk, hogy az általunk bevezetett technikát egy standard módszerrel is validáljuk. Két hasonló, de eltérő funkciójú integrin receptor (CD11b/CD18, CD11c/CD18) szerepét is tisztázni kívántuk monocitákban, makrofágokban és dendritikus sejtekben.

Mivel a sejtek nemcsak az ECM valamely komponensével képesek kapcsolatot kialakítani, hanem más sejtekkel is, így fontosnak tartottuk bebizonyítani, hogy az

általunk fejlesztett technika a sejt-sejt kapcsolatok közti adhéziós erőt is képes nagy pontossággal meghatározni.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Egyedi adherens sejtek automatizált válogatása és kis térfogatban történő lerakása

A vizsgált sejttípusok

Kísérleteinkben humán primer immunsejtek (monociták) és NE-4C neuroektodermális egér őssejtek válogatását céloztuk meg.

A perifériás vér mononukleáris sejteket (peripheral blood mononuclear cell, PBMCs) az ELTE Immunológia Tanszéke izolálta számunkra egészséges donorokból, melyet a Magyar Országos Vérellátó Szolgálat szolgáltatott. A monociták negatív mágneses szeparálással voltak izolálva Miltenyi Monocita Izoláló kit II- t használva. A sejtek 10% FCS (magzati borjúszérum) tartalmú RPMI médiumban (Roswell Park Memorial Institute) (37°C, 5% CO₂ atmoszféra), teflonbevonatú edényben voltak tárolva felhasználásukig, hogy elkerüljük a monociták spontán kitapadását a tároló edény falához. Az izolálást követő 24 órán belül felhasználtuk a sejteket. A monociták jelölése 0,5 μ M CFSE (5-karboxifluoreszcein-szukcinimidil észter) fluoreszcens festékkel történt (Molecular Probes).

A kísérletek előtt Bürker-kamra segítségével megszámoltam a sejteket és 10^5 nagyságrendű sejtszuszpenziót helyeztem az előzőleg PLL-g-PEG-gel (poly (L-lysine)graft-poly (ethylene glycol) co-polymer, SuSoS) kezelt 35 mm átmérőjű sejttenyésztő, műanyag Petri csészébe (Greiner). A sejteket 25 percig inkubáltam 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában. Az inkubációt követően a monocitákat többször (3-4-szer) mostam HBSS (Hanks' balanced salt solution, Hanks pufferelt só oldat, Sigma) pufferrel, hogy eltávolítsam a felületről az úszó sejteket.

Az NE-4C sejtvonalat 10% FCS tartalmú MEM (Minimum Essential Medium Eagle) médiumban tenyésztettem. A válogatás előtt a sejteket DiI (10 μM, 30 perc, 37°C, Invitrogen) festékkel jelöltem.

Felületkezelés válogatás előtt

Annak érdekében, hogy gyengítsem a sejtek felületre történő erős kitapadását, a monociták esetén a Petri csésze felületét a fehérjéket taszító polimer bevonattal, PLL-g-

PEG-gel borítottam, míg az egér őssejtek esetén a sejteket 30 mp-ig tripszin-EDTA-val (etilén-diamin-tetraacetát – kelátképzőanyag) kezeltem. A tripszines kezelést azért használtam, mert ez az egyik legismertebb fehérje hasító aktivitással rendelkező emlős eredetű proteáz enzim, amely a sejtadhéziós molekulák hasításával, a sejtek tenyésztőedénytől és egymástól történő elválasztását teszi lehetővé. Az EDTA pedig, kelátképző komplexként, a Ca²⁺ ionok megkötésével a sejtek közötti kapcsolatok elválását segíti, így a tripszin hatását erősíti.

PLL-g-PEG kezelés a válogatási folyamat előtt: A PLL-g-PEG-et HEPES (4-(2hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav) oldatban oldottam fel. A 35 mm átmérőjű műanyag sejttenyésztő Petri csésze felületét 1 ml térfogatú, 0,75-1,00 mg/ml koncentrációjú polimerrel borítottam és 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. Inkubálás után a gyártó (SuSoS) utasítása szerint a csészét milli-Q vízzel többször átöblítettem. Majd a monocita sejtszuszpenziót 10% FCS tartalmú RPMI médiumban a bevont csészére helyeztem.

Tripszin-EDTA kezelés a válogatási folyamat előtt: Az NE-4C sejtekkel történő válogatás előtt a sejteket szobahőmérsékleten 1x tripszin-EDTA oldattal kezeltem (Gibco, 25300) a következők szerint: a sejtekről eltávolítottam a sejttenyésztő médiumot és mostam 1 ml PBS-sel (Phosphate Buffered Saline, foszfátpufferes sóoldat), majd a tenyészetet 30 mp-ig 1 ml térfogatú tripszin-EDTA kezelésnek tettem ki. Ezután a tenyészetet 3-4-szer mostam sejttenyésztő médiummal, hogy eltávolítsam az úszó sejteket. A sejtek válogatását 2 ml sejttenyésztő médiumban végeztem a tripszines kezelés után 5-20 perccel.

A válogatás folyamata

a) A fluidikai rendszer.

A kísérletek során használt ~15-20 µm átmérőjű egyedi sejtek felszedését végző 70 µm belső átmérőjű üveg mikropipettát (Biomedical Instruments, Németország) egy manuálisan elforgatható kar tartja, amely a függőleges irányban motorizált mikromanipulátorhoz kapcsolódik (8. ábra). A rendszer folyadék csövei teflonból (PTFE) készültek 1 mm-es belső átmérővel. A két teflon cső egy-egy nagy sebességű két-utas, alaphelyzetben zárt folyadék szelephez csatlakozik. A vákuumot a sejtek felvételéhez, illetve a nyomást a felvett sejtek lerakására egy-egy fecskendő biztosítja.

A vákuumot az egyik fecskendőben egy fecskendő pumpa (NE-1000, New Era Pump Systems) segítségével generáltam, míg a hidrosztatikus nyomást gravitáció segítségével biztosítottam úgy, hogy egy másik fecskendőt a Petri csésze magasságától magasabb szintre emeltem, így elérve azt a kritikus (Laplace) nyomást, amely magasságon a mikropipetta már kinyílik és lehetővé válik az egyedi sejtet tartalmazó csepp lerakása. A vákuum -9050 Pa volt az NE-4C sejtek és -14050 Pa volt a monocita sejtek esetén, míg az injekciós nyomás 6050 Pa volt. A folyadék rendszert minden egyes kísérlet után átöblítettem ionizált vízzel, majd 96%-os etanollal, hogy elkerüljük a szennyeződéseket.



8. ábra: A sejtválogató berendezés egyedi sejtek automatizált válogatására és lerakására. A rendszer fő komponensei: inverz mikroszkóp digitális kamerával; motorizált fókusz és 2D-s motoros mikroszkópasztal; függőleges irányban motorizált mikromanipulátor; CellSorter vezérlő egység a folyadékáramlás szabályozására; vákuumot előállító 1-es fecskendő a fecskendőpumpában és gravitációs túlnyomást előállító 2-es fecskendő illetve a CellSorter szoftvert futtató számítógép⁹.

b) A képalkotás.

A Petri csészében lévő sejteket az inverz fluoreszcens mikroszkóp (Zeiss Axio Observer A1) 2D motorizált asztalának (Scan IM 120 x 100 motorizált asztal, Märzhäuser) inzertjébe helyeztem. Majd a tenyészet egy adott területét kiválasztottam és digitális kamera (Qimaging Retiga 1300 cooled CCD) segítségével fáziskontraszt és

fluoreszcens képet készítettem. A fáziskontraszt felvételek készítése közben a mikroszkóp asztal felett elhelyezkedő mikropipettát tartó kart kibillentettem, hogy ne zavarja a fénykép készítését.

c) A sejtek detektálása.

A felvett fáziskontraszt és/vagy a fluoreszcens képeken lévő sejtek detektálása történhetett manuálisan egy számítógép egér segítségével, vagy automatikusan is a CellSorter szoftver ún "Local variance" algortimusával. A detektálást követően pedig a szoftver megtervezte a válogatás legrövidebb útvonalát.

d) Sejtek válogatása és lerakása.

A sejtek detektálását követően a mikroszkóp kondenzor oszlopát hátra billentettem és a mikropipetta tartó kart visszaforgattam a minta felé. A vertikálisan motorizált mikromanipulátor (HS6/3, Märzhäuser) joystick-ját használva a mikropipettával óvatosan megközelítettem, majd megérintettem a Petri csésze alját azért, hogy 1 µm-es pontossággal kalibrálni tudjam a mikropipetta függőleges pozícióját. A mikropipettát fehér LED fénnyel világítottuk meg, hogy láthatóvá tegyük a pipetta hegyét a mikroszkópban. A kísérletek során a mikromanipulátor a mikropipettát fel-le irányba mozgatta. Mielőtt az első sejt felvétele megtörtént volna, sejttenyésztő médiumot szívtam a mikropipettába, hogy elkerüljem a sejtek ozmotikus sokkját. A felvett sejteket egy 24 x 32 mm²-es üveg fedőlemezre (VWR International) vagy PCR csövekbe (4titude) helyeztem. A fedőlemezre maximum 20 cseppet tettem le egymástól 5 mm távolságban, hogy teszteljem a lerakási folyamatot in situ. A válogatást követően megvizsgáltam minden lerakott cseppet fáziskontraszt és fluoreszcens módban is, hogy ellenőrizzem, hogy azok valóban tartalmazzák-e az egyedi sejteket. Majd a Petri csészében lévő sejtek válogatásra kijelölt területéről ismét mikroszkópos képét készítettem. Így össze tudtam hasonlítani a válogatás előtt és a válogatás után készített képeken, hogy pontosan mely sejtek felvétele volt sikeres.

Csepp térfogat mérése

Annak érdekében, hogy meghatározzam a mikropipetta által lerakott, egyedi sejtet tartalmazó cseppek térfogatát, egy analitikai mérlegen (Scaltec SBA 32) megmértem egy PCR strip (8 db PCR csövet tartalmazó csík) és annak záró sapkájának tömegét a cseppek csőbe tétele előtt és után. A válogatás során a strip mind a 8 csöve

feltöltésre került, majd a válogatást követően ráhelyeztem a záró kupakot a csövekre, hogy minimalizáljam a párolgást. Ezután minden cső esetén vizuálisan megvizsgáltam, hogy tartalmaznak-e cseppeket. A sejttenyésztő médium sűrűségét a víz sűrűségének értékével közelítettem: 1000 kg/m³.

4.2. Egyedi sejtek izolálása szuszpenzióból

A vizsgált sejttípusok

A kísérletek során a 4.1.-es részben már ismertetett monocita sejteket, illetve 3T3 egér kötőszöveti sejteket használtam.

A 3T3 egér embrionális fibroblasztokat (ATCC; CCL-92) MEM + 10% FCS tartalmú médiumban tenyésztettem. A kísérlet előtt a sejteket DiI fluoreszcens festékkel megfestettem (30 perc, 10 μ M, Invitrogen). A válogatási folyamat előtt a 3T3 sejteket 1x tripszin-EDTA oldattal 6 percig, 37°C-on kezeltem, majd a sejtszuszpenziót 300 g fordulaton 2 percig centrifugáltam.

Miniatűr "multi-well plate" építése Petri csészébe

Egy egyszerű 3D nyomtatót (Ultimaker) használtunk ahhoz, hogy miniatűr "multi-well plate"-et építsünk a 35 mm átmérőjű Petri csészékbe. A plate-ek politejsavból (PLA) készültek 0,5 vagy 1,0 mm magassággal kezeletlen hidrofób (3T3 sejtek esetén) vagy sejttenyésztő Petri csészében (monocita esetén). A célunk az volt, hogy a sejteket a csésze adott területén tartsuk. A csészébe épített struktúrák két nagyobb (5 x 5 mm²) és 24 kisebb (2 x 2 mm²) keretet (9. ábra a) tartalmaztak a ritka sejtkultúrából történő egyedi sejtek izolálására, míg a sűrű tenyészetből történő válogatásra a négy nagyobb (5 x 5 mm²) keretet tartalmazó Petri csészét (9. ábra b) használtam.


9. ábra: A Petri csészébe nyomtatott miniatűr plate-ek láthatóak az a-b ábrákon10.

Vékony sejtszuszpenziós réteg kialakítása Petri csészében

A 3T3 sejtek esetén kezeletlen, hidrofób műanyag Petri csészéket használtam. Mivel a monociták a hidrofób csésze felületére kissé kitapadtak, így esetükben hidrofil, szövettenyésztő csészét használtam, melyet 1 mg/ml PLL-g-PEG oldattal vontam be 30 percig, szobahőmérsékleten, hogy meggátoljam a sejtadhéziót.

Miután a 881 mm² területű Petri csészét 2 ml sejttenyésztő médiummal borítottam, 1 ml szilikon olajat (Silicon oil AR 20, Sigma Aldrich) vagy ásványi olajat (Sigma Aldrich) rétegeztem a médiumra. Mind a szilikon olaj, mind az ásványi olaj a gyártó adatlapja és korábbi kísérleti megfigyelések alapján biológiailag kompatibilis a sejtekkel és érdemben nem befolyásolják azokat. A vékony sejttenyésztő réteg létrehozásához egy laboratóriumi pipetta segítségével eltávolítottam a felesleges médiumot az olajréteg alól és azt egy eppendorf csőbe injektáltam. A csészében megmaradt sejttenyésztő folyadékréteg magasságát úgy becsültem meg, hogy egy analitikai mérlegen megmértem az eltávolított médium tömegét. Amikor a sejtválogatás ritka tenyészetből történt, 5-10 µl térfogatú, 10% FCS tartalmú tápközegben injektáltam 2000 sejtet a Petri csészébe épített, 5 x 5 mm²-es "miniatűr multi-well-plate" egyik keretébe. Amikor viszont sűrű kultúrából történt a válogatás, akkor 5 x 10⁴ jelöletlen és 50 DiI festékkel jelölt 3T3 sejtet injektáltam kézi, laboratóriumi pipettával, 5-10 µl térfogatban egy 5 x 5 mm²- es keretbe.

A válogatás folyamata szuszpenzióból

Az egyedi sejtek detektálására és izolálására, a 4.1.-es rész válogatási folyamatához hasonlóan, itt is az automatizált mikropipetta berendezést használtam. Az

egyik különbség az volt, hogy az alkalmazott mikropipetta belső átmérője nem 70, hanem 30 µm volt. A másik különbség pedig, hogy jelen esetben a vákuum és a nyomás létrehozására egyetlen fecskendőt (1-es fecskendő) használtam, amelyet egy fecskendő pumpa mozgatott. A vákuum értéke -100 Pa, a túlnyomás értéke pedig 4200 Pa volt. Ezen kívül egy másik fecskendőt (2-es fecskendő) is használtam, amelyben a nyomás állandóan ugyanaz volt, mint a Petri csészében, azaz a környezeti nyomás. Miután pozícionáltam a mikropipettát a következő sejt fölött és megközelítettem a felületet 5 µm magasságig, a fecskendő pumpa által mozgatott fecskendőben (1-es fecskendő) beállított vákuumot alkalmaztam a mikropipettára úgy, hogy a hozzá tartozó folyadék szelepet (1-es szelep) 10 ms időtartamra kinyitottam. Annak érdekében, hogy a sejt felvétele után gyorsan megszűntessem a vákuumot illetve az áramlást a mikropipettában, az állandó magasságon lévő fecskendőhöz (2-es fecskendő) tartozó szelepet (2-es szelep) a környezeti nyomással 1 mp-re nyitottam. A sejtek lerakásához ugyanezt a módszert használtam, de vákuum helyett túlnyomást állítottam be az 1-es fecskendőben, melyet 1 mp-ig alkalmaztam.

Kép szegmentáció sejtek felismeréséhez külső algoritmussal

Speciális sejtválogatási feladatokhoz tetszőleges, a CellSorter szoftverbe épített eljárástól független, külső kép szegmentációs algoritmusokat is tudtunk alkalmazni. A külső algoritmus a számítógépre letöltött képeket használja, majd átadja a felismert sejtek koordinátáit (adott esetben a sejtre illesztett határoló téglalap dimenzióit valamint a sejt átlagos fényességét) a hardvert vezérlő CellSorter programnak. Ezek az adatok átvihetőek a Windows vágólapon keresztül vagy egy .csv fájlban. A módszert a nyílt forráskódú ImageJ szoftver segítségével teszteltük, melyben számos képfeldolgozó és szegmentáló algoritmus áll rendelkezésre.

Adaptív sejtcélzás

Bár a folyadékkonvekciót minimalizáltam a vékony rétegű sejtszuszpenzió olaj réteggel való lefedésével, a sejtek passzív mozgását azonban nem tudtam teljesen leállítani. Ha a mikropipetta bizonyos sejteket korábban már felszívott, akkor ezzel más közeli sejteket is kissé elmozdított. Annak érdekében, hogy a célzott sejteket pontosan eltalálja a mikropipetta, az elmozdult sejtek koordinátáit a szoftver a válogatási folyamat közben korrigálta. Ez úgy történt, hogy mielőtt a mikropipetta felvette volna a soron következő sejtet, a szoftver készített egy újabb fluoreszcens képet, így felismerte,

ha a felvételre szánt sejt elmozdult és javította annak koordinátáit. Egy kép felvétele és kiértékelése 1-2 mp-nél nem tartott tovább. Így minden izolálandó sejtet kétszer detektáltunk számítógépes látással: először, amikor a számunkra érdekes teljes területet beszkenneltük, másodszor pedig közvetlenül mielőtt a felvenni kívánt sejtet megcéloztuk volna.

A kísérleti paraméterek optimalizálása

Annak érdekében, hogy maximalizáljam az egyedi sejtek válogatási hatékonyságát, a következő kísérleti paramétereket optimalizáltam:

- 1. A Petri csésze hidrofóbicitása annak érdekében, hogy elkerüljem a sejt kitapadását a válogatás során.
- A mikropipettára kapcsolt vákuum és nyomás értékek a sejt felvétele és lerakása során. Az optimális vákuum -100 Pa, az optimális túlnyomás pedig 4200 Pa volt. A mikropipettában lévő folyadékáramlást a mikropipettára kapcsolt pontos, 0 Pa beállításával állítottuk le.
- 3. Az üveg mikropipetta átmérője. Nagyobb átmérőjű mikropipettát használva több sejt került felvételre és nagyobb térfogatban, míg a kisebb átmérőjű hegyekkel a probléma az volt, hogy a sejtek beleragadtak a hegy belsejébe. Az optimális átmérő 30 µm volt.
- 4. A 3D nyomtatott mikrokutak mélysége. Az optimális mélység 1 mm volt. Ekkor a sejtek a kereten belül maradtak. A 0,1 vagy 0,5 mm-es mélységű kutak esetén szignifikánsan több sejt szökött ki a keretből.
- 5. Az 5 x 5 mm²-es keretbe injektált sejtszuszpenzió térfogata. Az optimális térfogat 5 μl volt. Ennél nagyobb térfogat esetén a sejtek gyakran kiúsztak a keretből, míg kisebb térfogatnál pedig nem terjedtek szét megfelelően a rendelkezésre álló területen belül.
- 6. Összehasonlítottam az új módszer hatékonyságát mikrostruktúrákban történő egyedi sejtcsapdázással és ezt követő mikropipettás válogatással. A PDMS-ből készült mikro-kutak átmérője a sejt méretének megfelelően volt optimalizálva. Az optimális átmérő 15 μm volt a humán monociták ill. 20 μm volt a 3T3 sejtek esetén.

Sejtek életképességének vizsgálata

Meghatároztam a sejtválogatási eljárás sejtek életképességére kifejtett hatását 3T3 sejteket használva. Az izolált sejteket a miniatűr "multi-well plate-en" belül 0,2% os tripán kék festékkel kezeltem. Miután a sejteket a tripán kék festékkel néhány percig szobahőmérsékleten inkubáltam, az izolált sejtekről képeket készítettem fáziskontraszt és világos látóterű módban. Ezután megszámoltam az ép (nem kék) és sérült (kék) sejteket a képeken. Az izolálást követően megvizsgált, vékony folyadékrétegbe injektált 707 sejt 95 \pm 4%-a életképes volt.

Kontrollként a 3T3 sejteket a hagyományosan használt 2 mm magas sejttenyésztő folyadékrétegbe helyeztem (35 mm átmérőjű Petri csészében) és a tripán kékkel való kezelés előtt 30 percig szobahőmérsékleten tartottam őket. A 30 perces szobahőmérsékleten történő inkubálást azért végeztem, mert átlagosan ennyi ideig tart egy sejtválogatási folyamat, így a kontroll sejtek életképességét ugyanannyi idő elteltével vizsgáltam, mint az izolált sejtek életképességét. A megvizsgált 594 kontroll sejt 94 \pm 2%-a volt életképes, így az a következtetés állapítotható meg, hogy a válogatás nem befolyásolta a sejtek életképességét.

A válogatás során felvett és lerakott cseppek térfogatának mérése

A sejtek izolálása valamint lerakása során az egyedi sejtet tartalmazó sejttenyésztő médium térfogatát a következőképp határoztam meg. Analitikai mérleg segítségével lemértem a Petri csésze tömegét a vékony vízréteggel és az ezt fedő olajréteggel együtt. Majd a sejt felvételét (ill. a lerakás folyamatát) vízzel, sejtek nélkül szimulálva, és 1000-szer megismételve újra lemértem a Petri csésze tömegét. A sejttenyésztő médium sűrűségét a víz sűrűségével közelítve (1000 kg/m³), a sejtfelkapás térfogata 1,4 ± 0,6 nl, míg a lerakásé 147 ± 11 nl volt. A viszonylag magas lerakási térfogatra azért volt szükség, hogy elkerüljük a sejtek mikropipettába tapadását. Az üveg mikropipetta felületének módosítása a sejtadhézió gátlásának érdekében várhatóan lehetővé fogja tenni a lerakási térfogat további csökkentését.

A passzív sejtmozgás sebességének meghatározása

Megmértem a sejtek passzív mozgásának sebességét kezeletlen, hidrofób, 35 mm átmérőjű Petri csészében. A 3T3 sejteket 1x tripszin-EDTA oldattal kezeltem 6 percig, 37°C-on, majd ezt követően a sejtszuszpenziót lecentrifugáltam (300 g fordulat, 2 perc).

Az első esetben a sejteket 2 ml térfogatú sejttenyésztő médiumot tartalmazó Petri csészébe helyeztem. A második esetben a sejteket egy vékony (~100 μ m-es) sejttenyésztő folyadékrétegben tartottam, melyet olaj fedőréteggel borítottam. A harmadik esetben pedig az előzőhöz hasonlóan a sejteket vékony sejttenyésztő folyadékrétegben tartottam, melyet olaj fedőréteggel borítottam, azonban itt a sejteket nem a teljes Petri csészébe injektáltam, hanem a Petri csészébe nyomtatott "multi-well plate" egy 5 x 5 mm²-es keretébe. Ezt követően a sejtekről egy órán keresztül minden fél percben fáziskontraszt képeket rögzítettem a mikroszkópon a CellSorter szoftver time-lapse modulját használva. Ezután minden egyes látótéren manuálisan nyomon követtem 5-10 sejt mozgását. Majd kiszámoltam a 2-3 kísérlet során végigkövetett sejtek átlagos sebességét. 120 mp-es időközönként (30 mp helyett) megmértem a sejtek elmozdulását, tehát a mozgás sebességét egy viszonylag hosszú, 2 perces időtartamra átlagoltam, hogy csökkentsem a mérési hiba lehetőségét.

4.3. Egyedi sejtek izolálása mikrostruktúrából

PDMS (poli-dimetil-sziloxán) mikro-kutak gyártása

15 és 20 µm átmérőjű kutakat használtam, melyek illeszkedtek a monociták és 3T3 sejtek méretéhez. A struktúrákat az MTA EK MFA MEMS Laboratóriuma készítette számunkra a következő eljárással. A microwell array litográfiai maszkját egy Heidelberg DWL 66+ lézer minta generátorral gyártották. A végső microwell tömböket PDMS-ből öntötték ki, SU-8 negatív mintát használva formázási replikaként. Az SU-8 (MicroChem) egy epoxi alapú negatív fotoreziszt, melyet széles körben használnak mikrostruktúrák gyártására. A szilícium szubsztrátra SU-8 3025 fotorezisztet vittek fel spin-coating módszerrel 3000 rpm fordulattal, Brewer Science Cee 200CBX-et használva, majd UV fénynek tették ki. Metoxy-2-propil acetát oldatot alkalmaztak, hogy eltávolítsák a megvilágítatlan rezisztet. Majd a kapott struktúrák geometriai paramétereit jellemezték. A mester replika minőségét pásztázó elektron mikroszkóp (SEM) segítségével tovább ellenőrizték. A PDMS elasztomert és a térhálósító szert 10:1 tömegarányban keverték össze, majd a buborékmentesített oldatot ráöntötték a fotoreziszt replikára és 2 napig szobahőmérsékleten szilárdították meg, ezután pedig a megszilárdult PDMS struktúrát leválasztották az öntőformáról. A végső PDMS mikrostruktúráját SEM-mel jellemezték (10. ábra).

Mivel a hagyományos, felületre kitapadt sejtek válogatáshoz használt 70 μ m belső átmérőjű mikropipetta térbeli felbontása 70 μ m^{8,9}, így a mikro-kutakat egy rácsba rendeztük 100 μ m-es rácsállandóval, hogy elkerüljük a környező kutakból a felvételre nem szánt sejtek felszedését.



10. ábra: A litográfiás eljárással létrehozott PDMS microwell tömbök pásztázó elektron mikroszkópos (a)
és nagyított (b) képe¹⁰.

Egyedi sejtek csapdázása PDMS mikro-kutakban

Miután a 10 x 10 mm²-es mikro-kutakat tartalmazó PDMS-t belehelyeztem egy 35 mm átmérőjű, sejttenyésztő médiumot tartalmazó Petri csészébe, sejttenyésztő inkubátorba tettem őket (37°C, 5% CO₂) ~2 órára, hogy minden egyes kút tökéletesen feltöltődjön a médium oldattal, és hogy az esetlegesen megtapadt levegő buborékokat eltávolítsuk. Azután a médiumot eltávolítottam a csészéből és a mikrostruktúrát tartalmazó rész kivételével a PDMS lemez minden oldalát szöszmentes törlőpapírral megtöröltem. Ezután a sejtek számát (3T3 sejtek esetén tripszines kezelését követően) Bürker-kamrában meghatároztam, és 2-4 x 10⁵ sejtet lecentrifugáltam 300 g fordulaton, 6 perc alatt. A centrifugálás után a felülúszót eltávolítottam és a leülepedett sejteket 100 µl térfogatú médiumban újraszuszpendáltam, melyet aztán egy laboratóriumi pipettával a PDMS lemezre helyezte és inkubáltam 30 percig, 37°C-on. Inkubálás után az úszó sejteket eltávolítottam a PDMS-ről egy laboratóriumi pipettával történő óvatos mosással. Végül a PDMS lemezt egy új Petri csésze aljára nyomtam és friss médiummal borítottam.

4.4. Egyedi sejtek adhéziós erejének mérése

4.4.1. Immunsejtek adhéziós erejének vizsgálata sejtadhéziós molekulákkal bevont felületeken

Az adhéziós erő mérésére használt sejttenyészetek

A kísérletek során immunsejtek: humán primer monociták és monocitákból *in vitro* differenciáltatott makrofágok és dendritikus sejtek adhéziós erejét vizsgáltam. A monociták izolálásának lépéseit a 4.1.-es részben mutattam be. A monocita-eredetű dendritikus sejtek (MDCs) létrehozásához a monocita sejteket 100 ng/mL rHu GM-CSF-fel (rekombináns humán granulocita/macrofág-kolónia-stimuláló faktor, R&D Systems) és 15 ng/mL rHu-IL-4-gyel (rekombináns humán interleukin-4, R&D Systems) kiegészített 10% FCS tartalmú RPMI médiumban tenyésztette számunkra az ELTE Immunológia Tanszéke 5 napig, 24 lyukú sejttenyésztő lemezen (Corning) 5 x 10⁵/ ml sejtsűrűségben. A monocita-eredetű makrofágok (MDMs) generálásához a sejteket ugyanúgy tenyésztették, mint az MDCs-eket, kivéve, hogy csak GM-CSF citokint adtak a kultúrához.

Adhéziós erő meghatározása

a) A sejttenyészetek előkészítése a 70 µm belső átmérőjű mikropipettával történő erőmérésre

A mérések előtt egy steril 9 mm x 9 mm x 5 mm-es (szélesség x mélység x magasság), PDMS-ből készült 2 üregű inzertet (Ibidi) helyeztem a 35 mm átmérőjű sejttenyésztő műanyag Petri csésze felületére (11. ábra). A keretet a csésze aljára nyomtam, majd a határait a csésze külső részének alján körberajzoltam, hogy biztosítsam a válogatás során az inzert területének láthatóságát. Az egyik keretbe 10 µg/ml koncentrációjú fibrinogént (Merck) helyeztem és 1 órán át inkubáltam 37°C-on párásított, 5% CO₂ légkörben. Az inkubáció után a fibrinogén oldatot eltávolítottam és a felületet kétszer mostam PBS-sel. Ezután az inzertet eltávolítottam a csészéből és a teljes csésze felületét 1 mg/ml PLL-g-PEG-gel vontam be a protokollnak megfelelően és szobahőmérsékleten, 30 percig inkubáltam vele a csészét. Így a 2 üregű inzert egyik fele fibrinogénnel lett bevonva, melyet aztán PLL-g-PEG-gel volt fedve. Majd 75000 sejtet

tartalmazó sejtszuszpenziót helyeztem a bevont csészére, amelyben 30 percig, 37°C-on párásított, 5% CO₂ légkörben inkubáltam a sejteket. Ezt követően a tenyészetet 3-4-szer HBSS pufferrel mostam, hogy eltávolítsam az úszkáló sejteket.



 11. ábra: Egy 35 mm átmérőjű, sejttenyésztő műanyag Petri csésze felületére helyezett, PDMS-ből készült 2 üregű inzert (Ibidi).

b) Képalkotás

A Petri csésze felületkezelése és sejtekkel való inkubálása után a 4.1.-es részben megismert módon a Petri csészét a fluoreszcens mikroszkóp 2D-s motorizált asztalára helyeztem; kiválasztottam a Petri csésze korábban körberajzolt területét és digitális kamera segítségével fáziskontraszt módban beszkenneltem azt.

c) Sejtek detektálása, válogatása

A fáziskontraszt képeken a sejteket automatikusan detektáltattam a CellSorter szoftverrel, majd a szoftver egy utazó ügynök algoritmust használva megtervezte a válogatás legrövidebb útvonalát.

A felületre kitapadt egyedi sejtek adhéziós erejét lépésenként megemelt vákuumot alkalmazva határoztam meg. A mikropipetta segítségével létrehozott lokális hidrodinamikai erő alkalmazása előtt és után a motorizált inverz mikroszkóp segítségével képet készítettem a vizsgált területről, amelyeken aztán megszámoltam a sejteket, és ez alapján határoztam meg a még felületre kitapadt sejtek arányát. A vákuumot addig növeltem, amíg a legtöbb sejtet el nem távolítottam a felületről.

Adhéziós erőmérések kis (5 µm) átmérőjű hidrosztatikus mikropipettával

A kísérletek előtt a fibrinogénnel fedett, 35 mm átmérőjű műanyag sejttenyésztő Petri csészébe CFSE festékkel jelölt monocita sejteket helyeztem "A sejttenyészetek előkészítése a mikropipettával történő erőmérésre" résznek megfelelően. Majd a Petri csészében lévő sejteket az inverz fluoreszcens mikroszkópra helyeztem. Ezekben a kísérletekben a 70 µm belső átmérőjű üveg mikropipetta helyett 5 µm átmérőjű hegyet használtam, hogy felemeljem a sejteket hidrosztatikus körülmények alatt. A mikropipetta hegyét 40 x objektív lencse fölött pozícionáltam 3 dimenzióban, 1 µm pontossággal. Először megérintettem a heggyel a Petri csésze felületét, hogy kalibráljam a függőleges helyzetét, majd a mikropipetta hegyének magasságát a felülettől 30 µm-re állítottam be. Azután a motorizált asztal joystick-jának mozgatásával a hegyet a sejt fölé helyeztem Beállítottam a vákuumot a fecskendőben és kinyitottam a folyadékszelepet. Aztán a mikromanipulátor joystick-jának mozgatásával, a heggyel óvatosan megközelítettem a sejtet. A hegy és a Petri csésze felülete közötti távolságot 30 µm-ről 10 µm-re csökkentettem. Majd a hegyet a felszíntől ismét 30 µm távolságra emeltem. Ha a sejt felvétele sikerült, akkor a következő sejtet céloztam meg, ha viszont a sejt a felületen maradt, akkor növeltem a vákuum értéket. A szívóerő értéke a fecskendőben 0-0,7 µN közötti erőtartomány volt, amelyet lépésenként növeltem addig, amíg a kiválasztott sejtet fel tudtam venni a felületről. A kis átmérőjű mikropipetta 5-10 sejt felvétele után gyakran eltömődött. Miután a hegy eldugult és nem tudtam vele több sejtet felvenni, kicseréltem a mikropipettát.

A hidrosztatikus mikropipetta manipulációs technika előnye, hogy egyszerű és kiküszöböli a hidrodinamikai szimulációk alkalmazását, azonban hátránya az alacsony áteresztőképessége, mely a manuálisan koordinált mikromanipulációból adódik.

Adhéziós erőmérés mikrofluidikai áramlási csatornával

Referencia mérésként műanyag áramlási kamrákat használtam 6 párhuzamos csatornával (Ibidi, μ-Slide VI 0.1), hogy összehasonlítsam a monociták adhézióját azok *in vitro* differenciáltatott leszármazottainak; a makrofágok és dendritikus sejtek adhéziós erejével. A 0,1 mm magasságú csatornákat 10 μg/ml koncentrációjú fibrinogénnel töltöttem fel és 1 órán át inkubáltam 37°C-on, ezután PBS-sel mostam a felületet. Ezt követően 1 mg/ml koncentrációjú PLL-g-PEG-et juttattam a csatornákba 30 percig, hogy gátoljam a nem specifikus sejtadhéziót. A kontroll csatornákat csak

PLL-g-PEG-gel borítottam, fibrinogén nélkül. A 2-4 x 10^{6} /ml sejtsűrűség elérése érdekében a sejteket Heraeus Pico 17 centrifuga segítségével ülepítettem (Thermo Electron Corporation) 300 g fordulaton, 6 percig. Majd 10 µl sejtszuszpenziót juttattam minden egyes csatornába. Ezután a csatornába került sejteket 30 percig inkubáltam 37°C-on párásított, 5% CO₂ atmoszférában. Inkubáció után az áramlási kamrát egy inverz fáziskontraszt mikroszkópra (Olympus CKX41, 4 x objektív lencse) helyeztem, hogy nyomonkövessem a felületre tapadt sejtek áramlás hatására bekövetkező leválását. Egy fecskendő pumpa által vezérelt, HBSS pufferrel megtöltött 50 ml-es fecskendőt a μ -Slide-hoz csatlakoztattam és az áramlási rátát lépésről lépésre növeltem, amíg a legtöbb sejtet el nem távolítottam a kezelt felületről. Az áramlási rátát minden egyes lépés során 10 mp-ig alkalmaztam. Az áramlási ráta növelése előtt és után a sejtekről képeket készítettem, hogy meghatározzam a még felületen lévő sejtek számát. Ebből aztán meghatároztam a még kitapadt sejtek számának és a kísérlet kezdetén a felületen lévő sejtek számának arányát.

Átlagos sejtterület és a sejtadhéziós erő közti összefüggés vizsgálata

Vizsgáltam az átlagos sejtterület és a sejtadhéziós erő közötti összefüggést a három sejttípus esetén. A fibrinogén felületen kitapadt, két különböző donortól származó összesen 709 monocita sejtet, 2250 makrofágot és 2946 dendritikus sejtet automatikusan detektáltattam a sok látóteres mozaik fáziskontraszt képeken a CellSorter szoftver segítségével. A sejteket befoglaló keretek (Δx) szélessége és (Δy) magassága alapján a sejtek területét (A) a következőképp becsültem meg:

$$\mathbf{A} = (\mathbf{\pi} * \Delta \mathbf{x} \Delta \mathbf{y}) / \mathbf{4}. \tag{1}$$

Azokat a ritka eseteket, amikor a detektáláskor egynél több sejt került ugyanabba a keretbe, kihagytam a számolásból.

Az áramlás mérése a mikropipettában

Az erőmérés során a mikropipetta hegyének magasságát a 2 ml ionizált vizet (Seralpur AP 30) tartalmazó Petri csésze felületétől 5 vagy 10 µm távolságra állítottam be. A mikrofluidikai rendszer PTFE csöveit ionizált vízzel töltöttem fel, azonban a fecskendőhöz csatlakozó cső végében levegőt hagytam. A csőben lévő víz és a levegő közötti határfelület egyértelműen látható volt. A folyadékszelepet aztán bezártam és a fecskendő térfogatát a 40 ml kezdeti értékről megnöveltem egy magasabb értékre, hogy

vákuumot generáljak benne. Az adott vákuum érték áramlási rátájának kiszámításához, megmértem a szelep nyitását követően a víz-levegő határfelület elmozdulását a teflon csőben. A fluidikai szelepet hosszabb időre, 20 mp-re nyitottam ki a mérés során, hogy minimalizáljam a tranziens hatásokat. A csőben lévő határfelület-elmozdulást tolómérő segítségével mértem meg. A vákuum értékeket a fecskendő kezdeti és végső térfogatából számoltam ki, korrigálva a hidrosztatikus nyomással (Hg = 270 mm) és a cső levegő tartalmával. Minden áramlási mérést ötször ismételtem meg.

Numerikus szimulációk

A felületre kitapadt egyedi sejtek adhéziós erejét nagy pontossággal tudtam mérni úgy, hogy többször egymás után, egyre nagyobb vákuum mellett próbáltam felkapni a pipetta alá pozícionált vizsgálandó sejtet. A mikropipettában kialakuló áramlás számítógépes szimulációja segítségével a fecskendőben lévő kísérleti vákuum értéket hidrodinamikai felhajtóerővé alakítottam, így meg tudtam adni a célzott sejtekre ható hidrodinamikai emelő erő becsült értékét Newton mértékegységben. Ahhoz, hogy megbecsüljük a célsejtre ható hidrodinamikai felhajtóerőt a mikropipettában, numerikus szimulációk segítségével meghatároztuk a 20 µm átmérőjű, félgömb modell sejtre ható erőt, figyelembe véve a nyomás és a nyíróerő eloszlását a modell sejtfelszínen. (A nyírófeszültség a félgömb felszínén lévő negatív nyomáshoz képest elhanyagolható volt.)

A szimuláció során fontos paraméter volt a mikropipetta apertúrája és a mikropipetta távolsága a felszíntől. Ezek vizsgálatára a 70 µm belső átmérőjű üveg mikropipettát toluidin-kék festékkel töltöttem fel és digitális mikroszkópos felvételek készítése után meghatároztam annak belső geometriáját (12. ábra).

47



12. ábra: A kísérletekben használt üveg mikropipetta belső átmérője a hegytől való távolság függvényében¹¹.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a sejt alakjának és a mikropipetta pozíciójának az emelő erőre gyakorolt hatását, 3D-s számítógépes szimulációkat futtattunk. Minden 3D-s szimuláció során a mikropipetta hegye és a Petri csésze alja közti távolság (H) 10 µm volt. A szimulációkat a COMSOL szoftvert (COMSOL Multiphysics® Modeling Software) alkalmazva végeztük a Navier–Stokes-egyenletek megoldásával. A CFD (Computation Fluid Dynamics) megközelítést alkalmaztuk, hogy kiszámoljuk a nyomás eloszlást a sejten és a kapott becsült vertikális emelő erőt. Ez a technika megoldja az alapvető áramlástani egyenleteket, valamint a további egyenleteket is, melyek modellezik a turbulencia hatását.

A numerikus szimulációkat a Petri csésze alján szabadon csúszó (free slip) peremfeltétellel (13. ábra a) és meg nem csúszó (no-slip) peremfeltétellel (13. ábra b) is olyan félgömb alakú modell sejttel futtattuk, ahol a mikropipetta a felvenni kívánt sejt

középpontját találta el. Azt is vizsgáltuk, amikor a mikropipetta a sejtet nem pontosan a középpontja fölött, hanem attól vízszintes irányban 5 μ m-es távolságban találta el a felvétel során (excentrikus pozíció). Azt tapasztaltuk, hogy az erő nagyságát az excentrikus pozíció alig változtatta meg. Az eredmények alapján tehát azt mondhatjuk, hogy a mikropipetta pozícionálási hibájának elhanyagolható hatása volt a hidrodinamikai felhajtóerőre.

A sejt alakjának a hidrodinamikai emelő erőre gyakorolt hatását egy lapos fél diszkosz alakú sejten vizsgáltuk a félgömbbel összehasonlítva szabadon csúszó (13. ábra a) és meg nem csúszó peremfeltételek (13. ábra b) mellett. Azt tapasztaltuk, hogy sejt alakjának hatása abban az esetben volt jelentős, amikor a Petri csésze alján "szabadon csúszó" peremfeltételt szabtunk ki.



13. ábra: A sejt alakjának és a mikropipetta pozíciójának emelő erőre gyakorolt hatásának vizsgálata, 3Ds szimulációkkal, a Petri csésze alján szabadon csúszó peremfeltétellel (a) és meg nem csúszó peremfeltétellel (b) számolva.

Statisztikai elemzés

Az adatokat 2-mintás, párosítatlan t-teszttel elemeztem a minták 95%-os megbízhatósággal történő összehasonlítására.

4.4.2. CD11b/CD18 és CD11c/CD18 integrinek vizsgálata immunsejteken

Az adhéziós erőmérések során vizsgált sejtek

A 4.4.1. fejezetben leírt három immunsejt: a monociták, makrofágok és dendritikus sejtek adhézióját vizsgáltam mélyebben. Az általuk legnagyobb mennyiségben expresszált receptorok a leukocita- specifikus β_2 integrinek, különösen az $\alpha_M \beta_2$ (más néven komplement receptor 3, azaz CR3, Mac-1, CD11b/CD18) és $\alpha_X \beta_2$ (más néven komplement receptor 4, azaz CR4, CD11c/CD18) integrinek. Tanulmányoztam az $\alpha_M \beta_2$ és $\alpha_X \beta_2$ integrinek ezen sejtek kitapadásához való hozzájárulását. Az ELTE Immunológia Tanszéke blokkolta számunkra az $\alpha_M\beta_2$ -t anti-CD11b antitesttel (monoklonális mIgG1 klón TMG6-5) vagy az $\alpha_X\beta_2$ integrineket anti-CD11c antitesttel (monoklonális mIgG1 klón 3.9, Biolegend) mindhárom sejten úgy, hogy a sejteket FcR receptorblokkoló szer (Miltenyi Biotech) jelenlétében 30 percig inkubálták a megfelelő antitesttel, 4°C-on. Majd a 4.4.1. fejezet "A sejttenyészetek előkészítése a mikropipettával történő erőmérésre" részéhez hasonlóan a 35 mm átmérőjű Petri csésze felületét fibrinogénnel vontam be. Ezután a nem-specifikus sejtadhéziót PLL-g-PEG polimerrel blokkoltam. Utána az antitesttel blokkolt sejteket, valamint a kontroll (antitesttel nem, csak FcR receptor blokkolóval kezelt) sejteket a csészékbe helyeztem és 30 percig, 37°C-on, 5% CO2-ot tartalmazó inkubátorban tartottam őket. Az inkubációt követően 3-4-szer mostam a sejteket HBSS pufferrel, hogy eltávolítsam az úszó sejteket. Ezt követően vizsgáltam a kitapadásukat 70 µm belső átmérőjű mikropipettával.

Fibrinogén ligandok számolása az adhezív felszínen

A fibrinogén ligandok számának meghatározására bevezettünk egy új módszert a felületi bevonatokban lévő fehérjék pontos számolására. A felületi molekulák, makromolekulák direkt számolásához általában nagy térbeli felbontású technika, például elektronmikroszkóp, atomi erőmikroszkóp vagy Röntgen-szórás szükséges. Ugyanakkor a sejtbiológiai kísérletekben használt műanyag felületeken ezek a módszerek sem képesek a kitapadt fehérjék számát megadni a hordozó felületi durvasága és egyéb technikai nehézségek miatt. Az általunk bevezetett módszer rendkívül egyszerű és mindössze standard fluoreszcensen jelölt fehérjéket keverünk. Feltesszük, hogy a jelölt fehérjék ugyanúgy tapadnak a felületre, mint a jelöletlenek. Ha minden fehérjét megjelölnék, a mikroszkóp nem tudná feloldani az egymástól néhány nanométerre lévő molekulákat. 10000:1 arányú jelöletlen:jelölt fibrinogén keverés esetében azonban a jelölt fehérjék közti távolság százszor akkora lesz, mint a jelöletlenek közti távolság. Megfelelő keverési arány mellett tetszőlegesen felnagyítható az átlagos távolság a jelölt, detektálandó fehérjék között. Így az optikai mikroszkóp mikrométeres felbontása már elegendő a képalkotáshoz. A fibrinogén molekulákat a műanyag felületen sejttaszító PLL-g-PEG bevonat alkalmazása előtt és után is megszámoltuk, és azt találtuk, hogy a PLL-g-PEG nem változtatja meg a már kitapadt fehérjék számát, amely esetünkben 2-5000 molekula/µm² volt. Ez az eredmény fontos információnak bizonyult az immunsejtek adhéziójának értelmezésekor.

Statisztikai elemzés

Az adatokat 2-mintás, párosítatlan t-teszttel elemeztem a minták 95%-os megbízhatósággal történő összehasonlítására.

4.4.3. Sejt-sejt adhéziós erő vizsgálata mikropipettával

Az adhéziós erőmérések során vizsgált sejtek, kezelések

Először egy konfluens HUVEC (human umbilical vein endothelial cell, emberi köldökvéna endotéliás sejt) sejtréteget hoztunk létre egy 35 mm átmérőjű műanyag, sejttenyésztő Petri csészében (Greiner). Majd 2 μM rMASP 1-gyel (mannán-kötő-lektin-asszociált szerin proteáz-1), 300 nM trombinnal 6 óráig vagy 10 ng/mL TNFα-val (tumor nekrózis faktor alfa) 24 óráig kezeltük őket. A kontroll tenyészetet nem kezeltük. Ezt követően az endotél sejteket tartalmazó Petri csészébe helyeztük az OG-488 (Oregon Green® 488 karbonsav-diacetát-szukcinimidil-észter-1, Invitrogen) fluoreszcens festékkel jelölt differenciált PLB 985 (dPLB 985) modell neutrofil granulocita sejteket és 60 percig, szobahőmérsékleten inkubáltuk őket. Az inkubáció után a tenyészet mosása nélkül a 4.4.1. fejezet "*Képalkotás* illetve *Sejtek detektálása, válogatása*" részében megismert módon vizsgáltam a különböző kezeléseknek kitett HUVEC sejtréteg és az egyedi neutrofil sejtek közötti adhéziós erőt 70 μm átmérőjű mikropipettával.

Statisztikai elemzés

Az adatokat egytényezős varianciaanalízissel elemeztem a minták 95 és 99%-os megbízhatósággal történő összehasonlítására.

5. Eredmények

5.1. Egyedi adherens sejtek automatizált válogatása és kis térfogatban történő lerakása

A számítógép- vezérelt mikropipetta

A korábban már bemutatásra került⁸ sejtválogató rendszert az izolált egyedi sejtek lerakására a következők szerint fejlesztettük tovább⁹ (8. ábra). Az egyedi sejtek felvételére szolgáló üveg mikropipettát egy vertikálisan motorizált, horizontálisan manuális mikromanipulátorhoz rögzített, manuálisan forgatható kar tartja (14. ábra). A motorizált mikroszkóp asztalon lévő CellSorter inzertben helyezkedik el a 35 mm-es Petri csésze a válogatni kívánt sejtkultúrával. A mikropipetta által izolált sejteket a rögzített inzerten található üveg fedőlemezre vagy PCR csövekbe tettem. Az egyedi sejtek szállítását a célhelyre úgy végeztem, hogy a motorizált asztalt a Petri csésze és a PCR csövek (vagy üveglemez) között oda-vissza mozgattam a számítógépen futó szoftver segítségével⁹.



14. ábra: Az egyedi sejtek felszedését végző 70 μm belső átmérőjű üveg mikropipettát egy manuálisan forgatható kar tartja, ami a függőleges irányban motorizált mikromanipulátorhoz kapcsolódik. A sejtek egy 35 mm átmérőjű Petri csészéből kerülnek felvételre és PCR csövekbe vagy egy vékony üveglemezre tesszük le őket⁹.

Felületre kitapadt neuroektodermális egér őssejtek (NE-4C) és humán monocita sejtek izolálása

Az NE-4C sejtekkel való kísérletek során a sejteket először DiI fluoreszcens festékkel jelöltem (10 μM, 30 perc), majd az adherens sejteket 30 mp-ig tripszin-EDTA oldattal kezeltem, hogy gyengítsem a kitapadásukat. Ezt követően fáziskontraszt képet készítettem a Petri csészében lévő sejtekről, melyeken aztán manuálisan detektáltam a sejteket. 5 különböző kísérletben összesen 99 egyedi sejt válogatását céloztam meg.

A humán monocita sejtek válogatása során a sejteket először CFSE fluoreszcens festékkel jelöltük, majd 8 kísérletben összesen 119 sejt válogatását végeztem el. Ezen sejttípus esetén 0,75-1,00 mg/ml koncentrációjú szintetikus PLL-g-PEG polimert használtam a sejtek műanyag Petri csészéhez történő adhéziójának csökkentésére.

A 15-ös ábra 17 db NE-4C és 10 db monocita sejt válogatását illusztrálja. Ezen kísérletek esetén az látható, hogy az összes manuálisan kiválasztott NE-4C sejt felvételre került (15. ábra b), míg a kiválasztott monociták közül 3 sejt a Petri csésze felületén maradt (15. ábra d). A manuálisan detektált sejtek sárga keretet kaptak. A mikropipetta által felkapott egyedi sejteket egyenként üveg fedőlemezre vagy PCR csövekbe helyeztem (16. ábra).



15. ábra: A neuroektodermális egér sejtek (a,b) és a monocita sejtek (c,d) fáziskontraszt és fluoreszcens képei a válogatás előtt (a,c) és után (b,d). A (d) ábrán lévő nyilak a válogatás után a felületen maradt sejteket mutatják. A skála hossza: 100 μm.

Egyedi sejtek parányi cseppekben történő lerakása

Az üveg fedőlemezre történő sejtlerakást azért használtam, mert így a válogatás után fáziskontraszt illetve - a sejtek fluoreszcens festékkel történő jelölésének köszönhetően - fluoreszcens módban is ellenőrizni tudtam *in situ*, hogy az apró cseppek valóban tartalmazzák-e a sejteket (16. ábra b,c). Így meg tudtam határozni, hogy a cseppek nulla, egy vagy akár több sejtet is tartalmaznak-e (1. táblázat). A fedőlemezre maximum 20 cseppet raktam le egymástól 5 mm távolságban.

Az NE-4C sejtek esetén a lerakott 99 cseppből 93 tartalmazott egyedi sejteket. Esetükben az üveglemezre helyezett cseppek $94 \pm 2\%$ -ban tartalmaztak egyedi sejteket, míg $6 \pm 2\%$ arányban nem tartalmaztak sejtet a cseppek. Nem találtam olyan cseppet, amelyben egynél több sejt lett volna (16. ábra d).

A monociták válogatásakor a lerakott cseppek $60 \pm 4\%$ -a tartalmazott egyedi sejteket és $33 \pm 5\%$ -uk nem tartalmazott sejtet (16. ábra e). A sejtet nem tartalmazó cseppeket hívjuk üres cseppeknek. A fedőlemezre helyezett cseppek térfogatát is mértem, mely az NE-4C sejtek esetén $0,7 \pm 0,03 \mu$ l, míg a monociták esetén $0,37 \pm 0,05 \mu$ l volt. Az átlag hibáját a súlyozott minta eltérés / kísérletek számának négyzetgyöke képlettel adtam meg.



16. ábra: Az üveg fedőlemezre helyezett egyedi sejtek kis cseppekben. (a) 15 egyedi NE-4C sejtet tartalmazó csepp egy vékony üveglemezen az objektívlencse felett. A cseppek közti távolság 5 mm. Az egyik cseppben lévő sejt fáziskontraszt (b) és fluoreszcens (c) mikroszkópos képe. A nyilak a cseppben lévő sejtre mutatnak. A cseppek térfogata $0.7 \pm 0.03 \mu$ l NE-4C sejtek esetében és $0.37 \pm 0.05 \mu$ l monocita sejtek esetében. Az egyedi sejtlerakás hatékonyságát mutató statisztika látható a (d) és (e) panelen NE-4C sejtekre valamint monocitákra⁹.

Sejttípus	Felület	Kezelés	Kijelölt sejtek száma	Felvett sejtek száma	Cseppek száma egyedi sejtekkel	Cseppek száma nulla sejttel	Cseppek száma több sejttel
NE-4C	Csupasz műanyag	tripszin- EDTA	20	20	20	0	0
		(30 mp)	19	19	19	0	0
			20	18	18	2	0
			20	19	19	1	0
			20	17	17	3	0
Humán monocita	PLL-g-PEG 1mg/ml (műanyag)	-	17	13	11	4	2
			20	17	15	3	2
			4	3	3	1	0
			16	12	7	9	0
	PLL-g-PEG 0,75mg/ml (műanyag)	_	19	12	10	7	2
			20	11	10	9	1
			20	14	13	6	1
			3	3	2	0	1

1. táblázat: A reprezentatív válogatási kísérletek eredménye NE-4C és monocita sejtekkel. Az adatok statisztikai összefoglalása a 16. ábrán látható⁹.

A válogatás folyamata után a Petri csésze felületén maradt sejtekről ismét mikroszkópos képet készítettem. Így össze tudtam hasonlítani a válogatás előtt és után készült képeket, aminek segítségével a válogatás útvonalán maradt sejteket azonosítani tudtam. Ezáltal a cseppekben lerakott sejtek számát a Petri csésze megfelelő területének a válogatás előtt és után történő (mikroszkópos) lefényképezésével is dokumentálni tudtam. Megvizsgáltam, hogy a kiválasztott sejtek valóban eltűntek-e a Petri csésze felületéről és azt is ellenőriztem, hogy voltak-e olyan sejtek, amelyek eltűntek a csészéből annak ellenére, hogy nem lettek kijelölve válogatásra. Ezeket az adatokat összevetettem a lerakott cseppekben tapasztalt sejtszámmal. Az NE-4C sejtek esetén 100%-os egyezést találtam. A monocitákkal való válogatás után kisebb eltéréseket tapasztaltam. A fedőlemezre tett cseppek $12 \pm 6\%$ -a üres volt, annak ellenére, hogy a mikropipetta a célsejtet felvette. Ez a hatás a nem megfelelő csepp térfogatnak tulajdonítható, vagyis ezek a sejtek nagy valószínűséggel a mikropipetta belsejében maradtak. Ez azonban a csepp térfogatának növelésével kiküszöbölhető.

A sejtek életképességét ebben a tanulmányban nem vizsgáltam, mivel a korábban bemutatásra került rendszerrel⁸ már alapos életképességi kísérleteket végeztek. Azt gondoljuk, hogy az automatizált sejt válogatási és lerakási folyamat nem befolyásolja a sejtek életképességét, ha ugyanazon vákuum és nyomás paramétereket használjuk, mint a manuális sejtlerakás során. Az egyedi sejt izolálásnak önmagában is lehet hosszú távú hatása a sejt életképességére, ez azonban független a válogatási technikától.

Az eredmények összefoglalása

Bemutatásra került egy új eszköz⁹, mely lehetővé teszi a számítógép vezérelt egyedi sejt izolálást egy sejtkultúrából. A mikropipetta egyedi sejteket tudott sikeresen felvenni egy Petri csészéből és ezeket apró cseppekben PCR csövekbe vagy üveg fedőlemezre tudta helyezni. A rendszer rugalmasan programozható, így egy ciklus alatt számos egyedi sejtet egyesével fel tud venni, majd csövekbe le is tudja tenni. A cseppek térfogata 0,4 - 0,7 µl között volt az általam vizsgált két sejttípus esetén. Tehát sikerült elérni azt a célt, hogy az egyedi sejteket 1 mikroliternél kisebb térfogatban nyerjük ki további vizsgálatok céljából. A válogatási folyamat sebessége 15-20 mp/sejt volt, tehát egy perc alatt 3-4 sejtet is képesek voltunk izolálni. Így ez a nagy hatékonyságú sejtválogató technika nagy áteresztőképességű, flexibilis berendezést biztosít az egyedi sejtek izolálására. A Petri csésze felületéről eltávolított sejtek képét mikroszkópos felvételek készítésével dokumentáltam, amely tájékoztatja a felhasználót arról, hogy az egyes PCR csövek, amelyekbe a sejteket helyeztük valóban egyedi sejteket tartalmaznak-e. A sejtek adhéziós erejét a manipulációk sikere érdekében hangolni kellett, így nem volt szükség a mások által gyakran alkalmazott sejteket csapdázó mikrostruktúrákra. Véleményem szerint az általunk alkalmazott, bonyolult megoldásokat nélkülöző, ugyanakkor flexibilis berendezés áttörést hozhat az egyedi sejtek izolálásában, mely szükséges az egyedi sejtek DNS/RNS tartalmának

szekvenálásához, illetve diagnosztikai, tumorterápiás vagy más molekuláris elemzések elvégzéséhez.

5.2. Egyedi sejtek izolálása szuszpenzióból

Az adherens sejtek felvétele során azonban problémát okozhat, hogy a túl erősen felülethez tapadó sejtek megsérülhetnek, illetve a mikropipetta által keltett hidrodinamikai felhajtóerő sokszor nem elegendő a sejtek felületről történő felvételére. A nem adherens sejttípusok felületen történő rögzítése pedig nem kívánt módon perturbálja a sejteket, megváltoztatva azok génexpressziós mintázatát is. Mivel a jelenleg elérhető robotok az egyedi sejtek manipulációja során csak a felülethez rögzített sejteket tudják használni, korlátozva ezzel az adott technika felhasználási területeit és elterjedését, kifejlesztettünk egy új eljárást¹⁰, mely képes automatikusan felismerni és izolálni az egyedi sejteket szuszpenzióból, anélkül, hogy a sejteket a Petri csésze felületéhez rögzítenénk.

Vékony szuszpenziós rétegből történő, egyedi sejtizoláló technika kifejlesztése

A szuszpenzióból történő egyedi sejt izolálásra a már megismert számítógépes látással ellátott motorizált mikroszkópot és mikropipettát használtam. Az 1 µm-es pozícionálási pontosság, az adaptív sejtcélzás és az 1 nl-nél pontosabb folyadékkezelés kombinációja egyedülálló precizitást és hatékonyságot eredményezett az egyedi sejt izolálásban. A folyadék konvekciójának minimalizálása érdekében, vagyis a szuszpenzióban lévő sejtek passzív mozgásának csökkentésére, a sejteket egy vékony (97 ± 10 µm-es) sejttenyésztő folyadékrétegben tartottam, melyet olaj fedőréteggel borítottam (17. ábra a,b). Egy kereskedelmi forgalomban kapható 3D nyomtatót használtunk arra, hogy politejsavból, 0,5 vagy 1,0 mm magas miniatűr "multi-well plate-et" építsünk a Petri csészébe (17. ábra c)¹⁰.

Megvizsgáltam a sejtek passzív mozgásának sebességét a Petri csészében. $39 \pm 12 \mu$ m/perc volt az átlagos mozgási sebesség, amikor a sejteket a hagyományos 2 mm magas sejttenyésztő rétegben tartottam, olaj fedőréteg nélkül. A sejtek "úszási" sebessége 5,4 ± 1,1 µm/percre csökkent, amikor a vékony rétegben tartott sejtszuszpenziót olaj réteggel fedtem. A leggyengébb passzív sejtmozgás akkor volt

58

megfigyelhető ($2,3 \pm 0,6 \mu$ m/perc), amikor a csészébe nyomtatott "multi-well plate" 5 x 5 mm²-es keretében hoztam létre a vékony réteget olaj lefedéssel (17. ábra b).

Utóbbi elrendezést használva, a sejtválogatás során kis, a sejtek méreténél alig nagyobb keresztmetszetű D = 30 μ m belső átmérőjű üveg mikropipettával a Petri csésze felszínét h = 5 μ m-re közelítettük meg. A megcélzott sejteket a mikropipettához csatlakoztatott nagy sebességű folyadék szelep által szabályozott enyhe vákuummal szívtuk fel.



17. ábra: Automatizált mikropipetta egyedi sejtek izolálására, vékony szuszpenziós rétegből. Az (a) panel mutatja a sejtválogatás koncepcióját. A sejtmozgás vizsgálatát ábrázolja az ábra (b) része. A Petri csészébe nyomtatott miniatűr plate látható a (c) ábrán¹⁰.

A sejt "monolayer"-t a nagyobb, 5 x 5 mm²-es keretben hoztam létre maximum 2000 sejt/mm² sűrűséggel úgy, hogy 5-10 μ l térfogatban injektáltam a sejtszuszpenziót egy manuális laboratóriumi pipettával az olaj alatti vékony sejttenyésztő folyadékrétegbe. Ritka sejttenyészetből (2000 sejt/keret) történő válogatáskor a kiválasztott egyedi sejteket az 5 x 5 mm²-es keretből a csészén belüli másik nagyobb keretbe vagy a 24 db kisebb, 2 x 2 mm²-es keretbe (9. ábra a) illetve PCR csövekbe is át tudtam helyezni. A 4 db 5 x 5 mm²-es keretet tartalmazó csészét (9. ábra b) pedig akkor használtam, amikor egymást követő válogatási és lerakási lépésekben sűrű tenyészetből (5 x 10⁴ sejt/keret) izoláltam egyedi sejteket.

Azt tapasztaltam, hogy 10000 sejt injektálásáig minden sejt a csészébe épített "multi- well-plate" kútjain belül maradt, illetve a sejtek több mint 99%-a még akkor is a kereten belül volt, amikor 5 x 10^4 sejtet juttattam a kialakított kutakba (sűrű tenyészetből történő izoláláskor). Ezzel bebizonyosodott, hogy az alacsony (1 mm) magasságú falak képesek a sejteket magukban tartani. Egy nagy sűrűségű, 5 x 10^4 sejtet tartalmazó sejtkultúra fáziskontraszt képe látható a 18. ábrán.



18. ábra: A Petri csészébe nyomtatott, 5 x 5 mm² nagyságú keretben lévő 5 x 10⁴ sejt fáziskontraszt mozaik képe. A sejteket 5 μl térfogatban injektáltam az olaj fedőréteggel borított, vékony sejttenyésztő folyadékréteg alá laboratóriumi pipettával. Az 1 mm magas falú keretek a sejtek több mint 99%-át magukban tartották¹⁰.

Az egyedi sejtek izolálása során először mikroszkópos képeket készítettem a számomra érdekes területről. Majd a fluoreszcens módban készített felvételeken automatikus detektálással kiválasztásra kerültek az izolálni kívánt sejtek. A sejtek detektálásának további optimalizálására а felhasználó különböző detektálási paramétereket állíthat be, így például a minimális és maximális fényességet, a sejtek méretét, a detektálás érzékenységét és a kép zajszintjét. Ez az eljárás mindössze néhány mp-ig (kevesebb, mint 1 percig) tart. A speciális sejtkiválasztási feladatokhoz egy külső algoritmussal működő kép szegmentáció is használható a hardvervezérlő szoftverrel összhangban. A sejtek könnyen detektálhatóak voltak a nyílt forráskódú ImageJ szoftver 'Particle Analysis' funkciójával. Ez lehetőségeset adott a kör alakú vagy elnyúlt sejtek detektálására külön-külön is.

Miután kijelölésre kerültek a sejtek az izolálási folyamathoz, elindítottam a válogatást. A sejt megcélzása során a valós idejű vizuális visszacsatolás hátrányos,

mivel a megvilágítási időt a fluoreszcens módban minimalizálni kell, hogy elkerüljük a sejtek sérülését, károsodását. Így a valós idejű visszacsatolás helyett a szoftver az adaptív sejtcélzást használta arra, hogy azonosítsa, ha a válogatási folyamat közben a felvenni kívánt sejt az eredeti pozíciójához képest elmozdult. A szoftver ezen algoritmusa a kezdeti sejt koordinátákat a teljes válogatásra szánt terület pásztázása során elmenti, majd mielőtt a soron következő sejtet felvenné, egy új képet készít, amely által az esetlegesen elmozdult sejt koordinátáit korrigálja.

A módszer lehetővé tette a sejtszuszpenziók nagy áteresztőképességű képalkotását és elemzését¹⁰, mely ~1000 sejt/perc volt ritka, illetve ~10000 sejt/perc volt sűrű sejtkultúrák esetén (19. ábra). A kiválasztott sejtek izolálása a korábbi módszerhez⁹ képest lassabb: 2-3 sejt/perc a ritka és ~1 sejt/perc a sűrű tenyészetek esetén. Azonban amikor egy kis populációt kell izolálni nagyszámú sejt közül, akkor a technika nagyon hatékony.



19. ábra: A szkennelési sebesség a sejtsűrűség függvényében. A mikroszkóp szkennelési sebességét a motorizált asztal mechanikája és a kamera expozíciós ideje limitálja. A szkennelési sebesség mérése során 10 x objektív lencsét és Andor Zyla 5.5 USB 3 kamerát használtam 4 megapixeles felbontással. A folyamat során a CellSorter szoftverben lecsökkentettem a motorizált asztal gyorsulását 1%-ra azért, hogy elkerüljem a sejtszuszpenzió esetleges rázkódását. A maximális sejtsűrűség 2000 sejt/mm² volt (3400 sejt/látótér)¹⁰.

Az új technika alkalmazása

Egyedi sejtek izolálása ritka sejtszuszpenzióból

Az új módszer alkalmazásával az egyedi sejteket $1,4 \pm 0,6$ nl térfogatban tudtuk felvenni anélkül, hogy a szomszédos sejteket eltávolítottuk volna (20. ábra a, b). A kísérletek során a sejtek méretétől alig nagyobb keresztmetszetű, 30 µm belső átmérőjű mikropipetta használatával a technika térbeli felbontása 34 ± 4 µm volt. Az egyedi sejteket válogatás során a Petri csészébe épített miniatűr plate kereteibe injektáltam 3 sejt/perc válogatási sebességgel, vagy hagyományos PCR csövekbe 2 sejt/perc válogatási idővel. A válogatás nem befolyásolta a sejtek életképességét. Az egyedi sejtek válogatási hatékonysága 78 ± 4% (egér 3T3) ill. 75 ± 3,1% (humán monocita) volt.

Bár a folyadék konvekcióját sikerült minimalizálni a vékony rétegű sejtszuszpenzió olaj réteggel való lefedésével, a sejtek passzív mozgását nem tudtuk teljesen leállítani (20. ábra c). A szoftver adaptív sejtcélzó algoritmusának köszönhetően viszont lehetővé vált, hogy a legfeljebb 50 – 100 μ m távolságra elúszott, eredetileg kijelölt sejtek kerüljenek felvételre. Az ennél távolabbra úszott sejteknél már általában nem lehettünk biztosak abban, hogy azok valóban az általunk eredetileg kijelölt sejtek voltak.



20. ábra: A képek egy egyedi sejt felvételét mutatják ritka fluoreszcens sejttenyészetből. A nyilak a kiválasztott egyedi sejt pozícióját jelölik mielőtt (a) illetve miután (b) a mikropipetta felszívta azt. Az ábra (b) részén a 30 μm belső átmérőjű mikropipetta hegye látható a felkapott sejt helyén. A (c) az egyesített 'a' (piros) és 'b' (zöld) képet mutatja, melyen megfigyelhető a sejtek elmozdulása, ugyanis a zöld színű sejtek nincsenek tökéletes átfedésben a pirosakkal¹⁰.

Egyedi sejtek izolálása sűrű sejtszuszpenzióból

A tenyészetet akkor tekintjük sűrűnek, ha a szomszédos sejtek közötti távolság kisebb, mint a válogatás felbontása. A sűrű sejtkultúrából (21. ábra) történő egyedi sejt válogatás során¹⁰ 5 x 10^4 jelöletlen és 50 fluoreszcens festékkel jelölt 3T3 sejtet helyeztem a Petri csésze egy 5 x 5 mm²-es keretébe, azonban a megcélzott jelölt sejtek kigyűjtése során az egyedi sejtek közelsége miatt jelöletlen sejteket is felkapott a mikropipetta.

A négy darab 5 x 5 mm²-es keretet tartalmazó Petri csészét (9. ábra b) használtam a válogatás során azért, hogy további válogatási ciklusokat alkalmazva a jelöletlen sejtektől megszabaduljak. Az első válogatást követően a miniatűr "multi-well plate" következő (második) keretébe helyezett sejtekről mikroszkópos képet készítettem, majd ezen keretből ismét válogatást végeztem egy következő, harmadik keretbe (ugyanazon Petri csészében), hogy tovább csökkentsem a jelölt sejtekre jutó jelöletlen sejtek számát. A három egymást követő válogatási eljárás végül egy tisztán, csak fluoreszcensen jelölt sejteket tartalmazó sejtpopulációt eredményezett (21. ábra b), jelöletlen sejtek jelenléte nélkül. A válogatás kezdetén, amikor a kiinduló tenyészet a fluoreszcensen jelölt sejtek mellett 1000-szer több jelöletlen sejtet tartalmazott, a készülék 25 ± 2 (átlag ± SEM) jelöletlen/jelölt sejtet izolált az első válogatás után. A következő ciklus során már jelentősen csökkent az egy jelölt sejtre jutó jelöletlen sejtek száma (1,8 ± 0,8/ jelöletlen sejt jutott egy jelölt sejtre). A harmadik válogatási kör után pedig már csak jelölt sejtek kerültek az új keretbe.



21. ábra: A módszerünk lehetővé tette egyedi sejtek izolálást egy olyan sűrű sejttenyészetből, mely a fluoreszcensen jelölt sejtek mellett 1000-szer több jelöletlen sejtet tartalmazott. Az (a) panel a szürkeárnyalatú ~17000 jelöletlen sejt fáziskontraszt és a 15 piros, zöld kerettel jelzett detektált fluoreszcensen jelölt sejt egyesített képét mutatja. A (b) panel az (a)-hoz hasonlóan az egyesített fáziskontraszt és fluoreszcens képet ábrázolja a három egymást követő lépés során izolált, egymástól 500 μm távolságra elhelyezett 12 fluoreszcens sejttel. Az utolsó két sejt ugyanazon a helyen található, mivel a 11. sejt lerakása nem volt sikeres, amikor a tervezett helyre kívántuk letenni¹⁰.

5.3. Egyedi sejtek izolálása mikrostruktúrából

Egyedi sejtek csapdázása és azt követő válogatása mikro-kutakból

Összehasonlítottam az új módszer hatékonyságát a mikrostruktúrákban történő egyedi sejtcsapdázással és az azt követő válogatással (22. ábra)¹⁰.



22. ábra: Összehasonlítottam a mikrostruktúrákban történő egyedi sejtcsapdázást és az azt követő, 70 μm belső átmérőjű mikropipettával történő sejtválogatást az új módszerünkkel. A válogatás útvonala látható a detektált sejtekkel az ábra (a) részén. A sárga pont az útvonal első sejtjét jelöli. A (b) rész mutatja a válogatás után készült képet a kutakban maradt sejtekkel¹⁰.

Mivel a felülethez tapadt sejtek felvételére szokásosan használt 70 µm belső átmérőjű mikropipetta térbeli felbontása 70 µm⁸, így 100 µm rácsállandójú négyzetrácsba rendezett, PDMS-ből készült mikro-kutakat (10. ábra) használtam annak érdekében, hogy elkerüljem a felvételre nem szánt sejtek kinyerését a környező kutakból. Azt tapasztaltam, hogy az egyedi sejtek kinyerési aránya jelentősen javult, amikor a válogatás nem mikro-kutakból, hanem vékony folyadékrétegből történt. Emellett a mikro-kutas rögzítés hátránya volt az is, hogy a sejtek jelentős része (~99%) elveszett a mosási lépések során. Bár ez az arány javítható a kutak közötti távolság csökkentésével, a mosási lépéssel elveszett sejtek száma továbbra is jelentős. Továbbá a mikropipetta válogatási hatékonysága csökken az egymáshoz közel zsúfolt mikro-kutak alkalmazásakor. Kísérleteimben 3T3 egér fibroblaszt sejteket és humán vérből preparált monocita sejteket használtam. A mikrokutak sejtekkel való feltöltési hatékonysága 25 \pm 8% volt 3T3 sejtek esetén, és 54 \pm 7% volt monocita sejtek esetén. A csapdázott és kiválasztott sejtek ~50%-a sikeresen izolálható volt a struktúrákból: az egyedi sejtek

válogatásának hatékonysága mikro-kutakból 49,6 \pm 10% (3T3), ill. 50,7 \pm 14% (monocita) (23. ábra) volt. Ez az arány ~75%-ra javult a vékony rétegből történő válogatások alkalmával (2. táblázat). Ami még fontosabb, hogy az új technikánk előkészítő lépései alatt elveszett sejtek számát gyakorlatilag nullára sikerült csökkenteni.



23. ábra: 3T3 egér fibroblaszt és humán monocita sejtek válogatási hatékonysága vékony folyadékrétegből (balra) illetve mikrostruktúrából (jobbra)¹⁰.

	Kiválasztott	Egyedi sejtek	Dupla sejtek	Felületen	Egyedi sejt					
	sejtek száma	száma	száma	maradt sejtek	válogatási					
				száma	hatékonyság (%)					
Válogatás mikro-kutakból										
3T3 sejtek	23	18	0	5	78					
	30	30	0	0	100					
	58	23	4	35	40					
	28	16	0	12	57					
	26	11	0	15	42					
	33	10	0	23	30					
	34	7	0	27	21					
Összesen	232	115	4	117	49,6 ± 10%					
Monociták										
	98	71	0	27	72					
	82	34	0	48	41					
	49	11	0	38	22					
Összesen	229	116	0	113	50,7 ± 14%					
Válogatás vékony folyadékrétegből										
3T3 sejtek	17	12	2	3	71					
	14	12	2	0	86					
	21	15	6	0	71					
	11	8	1	2	73					
	8	8	0	0	100					
	37	32	2	4	86					
	27	18	1	8	67					
Összesen	135	105	13	17	78 ± 4%					
Monociták										
	28	20	3	5	71					
	17	15	1	1	88					
	17	12	0	5	71					
	28	20	6	1	71					
	18	14	4	0	78					
Összesen	108	81	14	12	75 ± 3%					

2. táblázat: A ritka sejtszuszpenzióból történő egyedi sejtek izolálási hatékonyságának összehasonlítása a PDMS mikro-kutakból történő válogatás hatékonyságával. Az egyedi sejtek válogatási hatékonysága jelentősen javult: 49,6 ± 10%-ról 78 ± 4%-ra 3T3 sejtek esetében, valamint 50,7 ± 14%-ról 75 ± 3%-ra monociták esetében, amikor a sejtek kinyerése mikrostruktúrák használata helyett vékony folyadékrétegből történt¹⁰.

Az eredmények összefoglalása

Kifejlesztetésre került egy számítógépes látáson alapuló, motorizált mikroszkópot és mikropipettát alkalmazó robot, mely képes az egyedi, ép sejtek felismerésére és kíméletes, 1-2 nanoliter térfogatban történő izolálására (melyeket aztán további vizsgálatoknak, például DNS, RNS szekvenálásnak tehetnek ki) egy vékony (~100 μm) sejtszuszpenziós rétegből. Ez az egyszerű technika minimális mintaelőkészítést igényel, és gyakorlatilag bármilyen szöveti sejttípus esetén alkalmazható. Az 1 μm-es pozícionálási pontosság, az adaptív sejtcélzás és az 1 nl alatti folyadékkezelés kombinációja egyedülálló pontosságú és hatékonyságú egyedi sejtek izolálására alkalmas robotot eredményezett. A szuszpenzióból történő egyedi sejtizoláció megvalósítása érdekében a következő újítások és fejlesztések végrehajtása történt:

- Adaptív sejtcélzás annak érdekében, hogy a szoftver felismerje és kompenzálja, ha a válogatási folyamat közben a felvenni kívánt sejt az eredeti pozíciójához képest elmozdult.
- 1 nanoliter alatti folyadékkezelési pontosság a vákuum érték és a mikropipetta átmérőjének együttes optimalizálásával, valamint precíz környezeti nyomás alkalmazásával az áramlás leállítására.
- A folyadék konvekciójának minimalizálása érdekében a sejteket egy vékony, olajjal fedett folyadékrétegben tartottam.
- 3D nyomtató segítségével miniatűr "multi-well plate"-eket építettünk a Petri csészébe, hogy a kezdeti sejtkultúrát és az izolált sejteket különböző keretekben tartsuk.

A kifejlesztett robot képes volt izolálni fluoreszcens festékkel jelölt egyedi sejteket a válogatási ciklus többszöri ismétlésével egy olyan sejtkultúrából, mely 1000-szer több jelöletlen sejtet tartalmazott a fluoreszcensen jelöltek mellett. Annak érdekében, hogy kvalifikáljam a módszerünk hatékonyságát, a kutatók által gyakran használt PDMS mikrostruktúrákat is bevetettem. Vizsgáltam a sejtcsapdázás és válogatás hatékonyságát 3T3 és monocita sejtekkel. Azt tapasztaltam, hogy amikor a válogatás egy vékony folyadékrétegből történt, az egyedi sejtek kinyerési aránya jelentősen javult, és az előkészítő lépések során elvesző sejtek száma gyakorlatilag nullára csökkent. Eredményeink alapján azt jósoljuk, hogy a számítógépes látáson alapuló automatizált egy-sejt manipuláció a molekuláris sejtbiológia mindennapi technikájává válhat.

5.4. Egyedi sejtek adhéziós erejének mérése

5.4.1. Immunsejtek adhéziós erejének vizsgálata sejtadhéziós molekulákkal bevont felületeken

Ismert, hogy a legtöbb emlős sejt képes a kitapadásra, így a sejtek adhéziós erősségének meghatározása fontos feladat biológiai, biofizikai és orvosi szempontból egyaránt. Azonban a rendelkezésre álló, közvetlen erőmérésre alkalmas technikák alacsony áteresztőképessége miatt az egyedi sejtek adhéziós erejének kvantifikálása még ma is kihívást jelent. Az inverz mikroszkópra épített számítógép-vezérelt mikropipettát bevetettük egyedi humán fehérvérsejtek specifikus makromolekulákkal való kölcsönhatásának vizsgálatára¹¹, hiszen a specifikus makromolekulák felismerése és a hozzájuk való kötődés a fehérvérsejtek nélkülözhetetlen feladata az immunválasz kiváltása során. Humán primer monociták és monocitákból *in vitro* differenciáltatott makrofágok és dendritikus sejtek adhéziós erejét vizsgáltam fibrinogén felületen. A nem specifikus sejtadhéziót PLL-g-PEG polimerrel blokkoltam. Ez a kölcsönhatás orvos-biológiai szempontból központi jelentőségű a gyulladásos folyamatokban.

Egyedi sejtek adhéziós erejének mérése automatizált, 70 µm belső átmérőjű mikropipettával

A műanyag Petri csésze fibrinogén oldattal történő bevonását követően, a fehérjetaszító PLL-g-PEG^{102,103,104,105} polimert használva blokkoltam a nem-specifikus sejtadhéziót. A PLL-g-PEG a műanyag fibrinogénnel le nem fedett területeihez tapad, és így gátolja a sejtek műanyag felülethez történő közvetlen kitapadását.

A Petri csésze felületére tapadt sejteket a motorizált inverz mikroszkóp segítségével leképeztük, majd a szoftver automatikusan detektálta a sejteket. A 70 µm belső átmérőjű üveg mikropipetta az összes detektált sejtet egyenként végigjárta. A sejtadhéziót a mikropipettában lévő, pontosan szabályozott folyadékáramlás alkalmazásával mértük (24. ábra). A felületre kitapadt sejtek adhéziós erejét nagy pontossággal tudtam mérni úgy, hogy többször egymás után, egyre nagyobb vákuum mellett próbáltam felkapni a pipetta alá pozícionált vizsgálandó sejtet. Hidrodinamikai szimulációk alapján átkonvertáltuk a mikropipettához csatlakozó, fecskendőben beállított vákuum értéket az egyedi sejtekre ható emelő erővé.



24. ábra: Az egyedi sejtek adhéziós erejét mikropipettával mérő hidrodinamikai módszer sematikus ábrája. A kép közepén látható a sejt a sejtmaggal és a sejtadhéziós molekulák feltüntetésével. A fibrinogénnel bevont műanyag felületet a fehérjéket taszító PLL-g-PEG polimerrel kezeltem, hogy a nem specifikus sejtadhéziót gátoljam. Az objektív lencse a sejt alatt látható. Az ábrán metszetben látható szürke színű, 70 μm belső átmérőjű üveg mikropipetta végigjárta az összes detektált sejtet egyenként. A sejtadhéziót a mikropipettával keltett és nagy pontossággal kontrollált folyadékáramlás segítségével mértem¹¹.

A mikropipetta működése

A 4.1.-es részben megismert válogatási folyamatnak megfelelően a sejtek automatikus detektálását követően a mikropipettát tartó kart a minta fölé helyeztem, majd a Petri csésze felületét óvatosan megérintve a mikropipetta heggyel, kalibráltam annak függőleges pozícióját, melynek pontossága 1 μ m volt. A kísérlet közben a mikromanipulátor fel-le mozgatta a mikropipettát. A kísérleteket két különböző mikropipetta magassággal (5 és 10 μ m) futtattam, hogy meggyőződjek arról, hogy a módszer nem csak egy speciális beállításnál alkalmazható stabilan. A kísérletek mintegy
felét 5, másik felét pedig úgy végeztem, hogy a mikropipetta hegy 10 µm távolságra helyezkedett el a csésze felületétől. Az első sejt felszívása előtt sejttenyésztő médiumot szívtam a hegybe a sejtek ozmotikus sokkjának elkerülése érdekében. A sejtek vagy sejttörmelékek gyakorlatilag sohasem tömítették el a 70 µm-es hegyet. Egyedi sejteket céloztam: az egymáshoz túl közel elhelyezkedő sejteket kizártam a vizsgálatból.

Vákuum

A vákuumot egy fecskendőben generáltam fecskendő pumpa alkalmazásával, melynek értéke a kísérletek során 0 - 22 kPa tartományba esett. Ez úgy történt, hogy a válogatás előtt a fecskendő pumpába helyezett 50 ml-es fecskendőt 40 ml értékre állítottam be, csatlakoztattam rá a vákuum generálását biztosító, vízzel teli teflon csövet, majd 3 ml térfogatú levegőt szívtam a fecskendőbe, így 40/43 atmoszféra vákuumot kaptam. Ezt követően minden válogatási ciklus után 2 ml-enként növeltem a vákuumot egészen 40/51 atmoszféráig. Az erőmérés felbontását tehát az határozta meg, hogy mekkora lépésekben növeljük a szívóerőt. A fenti erőfelbontást használva, öt különböző erőértéken tudtam lemérni a sejteket, ~30 perc alatt. Az erőmérés felbontása tovább is növelhető, azonban ennek hátulütője az lenne, hogy lassulna a mérés. Ha kisebb lépésekben növelnénk a sejtek felvételéhez szükséges szívóerőt, akkor nem tudnánk fél óra alatt ilyen széles erőtartományt lemérni, ami azt jelentené, hogy egy adott sejttípuson ezt az erőtartományt nem lehetne egyetlen mintán lemérni.

Miután a mikropipettát a sejt fölé pozícionáltam, a vákuumot kapcsoló 1-es szelepet 20 ms időtartamra nyitottam. Minden adhéziós erőmérési ciklus után a Petri csésze területéről, amelyen a válogatást végeztük, újból mikroszkópos felvételeket készítettem, majd megnövelt vákuumot alkalmaztam a következő ciklus során. A sejtválogatási ciklust minden alkalommal ugyanazon a szoftver által megtervezett útvonalon ismételtem, egyre növelt vákuum értékkel addig, amíg a legtöbb sejt felvételre nem került a felületről.

Minden egyes adhéziós erőmérési ciklus előtt és után készült képen megszámoltam a sejteket és ez alapján határoztam meg a még felületre kitapadt sejtek arányát a kísérlet kezdetén a felszínre helyezett sejtszámhoz képest.

73

Egyedi sejtek adhéziós erejének mérése automatizált, 70 µm belső átmérőjű mikropipettával

Humán primer monociták és monocita eredetű makrofágok és dendritikus sejtek adhézióját vizsgáltam fibrinogén felületen (25. ábra)¹¹.



25. ábra: Kitapadt monociták (a,b), makrofágok (c,d) és dendritikus sejtek (e,f) fibrinogénnel borított, majd PLL-g-PEG-gel blokkolt felszínen (a,c,e) illetve a kontroll, csak PLL-g-PEG-gel fedett felszínen (b,d,f) vákuum alkalmazása előtt. Az ábra (b) részén a 70 μm belső átmérőjű mikropipetta hegye látható. A skála hossza: 100 μm¹¹.

Minden sejttípus esetén három különböző emberi donorból származó vérmintát vizsgáltam. Összesen 177 monocita, 588 makrofág és 522 dendritikus sejt adhéziós erejét mértem le mikropipettával. A Petri csészét fibrinogénnel, majd PLL-g-PEG polimerrel vontam be. A fibrinogén nélküli, vagyis csak PLL-g-PEG-et tartalmazó felületet kontrollként használtam.

Az erőmérés során a fecskendőben generált kísérleti vákuum értéket az egyedi sejtre ható hidrodinamikai emelő erővé alakítottuk a mikropipettában lévő folyadékáramlás számítógépes szimulációja segítségével. Annak érdekében, hogy megbecsüljük a célsejtre ható hidrodinamikai felhajtóerőt a mikropipettában, numerikusan szimulálva meghatároztuk egy modell (félgömb, 20 μm átmérőjű) sejtre ható erőt, figyelembe véve a nyomás és a nyíróerő eloszlását a sejtfelszínen.

A szimulációs eredmények ellenőrzése érdekében összehasonlítottuk a mikropipetta szimulált áramlási rátáját a kísérleti értékekkel (*Az áramlás mérése a mikropipettában* c. fejezet) a vákuum függvényében H = 5 μ m (26. ábra a) és H = 10 μ m (26. ábra b) mellett. Figyelembe vettük a gravitációs, a mikropipettát és a fecskendőt összekötő vékony PTFE csőben fellépő nyomásesés miatti, valamint a mikropipettában kialakuló áramlás sebessége folytán fellépő korrekciókat.



26. ábra: A szimulált áramlási ráta kísérleti értékekkel való összehasonlítása H = 5 μ m (a) és H = 10 μ m (b) mellett.

A Petri csésze alján szabadon csúszó peremfeltétellel számolva a kísérleti értékeket jobban közelítő szimulációs eredményeket kaptunk, mint a meg nem csúszó peremfeltétel esetén (26. ábra). Így a sejtet modellező félgömbre ható emelő erőt a szabadon csúszó peremfeltétellel számoltuk ki a mikropipettára kapcsolt vákuum függvényében.

Lineáris illesztéssel a következő összefüggést találtuk a hidrodinamikai emelő erő (F_L) és a mikropipettára kapcsolt vákuum (V) között: ha a mikropipetta magassága a felszíntől H = 5 µm F_L = 0,172 [nN/Pa] * V + 311 [nN] (R^2 = 0,996), és ha H = 10 µm, akkor F_L = 0,071 [nN/Pa] * V + 961 [nN] (R^2 = 0,999) (27. ábra). Ezeket az együtthatókat használtuk a kísérleti vákuum értékek becsült emelő erővé való konvertálására. A görbe meredeksége függött a kísérleti paraméterektől; leginkább a mikropipetta apertúrájától és a mikropipetta felülettől való távolságától. A lineáris összefüggés azt jelenti, hogy a hasonló kísérleti körülmények mellett beállított vákuum érték arányos lesz az emelő erővel, vagyis nem szükségesek számítógépes szimulációk, hogy összehasonlító méréseket végezzünk.



27. ábra: A H = 5 μm és H = 10 μm-en számítógépes szimulációval számolt hidrodinamikai emelő erő és a mikropipettára kapcsolt vákuum közötti összefüggés ábrázolása, lineáris illesztéssel¹¹.

Az egyedi sejtek adhéziós erejének pontosságát több tényező is befolyásolta. Az egyik tényező a mikropipetta x, y, z irányú pozíciójának pontossága, mely $\pm 1 \mu m$. Emellett további hibalehetőség adódhat a mikrofluidikai rendszer hibájából is. Abból, hogy mennyire tudjuk pontosan reprodukálni ugyanazt a folyadékáramlást, vagyis mennyire pontosan tudjuk mindig ugyanúgy beállítani a fecskendő pumpába helyezett fecskendőt, illetve a fecskendő pumpának is van egy $\pm 1\%$ -os hibalehetősége. Ezenkívül, a válogatási folyamat előtt vízzel feltöltött mikrofluidikai rendszer teflon csövéhez csatlakoztatott fecskendőbe a válogatás során folyamatosan víz kerül a sejtek felvételéből adódóan, melynek hatására kissé csökken az eredetileg beállított vákuum ereje. Az ezekből adódó hibákat összeadva 6,05%-os relatív mérési hibát kapunk a sejtek átlagos kitapadási erejének becslésére. Ez egy 100 sejtből álló populációra kiszámolt becsült érték, melynek pontos megadása nehéz, mivel kísérleti úton még nem tudjuk meghatározni az erőmérés pontosságát.

Kísérleteim során először a monociták adhéziós erejét vizsgáltam az automatizált mikropipettával 0-4,5 µN tartományban, azonban azt tapasztaltam, hogy a legtöbb sejt adhéziós ereje 0-2 µN közötti tartományba esett, így a differenciált sejtek monitorozását már ebben a szűkebb tartományban végeztem el. A 0-2,5 µN közötti intervallumban a monociták adhéziós ereje egy széles eloszlást mutatott negatív meredekséggel (28. ábra). Ezen erőtartomány alkalmazása után mindössze a sejtek 4%- át nem sikerült a felületről felvenni a mikropipettával, azonban ezeket a sejteket a maximális, 4,5 μ N erővel sem lehetett már eltávolítani. Korábban hasonló negatív meredekséget megfigyeltek az alacsony adhéziós tartományban, amikor a fibrinogénhez tapadt vérlemezkéket áramlási kamrákban vizsgálták¹⁰⁶.



28. ábra: A kitapadt monociták aránya fibrinogén és kontroll PLL-g-PEG felületen különböző emelő erők mellett, az automata mikropipettával mérve. Hidrodinamikai szimulációk alapján átkonvertáltuk a mikropipettához csatlakozó fecskendőben beállított vákuum értéket az egyedi sejtekre ható emelő erővé¹¹.

A monocitákkal elért eredmények alapján a makrofágok és dendritikus sejtek kitapadását a 0 és 2 µN közötti adhéziós erőtartományban tanulmányoztam (29. ábra). Szignifikánsan több makrofág és dendritikus sejt maradt a felülethez tapadva 0-2 µN tartományban, mint monocita. A dendritikus sejtek és a makrofágok viselkedése hasonló volt, de a dendritikus sejtek átlagos adhéziós aránya enyhén magasabb volt minden alkalmazott vákuumérték mellett. Azonban csak a zéró és a legmagasabb emelő erő értéknél volt a makrofágok és dendritikus sejtek közötti különbség szignifikáns. A PLL-g-PEG felületen a dendritikus sejtek valamivel magasabb kitapadást mutattak, mint a makrofágok.



29. ábra: Fibrinogén és kontroll PLL-g-PEG felületen a kitapadt sejtek aránya dendritikus sejtek és makrofágok esetében az emelő erő különböző értékei mellett az automata mikropipettával mérve. A * szignifikáns eltérést jelöl a dendritikus sejtek és a makrofágok között a fibrinogén felületen (P<0,05 t-próba)¹¹.

Sejtek adhéziós erejének mérése kis (5 μm) átmérőjű hidrosztatikus mikropipettával

Az általunk bevezetett, mikropipettával történő erőmérő módszer validálására a már bevált hidrosztatikus mikropipetta-manipulációs technikát (SPT, step-pressure micropipette manipulation technique)^{80,81} alkalmaztam, amellyel ellenőriztem a 70 µmes mikropipetta hidrodinamikai szimulációjából kiszámolt adhéziós erő nagysága. Összesen 34 (két különböző donorból származó) monocita sejtet mértem le ezzel a módszerrel. A kísérletek során a 70 µm belső átmérő helyett 5 µm átmérőjű üveg mikropipettát használtam a ~15 µm nagyságú sejtek hidrosztatikus körülmények közt történő felemelésére (30. ábra). A mérések folyamán először a sejtkultúrában lévő sejtek magasságát határoztam meg úgy, hogy a sejtet óvatosan megközelítettem a mikropipettával. A sejtek magassága 10-15 µm tartományba esett. Majd ezt követően az 5 μm apertúrájú mikropipettát a fibrinogénnel bevont felületen kitapadt ~15 μm-es sejt fölé vittem, beállítottam a fecskendőben generált vákuumot és a mikropipettán átfolyó áramlást szabályozó szelepet folyamatosan nyitva tartottam. A sejtek kis átmérőjű mikropipettával történő megragadásakor óvatosan megközelítettem, maid megérintettem a sejtet a mikropipetta hegyével (30. ábra a) és ezután ismét 30 µm-rel a felület fölé emeltem a hegyet. A 30-as ábrán látható piros nyíl a mikropipetta mozgását mutatja, miközben a sejtet felemeli. Ha a sejt levált a felületről, áttértem a következő sejtre, ha viszont a sejt a felületen maradt, tovább növeltem a vákuum értékét addig, amíg a kiválasztott sejtet sikerült felvenni (30. ábra b). Az adhéziós erő (F_A, adhesion force) kiszámítása a következő képlet szerint történt:

$$F_A = (p - p_0) \frac{d^2}{4\pi},$$
 (2)

ahol a p és a p_0 a mikropipettában illetve a Petri csészében lévő nyomás, d pedig a mikropipetta belső átmérője. (30. ábra). Kiszámoltam az adott vákuum értékek alkalmazása után még felületen maradt sejtek arányát (30. ábra c). A kitapadt sejtek számát az összes lemért sejt számával normáltam. (Ahhoz, hogy a grafikon a 28-29. ábrával összehasonlítható legyen, az adatokat újra kell skálázni, vagyis az egyáltalán kitapadó sejtek számával normálni.) A kísérlet előkészítésekor lemosott sejteket itt nem vettem figyelembe a mérési hiba csökkentése érdekében.

A hidrosztatikus mikropipetta-manipulációs technikával kapott eredmények tehát megerősítették a 70 µm átmérőjű mikropipetta hidrodinamikai áramlásával mért adhéziós erő nagyságát.



30. ábra: Hidrosztatikus körülmények között, a mikropipetta manipulációs technikával végzett sejtadhézió mérés egyedi monocitákon az általunk bevezetett, mikropipettával történő erőmérő módszer validálására¹¹.

Adhéziós erőmérés mikrofluidikai áramlási csatornával

Eredményeimet standard mikrofluidikai csatornákkal¹¹ is megerősítettem. Az áramlási kamra mikrofluidikai csatornáit a mikropipettás kísérletekhez hasonló módon láttam el a megfelelő bevonattal (31. ábra). Azt tapasztaltam, hogy a monociták könnyen leváltak a felületről (31. ábra b), míg a differenciált sejtek jóval nagyobb számban maradtak a fibrinogénnel bevont felszínen és a nyíróerő növelésével ezek a sejtek megnyúltak (31. ábra d, f). Az áramlási rátát tovább növelve a legtöbb sejt levált a felületről. A dendritikus sejtek és makrofágok esetén megfigyelhető volt tehát az áramlás hatása a sejt morfológiára. A nyíróerő növelésével a sejtek a folyadékáramlás irányába elnyúlttá váltak, ami befolyásolta az erőmérést (31. ábra d, f). Bár ez a jelenség endotél sejtek¹⁰⁷ esetén jól ismert, a leukociták esetén kevésbé dokumentált. Hasonló jelenség a mikropipettás erőméréskor nem volt megfigyelhető. A kísérletek során ugyanazokat a nyíróerő értékeket használtam minden sejttípusnál.



31. ábra: Kitapadt monociták (a, b), makrofágok (c, d) és dendritikus sejtek (e, f) képei fibrinogénnel bevont áramlási kamrákban. A nyilak (b,d,f) a folyadékáramlás irányát jelzik. Az ábrán látható nyíróerő értékek: 0 Pa (a, c, e); 21,3 Pa (b); 128,1 Pa (d), and 181,4 Pa (f). Skála hossza az ábra (a) részén: 100 um¹¹.

A nulla nyíróerő értéket kivéve minden alkalmazott nyírófeszültségen a monociták adhéziója szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a differenciált sejteké (32. ábra a). A kísérletek során a makrofágok és dendritikus sejtek közötti különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. Az enyhe mértékű, de következetesen megfigyelt különbség ezen két sejttípus között egyértelműen a nagyon alacsony és nagyon magas adhéziós erők csúcsainak amplitúdójában rejlik (32. ábra b). A magas adhéziós erőnél megfigyelt új csúcs megjelenése a makrofágok és dendritikus sejtek esetén egy erősen adherens alpopulációt mutat, mely a monocitákból hiányzik. Mindhárom, a PLL-g-PEG felületre gyengén kitapadt sejt esetén a kapott adatok egyetlen görbévé esnek össze a legkisebb nyírófeszültség alkalmazása után (32. ábra c). A PLL-g-PEG-gel borított csatornákban a legtöbb sejt már nagyon alacsony nyírófeszültséggel lemosható volt.



32. ábra: (a): Az adherens dendritikus sejtek, makrofágok és monociták aránya fibrinogénnel bevont és PLL-g-PEG-gel blokkolt mikrofluidikai áramlási kamrákban az alkalmazott nyírófeszültség függvényében. A * a szignifikáns eltérést jelöli a monociták és a differenciált sejtek között (P<0,05 t-próba). (b): Az (a) panelben bemutatott adatok a sejtek eloszlásának sűrűségfüggvényeként ábrázolva. (c): A sejtek kitapadása a PLL-g-PEG-gel borított áramlási csatornákban¹¹.

Megállapítható tehát, hogy a mikrofluidikai áramlási csatornákkal és az automatizált mikropipettával hasonló eredményeket kaptunk, azonban csak az utóbbi technika volt alkalmas arra, hogy szignifikáns különbséget tárjon fel a makrofágok és a dendritikus sejtek között a leggyengébb és a legerősebb adhéziójú populációban (29. ábra). A sejtek felületről történő eltávolításához szükséges nyírófeszültségnek megfelelő erő két nagyságrenddel kisebb volt, mint a mikropipetta által mért hidrodinamikai emelő erő.

Átlagos sejtterület és a sejtadhéziós erő közti összefüggés vizsgálata

Vizsgáltam az átlagos sejtterület és az adhéziós erő közti összefüggést (33. ábra). A makrofágok átlagos területe volt a legnagyobb, a monocitáké pedig a legkisebb (33. ábra d). Ugyanakkor a legerősebben kitapadt sejtek a dendritikus sejtek voltak (29. ábra), a leggyengébben tapadók pedig a monociták (28. ábra). Így az a következtetés vonható le, hogy nincs nyilvánvaló korreláció a sejtek mérete (területe) és az adhéziós erő között a vizsgált fehérvérsejtek esetében.



33. ábra: A fibrinogén felületre kitapadt monociták (a), makrofágok (b) és dendritikus sejtek (c) automatikusan, szoftver által zöld kerettel detektált fáziskontraszt képei, valamint az átlagos sejtterületük ábrázolása (d)¹¹.

Az eredmények összefoglalása

Ahhoz, hogy a sejtek adhéziójáról statisztikailag megbízható információt szerezzünk, nagyszámú sejtet kell megvizsgálnunk a biológiai szórás miatt. A közvetlen egyedi sejteken végzett adhéziós erőmérés azonban még ma is kihívást jelent és a technikák többsége alacsony áteresztőképességű. Az egyedi sejtek izolálására alkalmas számítógép-vezérelt mikropipettát egyedi sejtek specifikus makromolekulákkal való kölcsönhatásának vizsgálatára is alkalmaztam.

Emberi vérsejtek adhéziós erejét mértem. Azt tapasztaltam, hogy a humán vérből preparált monociták kevésbé tapadnak a fibrinogénhez, mint az in vitro körülmények közt differenciáltatott leszármazottaik. A legnagyobb átlagos adhéziós erőt a dendritikus sejtek mutatták. Az általunk mért adhéziós erőtartomány a FluidFMmel, HeLa sejteken mért 600 nN-os¹⁰⁸ átlagos erővel összehasonlítható volt. Az általunk használt módszert a már bevált hidrosztatikus mikropipetta-manipulációs technikával validáltam. Ezen túl eredményeimet standard mikrofluidikai csatornák segítségével is megerősítettem. Meg kell azonban jegyezni, hogy az áramlási csatornákban a sejtek felületről történő eltávolításához szükséges nyíróerő két nagyságrenddel kisebb volt, mint a mikropipetta által mért hidrodinamikai emelő erő. Ez a különbség egy feltételezett "cipzár hatásnak" tulajdonítható, vagyis annak, hogy a sejtek eltávolíthatóak a felületről a teljes adhéziós erő töredékével, ha a nyíróerő a molekuláris kötéseket nem egyszerre, hanem egymás után szakítja fel. Ezért a mikropipettát alkalmazó adhéziós teszt az egyedi sejtek teljes adhéziós erejét jobban karakterizálja, mint a nyírófeszültséget (hosszú ideig) alkalmazó módszerek.

A kísérletek felfedtek egy a fibrinogénhez erősen kitapadó sejtpopulációt, amely megjelenik a makrofágokban, még jelentősebb hányadát teszi ki a dendritikus sejteknek, de hiányzik a monociták közül. Az áramlási kamrákban történő erőmérések során, amikor nyíróerő választja le a sejteket a felületről, a differenciált sejtek esetén megfigyelhető volt az áramlás hatása a sejt morfológiára. A nyíróerő növelésével a sejtek a folyadékáramlás irányába elnyúlttá váltak. Hasonló hatás a mikropipettával történő erőméréskor nem volt megfigyelhető, mely azt mutatja, hogy az adhéziós erőmérések értelmezése minden bizonnyal egyszerűbb a mikropipetta alkalmazásakor. A sejtmorfológia változása összefüggésben van számos más, citoszkeletont érintő változással, mely befolyásolja az adhéziót és így az erőmérést. Ezen műtermék kiküszöbölésére a nyírófeszültség helyett a mikropipetta által létrehozott hidrodinamikai

84

emelő erő alkalmazását javasoljuk. Ha azonban a kísérlet célja az, hogy a nyíró áramlásra adott sejtes választ tanulmányozzuk a statikus sejtadhézió helyett, akkor tangenciális áramlásra van szükség.^{109,110} Mindent összevetve tehát elmondható, hogy az automatizált mikropipetta nagyobb érzékenységet nyújtott és kevesebb mellékhatást okozott a sejtekben, mint a nyíró áramlás a mikrofluidikai csatornákban.

A technikánk hátránya az AFM-hez képest az indirekt volta. Az adhéziós erő értékének meghatározásához hidrodinamikai szimulációkat kell végezni. A célsejtre ható becsült erő függ a sejt alakjától. Jelen tanulmányban a három általam vizsgált sejt alakja hasonló volt. Az AFM erő-spektroszkópiája lehetővé teszi a sejt leválási folyamatának vizsgálatát. Ahhoz azonban, hogy a mikropipettával kinetikai adatokat nyerjünk, nagy sebességű kamera szükséges, hogy nyomon tudjuk követni az áramlás során a sejtek leválását.

Következő célunk az, hogy az adhéziós erő széles eloszlásának molekuláris hátterét tárjuk fel úgy, hogy az automatizált mikropipettát a sejtfelszíni adhéziós fehérjék fluoreszcens jelölésével és egyedi sejtek RNS-ének szekvenálásával kombináljuk.

5.4.2. CD11b/CD18 és CD11c/CD18 integrinek vizsgálata immunsejteken

A kísérleteimben használt humán immunsejtek különböznek a CD11b/CD18 és CD11c/CD18 exressziójában; a monociták fejezik ki a legkevesebbet, míg a dendritikus sejtek expresszálják a legtöbb receptort. Tanulmányoztam az CD11b/CD18 és CD11c/CD18 integrinek monociták, makrofágok és dendritikus sejtek kitapadásához való hozzájárulását¹². Először blokkolásra kerültek a CD11b/CD18 vagy a CD11c/CD18 integrinek mindhárom immunsejten, majd vizsgáltam a fibrinogén felülethez történő kitapadásukat automatizált mikropipettával.

Azt tapasztaltam, hogy a CD11b/CD18 blokkolása erősítette a dendritikus sejtek (34. ábra a) és a makrofágok (34. ábra b) kitapadását, míg gátolta a monociták (34. ábra c) adhézióját a fibrinogénhez. Ha a CD11c/CD18-at gátoltuk, akkor mindhárom vizsgált sejttípus gyengébb adhéziót mutatott a kontrollhoz képest. Az eredmények alapján a CD11c/CD18 a legfontosabb receptor, ami a monociták, makrofágok és dendritikus sejtek fibrinogénhez történő erős kitapadását közvetíti. Meglepő módon azonban a CD11b/CD18 receptor blokkolása után a fibrinogén felülethez még erősebben tapadó dendritikus sejtek (34. ábra a) és makrofágok (34. ábra b) voltak megfigyelhetőek, ami

azt mutatja, hogy bár a CD11b/CD18 irodalmi adatok alapján kötődik a fibrinogénhez, mégis negatív szerepe van az adhézióban. Ez a monocitákra (34. ábra c) nem volt igaz, esetükben ugyanis mind a CD11b, mind pedig a CD11c receptor blokkolása csökkentette az adhézió erejét.



34. ábra: Dendritikus sejtek (a), makrofágok (b) és monociták (c) adhéziójának vizsgálata fibrinogénnel borított, majd PLL-g-PEG-gel blokkolt felületen a CD11b/CD18 vagy CD11c/CD18 receptorok antitestekkel történő gátlását követően. Az adatok a három különböző donortól származó minták átlagát/kontroll sejtek átlagát és a +/- SEM értékeket reprezentálják¹². A * szignifikáns eltérést jelöl a CD11b/CD18 és CD11c/CD18 receptor blokkolásával kapott eredmények között a fibrinogén felületen a különböző vákuum értékek mellett (P<0,05 t-próba).</p>

Hipotézisünk szerint a fibrinogénhez való adhézió függ a sejtfelszínen lévő C11b/CD18-CD11c/CD18 receptorok számától. Kísérleteink során megszámoltuk az integrinek számát a sejteken, illetve a fibrinogén ligandok (35. ábra) számát az adhezív felszínen. Ezek az eredmények fontos információnak bizonyultak az immunsejtek adhéziójának értelmezésekor.



35. ábra: Az ábrán 10000:1 arányban kevert jelöletlen:jelölt fibrinogén molekulák képe látható. A képeket műanyag Petri csészében epifluoreszcens mikroszkópon 63 x-os nagyítású objektívvel rögzítettük vizes pufferben a ki nem tapadt fibrinogén lemosása és a PLL-g-PEG bevonat felvitele után. Míg az (a) ábra az eredeti fluoreszcens képet mutatja, a (b) képen az ImageJ szoftver segítségével automatikusan detektált és megszámolt 99 db részecske látható.

A makrofágok és dendritikus sejtek esetén, a CD11b/CD18-CD11c/CD18 integrinek száma ugyanazon tartományba esett, mint a fibrinogén ligandok száma az adhezív felületen. Azonban ezen 2 integrin típus száma a monocitákon kisebb volt, mint a rendelkezésre álló ligandok száma.

5.4.3. Sejt-sejt adhézió vizsgálata mikropipettával

A számítógép- vezérelt mikropipetta lehetővé tette azt is, hogy sejt-sejt kapcsolatok adhéziós erejét vizsgáljuk¹³. Így a dPLB-985 neutrofil sejtek és az rMASP-1, trombin vagy TNFα kezelt, valamint a kezeletlen HUVEC sejtek közötti adhéziós erőt számszerűsíteni tudtuk. A különböző felületekre kitapadt neutrofileket minden válogatási folyamat után megemelt vákuummal próbáltam eltávolítani a HUVEC rétegről. A kísérlet elvégzésére a Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinikája kért fel minket, akik arra voltak kíváncsiak, hogy van-e különbség a különböző kezeléseknek kitett endotél sejtrétegre kitapadt neutrofilek adhéziós

erejében. Azt tapasztaltam, hogy a vártnak megfelelően a pozitív kontrollként használt TNF α kezelésnek volt a leghatékonyabb adhéziófokozó hatása és a TNF α -val kezelt endotél sejtrétegre tapadtak a legjobban a neutrofilek. Az rMASP-1 illetve a trombin kezelésnek hasonló hatása volt; kisebb mértékben, de szintén segítették az endotél rétegre történő kitapadást (36. ábra). A kutatást végző csoport egy 96- lyukú lemezen is elvégezte az endotél sejtek rMASP-1-gyel, trombinnal vagy TNF α -val való kezelését. A kezelt/kezeletlen felületet neutrofilekkel inkubálták és ezt követően az úszó sejteket lemosva mérték a kitapadt sejtek fluoreszcenciáját. Az általuk kapott eredmények összecsengtek a mikropipettás eredményekkel¹³.



36. ábra: A dPLB-985 neutrofil sejtek rMASP-1-gyel, trombinnal vagy TNFα-val kezelt endotél sejtréteghez történő adhéziós erejének meghatározása. A kezelések hatására endotél sejtekhez kitapadt neutrofil sejtek számát a kezeletlen HUVEC-hez tapadó neutrofilek számával normáltam¹³. A kezeletlen kontroll adatokat a piros vonal jelzi. A * a különböző kezelésnek kitett endotél rétegre helyezett neutrofilek és a kontroll tenyészet közötti szignifikáns eltérést jelzi a különböző vákuum értékek mellett (*P<0,05, **P<0,01 egytényezős varianciaanalízis).</p>

6. Összefoglalás

PhD tanulmányaim alatt részt vehettem egy olyan technika fejlesztésében, mely nem csak egyedi sejtek kinyerését, de a sejtek adhéziós erejének meghatározását is lehetővé teszi.

Az egyedi sejtekkel végzett vizsgálatok az utóbbi időben rendkívül fontossá váltak, hiszen a biológiai rendszerek (még a parányi sejtek szintjén is) komplex viselkedést mutatnak. A humán genom program óta számos második generációs DNS-szekvenáló technika jelent meg, és ezek a genom szekvenálását, újra szekvenálását, az ún. "transzkriptom", vagyis az mRNS-ek szekvenálását, a DNS-fehérje kölcsönhatások és az epigenom vizsgálatát lehetővé tevő nagy áteresztőképességű, költséghatékony módszerek napjainkban forradalmasítják a molekuláris biológiát. Ezen technikák fejlődésének következtében lehetőség nyílik akár egyedi sejtek teljes DNS és/vagy mRNS állományának szekvenálására.

Az egyedi sejtekkel végzett kutatások a gyógyításban is hasznos információkat adhatnak például a rákos betegségek hátteréről, ugyanis a rákos szövet jellemző tulajdonsága, hogy a benne lévő sejtek genetikai és transzkripciós szempontból is nagyon különbözőek. Emellett az egyedi sejtek transzkripciós mintázata az embriógenezisben és a szöveteink közti különbségek feltárásában is központi jelentőségű.

Az egyedi sejtekkel történő vizsgálatok elvégzésénél az egyik legnagyobb technikai nehézséget az ép, egyedi sejtek izolálása jelenti, ugyanis a legtöbb erre alkalmas technika alacsony áteresztőképességgel rendelkezik. Az ELTE Biológiai Fizika Tanszékén működő számítógép-vezérelt mikropipetta azonban alkalmas a Petri csésze felületére rögzített egyedi sejtek válogatására 3-4 sejt/perces válogatási sebesség mellett. Rendkívül fontos azonban a válogatáskor kinyert egyedi sejteket tartalmazó cseppek térfogata. Az izolált sejtekkel végzett (például szekvenálási) eljárások költséges reagenseinek következtében fontos volt a sejtek minél kisebb, 1 μ l alatti térfogatban történő kinyerése. Kísérleteink során a csepptérfogatot 0,4 – 0,7 μ l közötti tartományra tudtam lecsökkenteni. Tehát miután a felületre kitapadt NE-4C neuroektodermális egér őssejtek és a primer humán immunsejtek felvételre kerültek egy standard műanyag Petri csészéből, az egyedi sejteket parányi cseppekben sikerült letenni. A sejtek kíméletes, sérülés nélküli felvétele érdekében azonban a sejtek adhéziós erejét biokémiai úton (tripszin-EDTA alkalmazásával) vagy a felület módosításával hangolni kellett. A

lerakott cseppek $94 \pm 3\%$ -a egyedi NE-4C, illetve $60 \pm 4\%$ -a egyedi monocita sejteket tartalmazott. Módszerünket rutinszerűen és nagy szelektivitással tudtuk alkalmazni FACS-ként egészen az egyedi sejtek szintjéig.

Technikánk az egyedi sejtek izolálására azonban csak a felülethez rögzített sejteket tudta használni, korlátozva ezzel az alkalmazási lehetőségeket és a módszer elterjedését. Ezért kifejlesztettünk egy új módszert, amely képes felismerni és izolálni egyedi sejteket szuszpenzióból is, anélkül, hogy a sejteket a Petri csésze felületéhez kellene rögzíteni.

A Petri csészébe helyezett sejtek passzív mozgása minimálisra csökkent azáltal, hogy a csészébe nyomtatott 5 x 5 mm²-es keret vékony (~100 μ m-es), olajjal borított folyadékrétegébe injektáltam a sejteket. Az adaptív sejtcélzásnak köszönhetően a szoftver képes volt felismerni, ha a válogatási folyamat közben a felvenni kívánt sejt az eredeti pozíciójához képest elmozdult, így mielőtt a soron következő sejtet a mikropipetta felvette volna, a szoftver mindig egy új képet készített, amely által az esetlegesen elmozdult sejt koordinátáit korrigálni tudta. Kísérleteimben a kutatók által gyakran használt modell sejtet, a 3T3 egér fibroblasztot, valamint humán vérből preparált monocita sejtet használtam, hogy teszteljem az egyedi sejtek válogatásakor a módszer hatékonyságát.

Ugyanezen sejteket használva vizsgáltam a mikrostruktúrákban történő egyedi sejtcsapdázást, majd az ezt követő válogatási hatékonyságot is. A csapdázott és kiválasztott sejtek ~50%-a sikeresen izolálható volt a struktúrákból. Ez az arány azonban ~75%-ra javult a vékonyrétegből történő válogatások alkalmával. A mikro-kutakban történő sejt rögzítéskor azonban a sejtek jelentős része (általában többsége) elveszett a mosási lépések során. Így fontos előrelépés volt, hogy a sejtválogatást megelőző lépésekben a vékonyrétegből történő válogatáskor az elvesző sejtek számát sikerült leszorítani praktikusan nullára.

Az új módszer nemcsak a ritka (~2000 sejtet tartalmazó) sejttenyészetből történő egyedi sejt izolációt tette lehetővé, hanem azt is, hogy sűrű (~5 x 10⁴ sejtet tartalmazó) tenyészetből fluoreszcens festékkel megjelölt egyedi sejteket tudjunk kinyerni úgy, hogy a fluoreszcensen jelölt sejtek mellett a kultúra 1000-szer több jelöletlen sejtet tartalmazott. A megcélzott jelölt sejtek kigyűjtése során az egyedi sejtek közelsége miatt jelöletlen sejteket is felkapott a mikropipetta, azonban a válogatási folyamat többszöri megismétlésével (esetünkben három válogatási ciklus volt szükséges) az izolálandó egyedi, fluoreszcens sejteket sikerült megtisztítani a jelöletlen, felvételre nem szánt

sejtektől. Mivel a technika minimális mintaelőkészítést igényel és gyakorlatilag bármilyen szöveti sejttípus esetén alkalmazható, úgy gondolom, hogy a képalapú, automatizált egy-sejt manipuláció a molekuláris sejtbiológia mindennapi technikájává válhat.

A sejtadhézió jelensége alapvető a többsejtű élőlények számára. Mivel az emlős sejtek többsége képes a kitapadásra, az adhéziós erejük meghatározása biofizikai és orvosi szempontból egyaránt indokolt. Azonban az egyedi sejtek adhéziós erejének közvetlen meghatározására alkalmas technikák (elsősorban az AFM) alacsony áteresztőképességűek: kísérletenként csak kisszámú sejt mérhető le velük.

A számítógép-vezérelt mikropipetta egyedi sejtek specifikus makromolekulákkal való kölcsönhatásának vizsgálatára is alkalmazható volt. Kísérleteim során immunsejtek: humán primer monociták és monocitából *in vitro* differenciáltatott makrofágok és dendritikus sejtek adhéziós erejét vizsgáltam fibrinogén felületen. A nem specifikus sejtadhéziót a fehérjéket taszító PLL-g-PEG polimerrel blokkoltam. A felületre kitapadt sejtek adhéziós erejét nagy pontossággal tudtam mérni úgy, hogy többször egymás után, egyre nagyobb vákuum érték alkalmazása mellett próbáltam felvenni a vizsgálandó sejtet. Ahhoz, hogy meg tudjuk becsülni a célsejtre ható hidrodinamikai emelő erő értékét, a mikropipettában kialakuló áramlás számítógépes szimulációja volt szükséges.

Azt tapasztaltam, hogy a monociták voltak a legkevésbé adherensek a fibrinogénnel bevont felületen. A dendritikus sejtek és a makrofágok viselkedése hasonló volt, de a dendritikus sejtek átlagos adhéziós aránya kissé magasabb volt minden alkalmazott vákuum érték mellett. Az általunk bevezetett módszerrel rövid idő (~30 perc) alatt több száz, specifikus makromolekulákhoz kapcsolódott sejt adhéziós erejét sikerült lemérni, mely azt mutatja, hogy a technika alkalmas a nagy áteresztőképességű direkt erőmérésre.

Az általunk bevezetett módszert hidrosztatikus mikropipetta manipulációs technikával validáltam. Így kísérleti úton ellenőrizni tudtam a 70 µm belső átmérőjű mikropipettában kialakuló áramlás hidrodinamikai szimulációjából számolt adhéziós erő nagyságát. A hidrosztatikus mikropipetta manipulációs technikával kapott eredmények megerősítették a hidrodinamikai úton mért adhéziós erő nagyságát.

Ezen túl az eredményeimet alátámasztottam standard mikrofluidikai csatornákban mérve a kitapadt sejtekre ható nyíróerőt. A kísérletek felfedtek egy, a fibrinogénhez erősen kitapadó sejtpopulációt, amely megjelenik a makrofágokban, még jelentősebb hányadát teszi ki a dendritikus sejteknek, de hiányzik a monociták közül. A

két különböző technika hasonló eredményeket adott, azonban csak az automatizált mikropipetta volt alkalmas arra, hogy a legalacsonyabb és a legmagasabb adhéziós erőknél szignifikáns különbséget tárjon fel a makrofágok és a dendritikus sejtek között. A mikrofluidikai csatornákkal összevetve az automatizált mikropipetta nagyobb érzékenységet nyújtott és kevesebb mellékhatást okozott a sejtekben. Módszerünkkel a vizsgált egyedi sejtek könnyedén felkaphatók, izolálhatók és más technikákkal tovább vizsgálhatók, amely a számítógép-vezérelt mikropipetta határozott előnye.

Ugyanezen immunsejteket további vizsgálatoknak is alávetettem. Tanulmányoztam az általuk expresszált CD11b/CD18 és CD11c/CD18 integrinek fibrinogén felületre történő kitapadásukhoz való hozzájárulását az automatizált mikropipettával. Azt tapasztaltam, hogy a CD11c/CD18 blokkolása mindhárom sejttípuson gátolta, míg a CD11b/CD18 receptor blokkolása a differenciált sejtek esetén meglepő módon erősítette a sejtek fibrinogén felületre tapadását. Ez utóbbi effektus a monocitáknál nem lépett fel; esetükben mind a CD11b, mind pedig a CD11c receptor blokkolása csökkentette az adhézió erejét. Az eredmények alapján az feltételezhető, hogy a makrofágok és dendritikus sejtek esetén kompetitív gátlás történik, a két hasonló integrin verseng a mindkettőjük által köthető fibrinogén ligandokért. Ezzel szemben a monociták esetén a ligand megkötéséért nem folyik verseny a két receptor között, hanem inkább együtt vesznek részt az adhéziós folyamatban. Ez azzal magyarázható, hogy rajtuk kisebb az integrinek sűrűsége az általunk használt felületi ligand sűrűségnél. A feltevés megerősítéséhez további mérések szükségesek neutrofil sejteken. A neutrofilek ugyanis mindkét receptort a monocitákhoz hasonló mértékben expresszálják. Az eredmények alapján úgy gondoljuk, hogy a CD11b/CD18 gyengébb kitapadást közvetít, mint a CD11c/CD18, így a CD11b/CD18 receptor blokkolása (nem várt módon) növelheti a sejtek adhéziós erejét azáltal, hogy több CD11c/CD18 receptor kötődhet a fibrinogén molekulákhoz, ha a ligand sűrűsége limitált. Ez az indirekt receptor-kölcsönhatás tudomásunk szerint egy eddig le nem írt mechanizmus az immunológiában.

Ezeken túlmenően sejt-sejt kapcsolatok adhéziós erejének vizsgálatára is alkalmasnak bizonyult a technika. Az általunk kifejlesztett műszer különbséget tudott tenni három különböző (orvosi relevanciával bíró) kezelésnek (TNFα, trombin, rMASP-1) kitett endotél sejtrétegre kitapadt neutrofilek adhéziós erejében. Véleményem szerint az általunk alkalmazott, bonyolult megoldásokat nélkülöző, ugyanakkor flexibilis számítógép- vezérelt mikropipetta az egyedi sejtek izolálásában és manipulációjában áttörést hozhat.

7. Új tudományos eredmények

7.1. Tézispontok

1. A számítógép-vezérelt mikropipetta lehetővé tette a Petri csésze felületén immobilizált egyedi sejtek detektálását, válogatását mikroszkópon. Sikerült minimalizálni az egyedi sejtet tartalmazó cseppek térfogatát mikroliter alatti térfogattartományra és 15-20 mp/sejt válogatási sebességgel 0,4–0,7 μ l térfogatú, egyedi sejteket tartalmazó cseppeket izolálni automatikusan PCR csövekbe, ami döntő fontosságú a további vizsgálatok szempontjából. A kísérletekhez neuroektodermális egér progenitor, és humán primer monocita sejteket használtam. Az izolált cseppek 94 ± 3% (NE-4C) és 60 ± 4%-a (monocita) tartalmazott egyetlen sejtet.

2.a. Kifejlesztettem egy új módszert, mely képes automatikusan felismerni és izolálni az egyedi sejteket szuszpenzióból, anélkül, hogy a sejteket a Petri csésze felületéhez kellene rögzíteni. A passzív sejtmozgást hajtó folyadékkonvekció minimálisra csökkentése érdekében a sejteket egy vékony (~100 μ m-es) sejttenyésztő folyadékrétegben tartottam, melyet olaj fedőréteggel borítottam. Az egyedi sejteket 1,4 \pm 0,6 nl térfogatban sikerült felvenni anélkül, hogy a szomszédos sejteket eltávolítottam volna. Az egyedi sejteket a Petri csészébe nyomtatott miniatűr "multi-well-plate" üregeibe injektáltam 3 sejt/perc sebességgel, vagy standard PCR csövekbe 2 sejt/perc válogatási sebességgel.

2.b. Összehasonlítottam az új módszer hatékonyságát PDMS mikro-kutakban történő egyedi sejtcsapdázással és az azt követő sejtválogatással. Az egyedi sejtek kinyerési aránya jelentősen javult, amikor a válogatás a vékony folyadékrétegből történt. A mikro-kutakban történő sejtrögzítéskor a sejtek jelentős része elveszett a mosási lépések során. Vékonyrétegből történő sejtválogatás során azonban az elvesző sejtek számát közel nullára szorítottam le.

2.c. Az új módszer a válogatási ciklus többszöri ismétlésével lehetővé tette fluoreszcens festékkel jelölt egyedi sejtek izolálását olyan (nagy sűrűségű) sejtkultúrából is, mely 1000-szer több jelöletlen sejtet tartalmazott a jelöltek mellett. A technika minimális mintaelőkészítést igényel és gyakorlatilag bármilyen szöveti sejttípus esetén alkalmazható.

3.a. A számítógép-vezérelt mikropipetta egyedi sejtek adhéziós erejének meghatározására is alkalmas volt. Egyedi humán fehérvérsejtek: primer monociták és monocitából *in vitro* differenciáltatott makrofágok és dendritikus sejtek adhéziós erejét vizsgáltam fibrinogén felületen. A nem specifikus sejtadhéziót a fehérjéket taszító PLL-g-PEG polimerrel blokkoltam. A mikropipettában kialakuló áramlás számítógépes szimulációja segítségével kiszámoltuk a célsejtekre ható hidrodinamikai felhajtóerő értékét. Azt tapasztaltam, hogy a monociták a legkevésbé adherensek a fibrinogénnel bevont felületen. A legnagyobb átlagos adhéziós erőt a dendritikus sejtek mutatták. Ezzel a módszerrel rövid idő (~30 perc) alatt több száz sejtet mértem le egyenként, melyek a felületet borító specifikus makromolekulákhoz kapcsolódtak.

3.b. Az automatizált mikropipettát alkalmazó erőmérő módszert a már ismert hidrosztatikus mikropipetta-manipulációs technikával validáltam. Eredményeimet egy standard eszközzel, a mikrofluidikai áramlási csatornával is alátámasztottam. A kísérletek feltártak egy, a fibrinogénhez erősen kitapadó sejtpopulációt, amely megfigyelhető volt a makrofágoknál és dendritikus sejteknél is, de hiányzott a monocitákból. Kimutattam, hogy az automatizált mikropipetta nagyobb érzékenységet nyújtott, mint a nyíró áramlás a mikrofluidikai csatornákban.

3.c. Tanulmányoztam a CD11b/CD18 és CD11c/CD18 integrinek monociták, makrofágok és dendritikus sejtek kitapadásához való hozzájárulását mikropipettával. Eredményeim arra mutatnak, hogy a makrofágokban és dendritikus sejtekben kompetitív gátlás lép fel a kétféle receptor közt, vagyis a két hasonló integrin versenyez az elérhető fibrinogén ligandokért. Monocitákban ez nem volt megfigyelhető, ami azzal magyarázható, hogy rajtuk az általunk alkalmazott felületi ligand sűrűségnél kisebb ezeknek az integrineknek a sűrűsége.

3.d. Az automatizált mikropipetta lehetővé tette sejt-sejt kapcsolatok adhéziós erejének vizsgálatát is. Három különböző kezelésnek kitett (TNFα, trombin, rMASP-1) humán endotél (HUVEC) sejtréteg neutrofil sejtek adhéziójára kifejtett hatását mértem le, és kaptam orvosi szempontból is releváns eredményeket.

7.2. Thesis points

1. The computer-controlled micropipette allows the automated detection, manipulation and sorting of single cells in a Petri dish. It could be minimized the drop volume (0.4– 0.7 μ l) to reach the submicroliter regime, as it is a crucial parameter when subsequent measurements on cells. Droplets containing individual cells could be deposited into PCR tubes with a sorting speed of 15-20 seconds/cell. I used neuroectodermal mouse stem cells and human monocytes in my experiments. 94 ± 3% and 60 ± 4% of the deposited drops contained single cells for NE-4C and monocytes, respectively.

2.a. It has been developed a new method to automatically recognize and gently isolate intact individual cells from suspension without immobilizing cells on the surface of the Petri dish. To minimize fluid convection, cells were kept in a thin (~100 μ m) layer of buffer or culture medium covered with oil. Single cells could be picked up in a volume of 1.4 ± 0.6 nl without removing neighboring cells. Single cells were injected either into the wells of the miniature plate with a sorting speed of 3 cells/min or into standard PCR tubes with 2 cells/min.

2.b. I compared the efficiency of this method to that of single cell entrapment in microwells and subsequent sorting with the automated micropipette. The recovery rate of single cells was greatly improved when sorting from a thin layer of suspension instead of using microwells. In case of microwells most of cells were lost in washing steps. However, the number of cells lost in the preparation steps of the new technique was practically zero.

2.c. The new method enabled to isolate fluorescent cells also from dense cultures containing 1,000 times more unlabeled cells by the successive application of the sorting process. The technique needs minimal sample preparation, and can be applied for virtually any tissue cell type.

3.a. The technique can be used to determine adhesion strength of individual cells. I studied the adhesion force between individual human white blood cells: primer monocytes and monocyte derived macrophages and dendritic cells to fibrinogen. I blocked nonspecific cell adhesion by the protein repellent PLL-g-PEG polymer. The estimated hydrodynamic lifting force acting on target cells was calculated by the numerical simulation of the flow at the micropipette tip. I found that monocytes are less

adherent to fibrinogen than their *in vitro* differentiated descendants. Dendritic cells produced the highest average adhesion force. Using the introduced methodology hundreds of cells adhered to specific macromolecules were measured one by one in a relatively short period of time (~30 min).

3.b. Magnitude of the hydrodynamic lifting force was confirmed by the hydrostatic step-pressure micropipette manipulation technique. My results were reinforced in standard microfluidic shear stress channels. The experiments revealed the existence of a sub-population of highly adherent cells among macrophages and dendritic cells. Nevertheless, automated micropipette gave higher sensitivity and less side-effect than the shear stress channel.

3.c. I studied the contribution of the CD11b/CD18 and CD11c/CD18 integrins to the adhesion of monocytes, macrophages and dendritic cells. Based on my results, it can be assumed that a competitive inhibition occurs on macrophages and dendritic cells as the two similar integrin types compete for the ligands. In case of monocytes, there is no competition between the two receptors for ligand binding since there is enough ligand for both receptors.

3.d. The force of cell-cell adhesion could be investigated with the automated micropipette. I measured the effect of 3 different endothelial cell monolayer (HUVEC) treatments (TNF α , trombin, rMASP-1) to the neutrophil adhesion. The technique was sensitive enough to make difference between the impacts of medically relevant drugs.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Szabó Bálintnak és Dr. Horváth Róbertnek, amiért lehetőséget biztosítottak nekem, hogy a kutatócsoport tagja lehessek. Hálás vagyok nekik a rengeteg segítségért és szakmai útmutatásét, amit kaptam tőlük az évek során. Nagyon sokat tanulhattam tőlük.

A Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport munkatársainak (Dr. Székács Inna, Dr. Kurunczi Sándor) és PhD hallgatóinak (Péter Beatrix, Patkó Dániel, Kovács Boglárka, Nádor Judit, Orgován Norbert, Saftics András) is szeretnék köszönetet mondani. Köszönöm a számos közös élményt és konferenciautazást, amit az elmúlt évek alatt együtt élhettünk át. Örülök, hogy megismerhettem őket és új barátokra tehettem szert.

Köszönet Dr. Fürjes Péternek és Holczer Eszternek a mikrostruktúrákért, Dr. Környei Zsuzsannának az NE-4C sejtekért, az ELTE Immunológia Tanszékének (Dr. Sándor Noémi, Lukácsi Szilvia, Dr. Bajtay Zsuzsa, Prof. Erdei Anna) az immunsejtekért.

Köszönettel tartozom Dr. Hős Csabának a számítógépes szimulációért.

Köszönöm Prof. Vonderviszt Ferencnek a tanulmányaim során nyújtott segítségét, tanácsait. Köszönöm, hogy lehetővé tette számomra, hogy hazai és nemzetközi, szakmai konferenciákon részt vehessek.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni férjem, édesanyám, húgom, nagyszüleim, valamint barátnőim támogatását és türelmét. Hálás vagyok nekik a bíztatásukért.

9. Saját publikációk jegyzéke

9.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

- <u>R. Salánki</u>, T. Gerecsei, N. Orgovan, N. Sándor, B. Péter, Zs. Bajtay, A. Erdei, R. Horvath, B. Szabó. Automated single cell sorting and deposition in submicroliter drops. Appl. Phys. Lett. 105, 083703 (2014).
- <u>R. Ungai-Salánki</u>, T. Gerecsei, P. Fürjes, N. Orgován, N. Sándor, E. Holczer, R. Horváth, B. Szabó. Automated single cell isolation from suspension with computer vision. Scientific Reports (2016). | DOI: 10.1038/srep20375
- <u>R. Salánki</u>, Cs. Hős, N. Orgovan, B. Péter, N. Sándor, Zs. Bajtay, A. Erdei, R. Horvath, B. Szabó. Single cell adhesion assay using computer controlled micropipette. PLoS ONE 9(10): e111450. (2014).
- N. Sándor, Sz. Lukácsi, <u>R. Ungai-Salánki</u>, N. Orgován, B. Szabó, R. Horváth, A. Erdei, Zs. Bajtay. CR4 (CD11c/CD18) dominates adhesion of human monocytes, macrophages and dendritic cells over CR3 (CD11b/CD18). (Beküldve: Cellular and Molecular Life Sciences.)
- P. K. Jani, E. Schwaner, E. Kajdácsi, M. L. Debreczeni, <u>R. Ungai-Salánki</u>, J. Dobó, Z. Doleschall, J. Rigó Jr., M. Geiszt, B. Szabó, P. Gál L. Cervenak. Complement MASP-1 enhances adhesion between endothelial cells and neutrophils by up-regulating E-selectin expression (Beküldve: Journal of Biological Chemistry.)

9.2. A disszertációhoz közvetlenül nem kapcsolódó publikációk

- N. Orgovan, <u>R. Salánki</u>, N. Sándor, Zs. Bajtay, A. Erdei, B. Szabó, R. Horvath. In-situ and label-free optical monitoring of the adhesion and spreading of primary monocytes isolated from human blood: dependence on serum concentration levels. BIOSENSORS & BIOELECTRONICS (ISSN: 0956-5663) 54: pp. 339-344. (2014).
- 2. B. Peter, <u>R. Ungai-Salanki</u>, A. Dobos, I. Szekacs, N. Orgovan, Sz.Bősze, R. Horvath. Effects of EGCG on cancer cell adhesion and spreading measured by a

high-throughput label-free resonant waveguide grating biosensor (Beküldés előtt)

 N. Orgovan, <u>R. Ungai-Salánki</u>, N. Sándor, Zs. Bajtay, A. Erdei, B. Szabó, R. Horváth. Label-free monitoring of the adhesion kinetics of primary human monocytes, dendritic cells and macrophages on fibrinogen- and PLL-g-PEG-RGD-coated surfaces (Beküldés előtt)

9.3. Konferencia szereplések, előadások

- <u>R. Salánki</u>, N. Orgován, B. Péter, N. Sándor, Zs. Bajtay, A. Erdei, R. Horváth, B. Szabó. Élő emlős sejtek automatikus detektálása és válogatása mikroszkópon. A Magyar Biofizikai Társaság XXIV. Kongresszusa, Veszprém, Magyarország (2013) poszter
- N. Orgován, <u>R. Salánki</u>, B. Péter, N. Sándor, Zs. Bajtay, A. Erdei, B. Szabó, R. Horváth. Vérből izolált humán monociták adhéziójának vizsgálata OWLS-sel. A Magyar Biofizikai Társaság XXIV. Kongresszusa, Veszprém, Magyarország (2013) előadás
- <u>R. Salánki</u>, N. Orgován, B. Péter, N. Sándor, Zs. Bajtay, A. Erdei, R. Horváth,
 B. Szabó. Számítógépes látással detektált egyedi sejtek válogatása, előadás,
 MBFT kongresszus, Veszprém, Magyarország (2013) előadás
- <u>R. Salánki</u>, N. Orgován, B. Péter, N. Sándor, R. Horváth, B. Szabó. Automated single cell sorting and deposition. Single Cell Analysis Europe, Barcelona, Spanyolország (2013) poszter
- <u>R. Salánki</u>, N. Orgován, B. Péter, N. Sándor, R. Horváth, B. Szabó. Automated single cell sorting and deposition of live mammalian cells on microscope. Single Cell Genomics, Izrael (2013) poszter
- N. Orgovan, <u>R. Salánki</u>, N. Sándor, Zs. Bajtay, A. Erdei, B. Péter, Sz. Bősze, J. J. Ramsden, B.Szabó, R. Horvath. Label-free optical monitoring of the adhesion and spreading of human primary immune cells and human tumor cells. Athén, Görögország (2014) poszter
- <u>R. Salánki</u>, T. Gerecsei, N. Orgován, N. Sándor, B. Péter, Zs. Bajtay, A. Erdei,
 R. Horváth, B. Szabó: Automated single cell sorting and deposition in

submicroliter drops, Single cell genomics conference, Svédország (2014) poszter

- <u>R. Ungai-Salánki</u>, R. Horváth, B. Szabó. Egyedi sejtek adhéziós vizsgálata számítógép-vezérelt mikropipettával. MTA Természettudományi Kutatóközpont Doktori Konferencia 2014, Budapest, Magyarország (2014) előadás
- <u>R. Ungai-Salánki</u>, I. Szabó, N. Orgovan, I. Székács, B.Szabó, Sz. Bősze, R. Horvath. Effect of the FNIII14 and C8 peptides on tumor cell adhesion studied by a high-throughput label-free optical biosensor, Lisszabon, Portugália (2015) poszter
- <u>R. Ungai-Salánki</u>, Cs. Hős, N. Orgován, N. Sándor, Zs. Bajtay, A. Erdei, R. Horváth, B. Szabó. Egyedi sejtek adhéziós vizsgálata számítógép- vezérelt mikropipettával, MBFT konferencia, Budapest, Magyarország (2015) előadás
- <u>R. Ungai-Salánki</u>, T. Gerecsei, P. Fürjes, N. Orgovan, N. Sándor, E. Holczer, R. Horvath, B. Szabó. Automated single cell isolation from suspension with computer vision. VIII. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, Magyarország (2015) poszter
- <u>R. Ungai-Salánki</u>, T. Gerecsei, Cs. Hős, N. Orgován, N. Sándor, Zs. Bajtay, A. Erdei, R. Horváth, B. Szabó. Egyedi sejtek automatizált válogatása és manipulálása mikroszkópon. Microtrade Tudományos Szimpózium 2015, Budapest, Magyarország (2015) előadás
- 13. B. Péter, I. Székács, <u>R. Ungai-Salánki</u>, N. Orgován, Sz. Bősze, R. Horváth. EGCG élő sejtek adhéziós dinamikájára és mozgására gyakorolt hatásának vizsgálata jelölésmentes technikákkal. MBFT konferencia, Budapest, Budapest, Magyarország (2015) poszter
- 14. B Peter, I Szekacs, <u>R Ungai-Salánki</u>, N Orgovan, S Bosze, R Horvath. Labelfree investigations of the effect of green tea polyphenols on the dynamics of living cells. 4th International Conference on Bio-Sensing Technology Lisszabon, Portugália (2015) poszter
- 15. B. Péter, I. Székács, <u>R. Ungai-Salánki</u>, N. Orgován, Sz. Bősze, R. Horváth. Zöld tea polifenolok élő sejtek adhéziós dinamikájára gyakorolt hatásának jelölésmentes vizsgálata 45. Membrán-Transzport konferencia. Sümeg, Magyarország (2015) poszter
- N. Orgovan, <u>R. Ungai-Salánki</u>, N. Sándor, Zs. Bajtay, A. Erdei, B. Péter, Bősze,
 J. J. Ramsden, B. Szabó, R. Horváth. Label-Free Optical Monitoring Of The

Adhesion And Spreading Of Human Cells: High Throughput Analysis With Superior Sensitivity And Time Resolution. 17th International Conference on Cellular and Molecular Biology, Párizs, Franciaország (2015) előadás

- 17. Sz. Lukácsi, N. Sándor, <u>R. Ungai-Salánki</u>, N. Orgován, B. Szabó, R. Horváth, A. Erdei, Zs. Bajtay. Functional differences between human CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18): CD11b dominates iC3b mediated phagocytosis, while CD11c prevails adherence. Magyar Immunológiai Társaság 44. Vándorgyűlése, Velence, Magyarország (2015) poszter
- 18. N. Sándor, Sz. Lukácsi, <u>R. Ungai-Salánki</u>, N. Orgován, B. Szabó, R. Horváth, A. Erdei, Zs. Bajtay.Dissection the function of CR3 and CR4 integrins in human myeloid cells. Magyar Immunológiai Társaság Vándorgyűlése, Velence, Magyarország (2015) előadás
- N. Sándor, Sz. Lukácsi, <u>R. Ungai-Salánki</u>, N. Orgován, B. Szabó, R. Horváth, A. Erdei, Zs. Bajtay. Functional differences between human CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18): CD11b dominates iC3b mediated phagocytosis, while CD11c prevails adherence. 4th European Congress of Immunology, Bécs, Ausztria (2015) poszter
- 20. N. Sándor, Sz. Lukácsi, <u>R. Ungai-Salánki</u>, N. Orgován, B. Szabó, R. Horváth, A. Erdei, Zs. Functional differences between human CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18): CD11b dominates iC3b mediated phagocytosis, while CD11c prevails adherence. 15th European Meeting on Complement in Human Disease, Uppsala, Svédország (2015) előadás
- 21. E. Schwaner, P. K. Jani, E. Kajdácsi, M. L. Debreczeni, J. Dobó, P. Gál, <u>R.</u> <u>Ungai-Salánki</u>, B. Szabó, L. Cervenak. ASSESSMENT OF CELL ADHESION BETWEEN COMPLEMENT MASP-1 INDUCED ENDOTHELIAL CELLS AND NEUTROPHILS. Magyar Immunológiai Társaság 44. Vándorgyűlése, Velence, Magyarország (2015) poszter

10. Irodalomjegyzék

¹ S. S. Rubakhin, E. V. Romanova, P. Nemes, J. V. Sweedler. Profiling metabolites and peptides in single cells. Nat Methods 8: S20-29. (2011).

² V. Lecault, A. K. White, A. Singhal, C. L. Hansen. Microfluidic single cell analysis: from promise to practice. Current Opinion in Chemical Biology 16: 381. (2012).

³ A. Ståhlberg, C. Thomsen, D. Ruff, P. Åman. Quantitative PCR analysis of DNA, RNAs, and proteins in the same single cell. The American Association for Clinical Chemistry 58: 1682. (2012).

⁴ A. Raj, C. S. Peskin, D. Tranchina, D. Y. Vargas, S. Tyagi. Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. PLoS Biol. 4: e309. (2006).

⁵ H. H. Chang, M. Hemberg, M. Barahona, D. E. Ingber, S. Huang. Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. Nature 453: 544. (2008).

⁶ T. Kalisky, P. Blainey, S. R. Quake. Genomic analysis at the single-cell level. Annu Rev Genet. 45: 431. (2011).

⁷ Summary of the supplement on single-cell analysis. Nat Methods 8: 308. (2011).

⁸ Z. Környei, S. Beke, T. Mihálffy, M. Jelitai, K. J. Kovács, Z. Szabó, B. Szabó. Sci Rep. 3, Article number: 1088. (2013).

⁹ R. Salánki, T. Gerecsei, N. Orgovan, N. Sándor, B. Péter, Zs. Bajtay, A. Erdei, R. Horvath, B. Szabó. Automated single cell sorting and deposition in submicroliter drops. Appl. Phys. Lett. 105, 083703 (2014).

¹⁰ R. Ungai-Salánki, T. Gerecsei, P. Fürjes, N. Orgován, N. Sándor, E. Holczer, R. Horváth, B. Szabó. Automated single cell isolation from suspension with computer vision. Scientific Reports (2016). | DOI: 10.1038/srep20375

¹¹ R. Salánki, Cs. Hős, N. Orgovan, B. Péter, N. Sándor, Zs. Bajtay, A. Erdei, R. Horvath, B. Szabó. Single cell adhesion assay using computer controlled micropipette. PLoS ONE 9 (10): e111450. (2014).

¹² N. Sándor, Sz. Lukácsi, R. Ungai-Salánki, N. Orgován, B. Szabó, R. Horváth, A. Erdei, Zs. Bajtay. Functional differences between human CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18): CD11b dominates iC3b mediated phagocytosis, while CD11c prevails adherence. (Beküldés előtt)

¹³ P. K. Jani, E. Schwaner, E. Kajdácsi, M. L. Debreczeni, R. Ungai-Salánki, J. Dobó, Z. Doleschall, J. Rigó Jr., M. Geiszt, B. Szabó, P. Gál L. Cervenak. Complement MASP-1 enhances adhesion between endothelial cells and neutrophils by up-regulating E-selectin expression (Beküldve a Journal of Biological Chemistry-be)

¹⁴ N. Navin, J. Kendall, J. Troge, P. Andrews, L. Rodgers, J. McIndoo, K. Cook, A. Stepansky, D. Levy, D. Esposito, L. Muthuswamy, A. Krasnitz, W. R. McCombie, J. Hicks, M. Wigler. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. Nature 472: 90-94. (2011).

¹⁵ N. Navin, J. Hicks. Future medical applications of single-cell sequencing in cancer. Genome Med. 3: 31. (2011).

¹⁶ J. M. Irish, N. Kotecha, G. P. Nolan. Mapping normal and cancer cell signalling networks: towards single-cell proteomics. Nature Reviews Cancer 6: 146–155. (2006).

¹⁷ H. C. Fan, J. Wang, A. Potanina, S. R. Quake. Whole-genome molecular haplotyping of single cells. Nat Biotechnol. 29: 51-57. (2011).

¹⁸ A. Tarnok, H. Ulrich, J. Bocsi. Phenotypes of stem cells from diverse origin. J. Cytometry A 77: 6-10. (2010).

¹⁹ A. Raj, P. van den Bogaard, S. A. Rifkin, A. van Oudenaarden, S. Tyagi. Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. Nat Methods 5: 877-879. (2008).

²⁰ A. K. Shalek, R. Satija, X. Adiconis, R. S. Gertner, J. T. Gaublomme, R. Raychowdhury, S. Schwartz, N. Yosef, C. Malboeuf, D. Lu, J. T. Trombetta, D. Gennert, A. Gnirke, A. Goren, N. Hacohen, J. Z. Levin, H. Park, A. Regev. Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. Nature 498: 236-240. (2013).

²¹ J. Shendure, H. Ji. Next generation DNA sequencing, Nature Biotechnology 26: 1135. (2008).

²² M. Wu, A. K. Singh. Single-cell protein analysis. Curr Opin Biotechnol. 23: 83– 88.
(2012).

²³ A. J. Ibáñez, S. R. Fagerer, A. M. Schmidt, P. L. Urban, K. Jefimovs, P. Geiger, R. Dechant, M. Heinemann, R. Zenobi. Mass spectrometry-based metabolomics of single yeast cells. PNAS 110: 8790–8794. (2013.)

²⁴ D. Ramsköld, S. Luo, Y. C. Wang, R. Li, O. Deng, O. R. Faridani, G. A. Daniels, I. Khrebtukova, J. F. Loring, L. C. Laurent, G. P. Schroth, R. Sandberg. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. Nat Biotechnol. 30: 777–782. (2012).

²⁵ F. Kamme, R. Salunga, J. Yu, D. T. Tran, J. Zhu, A. Bittner, H. Q. Guo, N. Miller, J. Wan, M. Erlander. Single-cell microarray analysis in hippocampus CA1: demonstration and validation of cellular heterogeneityErlander. Neurosci. 23: 3607–3615. (2003).

²⁶ A. Ståhlberg, D. Andersson, J. Aurelius, M. Faiz, M. Pekna, M. Kubista, M. Pekny. Defining cell populations with single-cell gene expression profiling: correlations and identification of astrocyte subpopulations. Nucleic Acids Res. 39: e24. (2011).

²⁷ L. Warren, D. Bryder, I. L. Weissman, S. R. Quake. Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 17807–17812. (2006).

²⁸ S. S. Rubakhin, J. V. Sweedler. Characterizing peptides in individual mammalian cells using mass spectrometry. Nature Protocols 2: 1987–1997. (2007).

²⁹ A. Bora, S. P. Annangudi, L. J. Millet, S. S. Rubakhin, A. J. Forbes, N. L. Kelleher, M. U. Gillette, J. V. Sweedler. Neuropeptidomics of the supraoptic rat nucleus. J. Proteome Res. 7: 4992–5003. (2008).

³⁰ F. Tang, C. Barbacioru, Y. Wang, E. Nordman, C. Lee, N. Xu, X. Wang, J. Bodeau, B. B. Tuch, A. Siddiqui, K. Lao, M. A. Surani. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. Nat Methods 6. 377–382. (2009).

³¹ K. Kurimoto, Y. Yabuta, Y. Ohinata, Y. Ono, K. D. Uno, R. G. Yamada, H. R. Ueda, M. Saitou. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. Nucleic Acids Res. 34: e42. (2006).

³² F. Tang, K. Lao, M. A. Surani. Development and applications of single-cell transcriptome analysis. Nat Methods 8: S6-11. (2011).

³³ M. R. Emmert-Buck, F. R. Bonner, P. D. Smith, R. F. Chuaqui, Z. Zhuang, S. R. Goldstein, R. A. Weiss, L. A. Liotta. Laser Capture Microdissection. Science 274: 998-1001. (1996).

³⁴ L. A. Herzenberg, R. G. Sweet, L. A. Herzenberg. Fluorescence-activated cell sorting. Sci. Am. 234: 108–117. (1976).

³⁵ L. Herzenberg, D. Parks, B. Sahaf, O. Perez, M. Roederer, L. A. Herzenberg. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. Clin. Chem. 48: 1819–1827. (2002).

36

http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_528_Szeberenyi_Moleku laris_sejtbiologia/ch17s02.html

³⁷ J. Voldman. Curr Opin Biotechnol. 17: 532–537. (2006).

³⁸ D. A. Ateya, J. S. Erickson, P. B. Jr. Howell, L. R. Hilliard, J. P. Golden, F. S. Ligler.
The good, the bad, and the tiny: a review of microflow cytometry. Anal Bioanal Chem.
391: 1485–1498. (2008).

³⁹ A. Y. Fu, C. Spence, A. Scherer, F. H. Arnold, S. R. Quake. A microfabricated fluorescence-activated cell sorter. Nat Biotechnol 17: 1109-1111. (1999).

 40 S. H. Cho, C. H. Chen, F. S. Tsai, J. M. Godin, Y. H. Lo. Human mammalian cell sorting using a highly integrated micro-fabricated fluorescence-activated cell sorter (μ FACS). Lab Chip 10: 1567–1573. (2010).

⁴¹ A. K. White, M. VanInsberghe, O. I. Petriv, M. Hamidi, D. Sikorski, M. A. Marra, J. Piret, S. Aparicio, C. L. Hansen. High-throughput microfluidic single-cell RT-qPCR. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 13999-14004. (2011).

⁴² J. S. Jang, V. A. Simon, R. M. Feddersen, F. Rakhshan, D. A. Schultz, M. A. Zschunke, W. L. Lingle, C. P. Kolbert, J. Jen. Quantitative miRNA expression analysis using fluidigm microfluidics dynamic arrays. BMC Genomics 12: 144. (2011).

⁴³ J. Melin, S. R. Quake. Microfluidic large-scale integration: the evolution of design rules for biological automation. Annual review of biophysics and biomolecular structure 36: 213–231. (2007).

⁴⁴ C. Conrad, A. Wünsche, T. Z. Tan, J. Bulkescher, F. Sieckmann, F. Verissimo, A. Edelstein, T. Walter, U. Liebel, R. Pepperkok, J. Ellenberg. Micropilot: automation of fluorescence microscopy-based imaging for systems biology. Nat Methods 8. 246–249. (2011).

⁴⁵ M. Hosokawa, A. Arakaki, M. Takahashi, T. Mori, H. Takeyama, T. Matsunaga. High-density microcavity array for cell detection: single-cell analysis of hematopoietic stem cells in peripheral blood mononuclear cells. Anal. Chem. 81: 5308–5313. (2009).

⁴⁶ J. F. Swennenhuis, A. G. J. Tibbe, M.Stevens, M. R. Katika, J. van Dalum, Hien D. Tong, C. J. M. van Rijnd, L. W. M. M. Terstappen. Self-seeding microwell chip for the isolation and characterization of single cells. Lab Chip 15: 3039-46 DOI: 10.1039/C5LC00304K (2015).

⁴⁷ Y. Zhu, Y. X. Zhang, W. W. Liu, Y. Ma, Q. Fang, B. Yao. Printing 2-dimentional droplet array for single-cell reverse transcription quantitative PCR assay with a microfluidic robot. Sci. Rep. 5: 9551. (2015).

⁴⁸ M. T. Guo, A. Rotem, J. A. Heyman, D. A. Weitz. Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. Lab Chip 12. 2146-2155. (2012).

⁴⁹ J. C. Tormos, D. Lieber, J. C. Baret, A. E. Harrak, O. J. Miller, L.Frenz, J. Blouwolff,
K. J. Humphry, S. Köster, H. Duan, C. Holtze, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, C. A.
Merten. Droplet-Based Microfluidic Platforms for the Encapsulation and Screening of

Mammalian Cells and Multicellular Organisms. Chemistry & Biology 15: 427–437. (2008).

⁵⁰ J. R. Kovac, J. Voldman. Intuitive, image-based cell sorting using optofluidic cell sorting. Anal Chem. 79: 9321–9330. (2007).

⁵¹ A. Schneider, D. Spitkovsky, P. Riess, M. Molcanyi, N. Kamisetti, M. Maegele, J. Hescheler, U. Schaefer. "The Good into the Pot, the Bad into the Crop!"—A New Technology to Free Stem Cells from Feeder Cells. PLoS ONE 3: e3788. (2008).

⁵² N. Yoshimoto, A. Kida, X. Jie, M. Kurokawa, M. Iijima, T. Niimi, A. D. Maturana, I. Nikaido, H. R. Ueda, K. Tatematsu, K. Tanizawa, A. Kondo, I. Fujii, S. Kuroda. An automated system for high-throughput single cell-based breeding. Sci Rep. 3: 1191. (2013).

⁵³ Y. H. Anis, M R. Holl, D. R. Meldrum. Automated selection and placement of single cells using vision-based feedback control. Automated selection and placement of single cells using vision-based feedback control. IEEE Transactions on Automation Science and Engineering 7: 598. (2010).

⁵⁴ B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. Molecular biology of the cell, 5th Edition, Garland Science, New York, Chapter 19. 19: 2007 (2007).

⁵⁵ K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, S. Nourshargh. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat. Rev. Immunol. 7: 678–689. (2007).

⁵⁶ S. M. Albelda. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology. 68: 4-17. (1993).

⁵⁷ C. C. G. Rao, D. Chianese, G. V. Doyle, M. C. Miller, T. Russell, R. A. Sanders, L. W. M. M. Terstappen. Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. Int. Journal of Oncology 27: 49–57. (2005).
⁵⁸ H. Kobayashi, K. C. Boelte, P. C. Lin. Endothelial cell adhesion molecules and cancer progression. Curr. Med. Chem. 14: 377–386. (2007).

⁵⁹ G. Szabó. Sejtbiológia, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 497-513. (2009).

60

http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_524_Immunologia/ch04s 03.html

61

http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_524_Immunologia/ch03s 02.html

⁶² C. G. Gahmberg. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. Current Opinion in Cell Biology 9: 643–650. (1997).

⁶³ N. Hogg, R. Henderson, B. Leitinger, A. McDowall, J. Porter, P. Stanley. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. Immunological Reviews 186: 164–171. (2002).

⁶⁴ T. Schürpf, T. A. Springer. Regulation of integrin affinity on cell surfaces. The EMBO Journal 30: 4712-4727. (2011).

⁶⁵ Y. van Kooyk, C. Figdor. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. Curr Opin Cell Biol. 12: 542. (2000).

⁶⁶ C. Ammon, S. P. Meyer, L. Schwarzfischer, S. W. Krause, R. Andreesen, M. Kreutz. Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. Immunology 100:364–369. (2008).

⁶⁷ S. D. Wright, J. I. Weitz, A. J. Huang, S. M. Levin, S. C. Silverstein, J. D. Loike. Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. PNAS 85: 7734–7738. (1988).

⁶⁸ K. V. Christ, K. T. Turner. Methods to Measure the Strength of Cell Adhesion to Substrates. J. Adhes. Sci. & amp; Technol. 24: 2027–2058. (2010).

⁶⁹ J. Helenius, C. P. Heisenberg, H. E. Gaub, D. J. Muller. Single-cell force spectroscopy. J. Cell Sci. 121: 1785–1791. (2008).

⁷⁰ G. Sagvolden, I. Giaever, E. O. Pettersen, J. Feder. Cell adhesion force microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96: 471–476. (1999).

⁷¹ A. J. Garcia, P. Ducheyne, D. Boettiger. Quantification of cell adhesion using a spinning disc device and application to surface-reactive materials. Biomaterials, 18: 1091-1098. (1997).

⁷² A. S. Goldstein, P. DiMilla. Application of fluid mechanic and kinetic models to characterize mammalian cell detachment in a radial-flow chamber. Biotechnol. Bioeng. 55: 616–629. (1997).

⁷³ T. G. Van Kooten, J. M. Schakenraad, H. C. van der Mei, A. Dekker, C. J. Kirkpatrick, H. J. Busscher. Fluid shear induced endothelial cell detachment from glass
- influence of adhesion time and shear stress. Med. Eng. Phys. 16: 506–512. (1994).

⁷⁴ T. G. Van Kooten, J. M. Schakenraad, H. C. Van der Mei, H. J. Busscher. Influence of substratum wettability on the strength of adhesion of human fibroblasts. Biomaterials 13: 897–904. (1992).

⁷⁵ http://www.bio-protocol.org/e936

⁷⁶ J. Helenius, C. P. Heisenberg, H. E. Gaub, D. J. Muller. Single-cell force spectroscopy. J. Cell Sci, 121: 1785-1791. (2008).

⁷⁷ P. H. Puecha, K. Poolec, D. Knebelc, D. J. Muller. A new technical approach to quantify cell–cell adhesion forces by AFM. Ultramicroscopy 106: 637–644. (2006)

⁷⁸ J. Klebe. Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor. Nature, 250: 248-251. (1974).

⁷⁹ R. M. Hochmuth. Micropipette aspiration of living cells. Journal of Biomechanics 33: 15-22. (2000).

⁸⁰ J. Y. Shao, G. Xu, P. Guo. Quantifying cell-adhesion strength with micropipette manipulation: principle and application. Frontiers in Bioscience 9, 2183-2191. (2004).

⁸¹ K. L. Sung, L. A. Sung, M. Crimmins, S. J. Burakoff, S. Chien S. Determination of junction avidity of cytolytic T cell and target cell. Science 234: 1405-1408. (1986).

⁸² P. Hinterdorfer, Y. F. Dufrêne. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. Nat. Methods 3: 347–355. (2006).

⁸³ F. Li, S. D. Redick, H. P. Erickson, V. T. Moy. Force measurements of the alpha5beta1 integrin-fibronectin interaction. Biophys. J. 84: 1252–1262. (2003).

⁸⁴ M. Benoit, D. Gabriel, G. Gerisch, H. E. Gaub. Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. Nat. Cell Biol. 2: 313–317. (2000).

⁸⁵ S. K. Lower, M. F. Hochella, T. J. Beveridge. Bacterial recognition of mineral surfaces: nanoscale interactions between Shewanella and alpha-FeOOH. Science 292: 1360–1363. (2001).

⁸⁶ W. Bowen, R. W. Lovitt, C. J. Wright. Atomic Force Microscopy Study of the Adhesion of Saccharomyces cerevisiae. J. Colloid Interface Sci. 237, 54–61 (2001).

⁸⁷ A. Razatos, Y. L. Ong, M. M. Sharma, G. Georgiou. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95: 11059–11064. (1998).

http://fizipedia.bme.hu/index.php/Nanoszerkezetek_el%C5%91%C3%A111%C3%ADt %C3%A1si_%C3%A9s_vizsg%C3%A11ati_technik%C3%A1i

⁸⁹ E. Potthoff, O. Guillaume-Gentil, D. Ossola, J. Polesel-Maris, S. L. Gut-Landmann, T. Zambelli, J. A. Vorholt. Rapid and Serial Quantification of Adhesion Forces of Yeast and Mammalian Cells. PLoS One 7 (12): e52712. (2012).

⁹⁰ H. Zhang, K. K. Li. Optical tweezers for single cells. J. R. Soc. Interface 24: 671-690. (2008).

⁹¹ C. Grashoff, B. D. Hoffman, M. D. Brenner, R. Zhou, M. Parsons, M. T. Yang, M. A. McLean, S. G. Sligar, C. S. Chen, T. Ha, M. A. Schwartz. Measuring mechanical

⁸⁸

tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. Nature 466: 263–266. (2010).

⁹² N. Orgovan, B. Peter, Sz. Bősze, J. J. Ramsden, B.t Szabó, 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. 4: 4034 (2014).

⁹³ J. J. Ramsden, R. Horvath. Optical biosensors for cell adhesion. Journal of Receptors and Signal Transduction. 29: 211-223. (2009).

⁹⁴ N. Orgovan, R. Salánkib, N. Sándor, Zs. Bajtay, A. Erdei, B. Szabó, R. Horvath. Insitu and label-free optical monitoring of the adhesion and spreading of primary monocytes isolated from human blood: Dependence on serum concentration levels. Biosens. Bioelectron. 54: 339–344. (2014).

⁹⁵ K. Cottier, R. Horvath. Imageless microscopy of surface patterns using optical waveguides. Appl. Phys. B Lasers Opt. 91. 319–327. (2008).

⁹⁶ B. Y. J. M. Mitchison, M. M. Swann. THE MECHANICAL PROPERTIES OF THE CELL surface. J Exp Biol 32: 734–750. (1954).

⁹⁷ R. P. Rand, A. C. Burton. Mechanical Properties of the Red Cell Membrane. I. Membrane Stiffness and Intracellular Pressure. Biophys. J. 4: 115–135. (1964).

⁹⁸ J. Y. Shao, J. A. Xu. A modified micropipette aspiration technique and its application to tether formation from human neutrophils. J. Biomech. Eng. 124: 388–396. (2002).

⁹⁹ E. Evans, K. Ritchie, R. Merkel. Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces. Biophys. J. 68: 2580–2587. (1995).

¹⁰⁰ J. Y. Shao, R. M. Hochmuth. Micropipette suction for measuring piconewton forces of adhesion and tether formation from neutrophil membranes. Biophys. J. 71: 2892–2901. (1996).

¹⁰¹ K. L. Sung, L. A. Sung, M. Crimmins, S. J. Burakoff, S. Chien. Determination of junction avidity of cytolytic T cell and target cell. Science 234: 1405-8. (1986).

¹⁰² N. P. Huang, R. Michel, J. Voros, M. Textor, R. Hofer, A. Rossi, D. L. Elbert, J. A. Hubbell, N. D. Spencer. Poly(l-lysine)-g-poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Surface-Analytical Characterization and Resistance to Serum and Fibrinogen Adsorption. Langmuir 17: 489–498. (2001).

¹⁰³ R. Michel, S. Pasche, M. Textor, D. G. Castner. Influence of PEG Architecture on Protein Adsorption and Conformation. Langmuir 21: 12327–12332. (2005).

¹⁰⁴ S. Faraasen, J. Vörös, G. Csúcs, M. Textor, H. P. Merkle, E. Walter. Ligand-Specific Targeting of Microspheres to Phagocytes by Surface Modification with Poly(L-Lysine)-Grafted Poly(Ethylene Glycol) Conjugate. Pharmaceutical Research 20: 237-246. (2003).

¹⁰⁵ R. Ogaki, O. Z. Andersen, G. V. Jensen, K. Kolind, D. C. Evar Kraft, J. S. Pedersen, M. Foss. Temperature-Induced Ultradense PEG Polyelectrolyte Surface Grafting Provides Effective Long-Term Bioresistance against Mammalian Cells, Serum, and Whole Blood. Biomacromolecules, 13: 3668–3677. (2012).

¹⁰⁶ S. Usami, H. H. Chen, Y. Zhao, S. Chien, R. Skala. Design and Construction of a Linear Shear Stress Flow Chamber. Annals of Biomedical Engineering 21: 77-83. (1993).

¹⁰⁷ E. Potthoff, D. Franco, V. D'Alessandro, C. Starck, V. Falk, T. Zambelli, J. A. Vorholt, D. Poulikakos, A. Ferrari. Toward a Rational Design of Surface Textures Promoting Endothelialization. Nano Lett., 14: 1069–1079. (2014).

¹⁰⁸ E. Potthoff, O. Guillaume-Gentil, D. Ossola, J. Polesel-Maris, S. Leibund Gut-Landmann, T. Zambelli, J. A. Vorholt. Rapid and serial quantification of adhesion forces of yeast and mammalian cells. PLoS One 7: e52712. (2012).

¹⁰⁹ P. F. Davies. Flow-Mediated Endothelial Mechanotransduction. Physiol Rev. 75: 519–560. (1995).

¹¹⁰ N. Orgovan, D. Patkó, Cs. Hős, S. Kurunczi, B. Szabó, J. J. Ramsden, R. Horvath. Sample handling in surface sensitive chemical and biological sensing: A practical review of basic fluidics and analyte transport, Advances in Colloid and Interface Science, DOI: 10.1016/j.cis.2014.03.011 (2014).