

Flagellin alapú biomimetikus felületek jellemzése és élő sejtek adhéziójának nyomon követése jelölésmentes optikai bioszenzorokkal

Doktori (PhD) értekezés

Készítette:

Kovács Boglárka

Témavezetők:

Dr. Horváth Róbert, PhD

Prof. Vonderviszt Ferenc, DSc

Magyar Tudományos Akadémia Energiatudományi Kutatóközpont
Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet



Pannon Egyetem

Vegyészmérnöki és Anyagtudományok Doktori Iskola

DOI:10.18136/PE.2017.670



2017

Flagellin alapú biomimetikus felületek karakterizálása és élő sejtek adhéziójának nyomon követése jelölésmentes optikai bioszenzorokkal

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Írta:

Kovács Boglárka

Készült a Pannon Egyetem Vegyészmérnöki és Anyagtudományok Doktori Iskolájában

Témavezetők: Dr. Horváth Róbert és Prof. Vonderviszt Ferenc

Az értekezést témavezetőként elfogadásra javaslom:

Dr. Horváth Róbert: igen / nem
(aláírás)

Prof. Vonderviszt Ferenc: 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 vitáján %-ot ért el.

.....
Bíráló Bizottság elnöke

Veszprém,.....

A doktori (PhD) oklevél minősítése

.....
EDT elnöke

Veszprém,.....

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	3
PhD értekezés kivonata.....	5
Characterization of flagellin-based biomimetic coatings and monitoring of cell adhesion with label-free optical biosensors	7
Charakterisierung von Flagellin-basierten biomimetischen Oberflächen und Vervolgung der Zelladhäsion mit markierungsfreien optischen Biosensoren	8
1. Bevezetés	10
2. Irodalmi áttekintés	12
2.1. A sejtadhézió mechanizmusa, receptorok	12
2.1.1. Baktériumsejtek adhéziós mechanizmusa	12
2.1.2. Emlőssejtek adhéziós mechanizmusa	14
2.2. Optikai bioszenzorok.....	17
2.3. Jelölőanyagokat alkalmazó bioszenzorika.....	17
2.3.1. Fluoreszcens jelölések jellemzése	17
2.3.2. Fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer alapú bioszenzorok	18
2.4. Jelölésmentes bioszenzorok.....	20
2.4.1. Felületi plazmon rezonancia	21
2.4.2. Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia	22
2.4.3. Kettős polarizációs interferometria.....	26
2.4.4. Rácscsatolt interferometria	27
2.4.5. Kvarckristály mikromérleg	29
2.5. Felületi bevonatok sejtadhézió vizsgálatához.....	30
2.6. Flagellin fehérje és speciális tulajdonságai	32
2.7. Hofmeister sók.....	36
3. Célkitűzés	40
4. Anyagok és módszerek	41
4.1. Alkalmazott felületek tisztítása	41
4.2. Hidrofób felületek előállítása	41
4.3. Peremszög meghatározása	42
4.4. Arany bevonattal rendelkező Si/SiO ₂ hordozó létrehozása és fehérjével történő bevonása	42
4.5. Fehérjék előállítása és genetikai módosítása	43
4.6. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis	44

4.7.	Alkalmazott Hofmeister sóoldatok	44
4.8.	Kontrollfelületek létrehozása.....	45
4.9.	Vizsgálatok AFM-mel	45
4.10.	Vizsgálatok XPS-sel	45
4.11.	OWLS kísérletek menete.....	46
4.12.	A Hofmeister sók által előidézett változások kinetikai kiértékeléséhez használt modellek	47
4.13.	GFP termelő baktériumok	48
4.14.	Fáziskontraszt mikroszkópia	48
4.15.	Fluoreszcens mikroszkópia.....	50
4.16.	Humán sejtek fenntartása.....	51
4.17.	Humán sejtek fluoreszcens jelölése.....	51
5.	Eredmények és értékelésük	53
5.1.	A létrehozott flagellinrétegek karakterizálása OWLS, XPS és AFM technikákkal.....	53
5.2.	A hidrofób kölcsönhatás jelentősége, Hofmeister sók hatása a flagellinréteg önszerveződésére	59
5.2.1.	A felületi tömegsűrűség időbeli változása	59
5.2.2.	Az adszorpciós és deszorpciós görbék, illetve a réteg szerkezetének kinetikai kiértékelése	60
5.3.	A vad típusú orientált flagellin fehérjéből létrehozott réteg sejttaszító hatása E. coli esetén.....	65
5.4.	Az orientált vad típusú flagellinréteg sejttaszító képességének vizsgálata emlőssejtes modellel.....	70
5.5.	Sejtdhézió genetikailag módosított, RGD-motívumot kifejező flagellinvariánsokból kialakított rétegeken	74
5.5.1.	Polimer és fehérje felületi sűrűség és RGD-RGD ligand távolság.....	80
6.	Összefoglalás	81
7.	Tézispontok	84
8.	Publikációk	85
8.1.	A disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke	85
8.2.	A disszertációhoz kapcsolódó szóbeli és poszteres előadások.....	85
8.3.	A disszertációhoz szorosan nem kapcsolódó publikációk.....	87
9.	Köszönetnyilvánítás.....	88
10.	Irodalomjegyzék	90

PhD értekezés kivonata

A sejt-anyag kölcsönhatások tanulmányozása során az egyik legfontosabb lépés a felületi bevonatok tulajdonságainak kialakítása. Doktori munkám során az volt a célom, hogy költséghatékony, egyszerűen előállítható és hangolható, flagellin alapú, felületi önszerveződéssel rendelkező biomimetikus rétegeket hozzak létre, amelyekkel befolyásolni lehet élő sejtek adhézióját, felületi viselkedését. Az alkalmazott flagellinvariánsok segítségével sejttaszító és erősen adhezív felületeket is elő tudtam állítani. A kialakított rétegeken *in situ* követtem nyomon baktériumok és emlőssejtek adhézióját jelölésmentes optikai szenzorok és mikroszkópia segítségével.

A fehérjék szerkezetét és konformációját nagymértékben befolyásolja az őket körülvevő oldószer és hidratációs burok. A Hofmeister sorba tartozó sók hatással vannak a fehérjék másodlagos és harmadlagos szerkezetének kialakulására, ezáltal hangolhatják oldhatóságukat és stabilitásukat. Vizsgálataim során Hofmeister sókkal befolyásoltam a fehérjék és a hidrofób modellfelület közötti kölcsönhatást, és megmutattam, hogy a különböző sók számottevően eltérő hatást gyakorolnak a flagellin felületi adszorpciós tulajdonságaira: csökkenthetik, ill. növelhetik a felületre adszorbeálódott fehérjék felületi tömegsűrűségét.

A biológiai anyagokat utánzó felületek kialakítására egyre nagyobb az igény. Munkám során vad típusú flagellin mellett genetikailag módosított variánsokat is használtam, melyekben a D3 domén egy olyan szekvenciával lett helyettesítve, amely egy vagy több RGD-motívumot (Arg-Gly-Asp) tartalmazott. A vad típusú és a genetikailag módosított flagellinből orientált és sűrű monoréteget hoztam létre hidrofób felületeken. A fehérjeréteg tulajdonságait optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópiával (OWLS), atomerő mikroszkóppal (AFM) és röntgen fotoelektron spektroszkópiával (XPS) is karakterizáltuk.

A biomimetikus felületeken a baktérium- és az emlőssejtek adhéziós kinetikájának nyomon követését optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópiával végeztem. A bioszenzorral mért adatok kiegészítésére és alátámasztására fáziskontraszt és fluoreszcens mikroszkópiát alkalmaztam. A bioszenzoros és a mikroszkópos eredmények azt mutatták, hogy a bakteriális *E. coli* sejtek és az emlős HeLa sejtek a vad típusú flagellinrétegen nem tudnak kitapadni, bizonyítva a vad flagellinből képzett orientált monoréteg sejttaszító tulajdonságát. Az RGD-motívumot kifejező

flagellinvariánsok különböző mértékű HeLa sejtadhéziót indukáltak a motívum beépítésére használt linkerektől függően. Egyszerű és költséghatékony módon sikerült a sejtek adhézióját befolyásolni a felületi bevonatok alkalmazásával.

Characterization of flagellin-based biomimetic coatings and monitoring of cell adhesion with label-free optical biosensors

During my PhD work I investigated the adsorption properties of wild-type and genetically modified flagellin variants on hydrophobic surfaces. I influenced the adsorption of the proteins with different salts and I characterized the properties of the adsorbed layers. Moreover, I monitored bacterial and mammalian cell adhesion *in situ* on the assembled protein layers.

The solvation and hydration shell affect the structure and the conformation of proteins. Some neutral salts have striking effects on protein conformation and aggregation, which are called Hofmeister effects. The Hofmeister salts influence the secondary and tertiary structure, thus they can alter the solubility and the stability of proteins. The adsorption properties of the flagellin layer were influenced by these salts and I demonstrated that the various Hofmeister ions increased or decreased the surface mass density of the protein layer.

Creating biomimetic surfaces to control cell adhesion on target surfaces has crucial importance today. Genetically engineered flagellin mutants were established by replacing the variable D3 domain with a sequence displaying one or more of the integrin-binding RGD (Arg-Gly-Asp) motifs. The integration of the RGD motif was accomplished by applying various oligopeptide linkers. I prepared dense oriented monolayers using wild-type and engineered flagellin variants. The protein layer properties were characterized with optical waveguide lightmode spectroscopy (OWLS), atomic force microscopy (AFM) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS).

In order to follow the dynamics of bacterial and mammalian cell adhesion on the fabricated biomimetic surfaces I employed the OWLS label-free biosensor. To complete and support the biosensor data, I imaged the cells deposited on the created molecular layers both in phase contrast and fluorescent modes. I proved the anti-adhesive properties of the wild-type flagellin layers and demonstrated that the RGD-displaying flagellin variants induced cell adhesion at different levels. Therefore, I proposed biomimetic coatings to influence the adhesion of *E. coli* and HeLa cell in an easy and cost-effective way.

Charakterisierung von Flagellin-basierten biomimetischen Oberflächen und Vervollständigung der Zelladhäsion mit markierungsfreien optischen Biosensoren

In meiner Doktorarbeit untersuchte ich die Adsorption von Wildtyp- und genetisch modifizierten Flagellin-Varianten auf hydrophoben Oberflächen. Ich beeinflusste die Adsorption der Proteine mit verschiedenen Salzen und charakterisierte die adsorbierten Schichten. Ich überprüfte die Adhäsion von Bakterien- und Säugerzellen auf den zusammengesetzten Proteinoberflächen.

Die Lösungsmittel und die Hydratationsschale beeinflussen die Struktur und die Konformation der Proteine. Neutrale Salze haben eine Wirkung auf die Proteinkonformation und Aggregation, die als Hofmeister-Effekt bezeichnet werden. Die Hofmeister-Salze beeinflussen die sekundäre und tertiäre Struktur, so dass sie die Löslichkeit und die Stabilität der Proteine verändern können. Die Adsorptionseigenschaften der Flagellin wurden durch diese Salze beeinflusst und ich erwie, dass die verschiedenen Ionen die Massendichte der Proteinschicht erhöhen oder verminderten.

Die Herstellung biomimetischer Oberflächen zur Kontrolle der Zelladhäsion auf verschiedenen Oberflächen hat heute eine entscheidende Bedeutung. Genetisch veränderte Flagellin-Mutanten wurden durch ein oder mehrere integrinbindende RGD-Motive hergestellt die ersetzen die variablen D3-Domäne. Die Integration des Motivs wurde durch Anwendung verschiedener Oligopeptid-Linker erreicht. Ich habe dicht orientierte Monolagen unter Verwendung von Wildtyp- und genetisch veränderte Flagellin-Varianten vorbereitet. Die Eigenschaften der Proteinschicht wurden durch optische Wellenleiter-Lichtmodus-Spektroskopie (OWLS), Atomkraftmikroskopie (AFM) und Röntgenphotoelektronen-spektroskopie (XPS) charakterisiert.

Um die Dynamik der Bakterien- und Säugerzelladhäsion auf den gefertigten biomimetischen Oberflächen zu folgen, verwendete ich den OWLS-Biosensor, der ein etikettenfreies Sensing-Verfahren aufweist. Um die Biosensor-Daten zu vervollständigen und zu unterstützen, habe ich die auf den erzeugten molekularen Schichten abgeschiedenen Zellen sowohl im Phasenkontrast als auch im Fluoreszenz-Modus abgebildet. Ich bewies die antiadhäsiven Eigenschaften der Wildtyp-Flagellin-Schichten und zeigte, dass die RGD-zeigenden Flagellin-Varianten die Zelladhäsion auf unterschiedlichem Niveau induzierten. Ich habe es geschafft, die Adhäsion von *E. coli* und HeLa Zelle auf eine einfache und kostengünstige Weise zu beeinflussen.

Rövidítés jegyzék

AFM	atomic force microscopy	atomerő mikroszkóp
APTES	(3-aminopropyl)triethoxysilane	(3-aminopropil)-trietoxiszilán
BSA	bovine serum albumin	borjú szérum albumin
DPI	dual-polarization interferometry	kettős polarizációs interferometria
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride	N-3-dimetilaminopropil-etilkarboimid hidroklorid
FRET	fluorescence resonance energy transfer	fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer
GCI	grating coupled interferometry	rácscsatolt interferométer
HBSS	Hank's balanced salt solution	Hank-féle normalizált sóoldat
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etánszulfonsav
HMDS	hexamethyldisilazane	hexametil-diszilazán
NHS	N-hydroxysuccinimide	N-hidroxi-szukcinimid
PBS	phosphate buffered saline	foszfát puffer
PLL- <i>g</i> -PEG (PP)	poly(L-lysine)- <i>graft</i> -poly(ethylene glycol)	poli-etilén-glikollal funkcionizált poli-L-lizin
PLL- <i>g</i> -PEG-RGD (PPR)	RGD-functionalized PLL- <i>g</i> -PEG	RGD- funkcionizált PLL- <i>g</i> -PEG
PVD	physical vapor deposition	fizikai rétegleválasztás
OWLS	optical waveguide lightmode spectroscopy	optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia
QCM	quartz crystal microbalance	kvarckristály mikromérleg
RGD	arginine-glycine-aspartic acid	arginin-glicin-aszparaginsav
RIU	refractive index unit	törésmutató egység
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	SDS-poliakrilamid gélelektroforézis
SPR	surface plasmon resonance	felületi plazmon rezonancia
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy	röntgen fotoelektron-spektroszkópia

1. Bevezetés

A baktériumsejtek adhéziója nemcsak a patogenezis során, hanem az élettelen felületeken történő biofilmformálás esetén is a legelső lépés. Igazán nagy gondot okoz megakadályozni a baktériumok letapadását mind ipari folyamatok során, mind orvosi eszközök esetén. Számos olyan anyag létezik, mely meggátolja a baktériumok felülethez kapcsolódását. Habár a sejtadhézió mérése fontos, kevés technika alkalmas a folyamat valós idejű és nagy pontosságú nyomon követésére. Leggyakrabban radioaktív, ill. fluoreszcens jelölést és festést alkalmaznak [1], azonban ma már egyre jobban elterjedt a jelölésmentes bioszenzorok [2], úgymint az OWLS (optical waveguide lightmode spectroscopy, optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia) [3], a QCM (quartz crystal microbalance, kvarckristály mikromérleg) [4], vagy az SPR (surface plasmon resonance, felületi plazmon rezonancia) [5] használata is.

Emlőssejtek esetében a sejtadhézió elengedhetetlen ahhoz, hogy a különálló sejtek képesek legyenek háromdimenziós szövetbe rendeződni. A sejtek nem egyszerűen egymáshoz tapadnak, hanem egy komplex rendszer segítségével tudnak kapcsolatot létesíteni egymással. Számos sejtadhéziós mechanizmus felelős azért, hogy a sejteket összekösse és a citoskeletális rendszer segítségével kialakítsa a szövet szerkezetét [6]. Munkám során az emlőssejtek felülettel történő kölcsönhatásának első lépését, a sejtadhéziót vizsgáltam. Ennek mérésére számos technikát alkalmaznak napjainkban: mikroszkópiát [7], [8], AFM-et (atomic force microscopy, atomerő mikroszkóp) [9], mikropipettát [10] és optikai bioszenzorokat [11], [12].

A sejtadhézió során a sejtek kölcsönhatásba lépnek egy felülettel, egy szubsztrátummal vagy egy másik sejtrel, és megfelelő körülmények között hozzákapcsolódnak. A sejtek adhéziójának tanulmányozásával fontos információkat kaphatunk arról, hogy milyen tényezők befolyásolják ezen kapcsolatok kialakítását. Ennek egyik módja különböző tulajdonságú felületi bevonatok alkalmazása, aminek segítségével a sejt-mátrix kölcsönhatásokról tudhatunk meg többet. Ezeknek az információknak a segítségével jobban megérthetjük, hogy a sejtadhézió mechanizmusa hogyan zajlik, melyek azok a tényezők, amelyek segítségével az adhézió erősségét befolyásolni lehet, hogyan lehet indukálni vagy éppen megakadályozni a sejtek kitapadását a hordozón.

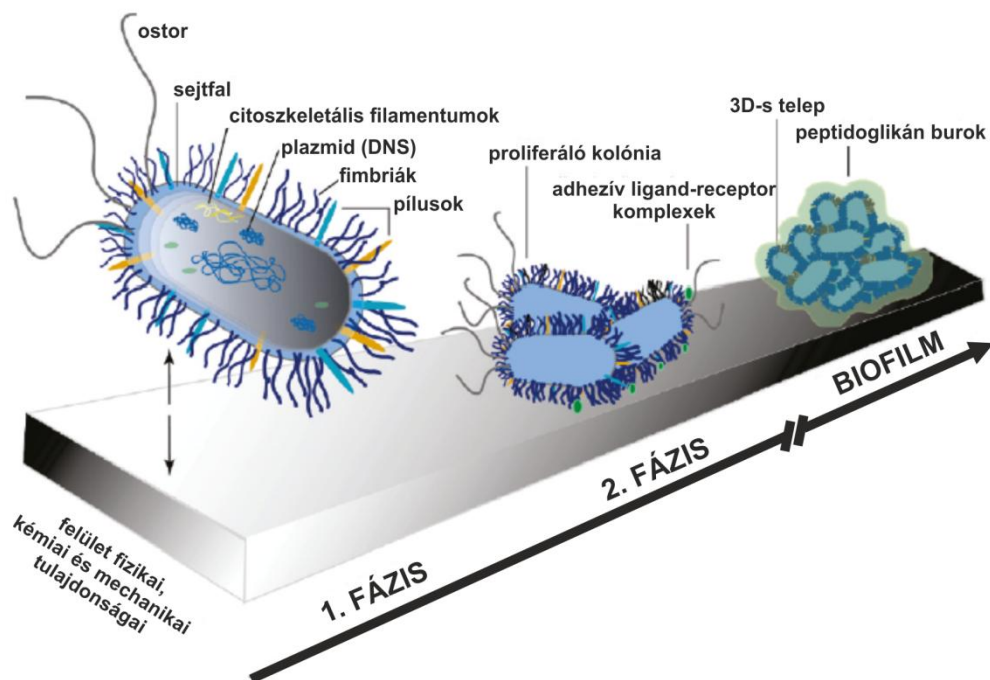
Munkám során genetikailag módosított fehérjékkel bevont felületek segítségével befolyásoltam élő sejtek adhézióját. Az alkalmazott fehérjék és rétegek tulajdonságait meghatároztam, és részletesen jellemeztem. A kialakított fehérje- és polimerrétegek segítségével *Escherichia coli* és HeLa sejtek adhézióját követtem nyomon *in situ*. A kapott adatok információt szolgáltatnak a sejtkitapadás első lépéséről és a sejtek viselkedéséről a különböző felületeken. A jelölést alkalmazó és jelölésmentes technikák segítségével részletes képet kaphatunk a sejtadhézió mechanizmusáról és az azt befolyásoló tényezőkről.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A sejtadhézió mechanizmusa, receptorok

2.1.1. Baktériumsejtek adhéziós mechanizmusa

A baktériumok adhéziója összetett folyamat, melyet számos különböző faktor befolyásol, többek között a felület anyagi tulajdonságai, a baktérium típusa, a környezeti paraméterek és a különböző anyagok jelenléte (pl.: fehérjék, antibiotikumok) [13], [14], [15]. A mikrobiális adhézió a sejt felületi struktúrája és a szubsztrátum felületi csoportjai közötti specifikus kölcsönhatások révén megy végbe. A baktériumok felülete szerkezeti és kémiai szempontból is heterogén pl. a Gram-negatív baktériumok rendelkeznek külső membránnal, melyek különböző lipopoliszacharidokat tartalmazó lipid kettősrétegből állnak. Az adhézió kezdeti szakaszában gyakran fontos szerepet játszanak a baktérium felületi struktúrái (pl.: flagellum, pílus). Míg a biofilmformálásban a sejtek által termelt nagy molekulatömegű polimerek (főként poliszacharidok) bizonyultak döntő fontosságúnak [16].



2.1. ábra A baktérium adhézió két fázisának sematikus ábrázolása [17].

Az adhézió mechanizmusát két fázisra lehet bontani (2.1. ábra). Az első fázis a reverzibilis fizikai fázis, amelyet fizikai erők irányítanak (Brown-mozgás, van der Waals kölcsönhatás, elektrosztatikus erők, hidrofób kölcsönhatás) [15], [18]. Az

oldatból a baktériumok fizikai erők hatására vagy a polimer felületi struktúráik segítségével érkeznek a felületre [19]. Ezeket a fizikai kölcsönhatásokat tovább osztályozhatjuk hosszú és rövid hatótávú kölcsönhatásra. A hosszú hatótávú kölcsönhatás jellemzője, hogy nem-specifikus és 50 nm-nél nagyobb a távolság a sejt és a felület között. A rövid hatótávú kölcsönhatás esetén a távolság kevesebb, mint 5 nm, kialakításában hidrogénkötés, ionos, dipólus és hidrofób kölcsönhatások vesznek részt. A baktériumok a hosszú hatótávú kölcsönhatás révén kerülnek a felület közelébe, majd ezt követően a rövid hatótávú kölcsönhatás játszik fontos szerepet. Tehát a rövid és a hosszú hatótávú kölcsönhatások elengedhetetlenek a baktériumok felületre történő adhéziójának kezdő lépéseihez [15], [20]. A baktériumok tulajdonságai (hidrofobicitása és felületi töltéeloszlása) és a felület tulajdonságai (kémiai összetétel, felületi érdesség és a felület térszerkezete) nagyon fontos tényezők a bevonat nélküli felületekre történő adhézió során [15].

A *második fázis* irreverzibilis és időfüggő molekuláris, illetve celluláris folyamatokból áll. Ennek során a baktérium felülete és a szubsztrát felülete között specifikus kölcsönhatás jön létre, melyben fontos szerepet játszanak a baktériumok felületi polimer struktúrái (pl.: kapszulák, fimbriák, pílusok). Ha a felületet a célsejt mátrix komponenseivel vagy plazmafehérjékkel vonják be, akkor a baktériumok adhézióját az adhezív mátrix molekulákat felismerő mikrobiális felületi komponensek (MSCRAMMs, microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) irányítják [15]. Ezek az MSCRAMM-k nagy affinitással (fajspecifikusan) ismerik fel az extracelluláris mátrix bizonyos komponenseit (pl.: fibronektin, fibrinogén, vitronektin), és elősegítik a célsejt kolonizációját. Amellett, hogy adhéziós molekulaként funkcionálnak, a virulenciában is fontos szerepük van [21].

Ezt követően számos baktérium képes biofilm formálására. A felülethez való tapadást követően osztódnak, sejt-sejt kölcsönhatásokat alakítanak ki, és extracelluláris polimer mátrixot termelnek, amelyben többretegű klasztereket alkotnak. A multicelluláris klaszterek kialakulását követően néhány baktérium leválik, és szétszóródik a környezetben, melynek köszönhetően növekedni tud a biofilm [15]. Az érett biofilm nagymértékben rezisztens a veleszületett és adaptív immunrendszerrel szemben, valamint az antimikrobiális és fertőtlenítőszerrel szemben [22].

2.1.2. *Emlőssejtek adhéziós mechanizmusa*

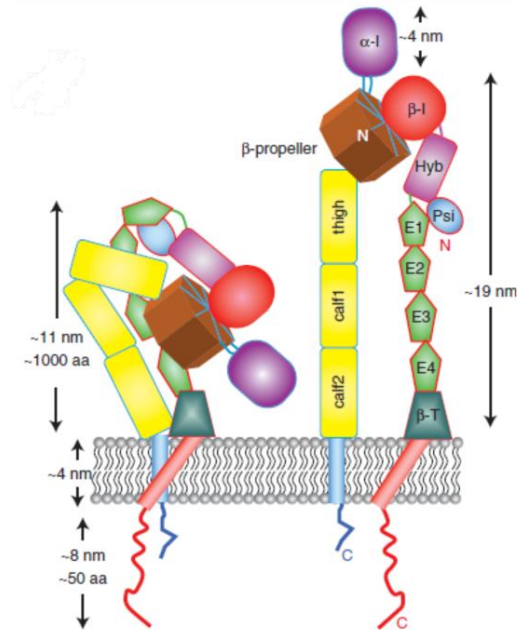
A sejtadhézió nélkülözhetetlen a sejtek szövetbe rendeződéséhez. Sokféle adhéziós mechanizmus felelős azért, hogy a sejtek egymáshoz és a felülethez kapcsolódjanak. A sejtadhézió kialakításában résztvevő multiprotein komplexeket három fő csoportba sorolhatjuk: sejtadhéziós molekulák vagy receptorok, extracelluláris mátrix fehérjék és a citoplazmatikus plakk vagy perifériás membrán fehérjék [6].

A sejtadhéziós receptorok általában transzmembrán glikoproteinek, melyek az extracelluláris felületen szabályozzák a különböző kapcsolat kialakítását, és meghatározzák a sejt-sejt és sejt-extracelluláris mátrix kölcsönhatások létrejöttét. Öt fő osztályát különböztetjük meg: kadherineket, immunoglobulinok, szelektinek, integrinek és mucinok. A sejtadhéziót egy vagy több sejtadhéziós molekula indítja el, melyek lehetnek: szoros illeszkedés (tight junction), réskapcsolat (gap junction), sejt-sejt kölcsönhatás és sejt-mátrix kölcsönhatás [23].

Az extracelluláris mátrix a sejteket szövetté szervezi, koordinálja a sejtek funkcióit, útvonalat biztosít a migrációhoz, molekulái aktiválják a klasszikus jelátviteli útvonalakat, ami indukálja a sejtnövekedést, a differenciációt és a génexpressziót. A mátrix fő komponensei, melyeket maguk a sejtek termelnek, a kollagén rostok, a proteoglikánok és a multiadhezív mátrix fehérjék. A sejt-mátrix kapcsolat kialakításáért az integrin receptorok felelősek, de emellett más adhéziós molekulák is kapcsolódnak a mátrix fehérjéihez (szelektinek, szindekán proteoglikánok) [23].

Az integrinek heterodimer transzmembrán fehérjék, melyek egy α és egy β alegységből épülnek fel. Mindkét alegység egy nagy extracelluláris és egy általában rövid citoplazmikus doménből áll (**2.2. ábra**). A ligand kötőhelyet a két alegység együttesen alkotja. Emlősök esetében 24 heterodimert különböztetünk meg (18 α és 8 β alegység), mivel a β alegység több α -val is kölcsön tud hatni. A receptorok a plazmamembrán citoplazmikus oldalán a sejt-váz polimerjeinek és a jelátviteli komplexek összeszerelődését szabályozza, míg az extracelluláris oldalon a mátrix makromolekuláival vagy a szomszédos sejtek felületén lévő receptorokkal alakítanak ki kapcsolatot. Tehát ezek a multifunkcionális receptorok integrálják a sejtet annak mikro környezetébe. Az integrineket és ligandjaikat a molekuláris kölcsönhatás szerkezete alapján négy fő osztályba sorolhatjuk: RGD-kötő (arginin-glicin-aszparaginsav), LDV-kötő (leucin-aszparaginsav-valin), A-domén $\beta 1$ integrinek

(laminin, illetve kollagén kötő tulajdonság) és α A-domént nem tartalmazó laminin kötő integrinek [24], [25], [26]. Általában kis affinitással ismerik fel a ligandjaikat (μ M - mM tartományban [27]), de a többszörös gyenge kölcsönhatás szilárd rögzítést biztosít a sejtek számára a mátrixban. Egy ligandot több receptor is felismer, így lehetővé válik a kölcsönhatások finomhangolása [23].



2.2. ábra Az integrin receptorok szerkezetének és aktiválódásának sematikus ábrázolása [28]. Az ektodomének, a TM (transzmembrán) és citoplazmikus domének között kialakuló speciális kapcsolat biztosítja az integrin összecukott állapotát. A ligand bekötésének hatására a receptor aktiválódik, és nyújtott konformációt vesz fel.

A 24 féle integrin receptor közül 8 ismeri fel az RGD-motívumot különböző affinitással [29]. Az RGD-motívum számos extracelluláris mátrix fehérjében megtalálható, mint például fibronectin, fibrinogén, vitronectin, von Willebrand faktor, illetve számos nagyméretű glikoproteinben is kifejeződik [30].

A sejtek aktin sejtváza egy nagyon dinamikus hálózat, melyet aktin polimerek és ehhez kapcsolódó különféle fehérjék alkotnak. Az aktin citoszkeleton számos esszenciális biológiai funkciót lát el, úgymint az intra- és az extracelluláris mozgás és a szerkezeti váz biztosítása. A fokális adhézios kontaktusok és az adherens kapcsolatok membránkapcsolt komplexek, melyek az aktin filamentumok számára nukleációs

pontként szolgálnak, valamint a sejt belseje, a plazmamembrán és az aktin sejtváza közötti keresztkötőként funkcionálnak. A fokális adhéziók szerkezeti szerepet töltenek be: összekapcsolják a sejt külső extracelluláris mátrixot és a sejt belüli aktin sejtváza. A fokális adhéziók integrin típusú receptorokat tartalmaznak, melyek az extracelluláris mátrixhoz kötődnek és intercellulárisan olyan fehérje komplexekhez kapcsolódnak, melyek vinkulint (univerzális fokális adhéziós marker), talint, α -aktinint, paxillint, tenzint és fokális adhéziós kinázt (FAK) tartalmaznak [31], [32], [33].

2.2. Optikai bioszenzorok

2.3. Jelölőanyagokat alkalmazó bioszenzorika

Számos biológiai eljárásban alkalmaznak valamilyen fluoreszcens jelölést a fehérjék helyének és aktivációjának meghatározására, a fehérje komplexek létrejöttének és konformációs változásainak megértéséhez, illetve a biológiai folyamatok nyomon követésére.

2.3.1. Fluoreszcens jelölések jellemzése

Fluoreszcens jelölésre gyakran használnak fluoreszcens fúziós fehérjéket, amelyeket génszintézis eljárással fejtenek ki a vizsgált sejtekkel. A fluoreszcens molekulák ritkán károsak közvetlenül a sejt különböző folyamataira, azonban a célfehérjéhez való kötődésük megzavarhatja annak természetes funkcióját. Sok fehérje dimerként, multimerként, polimerként vagy fizikai barrierként (pl. membránok) működik. A fehérjék kötőhelyei gyakran nagyon specifikusak a kölcsönható partnerekre, ezért a nagyméretű fluoreszcens fehérjéket (pl. GFP (green fluorescent protein) 28 kDa és 238 aminosavból áll) úgy kell a jelölendő fehérjéhez kapcsolni, hogy azok ne zavarják, és ne lépjenek kölcsönhatásba a kötőhelyekkel. A jelölőmolekulák méretükből adódóan megzavarhatják a jelölendő fehérje működését. Ebből kifolyólag a citoplazmában szabadon diffundáló monomer célmolekulák általában jobban funkcionálnak fluoreszcens fúziós fehérjeként. Emellett számos fluoreszcens molekula megfelelő körülmények között klaszterképződést indukál, amely a fúziós fehérje természetes lokalizációjának megváltozásához vezet. Így elengedhetetlen, hogy a fluoreszcensen jelölt fehérjéket tanulmányozásuk során megfelelő kontrollvizsgálatoknak vessék alá. A tesztelésükre a legjobb módszer a vad típusú gén mutáns génre történő kicserélése, majd a vad típusú és a mutáns géntermék fenotípusának összehasonlítása. Az így előállított vad típusú és mutáns fehérjék expressziós szintjét is ellenőrizni lehet, amely szintén információt szolgáltat arról, hogy a mutáns fehérje befolyásolja-e a sejtek működését [34].

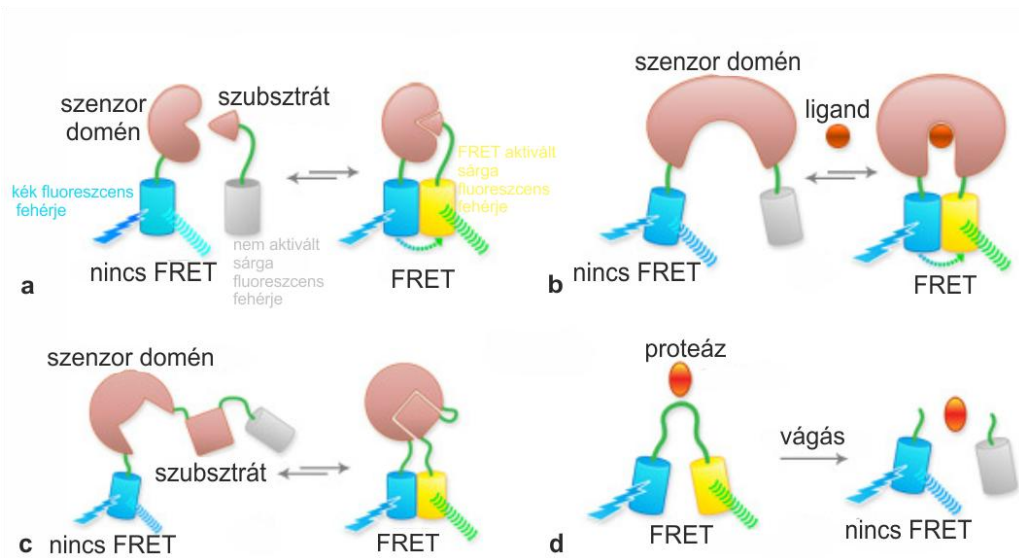
A szerves fluorofórok számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek a fluoreszcens fehérjékkel szemben: kisebb a méretük, jobb a fotostabilitásuk, széles a spektrumuk és gyakran nagyobb a fényerejük [35]. A jelölő molekulát direkt és indirekt módon is hozzá lehet kapcsolni a célmolekulához. Azonban fluorofórok alkalmazása esetén a

legnagyobb probléma a jelölés specifikusságának biztosítása és a megfelelő sztöchiometriai arány beállítása. Ezzel a módszerrel ugyanis nem lehet 100%-os jelölési arányt elérni, és a szabad festékmolekulák jelenléte háttérfestődéshez, ill. nem specifikus jelekhez vezethet. Ezért a jelölt és jelöletlen fehérjéket gyakran elválasztják egymástól ioncserés vagy méretekizárásos kromatográfiával. Emellett indirekt jelölési módszerek esetében extra aminosavakat visznek be a fehérjébe, amelynek segítségével később könnyebb a tisztítási procedúra [34]. Problémát jelenthet még a festékekkel jelölt fehérjék bejuttatása az élő sejtekbe.

2.3.2. *Fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer alapú bioszenzorok*

Gyakran alkalmazott fluoreszcens szenzorok közé tartoznak a FRET (fluorescence resonance energy transfer, fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer) alapú bioszenzorok (**2.3. ábra**). A FRET alapú szenzorok jele nagymértékben függ a donor és az akceptor molekulák közötti távolságtól, így ez a módszer értékes információt szolgáltat a ligand-receptor, a donor-jelölt hatóanyag, valamint az akceptor-jelölt sejt közötti kapcsolatáról.

A FRET egy sugárzásmentes energiatranszfer a gerjesztett állapotban lévő fluoreszcens donor és egy akceptor molekula között. Az energiatranszfert az akceptor molekula fotonemissziója követi. FRET akkor történik, amikor a fluoreszcens donor emissziós spektruma átfed az akceptor molekula abszorpciós spektrumával. Ennek következtében a donor élettideje csökken, és az akceptor fluoreszcenciája érzékenyítetté válik [36]. A donor és az akceptor molekulák többféle módon kerülhetnek egymás közelébe: az egyik fluorofórt rögzíthetik a felületre, a másik pedig hozzá tud kapcsolódni a kötőhelyéhez. Két fluorofór is kötődhet egy fehérjéhez, ekkor a környezeti körülmények konformációváltozásra készítetik a fehérjét, amely FRET-et indukál. Gyakran alkalmaznak olyan kioltó molekulákat, amelyek FRET-akceptorként funkcionálnak. Képesek energia fogadására, de nem rendelkeznek emissziós spektrummal. Ennek köszönhetően javul a jel-zaj arány, és könnyebbé válik az adatok kiértékelése [37].



2.3. ábra FRET-alapú bioszenzorok működési elvei (a) intermolekuláris FRET két külön domén között, (b) szenzor domén és effektor ligand közötti kölcsönhatás vizsgálatára szolgáló szenzor, (c) egyszerű genetikai expressziós egység: a szubsztrát és szenzor fehérje össze van kapcsolva, (d) fluoreszcens szenzor, amely a szubsztrát levágódását detektálja [37].

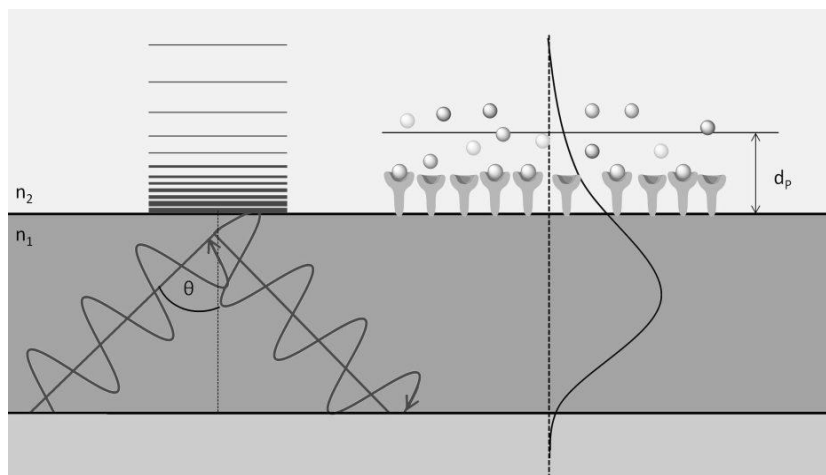
Azonban számos tényező megnehezíti a FRET-alapú szenzorok alkalmazását. Az alkalmazott fluorofóroknak megfelelő gerjesztési és emissziós spektrummal kell rendelkezniük, illetve a célfehérje harmadlagos térszerkezetét nem szabad befolyásolniuk. Nagyon fontos a donor és az akceptor molekulák optimális aránya is a megfelelő erősségű jel eléréséhez. A kísérletek kivitelezését nagyban megnehezíti, hogy elegendően közel kell egymáshoz lennie a donor és akceptor molekuláknak ahhoz, hogy a FRET jelenség bekövetkezzen. Valamint meg kell találni a megfelelő fluoreszcens szűrőt is, mely szelektíven csak a donort gerjeszti, míg minimalizálja az akceptor molekula gerjesztését. Emellett élő sejteken belüli alkalmazása limitált [37].

Mіндеzen okokból kifolyólag egyre inkább előtérbe kerülnek a jelölésmentes módszerek, melyek számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek a jelöléses bioszenzorokkal szemben.

2.4. Jelölésmentes bioszenzorok

A jelölésmentes bioszenzorika egyre nagyobb teret hódít az orvosi diagnosztika, a gyógyszerkutatás, az élelmiszerbiztonság és a hadviselés területén [38]. Ezek a szenzorok rendkívül sokféle molekula affinitásának és kinetikájának valós idejű meghatározását teszik lehetővé, mindezt úgy, hogy nincs szükség jelölő anyagok alkalmazására. További előnyös tulajdonságaik közé tartozik a nagyfokú érzékenység, a nagy áteresztőképesség és a költséghatékonyság [39], [40], [41]. Egyre gyakrabban alkalmazzák őket élő sejtek adhéziójának nyomon követésére is [11], [42], [43].

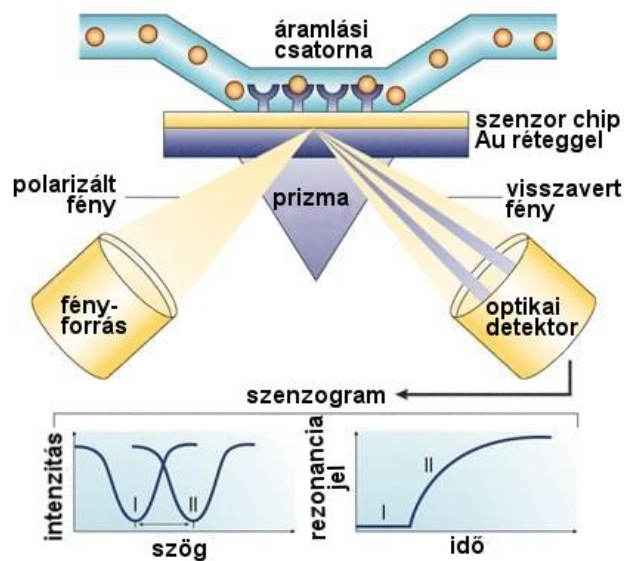
A következőkben négy jellemző példán keresztül szeretném bemutatni az evanescens térérzékelésen alapuló optikai bioszenzorokat. Először az evanescens hullám jelenségét szeretném szemléltetni. Ha egy elektromágneses hullám a kritikus szögnél nagyobb szögben érkezik egy határfelületre, akkor teljes visszaverődést szenved el a közeghatáron. Egy kis része a hullámnak azonban képes behatolni a szomszédos médiumba, létrehozva így az ún. evanescens teret, melynek intenzitása a felülettől távolodva exponenciálisan csökken (**2.4. ábra**). Az evanescens térérzékelésen alapuló bioszenzorok azt a jelenséget használják ki, hogy a behatolási mélységen (d_p) belül a (bio)molekulák kölcsönhatása vagy adszorpciója megváltoztathatja az effektív törésmutatót és a becsatolási szöget (θ) [44].



2.4. ábra Az evanescens tér sematikus ábrázolása. Teljes visszaverődés esetén az evanescens tér behatol a határoló közegbe (n_2), majd intenzitása exponenciálisan lecsökken. Az evanescens tér behatolási mélységén (d_p) belül a (bio)molekulák felületi adszorpciója megváltoztatja a lokális törésmutatót [44].

2.4.1. Felületi plazmon rezonancia

Az egyik leggyakrabban alkalmazott jelölésmentes optikai bioszenzor az SPR (surface plasmon resonance, felületi plazmon rezonancia). A módszer azon alapszik, hogy egy vezető-dielektromos határfelületet egy speciális szögben adott hullámhosszúságú fényvel besugároznak (2.5. ábra), aminek következtében töltésszcilláció alakul ki, amely egy haladó plazmonhullámot hoz létre a fém felületén. Leggyakrabban prizma segítségével csatolják be a fényt, melynek során a fény teljes visszaverődést szenved, és létrehozza az evanescens teret, ahol a vizsgálni kívánt határfelületi események végbemennek (pl.: adszorpció, bekötődés). A plazmongerjesztés csak bizonyos hullámhossz és megvilágítási szög esetén történik meg. Ezen paraméterek változásából lehet meghatározni a törésmutató-változást, majd ennek segítségével a felületre adszorbeált molekulák felületi tömegsűrűségét is. A módszer előnye, hogy a chip felülete módosítható, így sokféle célra felhasználható. Az SPR alkalmas fehérjék, DNS, polimerek adszorpciójának nyomon követésére [45], [46], [47]. Az evanescens tér behatolási mélysége a hullámhossztól és az anyag dielektromos állandójától függően 100-600 nm között változik [48].



2.5. ábra Az SPR működési elvének sematikus ábrázolása. A szenzor chip felületének közelében végbemenő törésmutató-változásokat detektálja a műszer. Az SPR csúcsok eltolódnak (I-ből II állapotba, bal oldali grafikon) amikor a biomolekula bekötődik, és megváltoztatja a felületi réteg tömegsűrűségét. A kapott rezonancia jel arányos a felületen végbement tömegváltozással (jobb oldali grafikon) [39].

2.4.2. *Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia*

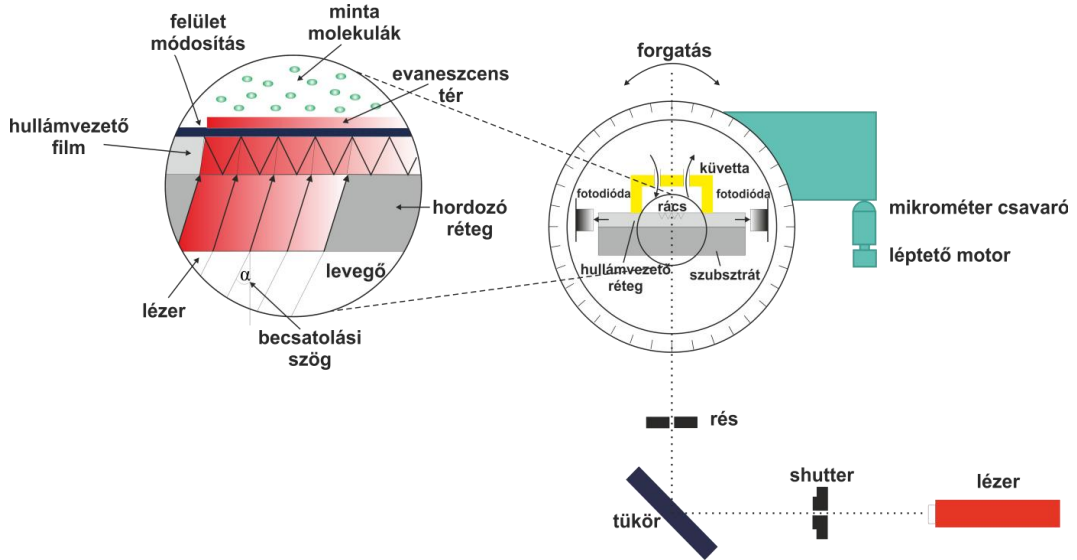
Az optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópia (optical waveguide lightmode spectroscopy, OWLS) egy általánosan elterjedt jelölésmentes optikai módszer, melynek alapja a szenzorfelület közelében végbemenő törésmutató-változás nyomon követése az evaneszcens tér felhasználásával. Így alkalmas fehérjék, baktériumok és emlőssejtek adszorpciójának monitorozására.

A műszer két fontos egysége az optikai hullámvezető chip és a precíziós goniométer, mely a chipet a rács hosszanti tengelye mentén forgatja. A hullámvezető chip egy üveghordozóra felvitt 170-220 nm vastagságú, nagy törésmutatójú (1,7-1,8) dielektromos film. A fény becsatolására egy kb. 20 nm mély szinuszos optikai rácsot alakítanak ki a dielektromos rétegben, párhuzamosan a chip hosszanti oldalával. A rács segítségével történik a lézerfény (He-Ne, 632,8 nm) hullámvezető rétegbe történő becsatolása, ahol a fény teljes visszaverődések sorozatát szenved el, és diszkrét módusokban terjed. A kilépő fényt a chip szélein elhelyezett fotodiódák érzékelik. A hullámvezetés és az evaneszcens tér kialakulása csak megfelelő szögek és törésmutatók esetén történik meg. Az evaneszcens térben a törésmutató változása a becsatolás körülményeit megváltoztatja, ezáltal módosulnak a becsatolási szögek is. A kísérlet során a becsatolt fény intenzitását mérjük a becsatolási szög függvényében, és a legnagyobb intenzitáshoz tartozó becsatolási szög megváltozását követjük nyomon. Így megkapjuk a módusokhoz tartozó rezonanciacsúcsok eltolódását, ami által kinetikai információhoz juthatunk a felület közelében végbemenő folyamatokról (**2.6. ábra**) [49].

A fény becsatolásához a következő feltételnek kell teljesülnie:

$$N = n_0 \sin \alpha + l \frac{\lambda}{\Lambda} \quad (1)$$

ahol N a gerjesztett hullámvezető módus effektív törésmutatója, n_0 a levegő törésmutatója, α a becsatolás szöge, l a diffrakciós rend ($l=1$ egymódusú OWLS hullámvezető chipek esetén), λ a gerjesztő fény hullámhossza és Λ a rácsállandó. A TE és TM polarizációjú módusokhoz külön becsatolási szög tartozik.



2.6. ábra Az OWLS szenzor kísérleti elrendezésének sematikus ábrázolása [49]. A felület közelében végbemenő törésmutató-változások a becsatolási szögek eltolódásához vezetnek, melyből a felületre adszorbeálódott tömegsűrűség kiszámítható.

Ha fehérjeréteg adszorbeálódik a hullámvezető felületére, akkor ennek a rétegnek a törésmutatóját (n_A) és rétegvastagságát (d_A) az alábbi egyenlettel lehet meghatározni az (1) egyenletben meghatározott N segítségével:

$$\pi m \cong \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{n_F^2 - N^2} (d_F + \Delta d_F)$$

$$-\arctan\left(\left(\frac{n_F}{n_C}\right)^{2\rho} \frac{\sqrt{(N^2 - n_C^2)}}{\sqrt{(n_F^2 - N^2)}}\right) - \arctan\left(\left(\frac{n_F}{n_S}\right)^{2\rho} \frac{\sqrt{(N^2 - n_S^2)}}{\sqrt{(n_F^2 - N^2)}}\right) \quad (2)$$

$$\Delta d_F = d_A \cdot \frac{n_A^2 - n_C^2}{n_F^2 - n_C^2} \left(\frac{\left(\frac{N}{n_C}\right)^2 + \left(\frac{N}{n_A}\right)^2 - 1}{\left(\frac{N}{n_C}\right)^2 + \left(\frac{N}{n_F}\right)^2 - 1} \right)^\rho \quad (3)$$

ahol n_F és d_F a hullámvezető réteg törésmutatója és vastagsága, n_C a minta törésmutatója, n_S a szubsztrát törésmutatója, $\rho=0$ TE és $\rho=1$ TM polarizáció esetén [49].

Ha a két polarizáció terjedése a felületre kitapad rétegben különböző, optikai anizotrópiáról beszélhetünk. Az anizotrópia jelensége több esetben is felléphet: ha két vagy több komponens eltérő törésmutatóval rendelkezik és a réteg strukturált, vagy ha a molekulák a vékonyrétegben nem random orientációval rendelkeznek, hanem rendezett rétegről van szó [50].

Egy egytengelyű kettőtörő vékonyréteg három független optogeometriai paraméterrel jellemezhető: a rétegvastagság (d_A), és az ordinális és extraordinális törésmutatókkal (n_o és n_e). Az adszorbeálódó fehérjék számára a hullámvezető síkjában nincs preferált irány, így $n_x=n_y=n_o$ és $n_z=n_e$. (A z tengely merőleges a hullámvezető síkjára.). A részletes számolásokban még feltételezhetjük, hogy a réteg a fény hullámhosszánál jóval vékonyabb ($d_A \ll \lambda$). Ez általában teljesül fehérjéreteg adszorpciója és látható fény esetén. Ebben az esetben a módusegyenletek az alábbiak szerint módosulnak, ahol a $\Delta d_{F'}$ a vékony uniaxiális réteg miatti perturbációt jelenti.

$$\Delta d_{F'} = \frac{n_o^2 - n_c^2}{n_F^2 - n_c^2} \left(\frac{\left(\frac{N}{n_c}\right)^2 + \left(\frac{N}{\bar{n}}\right)^2 - 1}{\left(\frac{N}{n_c}\right)^2 + \left(\frac{N}{n_F}\right)^2 - 1} \right)^\rho d_A \quad (4)$$

$$\bar{n}^2 = n_o^2 \left(\frac{1 - \frac{n_c^2}{n_o^2}}{1 - \frac{n_c^2}{n_e^2}} \right) \quad (5)$$

Az adszorbeált vékonyréteg növeli az hullámvezető módusok effektív törésmutatóit és eltolja a TE és TM módusokhoz tartozó értékeket ($\Delta N_{TE} \neq \Delta N_{TM}$). Ezt az effektív törésmutató-változást jól lehet nyomon követni az OWLS segítségével. Azonban a két függetlenül mért effektív törésmutatóból nem lehet három független optogeometriai paramétert meghatározni az uniaxiális rétegre. Ahhoz, hogy meg lehessen oldani az egyenletet és a réteg optogeometriai paramétereit (n_o , n_e , és d_A) meg lehessen határozni, az adszorbeálódott rétegek átlagos törésmutatóját rögzíteni kell. Így a további számítások során az átlagos törésmutató értéket $\bar{n}_A = 1,43$ értéken rögzítjük. Ezt a feltételezést, valamint az

$$\bar{n}_A^2 = \frac{2n_0^2 + n_e^2}{3} \quad (6)$$

egyenletet felhasználva meghatározható a három független paraméter, mely az uniaxiális felületi bevonatot jellemzi.

A részletes számolásokat a Horváth Róbert által fejlesztett MAPLE kóddal végeztük [51], [52].

A de Feijter formula segítségével a felültre adszorbeálódott tömeg sűrűségét (Γ) is meg lehet határozni, amennyiben a réteg optogeometriai paramétereit ismerjük:

$$\Gamma = d_A \frac{n_A - n_C}{\frac{dn}{dc}} \quad (7)$$

ahol a dn/dc értéke fehérjékre jellemzően $0,182 \text{ cm}^3/\text{g}$ [53].

Megmutatható, hogy a (7) egyenlettel leírt réteg anizotróp réteg esetén is kis hibával a helyes tömegértéket adja vissza, annak ellenére, hogy a benne szereplő n_A és d_A értékek irreálisak is lehetnek [50].

Az OWLS szenzor érzékenysége a törésmutatót tekintve $3,4 \times 10^{-5}$ RIU (refractive index unit, törésmutató egység) [54], a felületi tömegsűrűséget tekintve $10 \text{ pg}/\text{mm}^2$, és tipikus időbeli felbontása 2-20 s [55]. Kereskedelmi forgalomban számos bevonattal rendelkező chipet lehet kapni, a bevonatok lehetnek SiO_2 , TiO_2 , Ta_2O_5 , ITO, ZrO_2 és Al_2O_3 vékony rétegek, PTFE (poli(tetrafluoroetilén)) és szilícium vékonyrétegek passziválás céljából, ill. APTES ((3-aminopropil)-trietoxiszilán) szilanizálási célokra [56]. Emellett az optikai chip felülete tovább módosítható más eljárásokkal, amennyiben a bevonat átlátszó marad. Így az érzékelőmolekulákat sokféleképpen lehet rögzíteni a felültre: amino-, epoxi-, tiolszilanizálás útján, keresztkötő molekulák segítségével (pl.: EDC/NHS (etil-dimetilaminopropil-karboimid/N-hidroxiszukcinimid), glutáraldehid), fehérjék (pl. avidin), ill. polimerek fiziszorpciója útján (pl. PEI-polietylénimin) [57].

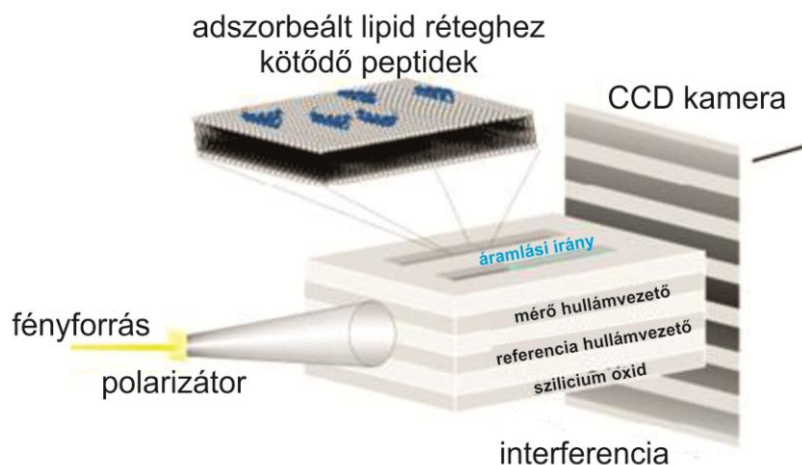
Az OWLS-t széles körben alkalmazzák *in situ* kísérletekben fehérjeadszorpció [58], baktériumok [59] és humán sejtek [12], [60] adhéziójának nyomon követésére, valamint immunoszenzorként is használják [61]. Fontos megemlíteni, hogy optikai hullámvezető-alapú szenzorok ma már tálcá formátumban (96, 384) is elérhetőek (Corning Epic BT

System), és sikeresen alkalmazhatóak sejtdhéziós és sejtszignalizációs kísérletekben [11], [62]. Azonban a tálcá alapú rendszerek csak kevés fajta felületi kémiával kaphatóak, speciális felületkémiai módosításuk még nem megoldott.

Az OWLS szenzor előnyei közé tartozik, hogy segítségével nemcsak kinetikai adatokhoz juthatunk, hanem információt kaphatunk a felületre adszorbeálódott tömegről is. Az érzékelőfelület sokféle felületkémiai eljárással módosítható, így többféle célra is felhasználható. Nagy előnye még a módszernek, hogy az optikai chip átlátszó, így közvetlenül a mérést követően a küvetta az optikai chippel együtt behelyezhető a mikroszkópba, és a felületről felvételeket lehet készíteni, anélkül, hogy a rendszert szét kellene szerelni.

2.4.3. *Kettős polarizációs interferometria*

A kettős polarizációs interferometria (dual-polarization interferometry, DPI) egy olyan hullámvezető szerkezetet alkalmaz, amely dielektromos rétegekből áll: egy szilícium-oxid hordozóra négy réteg szilícium-oxinitrid dielektromos filmet visznek fel (**2.7. ábra**). A második és a negyedik réteg nagyobb törésmutatójú, mint a szomszédos rétegek, így ezek lesznek a referencia és a mérő optikai hullámvezető útvonalak. Az alsó és a felső hullámvezető rétegbe párhuzamos lézert fényt becsatolva a módusok azonos mértékben gerjesztődnek, és továbbterjednek a szerkezetben. A lézer polarizációjának változtatásával a hullámvezető réteg mindkét polarizációs módusa gerjeszthető. A kimenetnél a referencia és a mérő hullámvezető réteg módusa találkozik, és interferencia lép fel. Mindkét polarizáció interferogramját mérve kiszámítható a minta okozta törésmutató-változás és a felületre adszorbeálódott réteg vastagsága. Mivel a DPI gyorsan vált a polarizációk között, ezért valós idejű mérést tesz lehetővé. Ennek köszönhetően a molekuláris kölcsönhatások konformációs változásait, a reakciók sebességi állandóit, affinitását és termodinamikáját is monitorozni lehet a segítségével [63].

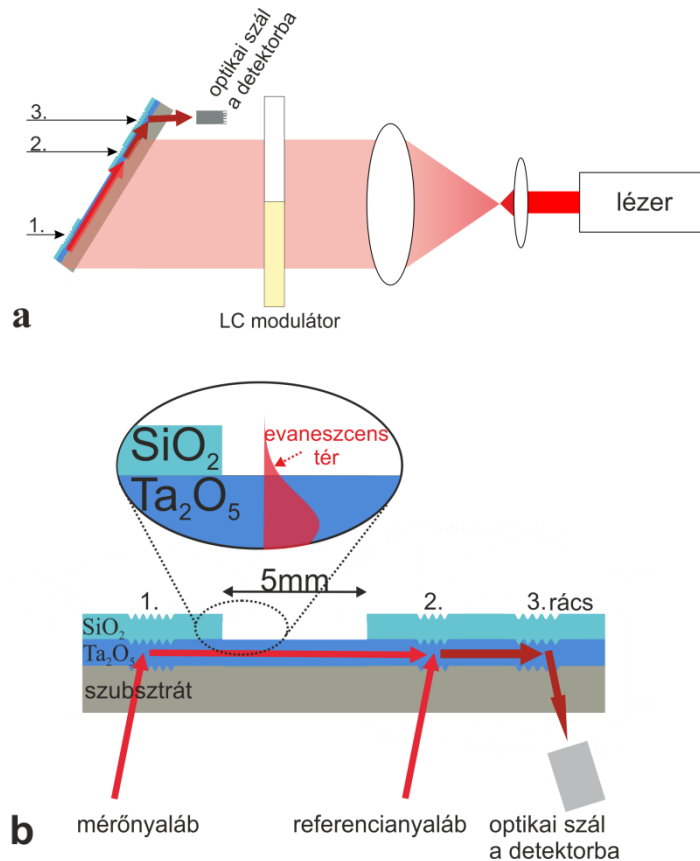


2.7. ábra A DPI működési elvének sematikus ábrázolása [64]. A szenzorchip öt rétegből tevődik össze.

A DPI módszer csak két módot tud alkalmazni, ezzel szemben az OWLS több mint kettőt, így az OWLS segítségével a mérések során több szerkezeti paramétert lehet megállapítani [65].

2.4.4. Rácscsatolt interferometria

A kereskedelmi forgalomban kapható jelölésmentes optikai bioszenzorok között jelenleg a legérzékenyebb módszer a rácscsatolt interferometria (grating coupled interferometry, GCI) (**2.8. ábra**) [66], [67]. A műszer érzékelési módszere egy sík optikai hullámvezető chipen alapul, melyen két becsatoló és egy kicsatoló rács található. Egy nyalábtágító segítségével a lézerfényt kitágítják, az egyik felét egy kétcellás folyadékkristályos (liquid crystal, LC) modulátoron engedik át (referencianyaláb), majd a két nyalábot párhuzamosan a két becsatoló rácsba vezetik. A folyadékkristályos modulátor egy periodikus jelet generál, amelyhez képest detektálható a jelváltozás. A becsatolt mérő- és referencianyaláb között interferencia lép fel. Az interferenciajelet a harmadik rács kicsatolja egy optikai szálba, mely a detektorba megy. Az érzékelőfelület a két becsatoló rács között az evaneszcens térben található, ahol a felületre érkező molekulák a szenzor felszínének közelében megváltoztatják a törésmutatót. Ennek következtében a mérőnyaláb fázisa megváltozik a referencianyalábéhoz képest. A módszer felületi érzékenysége kisebb, mint $0,1 \text{ pg/mm}^2$ [67].



2.8. ábra A GCI működésének sematikus ábrázolása. (a) A lézertény a nyalábtágítón és az LC moduláton keresztül áthalad és az 1. és 2. rácsokon keresztül becsatolódik a hullámvezető rétegbe. (b) A chip keresztmetszeti képe. A mérőnyaláb az 1. rácson, a referencianyaláb a 2. rácson csatolódik be. Az interferenciajelet a 3. rács csatolja ki az optikai szálba [67].

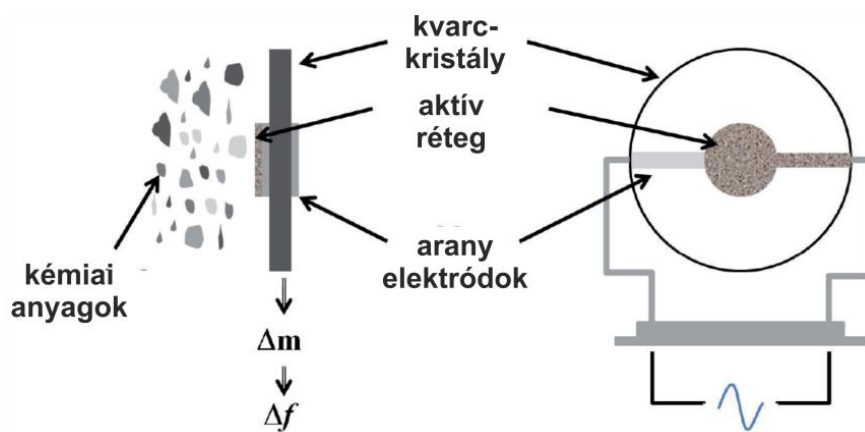
A Creoptix AG által forgalomba hozott GCI Wave szenzor segítségével nagy érzékenységet igénylő folyamatok valós idejű nyomon követése vált lehetővé, úgymint hatóanyagok fragmensalapú szűrése, kismolekulák kötődésének vizsgálata és gyengén kötő molekulák kinetikájának meghatározása.

A hullámvezető réteget alkalmazó szenzorok esetében a behatolási mélység a hullámvezető struktúrájának változtatásával hangolható, így a detektálni kívánt objektum (fehérje, vírus, sejt) méretéhez igazítható [68].

2.4.5. Kvarckristály mikromérleg

Az evaneszcens térérzékelésen alapuló optikai bioszenzorok mellett szeretném megemlíteni a széles körben elterjedt piezoelektromos kvarckristály mikromérleget is.

A kvarckristály mikromérleg (quartz crystal microbalance, QCM) mérési elve a piezoelektromos kvarckristály rezgési frekvenciájának érzékeny mérésén alapul. A QCM két elektródát tartalmaz, melyek a kvarckristály két oldalán helyezkednek el (2.9. ábra). A két elektróda egy oszcilláló elektromos erőteret hoz létre a kvarc lemezre merőlegesen. Az oszcilláló mező mechanikai rezgést idéz elő a kristályban, melynek iránya a kristályrács irányától függ. A felületen végbemenő kismértékű tömegváltozás megváltoztatja a kristály rezgési sajátfrekvenciáját, melyből kiszámítható a felületre adszorbeált molekulák mennyisége. A műszer tömegérzékenysége 10 pg/mm^2 alatti [69].



2.9. ábra A QCM működésének alapelve: az adszorbeálódó molekulák megváltoztatják a réteg viszkoelasztikus tulajdonságait, ennek következtében a rezonancia frekvencia is megváltozik [70].

A QCM-et számos célra alkalmazzák, többek között fehérje adszorpció [71], aptamer-fehérje kölcsönhatáson alapuló [72], nukleinsav hibridizációs kísérletekben [73], valamint sejtdhézió tanulmányozására is [74].

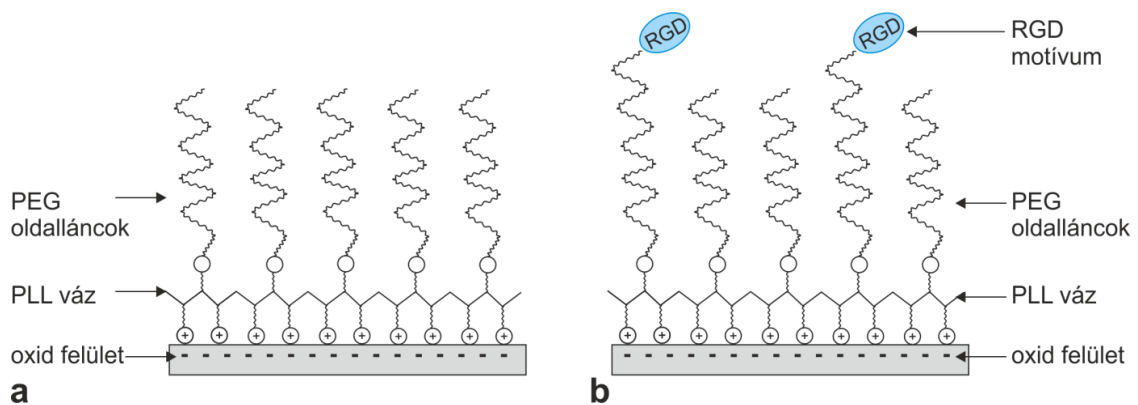
2.5. Felületi bevonatok sejtadhézió vizsgálatához

Világszerte egyre nagyobb igény mutatkozik olcsó, nagy mennyiségben előállítható, egyszerűen alkalmazható bevonatok létrehozására, melyek segítségével könnyen kontrollálható a sejtek adhéziója. A sejtek térbeli és időbeli adhéziójának befolyásolása fontos szerepet játszik többek között a gyógyszerkutatásban, a bioanyag-kutatásban és a szövetmérnökség területén is [75], [76], [77]. Ezek a bevonatok alapvetően két fő célt szolgálnak: vagy a sejtek adhéziójának teljes gátlását (pl. orvosi műszereken), vagy a sejtek kitapadásának elősegítését (pl. implantátumok).

A leggyakrabban használt anti-adhezív felületi bevonatok a szintetikus polietilén-glikol (PEG) alapú polimerek [78], [79] vagy kopolimerek [80]. Gyakran alkalmaznak felületre immobilizált biopolimereket, mint például karboximetil-dextránt (CMD) [81], [82], alginátot [83] vagy hialuronsavat [84]. Ezek a molekulák jellemzően nem alakítanak ki megfelelő sejttaszító felületi bevonatot spontán adszorpció révén, hanem valamilyen kémiai technika [85] és bonyolult felületmódosítás [86] szükséges a sejttaszító réteg létrehozásához. Csak néhány olyan anyag ismert, amely képes spontán adszorpcióval hatékony sejttaszító réteg kialakítására. Egy közismert példa erre a mucin, amely könnyen hozzáférhető, és különböző sejtek kitapadásának kontrollálására alkalmas bevonat készíthető belőle, ami egyszerűen kombinálható felületi mintázatokat létrehozó technikákkal [87]. Emellett gyakran hoznak létre olyan antibakteriális felületi bevonatokat, amelyekben antibakteriális enzimek [88] vagy gyógyszer hatóanyagok [89], [90] vannak a polimerekhez kapcsolva.

Sejtdhéziót elősegítő felületek létrehozása során gyakran az extracelluláris mátrixban található fehérjéket (pl.: kollagén, fibronectin) használják fel felületi bevonatként. Ezeknek a fehérjéknek csak bizonyos részeit (epitópok, néhány aminosav) ismerik fel a sejtek. Így nincs szükség a teljes fehérjére, csak ezekre a rövid aminosav-szekvenciákra, melyek mesterségesen termeltethetőek, és hozzákapcsolhatóak például polimerekhez [91], [92]. Ilyen célokra is elterjedten alkalmazzák a PEG-alapú polimereket, melyeket valamilyen sejtdhéziót elősegítő csoporttal funkcionalizálnak, leggyakrabban RGD-motívummal (fibronectinre jellemző) [93], [94] vagy GFOGER-motívummal (glicin-fenilalanin-hidroxi-prolin-glicin-glutamát-arginin, kollagénre jellemző) [95].

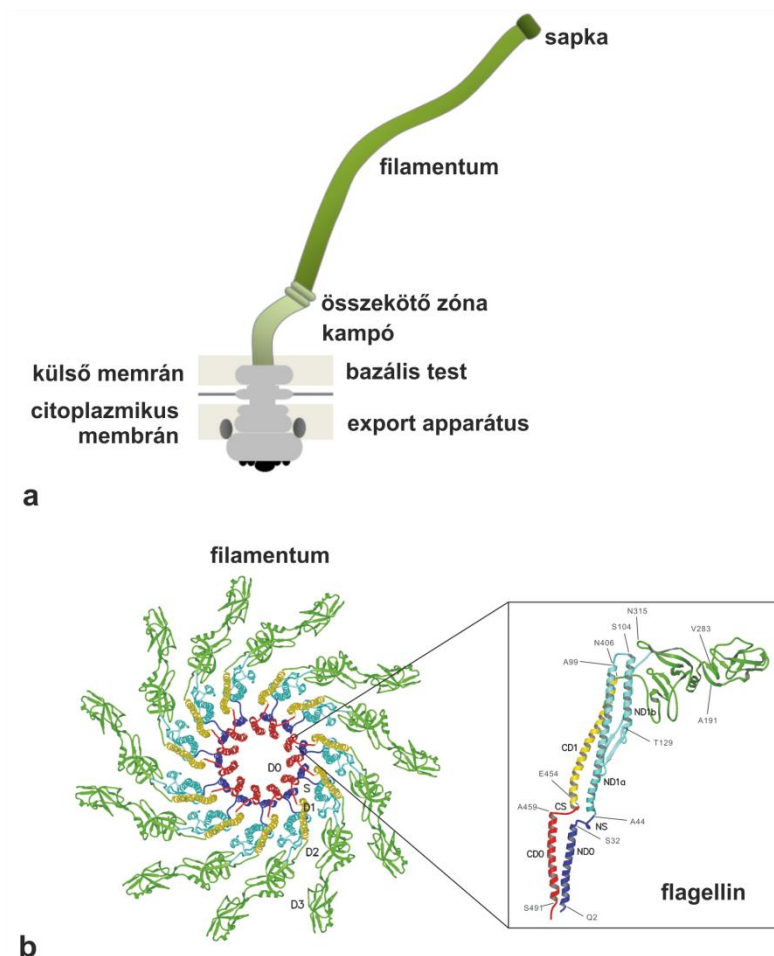
A PLL-*g*-PEG polimer poli-L-lizin (20 kDa) gerincből és polietilén-glikol (2-5 kDa) oldalláncokból épül fel. A negatívan töltött oxid felület és a pozitívan töltött PLL (< pH 10) között elektrosztatikus kölcsönhatás lép fel. A PLL a felületet jó lefedettséggel borítja be, hozzá fésűszerűen kapcsolódnak a PEG láncok (2.10. (a) ábra). A PEG oldallánc hidrofil, nem töltött, flexibilis, nagy víztartalmú és biokompatibilis. Meggátolja a fehérjék, a baktériumok és az emlőssejtek adhézióját. A PEG oldalláncok egy részét funkcionálizálhatják is a felhasználási céltól függően, ekkor a funkcionálizált oldallánc tipikusan hosszabb, hogy a csoportok megfelelő mértékben hozzáférhetőek legyenek. RGD-funkcionálás esetén jellemzően a PEG láncok 6-15%-ához kötnek RGD-motívumot (2.10. (b) ábra) [96].



2.10. ábra PLL-*g*-PEG és RGD-funkcionálizált változatának sematikus ábrázolása. A kopolimer vizes oldatból a negatívan töltött felületre a PLL-en keresztül adszorbeálódik. (a) A PEG oldalláncok meggátolják a fehérjék, a baktériumok és az emlőssejtek adszorpcióját a felületre [96]. (b) Az RGD-motívum kinyúlik az oldatba, és elősegíti az emlőssejtek adhézióját [97].

2.6. Flagellin fehérje és speciális tulajdonságai

A baktériumok mozgásszervei a flagellumok. A flagellumok három fő részből épülnek fel: a molekuláris motorból, a kampóból és a helikális filamentumból (**2.11. (a) ábra**). Az H^+ ionok által hajtott motor tengelyét az erősen görbült szerkezetű kampó köti össze az 5-10 μm hosszúságú helikális filamentummal [98]. A filamentum külső átmérője ~20 nm, és több ezer flagellin (FliC) molekula alkotja.



2.12. ábra (a) A bakteriális flagellum szerkezetének sematikus ábrázolása [99]. (b) A filamentum és a flagellin szalagmodelles szerkezeti képe [100].

A flagelláris filamentum önszerveződő tulajdonsággal rendelkezik, vagyis a flagellin monomerek megfelelő körülmények között spontán módon tudnak összeállni a natívval megegyező szerkezetű filamentumokká. A filamentumok 60-70 °C-os hőkezelésnek alávetve, vagy sav hozzáadásával monomer egységeikre esnek szét. A monomerekhez ún. magokat (rövid filamentumszálak) vagy precipitálószerket (pl. ammónium-szulfát) adva újra képesek szállá szerveződni [101].

A filamentumok másik érdekes tulajdonsága a polimorfizmus. A környezeti paraméterektől függően, reverzibilis módon, egymástól jól megkülönböztethető helikális stabil állapotokba képesek átrendeződni. Ezek az átrendeződések előidézhetőek a hőmérséklet, az ionerősség, a pH változtatásával vagy mechanikai erőhatással [98]. Ennek a tulajdonságnak köszönhetően számos megjelenési formája lehet a filamentumnak: egyenes (lehet R (jobbra)- és L (balra dőlő)- típusú), normál, spirális).

A *Salmonella typhimurium* baktérium flagellinje 494 aminosavból épül fel, és négy doménből áll: D0, D1, D2 és D3 (**2.12. (b) ábra**). A filamentum belső gyűrűjét (magját) a D0 és D1 domének alkotják, melyek helikális köteget (coiled-coil) alkotnak. A D1 domén N-terminális helikális köteget két β -redő és β -kanyar követi, melyek feltehetően a baktérium úszása közben az R- és L-típusú helikális konformáció közötti váltásért felelősek. A D2 és D3 domének nagyrészt β -redőből épülnek fel és a központi filamentum magból kinyúlva az oldat irányába néznek [102]. A flagellin terminális régiói, melyeket a D0 és D1 domének alkotnak, 180 N- és 100 C-terminális aminosavból állnak, erős szekvenciális homológiát mutatnak, azaz konzerváltak. A centrális szegmenseket alkotó D2 és D3 domének ezzel szemben nagymértékű szekvenciális és hosszbeli variációt mutatnak [103], [104]. A *S. typhimurium*-ból származó flagellin 66 N- és 44 C-terminális régiói oldatban nem rendelkeznek kompakt, stabil térszerkezettel [105]. A rendezetlen terminális régiók szerepet játszanak a sejten belüli polimerizáció megakadályozásában. A rendezetlen végű alegységek nem képesek egymáshoz kötődni, és a régiók nem tudják egymást rendezni az intracelluláris térben [106].

A polipeptid láncon belül a hidrofób aminosavak 7-es ismétlődései találhatóak [107], így a rendezetlen régiók nagy valószínűséggel amfipatikus helikális hélixeket alkotnak. A szerkezeti predikciók arra engednek következtetni, hogy a régiók monomer állapotban rendezetlenek. Feltehetőleg ezek a rendezetlen régiók rendeződni és stabilizálódni tudnak megfelelő hidrofób felszínen.

A hipervariábilis D3 domén nincsen kapcsolatban a szomszédos alegységekkel, nem vesz részt az alegységek közötti kapcsolatok kialakításában, így a filamentumformálásban sem. Tehát a D3 domén nagymértékben független része a FliC-nek, amely lehetővé teszi eltávolítását, ill. helyettesítését más oligopeptidekkel [108],

[109], anélkül, hogy megzavarná a szál önszerveződését. A *S. typhimurium* flagellinjének felépítésében a 190-284 aminosav-szekvencia vesz részt. Ez a domén egy β -hordó, mely négy β -láncból és egy rövid α -helikális szegmensből épül fel [100], [104]. A D3 domén külső közeg felé néző részét három hurokrégió alkotja, melyek aminosav-szekvenciáinak módosításával specifikus kötőhelyek alakíthatóak ki. Fontos megjegyezni, hogy nemcsak a beépíteni kívánt kötőhely tulajdonságait kell figyelembe venni, hanem a beépítésre használt linkereknek is megfelelőnek kell lenniük. A flagellin szerkezetéből adódóan olyan linkerpárt kell választani, mely biztosítja a kötőmotívum számára a megfelelő orientációt.

A flagellin monomer számos olyan tulajdonsággal rendelkezik, amely érdekessé teszi a nanobiotechnológia számára. A fehérje jól elkülöníthető hidrofil és hidrofób egységekből épül fel, ami lehetővé teszi hidrofób kölcsönhatások révén a monomerek gyors és hatékony önszerveződését [100]. Oldatban a D0 és D1 domének részben rendezetlenek, ennek köszönhetően könnyen tudnak alkalmazkodni a lokális környezetükhöz [105]. Emellett a hipervariábilis D3 domén a filamentum külső felszínén helyezkedik el és erősen hidrofil tulajdonságokkal rendelkezik annak érdekében, hogy meggátolja a filamentumok egymáshoz, valamint a baktériumsejt felszínéhez való tapadását. A filamentum a sejten kívül helyezkedik el, így a vad és a genetikailag módosított flagellinek kinyeréséhez nem szükséges a sejt feltárása, ami nagymértékben csökkenti a fehérje kinyeréséhez és tisztításához szükséges időt és költségeket.

Kuwijama és mtsai. megmutatták, hogy genetikai módosítás során különböző deléciók vihetők be a hipervariábilis központi régióba (D3 domén helyére) anélkül, hogy a flagellin szálformálási képessége megváltozna [110]. Ennek köszönhetően az idegen peptid-, ill. fehérjeszekvenciák beépítésének fő célpontja a *FliC* gén központi régiója, aminek hatására bakteriális filamentum a kívánt terméket fogja kifejezni a felszínén. A természetes, ill. a genetikai módosítással létrehozott deléciós mutánsok általában mechanikailag nem stabilak, és megváltozott polimorfia jellemző rájuk. Korábbi munkák azt is megmutatták, hogy a D3 domén eltávolítása szignifikánsan nem befolyásolja a filamentum stabilitását, abban az esetben, ha a többi 3 domént nem érinti változás [109]. Így a D3 domén kiváló célpont heterológ szekvenciák beépítésére, miközben megőrzi stabil filamentum formáló képességét is. A flagellin ezen

tulajdonságát kihasználva sikeresen építettek be magnetit-kötő domént [111], ill. xilanáz enzimet [112], [113] is a D3 domén helyére.

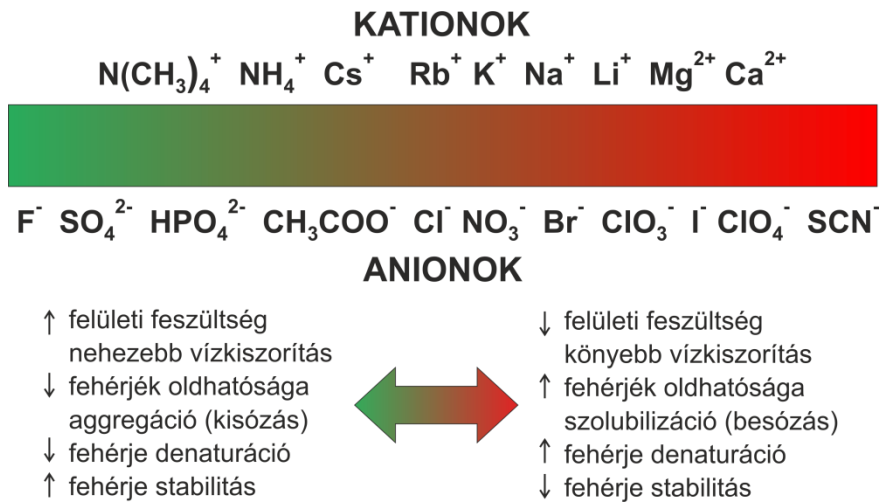
Irodalmi adatok szerint a flagellin nem adszorbeálódik hidrofíl felületen, ellenben hidrofób felületen tömör és stabil monoréteget alkot [52]. Megállapították, hogy a flagellin a D0 és D1 rendezetlen régiókon keresztül kötődik a hidrofób felülethez, így a hipervariábilis D3 domén az oldat irányába néz [52], [114]. Ennek köszönhetően a vad típusú fehérjék esetében a D3 domén, ill. a genetikailag módosított variánsok esetében a beépített peptidszekvencia az oldatban könnyen hozzáférhető lehet különböző sejtek számára.

2.7. Hofmeister sók

A fehérjék a felület közelébe érkeve nagy valószínűséggel adszorbeálódnak. Az adszorpciót számos belső és külső tényező befolyásolja. A belső tényezők közé tartozik a fehérjék másodlagos és harmadlagos térszerkezete, melyet a hidrofil, a hidrofób, ill. a pozitívan és a negatívan töltött oldalláncok nagymértékben meghatároznak. Külső paraméterek lehetnek a hőmérséklet, a pH, az ionerősség és a puffer összetétele. A hőmérséklet az egyensúlyi állapotra és az adszorpció kinetikájára is hatással lehet. A pH meghatározza a fehérje elektrosztatikus állapotát. Az izoelektromos ponton (pI) a fehérjék össztöltése nulla, míg alacsony pH-n ($\text{pH} < \text{pI}$) általában pozitívan töltöttek, magasabb pH-n ($\text{pH} > \text{pI}$) negatívan töltöttek. Az adszorpció sebessége nagyobb, amennyiben a felület és a fehérje ellentétes töltéssel rendelkezik. Az oldószer ionerőssége is nagymértékben befolyásolja a fehérje adszorpcióját [115]. Minél nagyobb az ionerősség, annál rövidebbek az elektrosztatikus kölcsönhatások a töltött részek között. Ennek következtében a töltött fehérjék vagy fehérje domének ellentétesen töltött felületekhez való kötődése gátolt, míg azonos töltésű felületre való adszorpciója kedvezményezett [116]. Ezek az elektrosztatikus hatások befolyásolhatják a fehérjék adszorpciójának kinetikáját. A fehérjék elektromos potenciáljának hatékony árnyékolása csökkenti a laterális kölcsönhatásokat, amelyek gyakran elektrosztatikus természetűek. Ez viszont növelheti a fehérje kitöltési sűrűségét (packing density), a kooperatív hatások megszűnését vagy a fehérje-fehérje repulziókat. Sőt a nagy ionerősség növeli a fehérjék aggregációját, amely a fehérjék kicsapásához vezethet [115].

Először 1888-ban írták le a Hofmeister effektust, amely az ionokat aszerint rendezte sorba, hogy milyen hatással vannak vizes közegben a fehérjék és a kolloid részecskék oldhatóságának változására, a denaturációra, valamint az enzimkinetikára [117]. Eredetileg azt feltételezték, hogy a víz szerkezete megváltozik az ionok hatására. Azonban bebizonyították, hogy az anionok nincsenek hatással a víz dinamikájára még nagy sókoncentráció esetén sem. Nem változtatják meg a hidrogénkötési hálózatot az anion közvetlen környezetében. Ennek eredményeképp azt a következtetést vonták le, hogy nincsenek hosszútávú szerkezetépítő vagy szerkezetromboló hatásuk ezeknek a sóknak [118]. Hofmeister kutatásai alapján bizonyos ionok (elsősorban anionok) közepes vagy nagy koncentrációban ($>100 \text{ mM}$) a fehérje tulajdonságaitól függően növelik vagy csökkentik azok oldhatóságát. Ezeket az ionokat az ún. Hofmeister sorba

rendezte, aszerint, hogy milyen hatékonysággal csapják ki a globuláris fehérjéket (2.13. ábra) [117].



2.13. ábra Tipikus Hofmeister sor anionokra és kationokra [118], [119].

A Hofmeister sorban anionok esetében a semleges (legkisebb hatású) Cl^- iontól balra található sókat kozmotrópoknak hívják, melyek erősen hidratáltak, erősítik a hidrofób kölcsönhatást, a fehérjékre és a makromolekulákra stabilizáló és kisózó hatásuk van. A Cl^- iontól jobbra lévő sókat kaotrópoknak hívják, melyek a feltekeredett fehérjék szerkezetét destabilizálják, csökkentik a hidrofób kölcsönhatást [118].

A legújabb kutatások szerint a Hofmeister hatás abban rejlik, hogy a sók befolyásolják a közvetlen ion-molekula, ill. a vízmolekulák és a makromolekulák első hidratációs burka közötti kölcsönhatásokat. Bizonyos megközelítések szerint a kicsapószerkezetek elősegítik a H-kötések létrejöttét a vízmolekulák környezetében (kozmotrópok), míg a szolubilizálószerkezetek tönkreteszik a H-kötéseket (kaotrópok). Más megközelítésben a diszperziós erőket teszik felelőssé a Hofmeister hatásért [120].

Bogár és mtsai. nemrégiben kidolgoztak egy olyan egységes elméletet, amely szerint a Hofmeister effektus a molekula-víz határfelületi feszültség sófüggésén alapszik és fenomenológiai leírást adnak a Hofmeister hatás eddig ismert formáira [121]. Általánosságban elmondható, hogy a határfelületi feszültséget, az érintkező fázisokban és a fázisok között fellépő kohéziós és adhéziós kölcsönhatások határozzák meg. Fehérje-só rendszer esetén a felületi feszültséget a következő három faktor befolyásolja: a felületen jelenlévő aminosavak természete (mely magától a fehérjétől függ), a vízmolekulák közötti H-kötés erőssége és a felület és a felszín közötti oldott anyagok

koncentrációkülönbsége [122]. Oldott anyagként a rendszerhez Hofmeister sók hozzáadva a só az utóbbi két faktort fogja befolyásolni. A határfelületen az oldott anyag felhalmozódása a felületi feszültség csökkenését, míg annak hiánya a felületi feszültség növekedését eredményezi. Ez azt jelenti, hogy függetlenül attól, hogy az ionok hatással vannak-e globálisan vagy lokálisan a víz H-kötésszerkezetére, nagy sókoncentrációk esetén a kaotrópok hozzájárulnak a fehérje-víz határfelületi feszültségének csökkentéséhez, miközben a kozmotrópok növelni fogják azt. A fehérje-víz határfelületi feszültség koncepció segítségével a Hofmeister effektus során fellépő konformációs változások leírása is lehetővé vált. Számos fehérje konformációja nyitott és zárt állapot között változik. A fehérjék főbb konformációs változásait a fehérje-oldószer felületi régió változásai kísérik. A kaotróp sók csökkentik a felületi feszültséget, míg a kozmotrópok növelik azt. Ebből következik, hogy a kozmotrópok a zárt, míg a kaotrópok a nyílt konformációt stabilizálják, figyelembe véve a molekula eredeti alapállapotát. A sófüggő felületi határfeszültség-ingadozási koncepció a Hofmeister effektus széles körének minőségi leírását teszi lehetővé, beleértve a szokatlan eseteket is [121], [123].

Összefoglalva a Hofmeister effektus pontos hatásmechanizmusa még nem ismert. Kétségkívül mindezen mikrofizikai paraméterek szerepet játszanak a folyamatban, azonban még mindig nem teljesen tisztázott, hogy pontosan mi is okozza. A kulcslépés feltehetőleg a felület közelében az anionok/kationok felhalmozódása/kizárása. Azonban még mindig vitatott kérdés, hogy ezeket a folyamatot pontosan mi szabályozza: a határfelületen a víz szerkezetének megváltozása és/vagy az ionok specifikus polarizálhatósága. Számos jelenség van, amely legtöbbször igaz a Hofmeister effektusra: általában elektrosztatikus kölcsönhatások esetén lép fel, főként az anionokra jellemző, függetlenül a vizsgált tulajdonságoktól a különböző töltésű felületek ellentétes sorrendbe rendezik a sókat [124].

A Hofmeister sók hatását számos fehérjére vizsgálták már. Az erre alkalmazott technikák között van a neutronszórás, a differenciális pásztázó kalorimetria és az infravörös spektroszkópia. Ezen módszerekkel bebizonyították, hogy a kaotróp és kozmotróp sók eltérően befolyásolják a fehérje szerkezetét [120]. Kiszögű röntgenszórással vizsgáltak lizozimot, γ - és α -krisztallint és aszpratát karbamoil transzferázt, ahol a pH-tól függően a Hofmeister hatásnak megfelelően vagy

ellentétesen viselkedtek a fehérjék [125]. Továbbá a bakteriorodopszinra és a vízdoldható mioglobinra gyakorolt Hofmeister hatást abszorpciós spektroszkópiai kísérletekkel elemezték [123], A sók NaSCN lizozim adszorpciójára gyakorolt hatását pedig OWLS-sel is tanulmányozták [126].

3. Célkitűzés

Munkám során olyan élő sejtek adhézióját befolyásoló, fehérjéből kialakított felületi bevonatot terveztem létrehozni, amelyek könnyen előállíthatóak, hangolhatóak és tulajdonságai szabályozottan változtathatóak. Választásom a flagellin fehérjére esett, mert az előzmények alapján kiváló jelöltnek bizonyult: könnyen előállítható, génszabályozási eljárások révén egyszerűen módosítható, hidrofób felületeken kompakt monoréteget alkot, valamint adszorpciós tulajdonságai kontrolláltan befolyásolhatóak. Célul tűztem ki a felületi rétegek önszerveződésének valós időben, optikai bioszenzorok alkalmazásával történő karakterizálását.

A flagellinréteg stabilitásának és borítottságának növelése céljából vizsgálni kívántam a Hofmeister sorba tartozó sók alkalmazhatóságát. A Hofmeister sók segítségével a flagellin és a hidrofób felület között kialakuló kölcsönhatást térképeztem fel, optimalizáltam a réteg tulajdonságait, a szerkezetét és a felszín borítottságát. A bioszenzoros adatok analizálásával vizsgáltam az önszerveződés folyamatainak kinetikáját, valamint a réteg struktúráját.

A vad típusú flagellinből előállított orientált réteg jól modellezi a bakteriális filamentum felületét, mely hipotézisünk szerint sejttaszító tulajdonságokkal rendelkezik. Ennek a feltevésnek az igazolása érdekében bakteriális *E. coli* és humán HeLa sejtek adhéziójával vizsgáltam a vad típusú fehérjéből készített bevonat hatását.

Genetikai módosítás révén a flagellinbe olyan motívumokat lehet beépíteni, melyek elősegíthetik a sejtadhéziót. Az így létrehozott fehérjerétegekre rákos HeLa sejtek adhéziós kinetikáját nagy érzékenységgel jelölésmentes optikai bioszenzorokkal tanulmányoztam. Megvizsgáltam, hogy a beépített kötőmotívumok száma és az alkalmazott linkerek hogyan befolyásolják az élő sejtek felületi kitapadását.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Alkalmazott felületek tisztítása

Kísérleteim során 3 különböző hordozót használtam: üveg tárgylemezt, szol-gél SiO₂-TiO₂ optikai hullámvezetőt (OW2400 chip, MikroVákuum Kft.) és arany bevonattal rendelkező Si/SiO₂ hordozót (4.1. táblázat).

A tárgylemezeket és OW2400 chipet standard tisztítási protokollnak vettem alá. A hordozókat 3 percre krómkénsavba mártottam, majd Milli-Q ultratiszta vízzel mostam, ezt követően 1 M KOH oldatba merítettem, majd többször öblítettem vízzel. A folyamat végére a hordozók felülete hidrofíl lett. A hordozókat ezt követően N₂ gázzal leszárítottam.

Az arany bevonattal rendelkező Si/SiO₂ hordozót 5 perces oxigén plazma tisztításnak vettem alá (Plasma Prep II, Structure Probe Inc.).

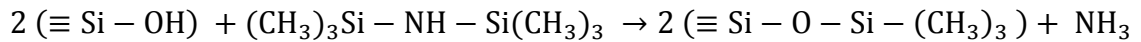
hordozó	módosítás	felhasználás
üveg tárgylemez	szilanizálás	XPS, fluoreszcens mikroszkópia
optikai hullámvezető chip	szilanizálás	OWLS, fáziskontraszt mikroszkópia
arany bevonattal rendelkező Si/SiO ₂ hordozó	szilanizálás	AFM

4.1. táblázat Az alkalmazott hordozók felhasználása.

4.2. Hidrofób felületek előállítása

A hidrofobizálás során zárt reaktoredénybe 95 ml xilolt mértem be, majd belehelyeztem a chiptartót a különböző hordozókkal. A chipet aktív felülettel lefelé helyezkedtek el a chiptartóban. Az edényt elektromos melegítőre helyeztem, és egy fűtőhálót tettem köré, majd elkezdtem melegíteni, amíg a xilol forrni nem kezdett. Ezt követően ellenőriztem a xilol szintet az edényben, és 5 ml hexametil-diszilazánt (HMDS) pipettáztam lassan az edény falára.

A kialakult refluxot 5 óráig biztosítottam a rendszerben. A reakció az alábbi reakcióegyenlet alapján megy végbe:



5 óra elteltével a hordozókat azonnal xilolba helyeztem. Ezt követően xilol, metanol, xilol, metanol mosásnak vettem alá őket, N₂ gázzal szárazra szárítottam, és üveg óralemezre helyeztem a hordozókat. A beégetési lépés során 110 °C-on 1 óra alatt kialakult a kovalens kötés a hordozók felülete és a szilán között. A hordozók hidrofobicitását kontaktszög mérésével ellenőriztem. Az így kezelt szilanizált felületen 90-95° peremszöget mértem. A hordozókat felhasználásig exszikkátorban tároltam [127].

4.3. Peremszög meghatározása

A peremszögek meghatározását szobahőmérsékleten végeztem. Egy zárt vízgőzzel telített üvegekamrába helyeztem a hordozót, ~5 µl vizet cseppentettem a felületre, majd 10 perc múlva felvételt készítettem a csepről. Az ImageJ szoftver DropSnake módszerét használtam a peremszögek meghatározására [128].

4.4. Arany bevonattal rendelkező Si/SiO₂ hordozó létrehozása és fehérjével történő bevonása

Bár az AFM módszernek nagyon nagy a vertikális felbontása, a bevonat vastagságának meghatározásához szükséges a szubsztrát szabadon hagyott eredeti felülete a bevont felület mellett. Olyan bevonat esetén, ahol a szubsztrát nincs beborítva teljesen a bioréteggel, a rétegvastagság könnyen meghatározható. Ellenkező esetben gondoskodni kell a referens felület megőrzéséről. A mikrotechnológiai eljárások során rutinszerűen alkalmazott Si/SiO₂ hordozón litográfiai módszerrel egy két részre osztott téglalapot alakítottak ki, melynek egyik fele lakkal fedett, másik fele fedetlen. Fizikai rétegleválasztás segítségével (PVD, physical vapor deposition) a szilárd arany forrást melegítéssel gőzfázisba vitték, és a paraméterek megfelelő megválasztásával egy kb. 60 nm vastag aranyréteget választottak le a felületre. Mivel az arany gyengén tapad az oxidhoz, a bioréteg leválasztását követően mechanikailag könnyen eltávolítható, egy éles lépcsőt eredményezve az eredeti szubsztrát és bevont felület között.

A részben arannyal bevont SiO/SiO₂ hordozót tisztítottam, majd hidrofobizáltam a fentebb leírt módokon. 1 mg/ml koncentrációjú genetikailag módosított flagellin (RGD-1L) oldatot cseppentettem rá, majd 30 perc elteltével leöblítettem PBS-sel, majd MQ vízzel, és N₂ gázzal leszárítottam. Az arany bevonatot egy csipesz segítségével eltávolítottuk, az alatta lévő felületet az arany megvédte, így itt a módosítatlan SiO/SiO₂ felületet kaptuk vissza. Az aranyréteg eltávolításának köszönhetően tehát egy éles lépcső alakult ki a bevonat nélküli (SiO/SiO₂) és a HMDS-sel és flagellinnel bevont felületek között.

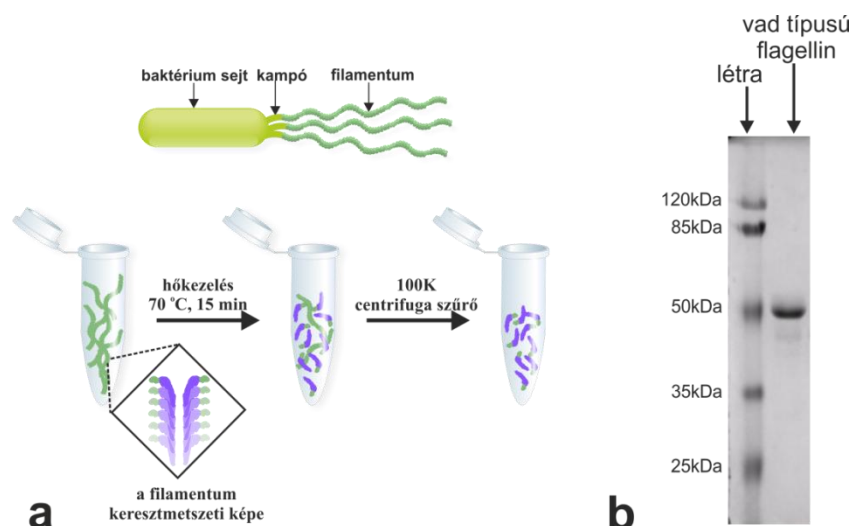
4.5. Fehérjék előállítása és genetikai módosítása

Kísérleteim során *Salmonella typhimurium* által termelt vad és mutáns fehérjéket használtam. A Pannon Egyetem Bio-Nanorendszerek Kutatólaboratóriumában a D3 domén helyére a **GRGDS** pentapeptidet építették be, mivel az RGD-motívumot határoló aminosavak az irodalmi adatok alapján tovább növelik a kötés erősségét. A D3 deléciós mutánst tartalmazó pKOT-alapú plazmidba különböző linkerek segítségével juttatták be a kódoló DNS szekvenciát. A *Salmonella* sejtek elektroporáció útján vették fel a plazmidokat. Három variánst állítottak elő, melyek az alábbiak voltak:

RGD-1 (FliC_LET**GRGDS**SEL), RGD-1L (FliC_LE**GRGDST**GEL), és RGD-4 (FliC_LE(**GRGDS**)₄EL).

A flagellin preparálása során *S. typhimurium* sejteket 2 l térfogatú törzsoldatban növesztették. Ezt követően ultracentrifugálással elválasztották a filamentumot a baktériumsejttől, majd különböző sebességű centrifugálással szeparálták az egyes frakciókat. A fehérje tisztítása során a filamentumot többször monomerizálták, és újra polimerizáltatták 1 M ammónium-szulfát hozzáadásával. Végül a többszörösen polimerizáltatott filamentumot kromatográfiával tisztították, és csapadék formájában tárolták.

A filamentum csapadékot PBS-ben oldottam be, majd 15 perces 70 °C-os hőkezelésnek vettem alá, melynek köszönhetően a szálak depolimerizálódtak, és monomer egységekké estek szét. Az esetleges száltöredékek eltávolítása érdekében a mintát 9.500×g-n 100 kDa névleges molekulatömegetől áteresztő centrifugális szűrőn (Millipore, UFC510008) szűrtem át (**4.1. ábra**).



4.1. ábra (a) Flagellin preparációja filamentum oldatból. A filamentum oldatból hőkezelést és szűrést követően kapjuk meg a flagellin oldatot. (b) A fehérjék tisztaságát SDS-PAGE gélelektroforézissel ellenőrizzük.

4.6. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

A fehérjeminták minőségét 12,5%-os poliakrilamid gélen ellenőriztük. A gélfuttatáshoz 3 µl előfestett fehérje markert (Thermo Scientific) és 4 µl fehérjemintát alkalmaztunk. Az elektroforézist konstans 30 mA áramerősségen 30 percig végeztük. A gélt Coomassie Brilliant Blue festékkel festettük meg a sávok láthatóvá tételéhez.

4.7. Alkalmazott Hofmeister sóoldatok

A fehérjék adszorpciójának befolyásolására különböző, a Hofmeister sorba tartozó sókat használtam. Ezek az alábbiak voltak a kozmotrópoktól a kaotrópok felé haladva: Na_2SO_4 , NaF, CH_3COONa , NaCl, NaBr, NaI, NaNO_3 , NaClO_4 . A sókat 10 mM PBS-ben oldottam fel 720 mM koncentrációban 7,4-es pH-n.

4.8. Kontrollfelületek létrehozása

A PLL-g-PEG és RGD funkcionizált formáját (SuSoS AG, Svájc) 10 mM HEPES-ben (pH 7,4) 1 mg/ml-es koncentrációban oldottam be, majd steril szűrést követően porciózva -20 °C-on tároltam. A PLL-g-PEG és PLL-g-PEG-RGD-t a krómkénsavval megtisztított hidrofil hordozók felületére vittem fel. Chipek esetén a küvettába pipettáztam 500 µl-t, 30 percig hagytam rajta, majd kipipettázást követően mostam a felszínt 500 µl PBS-sel. A tárgylemezek esetén a polimer oldatokat rácseppentettem a felületre, és 30 perc elteltével PBS-sel lemostam a felületről. Ezt követően kerültek a sejtek a polimerrel bevont felületekre.

4.9. Vizsgálatok AFM-mel

A felhasznált Si/SiO₂ hordozók részben 60 nm vastag aranyréteggel voltak borítva, annak érdekében, hogy a létrehozott réteg vastagságát meg lehessen határozni. A plazmatisztítást követően hidrofobizáltam a hordozókat, bevontam flagellinnel, majd az aranyréteget csipesz segítségével lehúztuk a felületről. Így visszakaptam az eredeti felületet és a szilanizált, valamint fehérjével bevont felületet egymás mellett. Az AFM képeket egy SmartSPM 1000 műszer (AIST-NT) segítségével készítettem. A kísérlethez szilícium tűt (a normál tű görbületi sugara kevesebb, mint 10 nm) használtam kopogtató módban. A kopogtató mód optimális frekvenciája 320 kHz-re volt beállítva, és a tipikus letapogató sebesség 0,5 és 1 Hz között volt a beolvasott terület méretétől függően. Az AFM adatokat a Gwyddion szoftver segítségével értékeltük ki [129].

4.10. Vizsgálatok XPS-sel

A bevonatok vastagságának és összetételének meghatározása röntgen fotoelektron-spektroszkópiával történt. A mérések során a mintát egy alumínium anód által kibocsátott röntgensugár gerjesztette. A mintából távozó fotoelektronok kinetikus energia szerinti szeparálását egy előfékezéses mezőt alkalmazó, speciális hengeres tükör analízátor végezte (ESA 105, Staib Instruments Ltd.), amely így állandó, 1,2 eV energia felbontású fotoelektron-spektrumot állított elő.

XPS méréseink során 20 x 20 mm méretű HMDS-sel, ill. flagellinnel borított mintákat vizsgáltunk. A bevonatkészítést követően a leszárított mintákat a méréshez biztosított ultranagy vákuumba (ultra-high vacuum, UHV) helyeztük, és 48 órás 70 °C-os hőkezelésnek vetettük alá, végezetül az UHV rendszer enyhe kiégetésére is sor került (a végső elért vákuum 1×10^{-9} mbar volt).

A fő elemkomponensek detektált vonalai a következők voltak: C 1s (kötési energia: 285-289 eV), O 1s (531 eV), Si 2p 3/2 (103 eV (oxidált állapotban)), N 1s (401 eV). A minták S tartalmát nem vizsgáltuk, mivel ez az XPS detektálási határa alatt volt. A minták vákuumban stabilnak bizonyultak, azonban fél órás röntgen besugárzást követően a csúcsok alakja változást mutatott, mely a minta degradálódására utalt. Ennek következtében a nagyobb jel/zaj viszony érdekében végzett hosszabb mérések elvégzése nem volt lehetséges, így a kapott spektrumok viszonylag zajosak.

A fotoelektron-spektrumok kiértékelésekor a Shirley-típusú háttér levonását követően a csúcsokat Gauss/Lorentz-típusú függvényekkel illesztettük. Minden komponens esetén ezt a módszert alkalmaztunk a csúcsok területének meghatározására. A kvantitatív eredményeket a flagellin és HMDS rétegek vastagságának számításához használtuk, feltételezve, hogy az összetételük sztöchiometrikus. A számításokban kétréteges modellt alkalmaztunk, melyben az üveghordozóra került a két szerves réteg (üveghordozó/HMDS/flagellin). Az elemösszetevők jelének súlyozásához használt érzékenységi faktorok az irodalomból származtak [130].

4.11. OWLS kísérletek menete

Az OWLS kísérleteket OWLS 210 és BIOS-1 műszereken végeztem (MikroVákuum Kft). A kísérletek kétféle módon, átfolyó és nyitott küvettaal zajlottak.

Átfolyó küvetta esetén a mintát egy Ismatec Reglo 8 görgős perisztaltikus pumpa segítségével juttattam a küvettaába $1 \mu\text{l/s}$ áramlási sebességgel. Stabil PBS alapvonal felvételét követően 30 percig áramoltattam a fehérje/baktérium oldatot. Ezt egy 30 perces pufferes lemosás követte.

Nyitott küvetta esetében pipetta segítségével juttattam az oldatokat a küvettaába, miközben a mérést 20 másodpercig szüneteltettem. Stabil PBS alapvonal felvételét

követően pipetta segítségével kicseréltem a puffert 500 µl fehérje/polimer oldatra, 30 perc után 500 µl PBS/10 mM HEPES (pH 7,4) mosás következett újabb 30 percre. Ezt követően 500 µl 20 mM HEPES HBSS (pH 7,0) puffert juttattam a küvettába, majd stabil alapvonalat vettem fel, végül 500 µl 60.000 sejtet tartalmazó sejtszuszpenziót pipettáztam bele a küvettába, és 2 óráig mértem az adhéziójukat.

4.12. A Hofmeister sók által előidézett változások kinetikai kiértékeléséhez használt modellek

A flagellin adszorpciója és deszorpciója során meghatározott felületi tömegsűrűség értékekre a kinetikai modellezés során a következő differenciálegyenleteket alkalmaztuk [131]:

$$\frac{dM_r}{dt} = k_a c_v \Phi - k_d M_r \quad (8)$$

$$\frac{dM_i}{dt} = k_i c_v \Phi \quad (9)$$

Azt feltételezzük, hogy a fehérje a felületen kétfajta adszorbeált állapotot tud felvenni. Az első állapot a reverzibilis állapot, mely esetben a fehérjék felületi tömegsűrűségét M_r -rel jelöljük. A másik az irreverzibilis állapot, melyet M_i felületi tömegsűrűséggel jelölünk. A reverzibilisen adszorbeálódó molekulák a szenzorfelület feletti térfogatból a határfelületet k_a sebességi állandóval tudják megközelíteni, az irreverzibilisen adszorbeálódó molekulák k_i sebességgel. A reverzibilisen adszorbeált molekulák k_d sebességi állandóval hagyják el a felületet. A modell egyenletekben c_v a fehérjekoncentrációt jelöli a diffúziós határrétegben, Φ a szabadterület-függvény, melyet numerikus szimulációból állapítottak meg [132]:

$$\Phi = \frac{(1 - \Theta)^4}{1 - 1.403 \cdot \Theta + 0.895 \cdot \Theta^2} \quad (10)$$

$$\Theta = \frac{1}{\Theta_{\infty}} \left(\frac{M_r}{m/a_r} + \frac{M_i}{m/a_i} \right) \quad (11)$$

ahol Θ a felületi borítottság, m a fehérje moláris tömege, a_i és a_r a irreverzibilisen és reverzibilisen adszorbeált fehérje lábnnyoma.

A határfelület feletti koncentrációt az alábbi differenciálegyenlettel lehet meghatározni:

$$\frac{dc_v}{dt} = \frac{1}{\delta} \left(D \frac{c_0 - c_v}{\delta} + k_a M_r - (k_a + k_i) c_v \Phi \right) \quad (12)$$

ahol δ a diffúziós határréteg vastagsága, D a diffúziós együttható, c_0 a fehérjekoncentráció a tömbfázisban.

A fehérjeadszorpció kinetikai analiziséhez felhasznált modellt MATLAB kódba Kovács Noémi és Horváth Róbert implementálta. A kód továbbfejlesztését és a részletes kinetikai analizist Saftics András és Horváth Róbert végezte.

4.13. GFP termelő baktériumok

Kísérleteimben BL21 C+RIL *Escherichia coli* sejteket használtam, melyek pVJsGFPa GFP kódoló plazmidot tartalmaznak. A baktérium nagy mennyiségben termel GFP fehérjét, így fluoreszcens mikroszkópban zölden világítanak a sejtek. A sejtek 10% glicerint tartalmazó PBS-ben -20 °C-on tároltam. A felolvasztást követően 5 percig 855×g-n centrifugáltam, majd PBS-ben újraszuszpendáltam. Kísérleteimben 3×10⁷ sejt/ml koncentrációban alkalmaztam őket. A sejtszámot hemocitóméter segítségével határoztam meg.

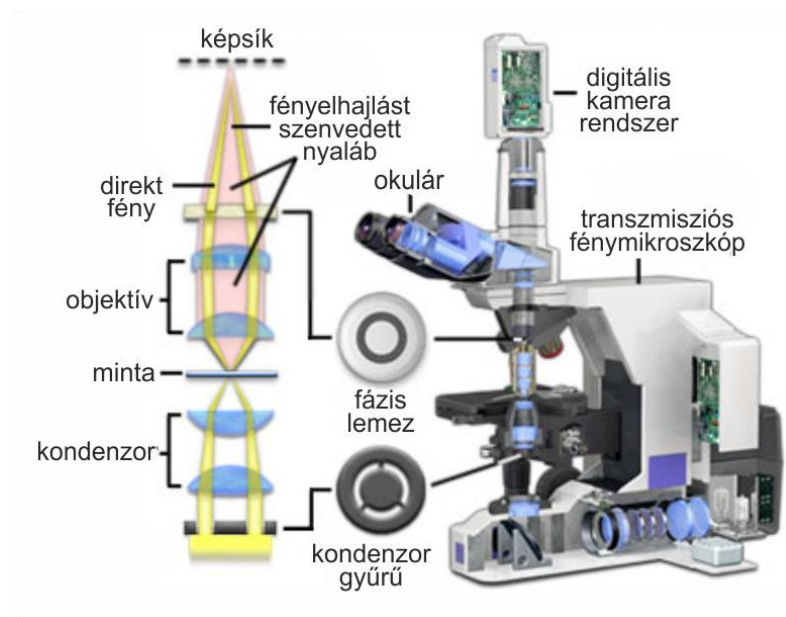
4.14. Fáziskontraszt mikroszkópia

A sejtekről a fáziskontraszt mikroszkópos képeket Zeiss Axio Observer.Z1 mikroszkóppal készítettem.

Azok a minták, melyek abszorbeálják a megvilágító fény egy részét, ezáltal megváltoztatva annak amplitúdóját, könnyen vizsgálhatóak világos látóterű mikroszkóppal. Azonban számos biológiai objektum (pl. sejtek) nem képes

megváltoztatni a fény amplitúdóját, így világos látóterű mikroszkópban csak megfestés után válnak láthatóvá. A sejt különböző részeinek, mint például a membránnak vagy a különböző sejtorganelleknek eltérő a törésmutatója, így amikor fény halad át rajtuk a fény fázisa megváltozik. A vastagabb és nagyobb törésmutatójú részekben a fény nagyobb fázistolást szenved el.

A fáziskontraszt mikroszkópiában ezt a különböző mértékű fáziseltolódást használjuk ki (4.2. ábra). A megvilágító fény egy gyűrűdiafragmán áthaladva megvilágítja a vizsgálandó mintát és annak környezetét. Ezt követően a fény két úton halad tovább. A fény azon része, amely nem halad át a mintán, a fázislemez fázismoduláló mintázatára kerül, és megváltozik a fázisa. Azok a fénysugarak, amelyek áthaladnak a vizsgálandó minta különböző törésmutatójú részein lelassulnak, és fáziseltolódást szenvednek. Ha ezt a fázisdifferenciát a fényáteresztő fázisgyűrű segítségével $\lambda/4$ hullámhosszal megnövelik, akkor a referenciafény és a mintán áthaladó fény között interferencia lép fel, ennek következtében a keletkező kép a fáziskésést okozó helyen környezeténél kontrasztosabb lesz. Így az objektum tisztán láthatóvá válik [133], [134].

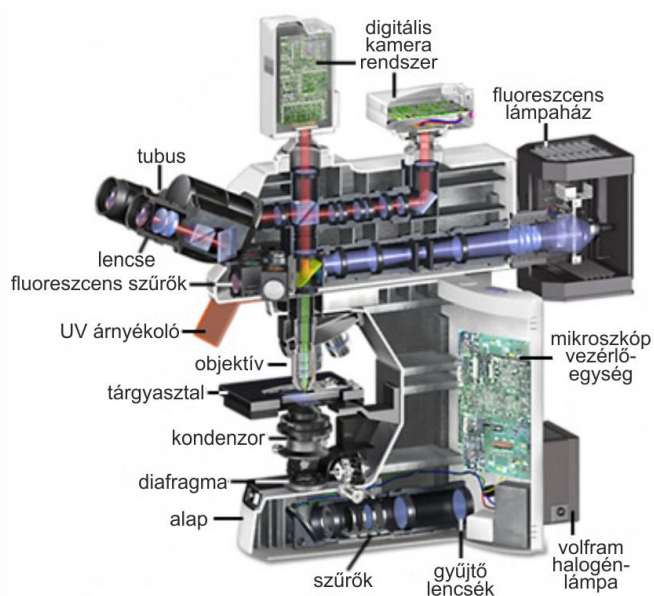


4.2. ábra A fáziskontraszt mikroszkóp és a fáziskontraszt optikai út sematikus ábrázolása. A működési elve azon alapszik, hogy a fáziseltolódást amplitúdó különbséggé alakítja [135].

4.15. *Fluoreszcens mikroszkópia*

A sejtekről a fluoreszcens mikroszkópos képeket Zeiss Axio Observer.Z1 mikroszkóppal készítettem.

Fluoreszcens mikroszkóp működése (4.3. ábra) azon a jelenségen alapszik, hogy megfelelő hullámhosszú fénnel gerjesztve a minta fény kibocsájtásával adja le a gerjesztés során kapott energia egy részét, mely detektálható. A minta lehet önmagában, természetes úton fluoreszcens, vagy festhető fluoreszkáló anyagokkal. A gerjesztő fényforrás egy filteren keresztül halad át, amely a gerjesztetni kívánt fluoreszcens molekulának megfelelő hullámhosszúságú fényt enged át. A besugárzó fény gerjeszti a vizsgálandó minta kromofórbait, melynek során az elektronok egy magasabb energiaállapotba kerülnek. Amikor az elektronok visszatérnek alapállapotukba, egy alacsonyabb energiaszintre, akkor fényt bocsájtanak ki. Ahhoz, hogy a gerjesztő fény mellett a kibocsájtott fényt láthatóvá tegyék, egy második szűrőn vezetik át. A fluoreszkáló területek könnyen észlelhetőek a mikroszkópban, és nagy kontraszttal világítanak a fekete háttérben. A technika segítségével nemcsak a sejtek, hanem a sejtalkotók részletei is jól megfigyelhetőek. A fluoreszcens mikroszkópia dinamikusan fejlődik, segítségével már 3D-s képeket is képesek rutinszerűen készíteni a vizsgált mintákról [136].



4.3. ábra A fluoreszcens mikroszkóp működésének sematikus ábrázolása [136].

4.16. Humán sejtek fenntartása

A HeLa sejtek (93021013 Sigma-Aldrich) 10% FBS-t (fetal bovine serum, magzati borjúsérum), 4 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillint, 100 µg/mL sztreptomicint és 0,25 µg/mL amfotericin B-t tartalmazó DMEM médiumban (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 37 °C-on 5% CO₂ atmoszférában voltak tenyésztve. A kísérletek előtt standard tripszinezési protokollal (0,05% (m/V) tripszin, 0,02% (m/V) EDTA) távolítottam el a sejteket a Petri-csésze aljáról. A sejtekhez ezt követően 20 mM HEPES-t, ill. Ca²⁺ és Mg²⁺ ionokat tartalmazó HBSS-t adtam (pH 7,0). A sejteket 380×g-n 3 percig centrifugáltam. A sejtledeket a kísérleti pufferben újraszuszpendáltam. A sejtszámot hemocitóméter segítségével határoztam meg.

A kísérleteket követően fáziskontraszt mikroszkópos felvételeket készítettem a felületen lévő sejtekről egy Zeiss Axio Observer.Z1 mikroszkóp segítségével, 20× objektívvel.

4.17. Humán sejtek fluoreszcens jelölése

A bioszenzoros kísérletekkel párhuzamosan emlőssejtek esetében sejtfestéses kísérleteket is végeztem. A kísérlet azonos módon zajlott, mint az OWLS kísérlet. A méretre vágott, tisztított és szilanizált tárgylemezeket 24 lyukú steril tálcába rögzítettem kétoldalú biokompatibilis ragasztóval (Adhesives Research Inc.). A hordozókra fehérje/polimer oldatot cseppentettem, lefedtem, és 30 percig vártam. Ezt követően PBS/10 mM HEPES (pH 7,4) pufferrel mostam a lyukakat. Végül átöblítettem 20 mM HEPES HBSS-sel (pH 7,0), és 60.000 sejt/lyuk sejtszuszpenziót tettem a felületre. 2 óra elteltével megkezdtem a sejtfestéses eljárást.

Az aktin citoskeleton és fokális adhézións jelölő kit (Millipore FAK100) segítségével végeztem a humán sejtek jelölését. A vinkulint monoklonális anti-vinkulinnal, az F-aktint (H+L) FITC-konjugált anti-egér IgG antitesttel és TRITC-konjugált falloidinnal és a sejtmagot DAPI-val festettem meg. Zeiss Axio Observer.Z1 mikroszkóp 20× objektívjével készítettem felvételeket a megfestett sejtekről.

A sejteket szobahőmérsékleten 4% paraformaldehiddel 20 percig fixáltam, kétszer mostam 0,05% Tween-20-t tartalmazó PBS pufferrel (mosó puffer), majd 0,1% Triton X-100-at tartalmazó permeabilizáló reagenssel kezeltem 5 percig. Az inkubálási idők

alatt billegtető gépre tettem a lemezt. Ezt követően újra kétszer mostam a mosó pufferrel. 1% BSA-t tartalmazó PBS-sel blokkoltam 30 percig, mellyel csökkenthető a háttérfestődés mértéke. Hozzáadtam 300 µl/lyuk 1:100 hígított elsődleges anti-vinkulin antitestet, és 60 percig inkubáltam. Háromszor mostam a mosó pufferrel: 1. lépésben 5 perc után, 2. és 3. lépésben 10 perc után. A következő lépés a kettős jelölés volt. Ezen lépés során használt festékek fényérzékenyek, így alumínium fóliával letakartam a lemezt. 300 µl/lyuk festékoldatot adtam a lyukakhoz, melyben 1:200 FITC-konjugált másodlagos antitest és 1:500 TRITC-konjugált falloidin volt majd 60 percig inkubáltam. Újra háromszor mostam a lyukakat a mosó pufferrel, a korábban leírt módon. 300 µl/lyuk 1:1000 hígított DAPI-val festettem a sejtmagokat 5 percig. A mosó pufferrel háromszor mostam, végül 0,01% nátrium-azidot tartalmazó PBS-ben, parafilmmel lezárva, alufóliával becsomagolva, 4 °C-on tároltam a lemezt a mikroszkópos felvételek készítéséig.

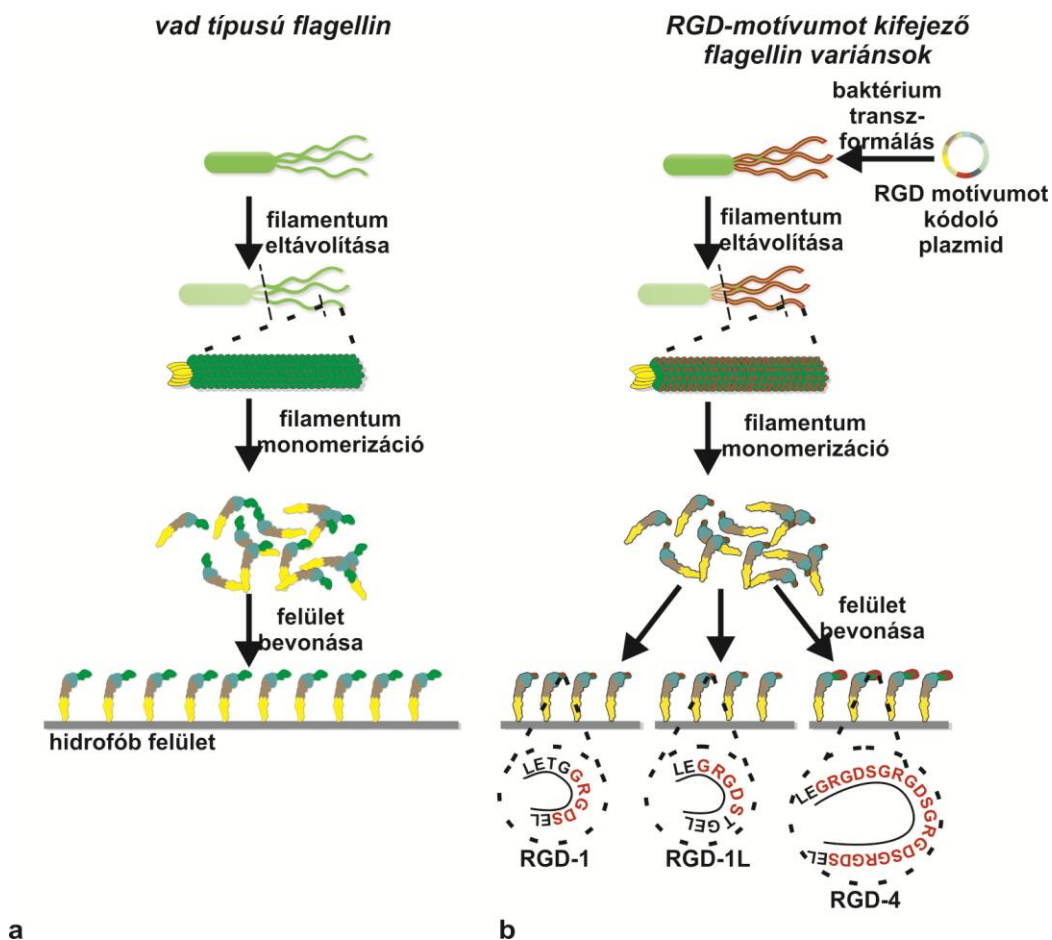
5. Eredmények és értékelésük

5.1. A létrehozott flagellinrétegek karakterizálása OWLS, XPS és AFM technikákkal

A vad típusú és az RGD-motívumot kifejező fehérjékből hidrofobizált OWLS szenzor chipen, hidrofobizált tárgylemezen és hidrofobizált arany bevonattal rendelkező SiO/SiO₂ hordozón alakítottam ki rétegeket. A chipeket az OWLS kísérletek során használtam fel a fehérjék adszorpciójának meghatározására. Ezekből a chipékből limitált mennyiség állt a rendelkezésünkre, ezért az XPS kísérletekhez szilanizált üveglemezeket használtam fel. Az üveglemezeken kialakított HMDS réteg feltételezéseink szerint megfelel az OWLS chipen kialakított rétegnek. Korábban próbáltam az OWLS chipeket AFM-mel tanulmányozni, azonban a felület elektrosztatikusan feltöltődött, így nem lehetett képeket készíteni róla. Ebből kifolyólag, valamint a litográfiai módszer gyakorlata miatt alkalmaztunk SiO/SiO₂ hordozót az AFM kísérletekhez. Mindezek mellett azt feltételezzük, hogy a szilán azonos módon kapcsolódik a felületekhez és a kialakított réteg tulajdonságai is azonosak.

A különböző hordozókon a peremszög értéke 85°-90° között változott. Az üveghordozókon a flagellin felvitelét követően is megmértem a kontaktszöget, amely 70°± 4°-nak adódott.

Az **5.1. ábrán** a fehérjeréteg előállításának lépései láthatóak a fehérje előállításától a hidrofób felület bevonásáig.

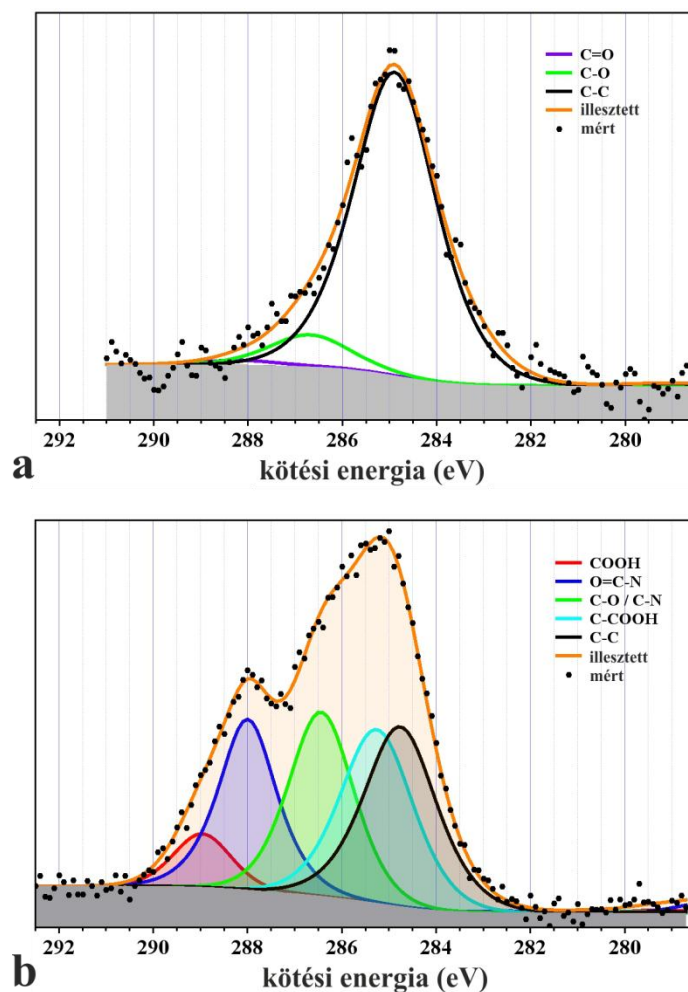


5.1. ábra A (a) vad típusú és (b) genetikailag módosított flagellinvariánsokból kialakított rétegek előállításának sematikus ábrázolása.

A fehérjével (RGD-1, RGD-1L, RGD-4 és vad típusú flagellin) bevont és fehérje nélküli hidrofób mikroszkóp tárgylemezeket XPS-sel vizsgáltuk meg. Az XPS mérés lehetővé tette, hogy meghatározzuk a bevonatok elemi összetételét és rétegvastagságát. Minden minta esetén meghatároztuk a C, O, N és Si jeleket, a C 1s vonalát pedig részleteiben is kielemeztük. A rétegvastagságot a mért elemi intenzitás adatok alapján egy kétrétegű modellt (két fedőréteg és egy hordozó réteg) alkalmazva optimalizációs eljárásban határoztuk meg. Ennek során úgy választjuk meg a rétegvastagságokat, hogy az visszaadja a mért intenzitásarányokat. Ehhez szükséges, hogy minden rétegnek (esetünkben: üveghordozó, szilánréteg, flagellinréteg) ismerjük a névleges összetételét, mely adatok a rendelkezésünkre álltak. Az elemösszetétel azt mutatta, hogy az üveghordozón egy vastag réteg található szignifikáns N tartalommal. Ezzel szemben a referenciafelületen egy vékony réteg mutatkozott magas C tartalommal, valamint az

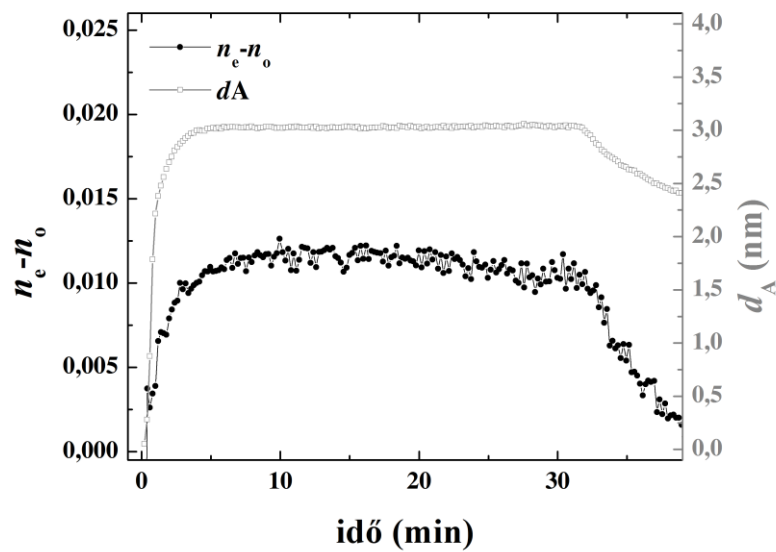
üveghordozóra jellemző Si és O vonalak is detektálhatók voltak. A bevonatok rétegvastagságának meghatározása során figyelembe vettük az összes mért komponens. A kétréteges modell rendkívül jól illeszkedett a kísérleti adatokhoz. A részletes számítások szerint, függetlenül a flagellin típusától, a flagellinréteg vastagságára 2,3 nm adódott.

Az **5.2. ábrán** látható a referencia és a flagellinnel bevont felületeken a mért szén 1s jel kötési (oxidációs) állapotok szerinti felbontása. A flagellinréteg következtében megjelenő O=C-N kötésállapotú C atomok nagymértékben megváltoztatták a csúcs alakját. Az XPS nagy felbontása lehetővé teszi, hogy a teljes szén jelet a kémiai kötéseknek megfelelően szubkomponensekre felbontva a szubkomponensek mennyiségét is meghatározhassuk. Eszerint a C 1s jel többféle ilyen szubkomponensre volt felbontható. A C atom 284,8 eV-nál lévő szigma C-C kötése mellett az alábbi szén állapotokat és a hozzájuk tartozó kötési energiákat tudtuk megkülönböztetni: C atom és karboxil csoport közötti kötés (C-COOH) 285 eV-nál, C atom és O vagy N atom közötti kötés (C-N vagy C-O) 286,5 eV-nál, C atom peptid-kötésben (O=C-N) 288,1 eV-nál, valamint C atom karboxil csoportban (COOH) 289,2 eV-nál [137]. Tehát amíg a szilanizált felületen a szén jórészt C-C szigma kötési állapotban található, addig a flagellinnel bevont felületen szignifikáns mennyiségben mérhetőek C-N/C-O és O=C-N kötések is. A röntgensugárzás hatására roncsolódik a fehérje, melynek következtében a kötésállapotok lassan, de jól látható mértékben megváltoznak. Ez a változás a mérés kezdete után 15 perc elteltével tapasztalható, így a sokszorosán átlagolt mérés 3-4 órája alatt nagymértékben torzul a csúcs. Emiatt a C és N kiértékelésben csak az első 15 perc adatát használtuk fel.



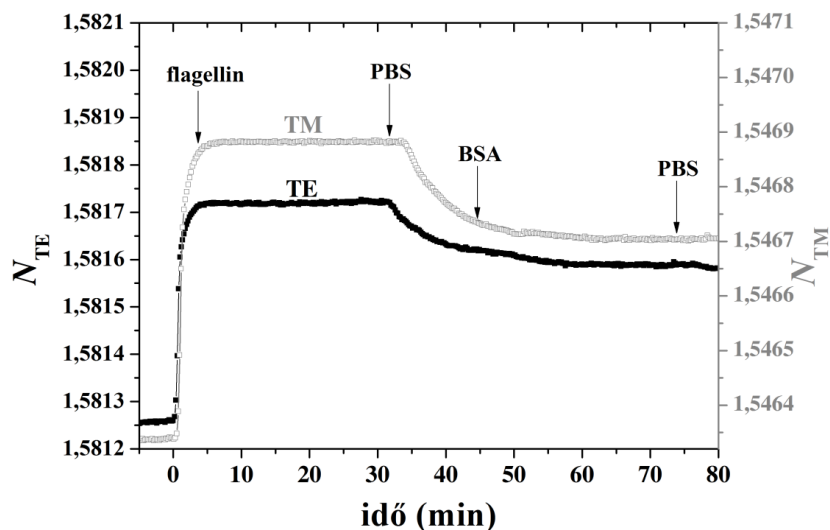
5.2. ábra Az XPS mérés során nyert fotoelektron-spektrumok C 1s csúcsa a hidrofób üveghordozón a fehérje felvitele előtt (a) és után (b).

A vad típusú flagellin adszorpcióját és deszorpcióját az **5.2. fejezetben** bemutatott módon vizsgáltam. A genetikailag módosított RGD-1L fehérje adszorpcióját és deszorpcióját *in situ* OWLS méréssel demonstráltam. A kialakított réteg optogeometriai paramétereit a homogén izotróp modell segítségével állapítottuk meg [50], [52]. Ez a variáns nagyon hasonlóan viselkedik a kutatócsoportunk által korábban vizsgált $\Delta D3_FliC$ fehérjéhez. Ahogyan a $\Delta D3_FliC$ -nél, úgy az RGD-1L fehérjénél is szignifikáns pozitív optikai kettőstörést mértünk ($\sim 0,01$), ami arra utal, hogy orientált réteg alakul ki a felületen (**5.3. ábra**).



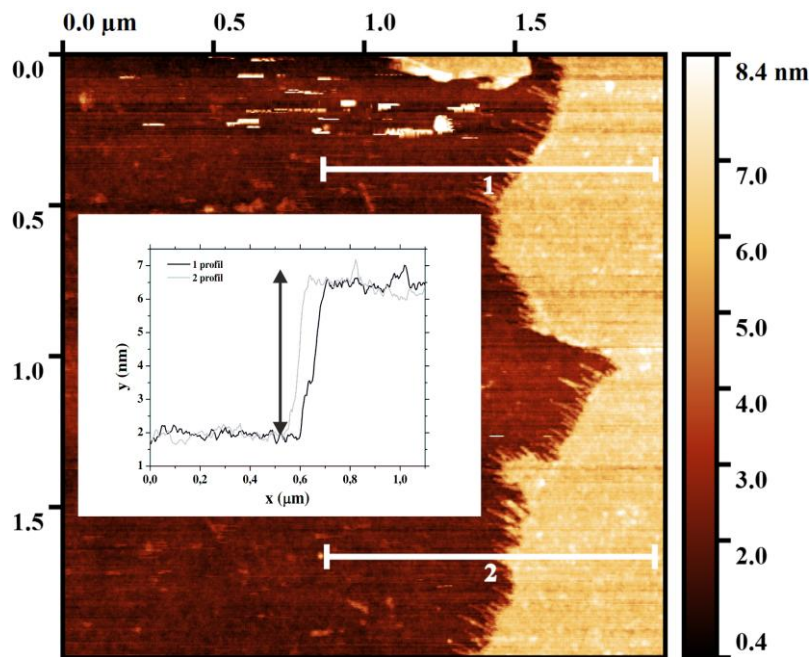
5.3. ábra Az anizotróp optikai modell segítségével számított rétegvastagság (d_A) és optikai kettőstörés ($n_e - n_o$) az RGD-1L flagellin adszorpciója során.

A réteg kompaktságának tesztelésére 1 mg/ml BSA oldatot használtunk, amely nem okozott jelváltozást, bizonyítva ezzel feltevésünket, hogy kompakt flagellinréteg alakult ki a felületen (**5.4. ábra**). A fehérjeréteg átlagos rétegvastagsága 2,3 nm-nek bizonyult.



5.4. ábra RGD-1L flagellin adszorpciója *in situ* OWLS kísérletben. A fehérje adszorpciója és deszorpciója során mért törésmutató-változás. 1 mg/ml BSA oldat küvetába juttatása esetén nem változott a bioszenzor jel.

A kialakított fehérjeréteg vastagságát AFM segítségével is meghatároztuk. A részben arannyal bevont SiO/SiO₂ hordozót hidrofobizáltam, RGD-1L fehérjével borítottam, PBS-sel mostam, majd N₂ gázzal leszártottam. Az aranyréteg eltávolításának köszönhetően éles lépcső alakult ki a bevonat nélküli (SiO/SiO₂) és a HMDS-sel és flagellinnel bevont felületek között, ami lehetővé tette a kialakult réteg vastagságának meghatározását (5.5. ábra). Ha számításba vesszük a HMDS réteg 1-2 nm-es vastagságát, akkor a fehérjeréteg vastagsága 2-3 nm-nek adódik, ami megfelel az XPS-sel és az OWLS-sel végzett kísérletekből nyert adatoknak.

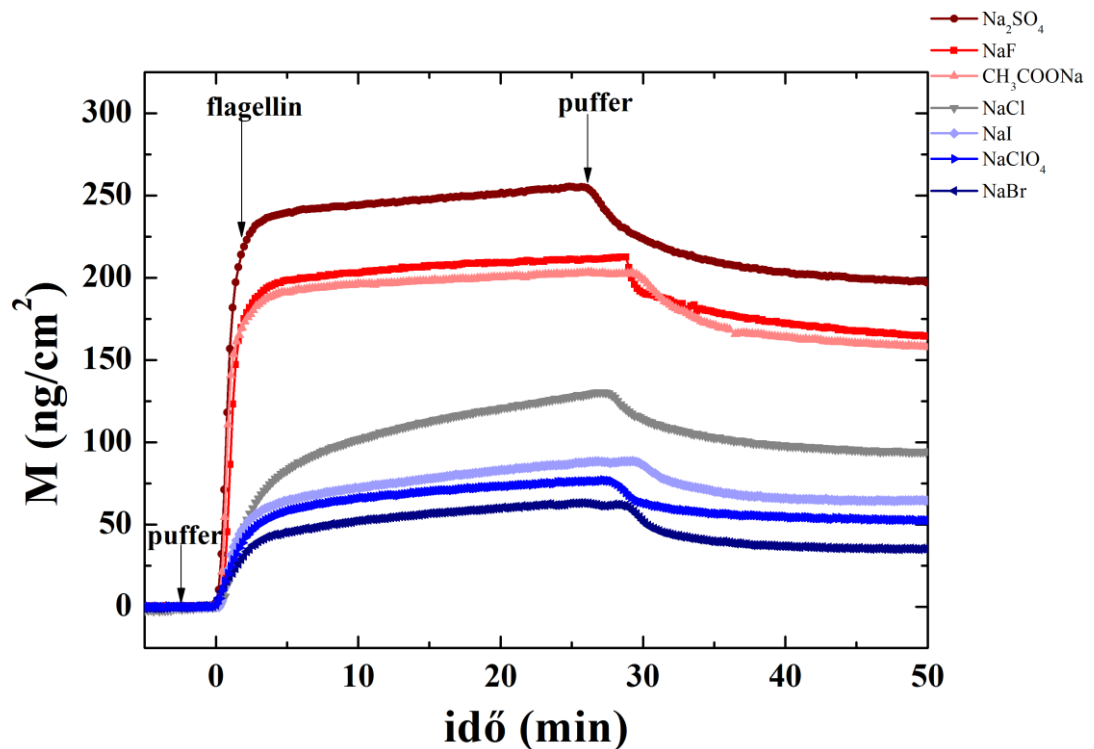


5.5. ábra Az aranyréteggel bevont Si/SiO₂ hordozón készült AFM felvétel a szilanizált és flagellinnel bevont felületeken. Az aranyréteg litográfia lehetővé tette, hogy egy éles lépcső jöjjön létre a bevonat nélküli és a HMDS és flagellinréteggel bevont oldal között.

5.2. A hidrofób kölcsönhatás jelentősége, Hofmeister sók hatása a flagellinréteg önszerveződésére

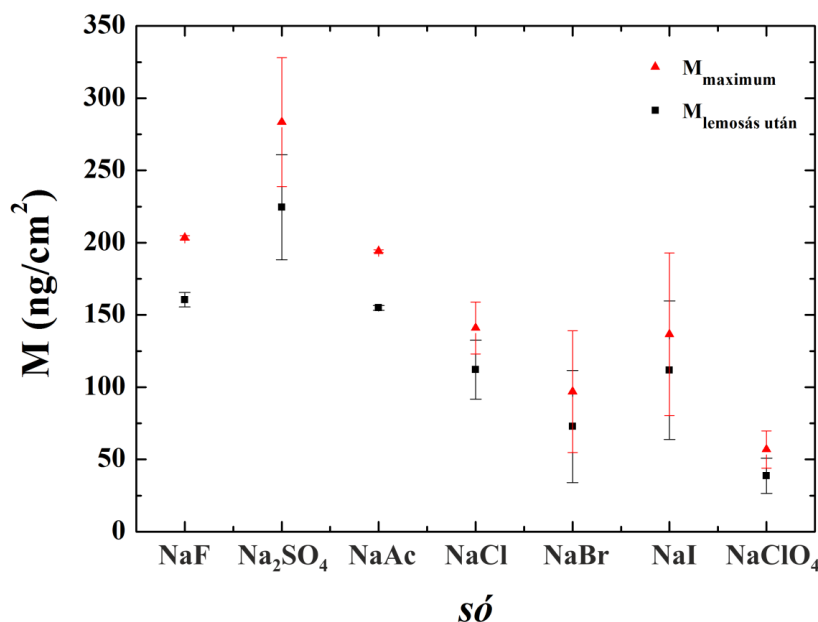
5.2.1. A felületi tömegsűrűség időbeli változása

Kísérleteim során a 4.12. fejezetben található egyenletek felhasználásával a felület közelében végbement törésmutató-változás segítségével meghatároztam a felületre adszorbeálódott fehérjék tömegét. A Hofmeister-sorban semleges NaCl esetén kapott tömegértékeket összehasonlítva a többi sóval kapott értékekkel, az alábbi megállapításokat tehetjük: a Na_2SO_4 , a NaF és a CH_3COONa (azaz a kozmotróp sók) növelték a felületre adszorbeálódott fehérje mennyiségét, míg a NaI, a NaClO_4 és a NaBr (azaz a kaotróp sók) csökkentették a fehérje felületi tömegsűrűségét (5.6. ábra).



5.6. ábra Reprezentatív ábra a Hofmeister sók által okozott felületi tömegsűrűség változásról. A semleges NaCl sóhoz képest a kozmotróp sók növelték, míg a kaotróp sók csökkentették a felületre adszorbeálódott fehérjék mennyiségét.

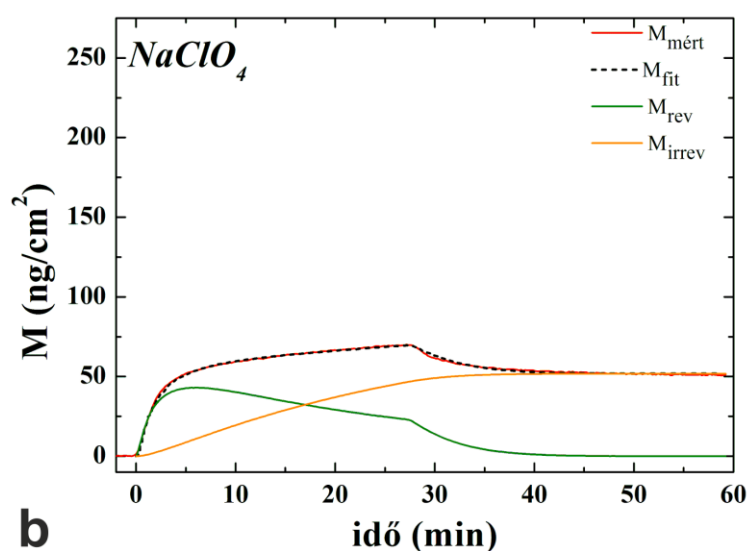
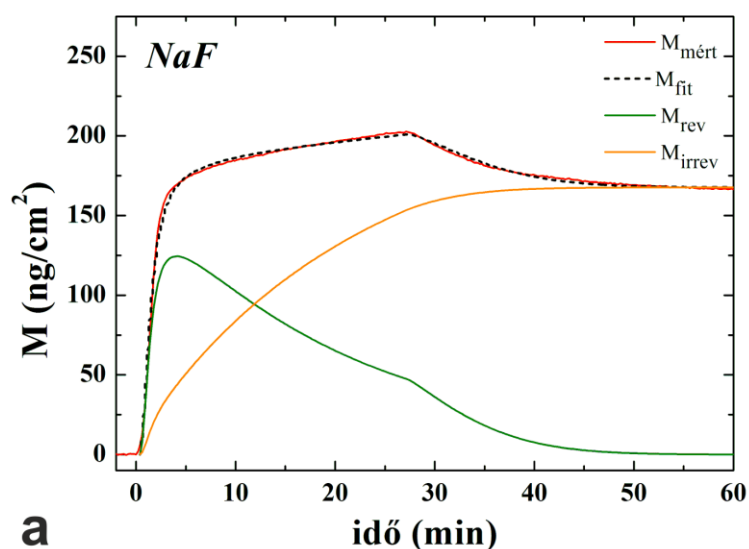
Ezt a tendenciát az **5.7. ábra** még inkább kiemeli, ahol a felületi tömegsűrűség értékek a maximumot elérve ($M_{maximum}$), ill. a lemosást követően ($M_{le mosás után}$) vannak ábrázolva. A kozmotróp sók növelték az adszorpciót, míg a kaotrópok csökkentették.



5.7. ábra A Hofmeister hatás jól látható a felületi tömegsűrűségben okozott változásban. Az M értéke a kaotrópok sóktól a kozmotróp sók irányába nő.

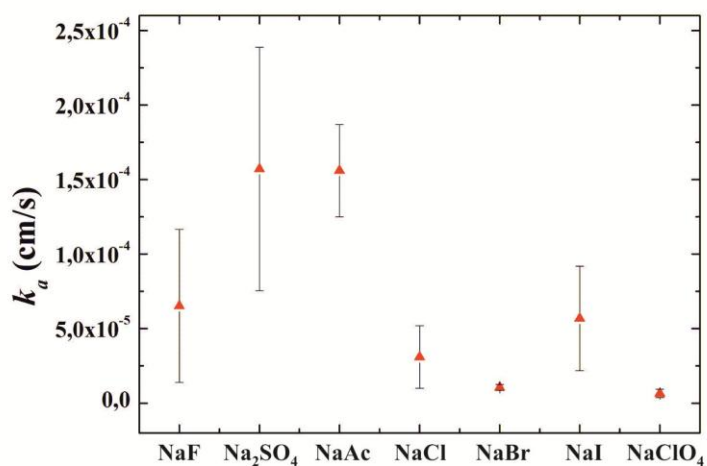
5.2.2. Az adszorpciós és deszorpciós görbék, illetve a réteg szerkezetének kinetikai kiértékelése

A kinetikai modell illesztéséből kapott eredmények két tipikus esete látható az **5.8. ábrán**. Az **5.8. (a) ábra** a kozmotróp NaF hatását mutatja a flagellin adszorpcióra. A NaF jelenléte a felületi tömegsűrűséget 168 ng/cm²-re növelte, míg a semleges NaCl só esetében 94 ng/cm² volt ez az érték. Az adszorbeálódott fehérjetömeg nagyobb része irreverzibilisen tapadt ki a hidrofób felületre, a reverzibilisen kitapadt fehérje mennyisége elhanyagolható. Az **5.8. (b) ábra** a kaotróp NaClO₄ só hatását mutatja a flagellin adszorpciójára. Az irreverzibilisen adszorbeálódott tömeg 58 ng/cm²-re csökkent a kaotróp só hatására. Ez két és félszer kisebb tömeg, mint a NaF esetében.

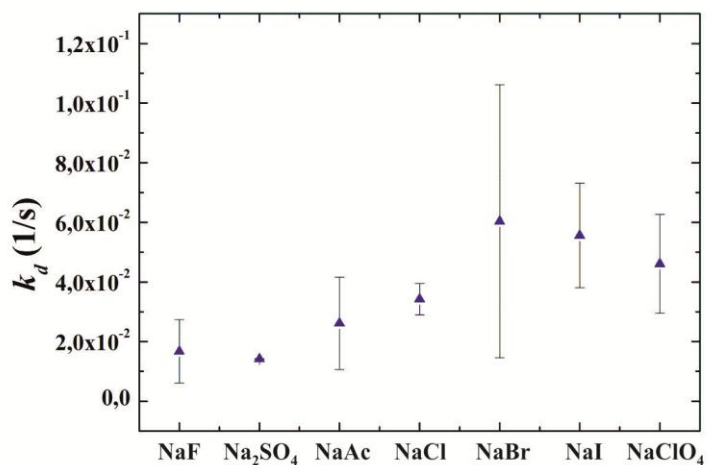


5.8. ábra Reprezentatív görbék a (a) kozmotróp NaF és (b) kaotróp NaClO₄ sók okozta felületi tömegsűrűség változásról (piros-mért, fekete-illesztett, zöld-reverzibilis, narancssárga-irreverzibilis).

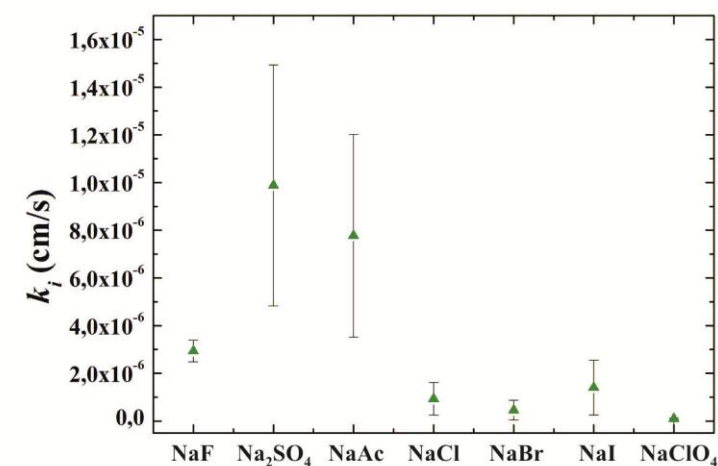
A kinetikai kiértékelés során meghatározott paraméterek az **5.9. ábrán** láthatóak. A reverzibilisen adszorbeálódó molekulák a szenzorfelület feletti teljes térfogatból a határfelületet k_a sebességi állandóval tudják megközelíteni, és k_d sebességi állandóval hagyják el a felületet. Az irreverzibilisen adszorbeált molekulák k_i sebességgel közelítik meg a felületet. A k_a és k_i értékek (**5.9. (a) és (c) ábra**) a kozmotróp sók irányából a kaotróp sók irányába csökkennek, míg a k_d (**5.9. (b) ábra**) ugyanezen irányban nő.



a só



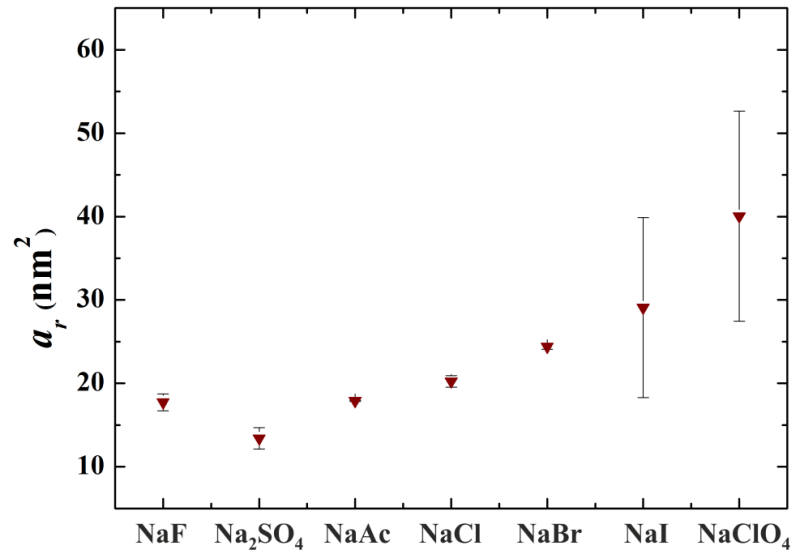
b só



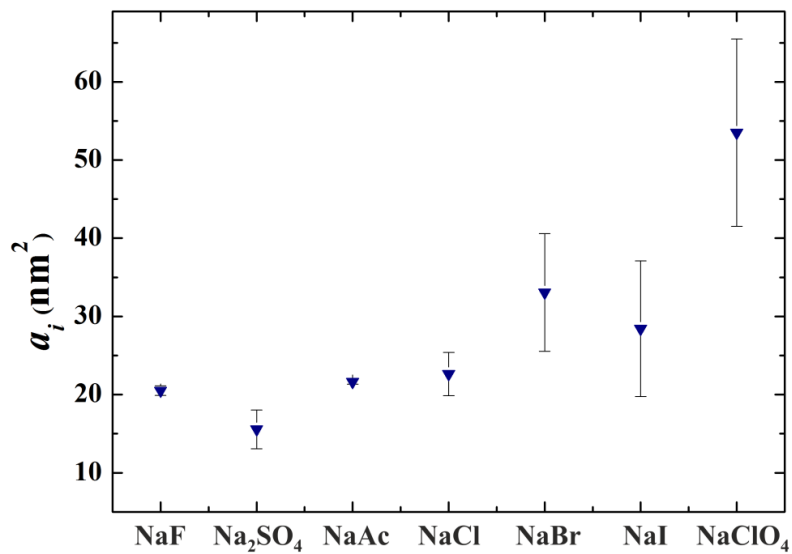
c só

5.9. ábra A Hofmeister sók hatása a k_a , k_d és k_i sebességi állandókra.

A reverzibilisen (a_r) és irreverzibilisen (a_i) kitapadt fehérjék lábnyoma az **5.10. ábrán** látható. Az a_r és a_i értékek a kozmotróp sók irányából a kaotróp sók irányába nőttek.



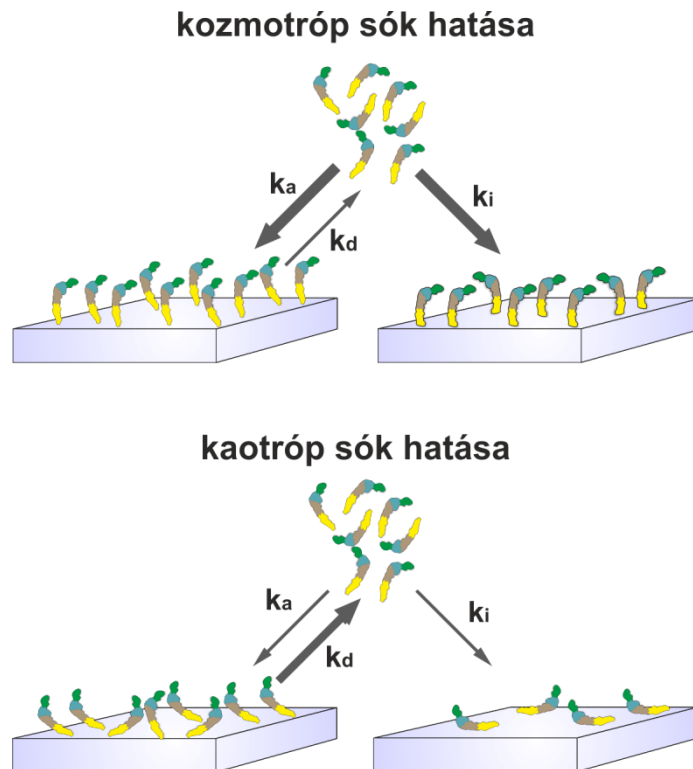
a $só$



b $só$

5.10. ábra A fehérje lábnyomának változása a (a) reverzibilisen és (b) irreverzibilisen adszorbeálódott fehérjék esetében.

Az eredmények azt mutatják, hogy a Hofmeister sorba tartozó sók nagymértékben befolyásolják a vad típusú flagellin adszorpcióját hidrofób felületekre, így a feltételezés, hogy a kitapadást elsősorban a hidrofób kölcsönhatás vezérli, alátámasztást nyert. A kaotróp sók hatására a fehérje lábnyoma alapján azt mondhatjuk, hogy a D0 domén alakítja ki kölcsönhatást a felülettel, és a D3 domén az oldat irányába néz. Míg kozmotróp sók hatására a fehérje valószínűleg a hosszanti tengelye mentén adszorbeálódik a felületre, ennek köszönhetően jelentősen nagyobb a lábnyoma (**5.11. ábra**).



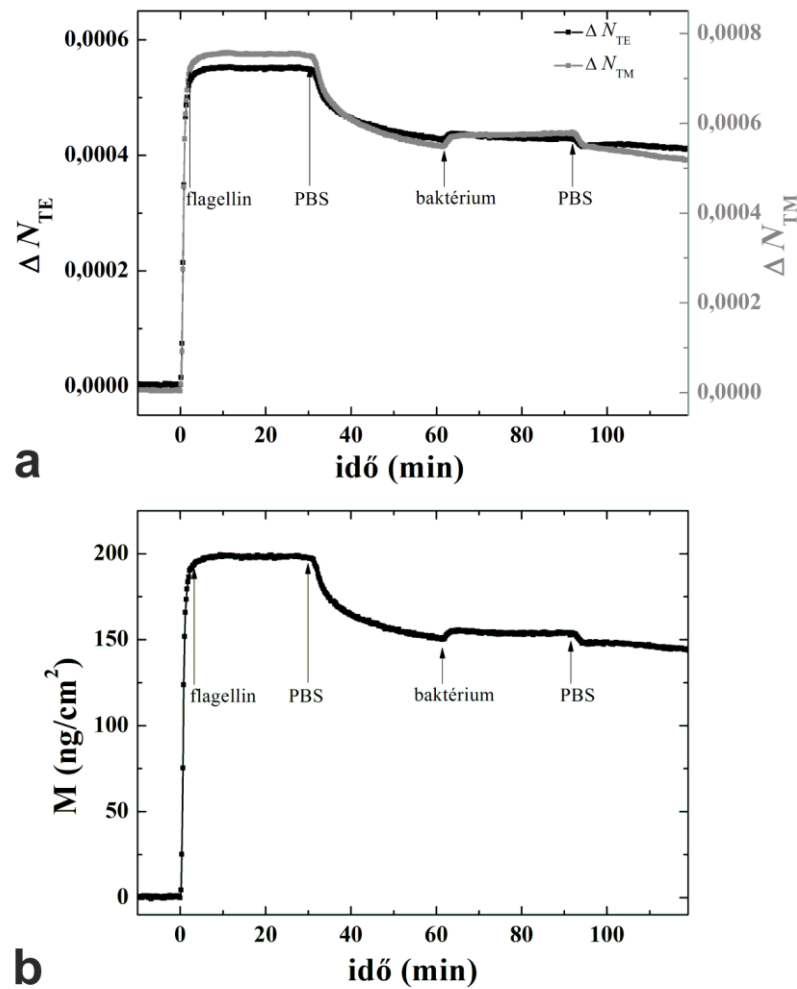
5.11. ábra A flagellin fehérjék adszorpciós kinetikájának modellje hidrofób felületeken. (a) A kozmotróp sók hatására nő a felületre adszorbeálódott fehérjék felületi tömegsűrűsége. A fehérje lábnyoma azt mutatja, hogy a D0 domén alakítja ki kölcsönhatást a felülettel. (b) A kaotróp sók hatására kevesebb flagellin adszorbeál a felületre, a lábnyom alapján a hosszanti tengelyük mentén.

5.3. A vad típusú orientált flagellin fehérjékből létrehozott réteg sejttaszító hatása *E. coli* esetén

A bakteriális filamentum fő feladata a mozgás biztosítása a sejtek számára. A filamentumok egyetlen nagy helikális köteggé állnak össze és a baktérium úszása során összehangolt forgásukkal propellerként hajtják előre a sejtet. A mozgásuk sebessége 20-30 $\mu\text{m/s}$ is lehet [98]. Ahhoz, hogy a filamentum képes legyen kötegeket formálni, majd ezt a köteget nyugalmi állapotban felbontani, szükség van arra, hogy a filamentumok ne tapadjanak sem egymáshoz, sem pedig magához a baktériumsejthez. Tehát a filamentum bakteriális struktúrákhoz nem tapad hozzá. Feltételezésünk szerint a vad típusú orientált flagellinréteg a filamentum felszínét utánozza, és ebből kifolyólag feltehetőleg baktériumtaszító tulajdonságokkal rendelkezik. Ezért a létrehozott vad típusú fehérjerétegeken *E. coli* sejtek adszorpcióját vizsgáltam *in situ* OWLS kísérletek során. Kontrollként hidrofób chip felületet alkalmaztam.

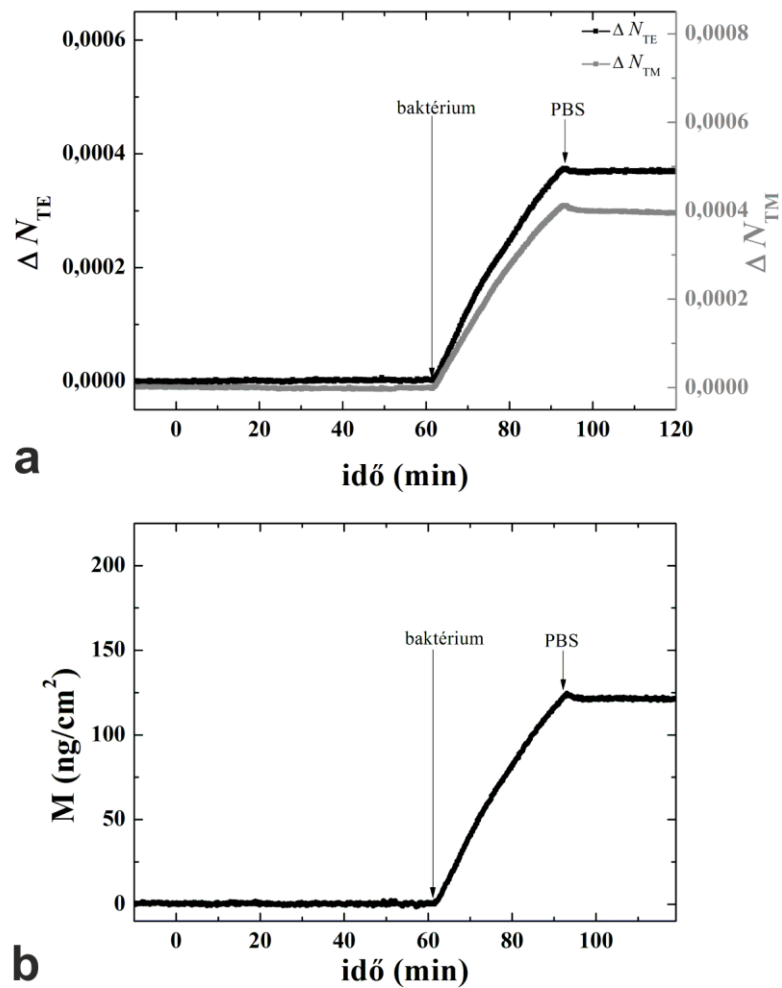
A kísérlet során mind a TE_0 mind pedig a TM_0 módusokat detektáltam. A fehérjéket perisztaltikus pumpa segítségével juttattam a küvettába. A fehérje oldat küvettába érkezését követően a jel 5 perc után szaturálódott, vagyis a felület telítődött fehérjékkel. A négyrétegű rétegmodellt és a de Feijter formulát használva megállapítottam a fehérje felületi tömegsűrűségét, amely 195 ng/cm^2 -nek adódott. Figyelembe véve a vad típusú flagellin molekulatömegét, egyetlen fehérje átlagosan $44,1 \text{ nm}^2$ területet foglal el. Ha számításba vesszük a fehérje méretét és bonyolult alakját is, akkor mindez alátámasztja a fehérjeréteg jó térkitöltését [52].

A fehérjeréteg kialakítását követően a felületet 30 percig mostam pufferrel. Ennek során a felületre nem vagy gyengén kötődött fehérjék lemosódtak a felületről. Ezt követően 30 percig injektáltam a baktérium szuszpenziót, majd újabb 30 perces mosást végeztem. Jól látható az **5.12. ábrán**, hogy a baktérium oldat nem okozott jelentős jelváltozást a vad típusú flagellinnel bevont felületen, és a mosás során a kismennyiségű baktériumsejt, ami adszorbeálódott a felületre, lemosódott róla.



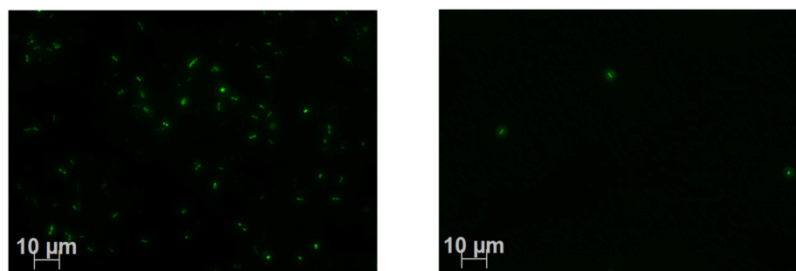
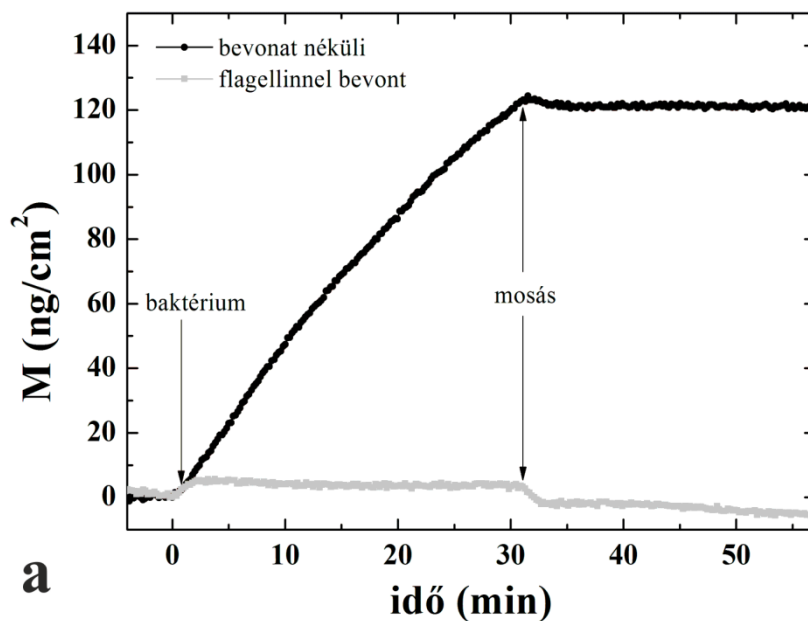
5.12. ábra (a) Egy reprezentatív kísérlet során mért törésmutató-változás a fehérje- és baktériumadszorpció során. A kísérletet 25 °C-on szilanizált szenzor chipen végeztem. (b) A törésmutató-változásból meghatározott felületi tömegsűrűség. A nyilak azt az időpontot jelölik, amikor a minta a műszer érzékelési tartományába került.

A kontrollkísérletben hidrofób felületen vizsgáltam a baktériumok adszorpcióját. A baktérium oldat injektálását követően folyamatos jelnövekedés volt tapasztalható. A baktériumok irreverzibilisen kitapadtak a felületre, és a mosást követően sem tapasztaltam jelcsökkenést (**5.13. ábra**).



5.13. ábra (a) Egy reprezentatív kísérlet során mért törésmutató-változás a baktériumadszorpció során. A kísérletet 25 °C-on szilanizált szenzor chipen végeztem. (b) A törésmutató-változásból meghatározott felületi tömegsűrűség.

Az **5.14. ábrán** látható a két kísérlet összehasonlítása. A flagellinnel bevont felületen csak néhány sejt tapadt ki, de ezek is csak reverzibilisen, mosás segítségével el lehetett távolítani őket a felületről. A hidrofób felületen ezzel szemben a sejtek irreverzibilisen tapadtak ki és mosást követően sem lehetett őket lemosni a felületről. A fluoreszcens mikroszkópos képek is alátámasztják a bioszenzorral kapott adatokat.



5.14. ábra (a) Az *in situ* OWLS kísérlet során meghatározott felületi tömegsűrűség a bevonat nélküli (fekete görbe) és a flagellinnel bevont (szürke görbe) felületen. (b) Reprezentatív fluoreszcens képek a bevonat nélküli (bal oldalon) és a flagellinnel bevont (jobb oldalon) felületekről.

A kísérleteket több alkalommal megismételtük és a flagellinréteg baktériumtaszító hatása jól reprodukálható volt. A hidrofób felületen a baktériumadszorpció kevésbé pontosan volt reprodukálható, a mért felületi tömegsűrűség értékek 10-20%-os szórást mutattak. A mért görbék alakja minden esetben hasonló volt: monoton növekedést és telítődést mutatott.

Figyelembe véve egy baktérium tömegét (~1,5 pg) és a mikroszkópos képeken manuálisan meghatározott sejtszámot, a felületi tömegsűrűségnek 945 ng/cm²-nek kellett volna adódnia. Ezzel ellentétben az OWLS kísérlet során mért adatokból

123 ng/cm²-es tömegsűrűséget számoltam. Az OWLS szenzor a kitapadó sejteket a felület közelében csak 100-200 nm-es magasságig érzékeli, így a különbség a mért és számolt adatok között reális, tekintetbe véve, hogy az *E. coli* baktériumok pálcika alakúak, hosszanti tengelyük mentén fekszenek a felületen és átlagos átmérőjük 700-800 nm.

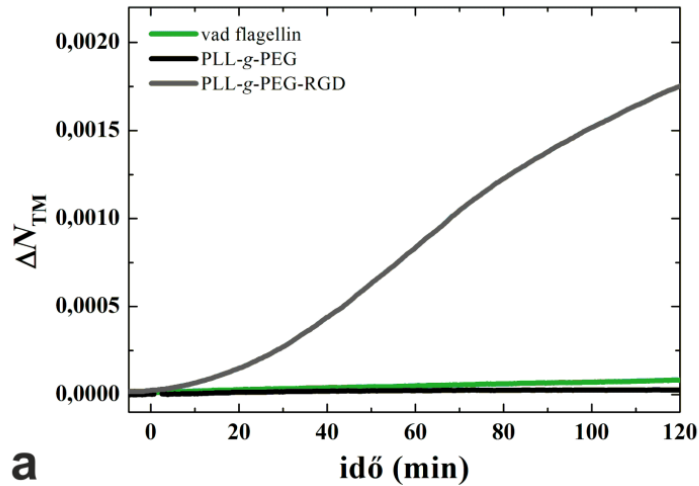
5.4. Az orientált vad típusú flagellinréteg sejttaszító képességének vizsgálata emlőssejtes modellel

Bizonyos emlőssejtek felszínére képesek kitapadni a baktériumok. Ebben a folyamatban a legfontosabb adhéziós struktúrának a filamentum bizonyult. A filamentum csak akkor tud kitapadni a sejtre, ha a célsejten van megfelelő receptor, amely képes felismerni. A flagellin egységeken található ismétlődő epitópok nagymértékben hozzájárulnak a kölcsönhatás kialakulásához [138], [139]. Az esetünkben alkalmazott HeLa sejtek nem rendelkeznek filamentumot felismerő receptorral, így a filamentum nem funkcionál adhéziós struktúraként. Ebből kifolyólag feltételezhető, hogy a flagellin sem fogja indukálni a HeLa sejtek adhézióját. Munkám során kontrollfelületként a sejttaszító tulajdonságokkal rendelkező PLL-g-PEG és a sejtadhéziót indukáló PLL-g-PEG-RGD polimereket alkalmaztam.

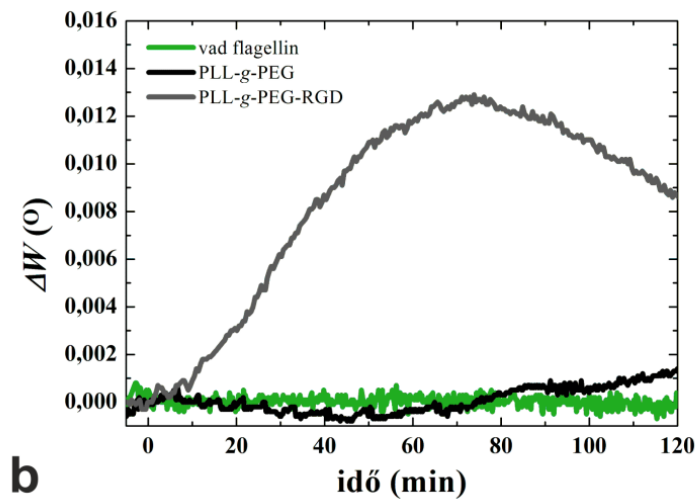
A kísérlet során a fehérjeréteg esetében tisztított és hidrofobizált, polimerrétegek esetében tisztított szenzor chipet használtam. A PBS/10 mM HEPES (pH 7,4) alapvonal felvételét követően a puffert kipipettáztam a küvettából és bemértem a flagellin/polimer oldatokat. A kialakított fehérje-, ill. polimerrétegeket PBS/10 mM HEPES (pH 7,4) pufferral mostam a reverzibilisen adszorbeálódott molekulák eltávolítása érdekében. Ezt követően 20 mM HEPES HBSS-re (pH 7,0) cseréltem a puffert. A stabil alapvonal felvételét követően pipetta segítségével a küvettába juttattam a sejtszuspenziót, és 120 percig mértem a sejtek adhézióját.

A fehérjeadszorpció során a TM_0 hullámvezető módus változásait detektáltam (a törésmutató-változást és a ΔN_{TM-t}). A HeLa sejtek a mérés két órája alatt a vad típusú flagellinrétegen és a PLL-g-PEG rétegen az OWLS jelben nem okoztak jelváltozást, ami arra utal, hogy nem tudtak kitapadni.

A ΔN_{TM} jelek a vad típusú flagellinrétegen, ill. a PLL-g-PEG rétegen a sejtes kísérlet teljes időtartama alatt az alapvonalon maradtak (**5.15. (a) ábra**). A ΔN_{TM} arányos a sejtadhézió mértékével [55], [140], így azt mondhatjuk, hogy mindkét felület nagymértékben sejttaszító tulajdonságú. A PLL-g-PEG-RGD felületen szigmoid alakú görbét kaptam, mely az aktív sejtadhézióra jellemző [140].



a



b

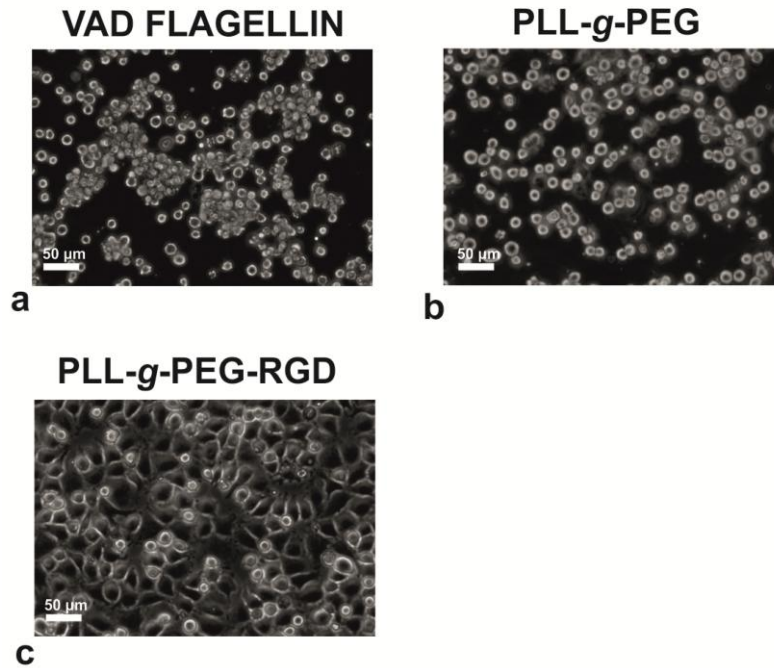
5.15. ábra Sejtek hozzáadását követően mért OWLS jelek. (a) A ΔN_{TM} jelek a PLL-g-PEG-gel és a vad típusú flagellinnel borított felületen a kísérlet két órája alatt nem változtak. A PLL-g-PEG-RGD felületen kapott szigmoid görbe a sejtdhézióra jellemző. (b) A félértékszélesség adatok is alátámasztják azt, hogy a sejtek nem tapadtak ki a PLL-g-PEG-gel és a vad típusú flagellinnel borított felületen, míg a PLL-g-PEG-RGD felületen kitapadtak.

A TM_0 rezonanciacsúcs félértékszélességének (full width at half maxima - ΔW) változását is mértem. Az emlőssejtek a felületre érkezés és a kiterülés következtében megváltoztatják a mikrométeres skálájú optikai inhomogenitást a felület közelében. A sejtek felületre történő kitapadásának modellezésére az úgynevezett LIME (local interference method, lokális interferencia módszer) módszert alkalmazzák, mely magába foglalja a hullámvezetésből és a diffrakcióból eredő hatásokat.

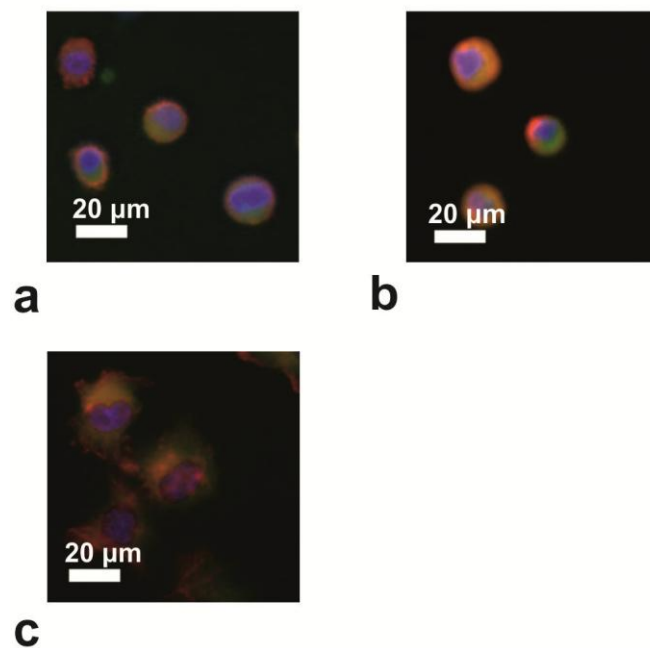
A numerikus szimulációkból az derült ki, hogy a felvitt réteg optikai inhomogenitásai megnövelik a rezonanciacsúcs félértékszélességét, abban az esetben, ha az inhomogenitások mérete minimum 5 μm -es. A HeLa sejtekből képzett réteg inhomogenitásainak mérete tipikusan 10-100 μm , tehát ebben az esetben jelentős félértékszélesség változások lépnek fel. A szimulációk arra is rámutattak, hogy a félértékszélesség 50%-os lefedettségnél a maximális [51], [141]. A vad típusú flagellinrétegen és a PLL-g-PEG rétegen a sejtek elhanyagolható változást idéztek elő, bizonyítva ezzel, hogy nem volt jelentős sejtadhézió (**5.15. (b) ábra**). A PLL-g-PEG-RGD felületi bevonat esetén a ΔW jel monoton nőtt, elérte a maximumot, majd csökkenni kezdett. Ez a fajta kinetikai viselkedés arra utal, hogy a felületi borítottság meghaladja az 50%-ot, tehát a PLL-g-PEG-RGD esetében a sejtek a felület több mint 50%-át beborították.

A bioszenzoros adatokat a fáziskontraszt és a fluoreszcens mikroszkópos képek jól alátámasztják. A fáziskontraszt képeken gömb alakú, fényes, nem kitapadt morfológiájú sejtek figyelhetők meg a vad típusú flagellinnel és PLL-g-PEG-gel bevont felületeken (**5.16. (a) és (b) ábra**). A PLL-g-PEG-RGD-vel bevont felületen a kitapadt sejtekre jellemző morfológia látható (**5.16. (c) ábra**).

A fluoreszcens képeken hidrofób üveghordozóra felvitt vad típusú flagellin, PLL-g-PEG és PLL-g-PEG-RGD rétegeken láthatóak a sejtek, 120 perccel a sejtek ráhelyezését követően. A fluoreszcens képeken a kék szín a sejtmagot, a piros az F-aktint, a zöld a vinkulint jelöli. Hasonlóan a fáziskontraszt képekhez, a vad típusú flagellinnel és a PLL-g-PEG-gel bevont felületeken is gömb alakú sejtek láthatóak, ahol a sejtmag jól elkülönül, de a fokális adhézios kontaktusok nem láthatóak (**5.17. (a) és (b) ábra**). A PLL-g-PEG-RGD felületen jól látszódik az F-aktin és a vinkulin is (**5.17. (c) ábra**), ami bizonyítja a sejtkitapadást.



5.16. ábra Fáziskontraszt mikroszkópos képek az OWLS kísérleteket követően (a) vad típusú flagellinnel, (b) PLL-g-PEG-gel, (c) PLL-g-PEG-RGD-vel bevont felületeken. A gyengén kítapadt sejtek gömb alakúak.



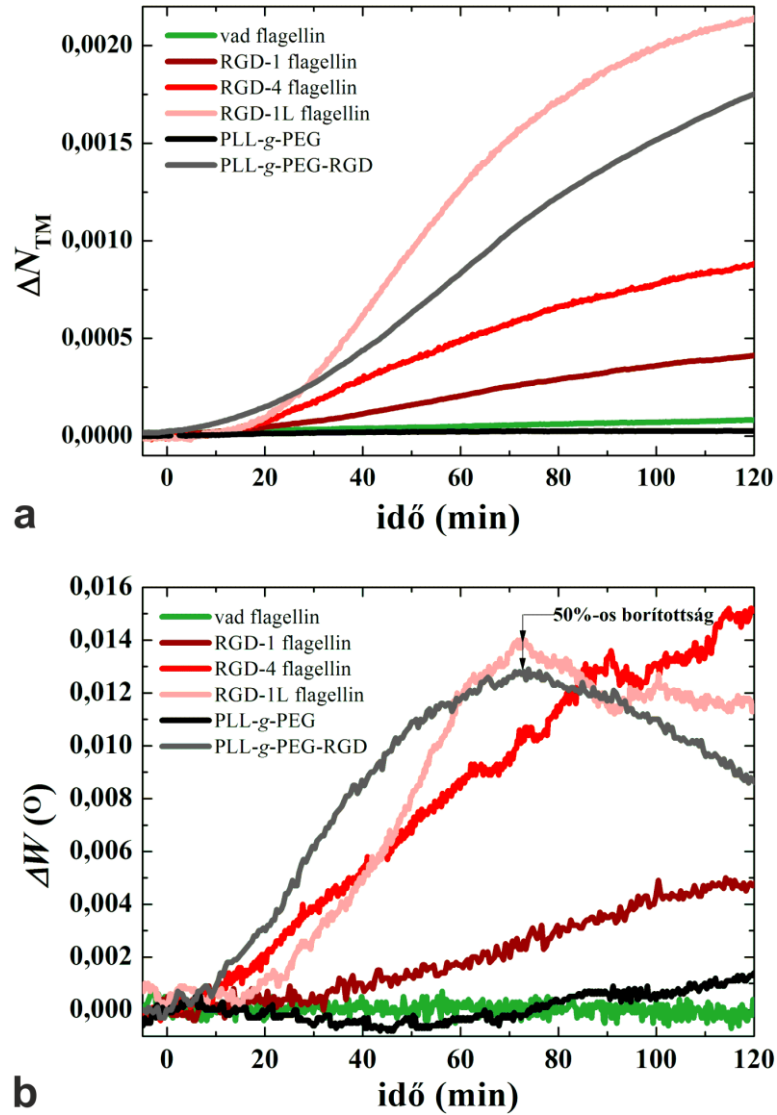
5.17. ábra Párhuzamos kísérletekben hidrofobizált üveglemezen készült fluoreszcens mikroszkópos képek (piros: F-aktin, kék: sejtmag, zöld: vinkulin) az (a) vad típusú flagellinnel, (b) PLL-g-PEG-gel, (c) PLL-g-PEG-RGD-vel bevont felületeken készültek.

5.5. Sejtadhézió genetikailag módosított, RGD-motívumot kifejező flagellinvariánsokból kialakított rétegeken

A flagellin számos előnyös tulajdonságának köszönhetően génebézési eljárásokkal könnyen módosítható. Munkám során olyan variánsokkal dolgoztam, melyekbe különböző linkerek segítségével építették be a sejtadhéziót indukálni képes GRGDS pentapeptidet. Az így létrehozott fehérjékből kialakított rétegeken teszteltem HeLa sejtek adhézióját. A célom az volt, hogy megállapítsam, hogy a sejtek képesek-e felismerni a fehérjébe épített motívumot, és hogy ezt a felismerést befolyásolják-e az alkalmazott linkerek.

Az RGD-motívumot kifejező flagellinrétegeken a sejtek folyamatos jelnövekedést okoztak a ΔN_{TM} jelben a maximum értékig. Hasonló viselkedést mutattak a PLL-g-PEG-RGD rétegeken is. A kapott görbék szigmoid alakúak, ami az aktív sejtadhézióra jellemző (**5.18. ábra**) [140]. A kísérletek végén a kapott ΔN_{TM} OWLS jelek az alábbiak voltak: $0,0021 \pm 0,0001$ az RGD-1L esetén, $0,0017 \pm 0,0001$ a PLL-g-PEG-RGD esetén, $0,0008 \pm 0,0001$ az RGD-4 esetén és $0,0004 \pm 0,0001$ az RGD-1 esetén. A PLL-g-PEG rétegen $0,00008 \pm 0,000005$, ill. a vad típusú fehérjerétegen $0,00003 \pm 0,000002$ adódott ez az érték. Mivel az alkalmazott sejtszám azonos volt, így a nagyobb jel, erősebb sejtadhéziót jelent, tehát amelyik felület a legnagyobb ΔN_{TM} értéket indukálta, azon volt a legnagyobb a sejtadhézió mértéke. Ezek alapján a legjelentősebb sejtadhézió az RGD-1L felületen volt, majd a PLL-g-PEG-RGD-n, az RGD-4-en és végül az RGD-1-en. Tehát a három különböző fehérjerétegen a sejtek eltérő mértékben tapadtak ki, ami azzal magyarázható, hogy az RGD-motívumok különböző linkerekkel lettek beépítve a fehérjébe. Az RGD-1L esetében egy rövidebb N-terminális linkert (LE) és egy hosszabb C-terminális (TGEL) linkert használtak. A hosszabb C-terminális linkernek köszönhetően a motívum kissé kiemelkedik, és az oldat irányába néz, melynek következtében jobban hozzáférhető a sejtek számára. Az RGD-4 variáns azonos N- és C-terminális linkereket (LE) és a GRGDS pentapeptidből négy ismétlést tartalmaz. A várttal ellentétben ez a variáns kisebb adhéziót indukál, melyre részben magyarázatul szolgálhat az, hogy az RGD-motívumok esetén az RGD-RGD távolság csökkenésével a sejtadhézió nő, azonban 10 nm távolságnál ez az érték szaturálódik. RGD-1 esetében egy hosszabb N-terminális (LETG) és egy rövidebb C-terminális (EL) linkerpár segítségével integrálták a motívumot. A hosszabb N-terminális linkernek köszönhetően a GRGDS pentapeptid inkább a felület irányába néz, nehezen hozzáférhető a sejtek

számára. Mindez bizonyítja, hogy az alkalmazott linkerek eltérő hozzáférhetőséget és rugalmasságot biztosítottak a sejtek számára, kihatva ezzel a sejtek kitapadására.

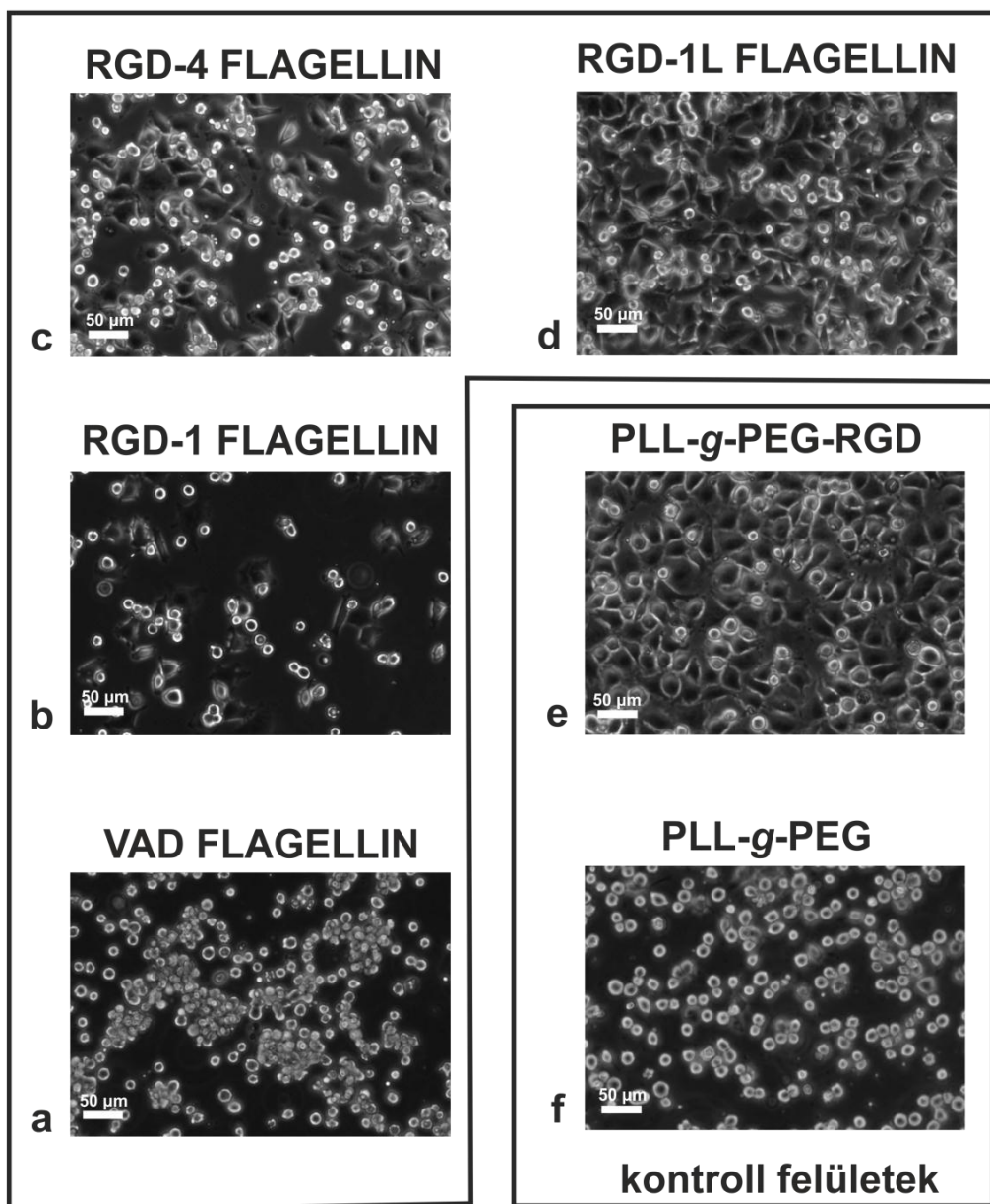


5.18. ábra (a) A mért ΔN_{TM} értékek korrelálnak a sejtadhézió mértékével. Az RGD-motívumot tartalmazó bevonatok indukálták a sejtadhéziót, míg a vad típusú flagellin és a PLL-g-PEG meggátolta. (b) A félértékszélesség 50%-os borítottságnál (RGD-1L és PLL-g-PEG-RGD) éri el a maximumot.

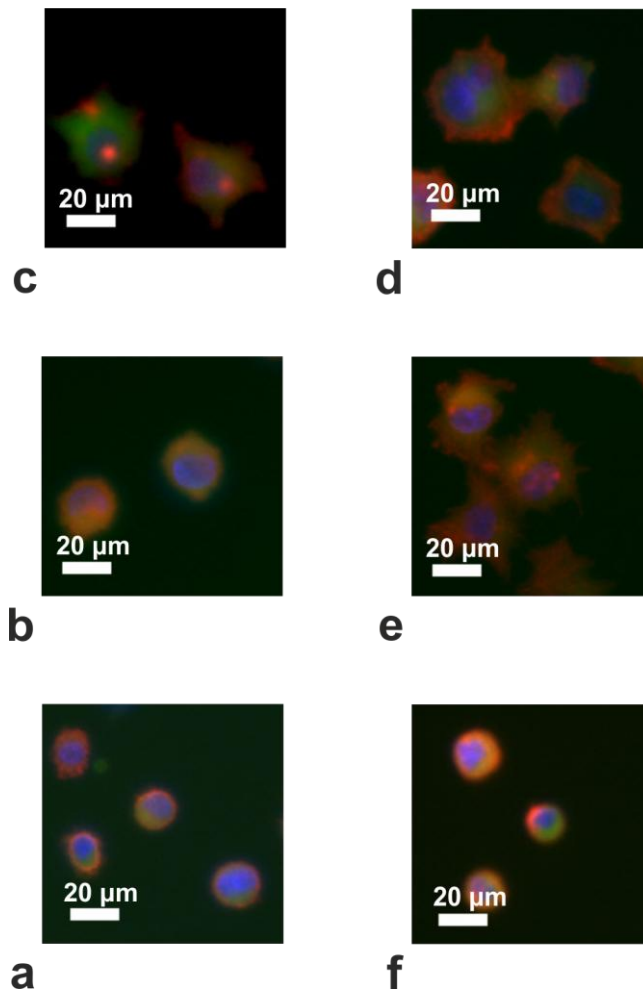
A rezonanciacsúcs félértékszélessége az RGD-t tartalmazó variánsokkal bevont felületeken a sejtadhézió során különböző mértékben változott. Korábbi eredmények és numerikus szimulációk azt mutatják, hogy sejtelterülés hatására a W érték nőni kezd. 50% sejtborítottság esetén eléri a maximumot, ezt követően pedig visszacsökken az eredeti értékre. Tehát a W változásának nyomon követése a felület inhomogenitásának meghatározására szolgál. A W értéke elméletileg 50%-os felületi borítottságnál éri el maximumát, minimumához pedig két eset tartozik: vagy nincs sejt a felületen vagy pedig a teljesen felület borított kiterült sejtekkel [141].

Az RGD-4 és RGD-1 variánsokkal borított felületen a W monoton nőtt a kísérlet végéig, de nem érte el a maximumot. Ez azt jelenti, hogy a felületi borítottság nem érte el az 50%-ot. Ezzel szemben az RGD-1L és a PLL-g-PEG-RGD esetében a jel monoton nőtt, elérte a maximumot, majd csökkenni kezdett. Ez a fajta kinetikai viselkedés tehát arra utal, hogy a felületi borítottság meghaladja az 50%-ot, mivel a félértékszélesség elérte a maximumot, majd újra csökkenni kezdett, de nem érte el a minimum értékét. Mindezek alátámasztják azt az eredményt, hogy a legjelentősebb sejtadhézió a RGD-1L és a PLL-g-PEG-RGD esetében volt.

A fáziskontraszt mikroszkópos képeken jól látható, hogy a felvételeken a sejtadhézió mértéke jól korrelál a bioszenzorjelekkel. Egyre nagyobb mennyiségű kiterült sejt látható a képeken az RGD-1 flagellinbevonattól az RGD-1L flagellinbevonatig haladva (**5.19. (b), (c), és (d) ábra**). A fluoreszcens képeken a HeLa sejtek sejtmagja (kék), a vinkulin (zöld) és az aktin citoskeleton (piros) látható. Az F-aktin jelölésére TRITC-konjugált falloidint, a fokális kontaktusokhoz anti-vinkulint, míg a sejtmaghoz DAPI-t használtam. A fokális adhéziós kontaktusok jól láthatóak az **5.20. b, c, d és e ábrán**. A képeken szignifikáns különbség látható a sejtadhéziót elősegítő rétegeken kiterült sejtek lamellopódiái és a sejttaszító rétegeken látható nem kiterült sejtek között. A fluoreszcens mikroszkópos képek is jól alátámasztják a bioszenzorral kapott eredményeimet.



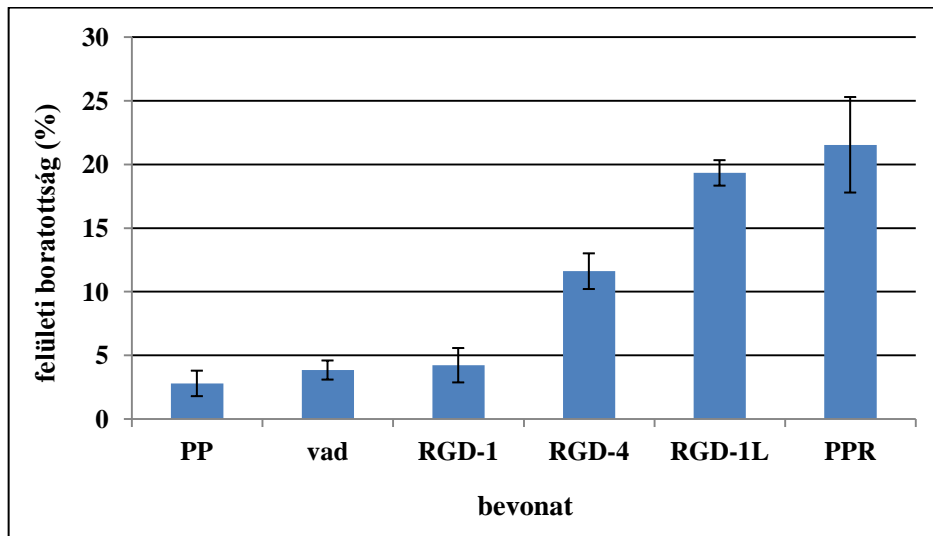
5.19. ábra Fáziskontraszt mikroszkópos képek az OWLS kísérleteket követően (a) vad típusú flagellinnel, (b) RGD-1 flagellinnel, (c) RGD-4 flagellinnel, (d) RGD-1L flagellinnel, (e) PLL-g-PEG-gel, (f) PLL-g-PEG-RGD-vel bevont felületeken. A gyengén kitapadt sejtek gömb alakúak.



5.20. ábra Párhuzamos kísérletekben hidrofobizált üveglemezen készült fluoreszcens mikroszkópos képek (piros: F-aktin, kék: sejtmag, zöld: vinkulin) (a) vad típusú flagellinnel, (b) RGD-1 flagellinnel, (c) RGD-4 flagellinnel, (d) RGD-1L flagellinnel, (e) PLL-g-PEG-gel, (f) PLL-g-PEG-RGD-vel bevont felületeken.

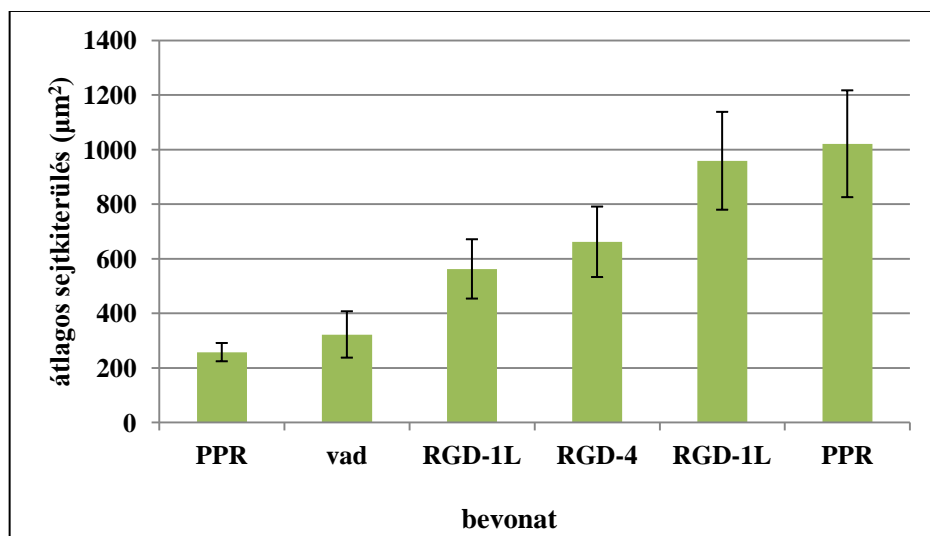
A sejtfestéses kísérletek célja az volt, hogy szemléltessem, hogy a sejtek hogyan viselkednek a különböző bevonatokon és láthatóvá tegyem a sejtadhézióban szerepet játszó fokális adhéziós kontaktusokat. Ennek érdekében annyi sejtet tettem a lyukakba (melyek felülete és térfogata is nagyobb, mint az OWLS küvettáé), hogy biztosan ne alakuljon ki teljesen konfluens sejtréteg. Lyukanként 50.000 sejtet tettem, míg az OWLS kísérletekben 60.000 sejt került a küvettába. Ennek következtében a felületi sejtborítottság biztosan kisebb lesz, mint az OWLS kísérletek esetében.

A fluoreszcens képeken az alábbi ábrán látható lefedettség a jellemző (n=3) (5.21. ábra):



5.20. ábra A fluoreszcens mikroszkópos képeken a sejtek által lefedett terület aránya.

Az OWLS és fluoreszcens jelöléses kísérletek közötti sejtszám különbség miatt jobb kiértékelésnek bizonyulhat a sejtek által átlagosan elfoglalt terület összehasonlítása (n=3) (5.21. ábra). Amely megmutatja, hogy az RGD-1L és PLL-g-PEG-RGD bevonatokon voltak leginkább kiterülve a sejtek. Ezt követi az RGD-4 és RGD-1 flagellinbevonatokon mért sejtkiterülés mértéke. A sejtek a legkisebb területet a vad típusú és PLL-g-PEG felületeken foglalták el.



5.21. ábra A sejtek átlagos kiterülésének mértéke a különböző bevonatokon.

5.5.1. Polimer és fehérje felületi sűrűség és RGD-RGD ligand távolság

Kísérleteim azt mutatták, hogy a különböző linkerek segítségével beépített RGD-motívum eltérő mértékben hozzáférhető a sejtek számára. Azonban azt is figyelembe kell venni, hogy az adhézió mértéke nemcsak a hozzáférhetőségtől, hanem az RGD-RGD távolságtól is függ [11], [142], [143]. A felületek fehérjével/polimerrel való bevonása során mért OWLS adatok felhasználhatóak arra, hogy megbecsüljük a ligand-ligand távolságokat. Az N_{TE} és N_{TM} értékekből meghatározható a felületi tömegsűrűség (M). Az M -et és a fehérjék, ill. polimerek molekulatömegét felhasználva meg lehet állapítani a molekulák felületi sűrűségét (ρ). Ezt követően az átlagos RGD-RGD távolságot ($d_{RGD-RGD}$) az alábbi egyenlet alapján lehet megbecsülni [144]:

$$d_{RGD-RGD} = \sqrt{\frac{2}{\sqrt{3}} \frac{1}{\rho \cdot N_A}} \quad (13)$$

ahol N_A az Avogadro állandó.

Az átlagos RGD-RGD távolság PLL-*g*-PEG-RGD esetében 7 nm-nek, az RGD-motívumot kifejező flagellinvariánsok esetében átlagosan 6 nm-nek adódott. Fontos megjegyezni, hogy az RGD-RGD távolság csökkentése növeli a sejtadhéziót, de az effektus 10 nm környékén szaturálódik [11], [145]. Így a megfigyelt különbségek nem az RGD-RGD távolságok közötti eltérésekből, hanem az RGD-motívum eltérő orientációjából, flexibilitásából és hozzáférhetőségéből erednek [146].

6. Összefoglalás

PhD munkám során vad típusú és genetikailag módosított flagellinvariánsok adszorpciós kinetikáját és rétegformálási képességét vizsgáltam jelölésmentes optikai bioszenzorral. A kialakított rétegek részletesebb karakterizálására is sor került AFM és XPS technikák alkalmazásával. A kialakított orientált vad típusú és genetikailag módosított monorétegeken baktérium és humán sejtek adhézióját tanulmányoztam jelölésmentes optikai bioszenzorral, fáziskontraszt és fluoreszcens mikroszkóppal.

A kialakított fehérjeréteg tulajdonságait különböző technikákkal karakterizáltam. Az XPS mérések bizonyították, hogy a hidrofób felületen kialakult a flagellinréteg, melynek vastagsága 2,3 nm. A genetikailag módosított flagellinvariánsok adszorpciós kinetikáját OWLS segítségével ellenőriztem, és igazoltam, hogy a variánsok a vad típusú flagellinhez hasonlóan, orientált monoréteget hoznak létre hidrofób felületeken. A réteg kompaktságát BSA oldat hozzáadásával teszteltem, amely nem okozott jelváltozást. A fehérjeréteg vastagsága az OWLS mérések eredményeiből kiszámítva szintén 2,3 nm-nek adódott. Ezt követően AFM-mel is karakterizáltuk a réteget. Aranyréteg segítségével egy éles lépcsőt sikerült kialakítani a bevonat nélküli, valamint a HMDS-sel és fehérjével bevont felületek határán. Ha számításba vesszük a HMDS réteg 1-2 nm-es vastagságát, akkor a fehérjeréteg vastagsága 2-3 nm-nek adódott, ami megfelel az XPS és OWLS mérésekből számított vastagságértékeknek.

A vad típusú flagellin adszorpcióját a Hofmeister sorba tartozó kozmotróp és kaotróp sók segítségével befolyásoltam, és OWLS-sel tanulmányoztam a hidrofób felületen létrehozott rétegek tulajdonságait. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a kaotróp sók hatására a fehérje nagyobb mennyiségben adszorbeálódik a felületre, a D0 domén alakít ki kölcsönhatást a felülettel, és a D3 domén az oldat irányába néz. Ezzel szemben a kozmotróp sók csökkentették a felületre adszorbeált fehérjék mennyiségét. A számítások alapján kapott lábnyom értékek arra utalnak, hogy a fehérje a hosszanti tengelye mentén adszorbeálódik a felületre. Az erős Hofmeister effektus egyértelműen bizonyította a hidrofób kölcsönhatás dominanciáját az adszorpciós folyamatban.

Feltételezésünk szerint a vad típusú orientált flagellinréteg nagyon hasonlít a filamentum felszínéhez, ezért baktériumtaszító tulajdonságokkal rendelkezik. Vad típusú flagellinből felületi bevonatot hoztam létre, és ezeken a rétegeken vizsgáltam

E. coli sejtek adszorpcióját *in situ* OWLS kísérletek során. Kontrollként a bevonat nélküli hidrofób felületet használtam. A bioszenzor kísérletek és a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatok megmutatták, hogy a baktériumok nem tapadtak ki a vad típusú flagellinnel bevont felületen, és a néhány kitapadt sejt mosás útján eltávolítható volt. Míg a bevonat nélküli hidrofób felületen a sejtek kitapadtak, és intenzív mosás követően sem lehetett eltávolítani őket.

Ezt követően a vad típusú flagellinrétegen HeLa sejtek adhézióját is vizsgáltam. Kontrollként PLL-g-PEG (sejtdhéziót gátló) és PLL-g-PEG-RGD (sejtdhéziót elősegítő) szintetikus polimereket használtam. A HeLa sejtek nem rendelkeznek filamentumot felismerő receptorról, így a filamentum nem funkcionál adhéziós molekulaként. Feltehetőleg maga a flagellin sem funkcionál adhéziós molekulaként, így nem indukálja a sejtek adhézióját. A bioszenzor adatok mindezt alátámasztják: a ΔN_{TM} jelek a vad típusú flagellinrétegen, ill. a PLL-g-PEG rétegen a sejtes kísérlet teljes időtartama alatt az alapvonalon maradtak. Mivel a ΔN_{TM} arányos a sejtdhézió mértékével, így azt mondhatjuk, hogy a vad típusú flagellinbevonaton, hasonlóan a PLL-g-PEG polimerhez, a sejtek nem tapadtak ki. A TM_0 rezonanciacsúcs félértékszélességében elhanyagolható változást idéztek elő a sejtek, bizonyítva ezzel, hogy nem volt jelentős sejtdhézió a vad típusú flagellinrétegen és a PLL-g-PEG rétegen. A bioszenzor adatokat a fáziskontraszt és a fluoreszcens mikroszkópos képek jól alátámasztják. A mikroszkópos képeken gömb alakú, nem kitapadt morfológiájú sejtek láthatóak.

A flagellin kiváló célpont a genetikai módosításra, mivel a D3 domén helyére különféle szekvenciák építhetők be, anélkül, hogy a fehérje szálfarmálási képessége megváltozna. A Pannon Egyetem Bio-Nanorendszerek Kutatólaboratóriumában a D3 domén helyére a sejt felszíni integrin receptorok felismerési motívumát, a GRGDS pentapeptidet építették be különböző linkerek segítségével. A különböző linkerek eltérő hozzáférhetőséget és flexibilitást biztosítanak a sejtek számára. A munkám során három variánst használtam:

RGD-1 - 1 RGD-motívum, LETG és EL linkerekkel,
RGD-1L - 1 RGD-motívum LE és TGEL linkerekkel,
és RGD-4 - 4 RGD-motívum, LE és EL linkerekkel.

A kapott ΔN_{TM} görbék szigmoid alakja a sejtadhézióra jellemző. A három különböző fehérjére a sejtek eltérő mértékben tapadtak ki, ami azzal magyarázható, hogy az RGD-motívumok különböző linkerekkel lettek beépítve a fehérjébe. A félértékszélesség adatok is azt mutatják, hogy a legjelentősebb sejtadhézió az RGD-1L rétegen volt, ezt követi az RGD-4, majd az RGD-1 flagellinbevonat. A fáziskontraszt és a fluoreszcens mikroszkópos képeken a sejtadhézió mértéke jól látható, és korrelál a bioszenzorral kapott eredményekkel.

A munkám során előállított fehérjebevonatokat részletesen karakterizáltam. Sikertelenül olyan flagellinbevonatokat létrehoznom, melyek segítségével befolyásolni tudtam az *E. coli* és a HeLa sejtek adhézióját. A HeLa sejtek esetében az adhézió mértékére hatással volt az alkalmazott mutáns fehérjék típusa.

Bebizonyosodott, hogy a flagellin alkalmas felületi bevonatok létrehozására, és előnyös tulajdonságainak köszönhetően genetikai módosítások révén számos további sejtadhéziót elősegítő motívum beépítése is lehetséges. Így nemcsak az RGD-RGD távolság hangolása valósítható meg a rendszerrel, hanem a különböző receptorok közötti esetleges szinergia, erősítés vagy gyengítés is tanulmányozhatóvá válik. Emellett a mérési rendszer továbbfejlesztése is folyamatban van. A sejtes kísérletek gyorsabb és könnyebb elvégzése érdekében lemezalapú bioszenzor felületek fejlesztésén is dolgozom, hogy egyszerre több párhuzamos kísérletet lehessen elvégezni.

7. Tézispontok

1. Optikai hullámvezető fénymódus spektroszkópiával (OWLS) jellemeztem a Hofmeister sók hatását vad típusú flagellin adszorpciójára. Megmutattam, hogy a kozmotróp sók növelték a flagellin adszorpcióját, ezzel szemben a kaotróp sók csökkentették a fehérje adszorpcióját. Bebizonyítottam, hogy ezek az ionok hidrofób felületeken szignifikánsan befolyásolják a monomer flagellin rétegformálási tulajdonságát. Igazoltam, hogy a hidrofób kölcsönhatás fontos szerepet játszik a flagellin adszorpciójának folyamatában [T3].
2. Jelölésmentes optikai bioszenzorika és fluoreszcencia mikroszkópia kombinált alkalmazásával megmutattam, hogy a flagelláris filamentumot alkotó flagellin monomerekből hidrofób felületen létrehozott orientált monoréteg a filamentum felszínét utánozza, és meggátolja az *E. coli* sejtek adhézióját a felületen [T2].
3. A vad típusú flagellint felületi bevonatként használtam HeLa sejtek adhéziójának vizsgálatára. Megmutattam, hogy az orientált vad típusú flagellin kiváló sejttaszító hatással rendelkezik, és meggátolja a HeLa sejtek adhézióját [T1].
4. Megmutattam, hogy az RGD-motívumot kifejező, genetikailag módosított flagellinvariánsokból kialakított monorétegek különböző mértékű sejtadhéziót indukálnak. A sejtadhézió mértéke a motívum beillesztésére szolgáló linkerektől és a beillesztett motívumok számától függ. Az elvégzett kísérletek eredményei arra utalnak, hogy a megfelelő linker megválasztásával befolyásolható a kötőhely rugalmassága és hozzáférhetősége [T1].

8. Publikációk

8.1. *A disszertációhoz kapcsolódó publikációk jegyzéke*

- [T1] B. Kovacs, D. Patko, I. Szekacs, N. Orgovan, S. Kurunczi, A. Sulyok, N. Q. Khanh, B. Toth, F. Vonderviszt, and R. Horvath, "Flagellin based biomimetic coatings: from cell-repellent surfaces to highly adhesive coatings," *Acta Biomater.*, vol. 42, pp. 66–76, 2016.
- [T2] B. Kovacs, D. Patko, A. Klein, B. Kakasi, A. Saftics, S. Kurunczi, F. Vonderviszt, and R. Horvath, "Bacteria repellent layer made of flagellin," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 257, pp. 839–845, 2018.
- [T3] B. Kovacs, A. Saftics, A. Biro, S. Kurunczi, F. Vonderviszt, Andras Der, R. Horvath, "Adsorption-desorption kinetics and structure of self-assembled flagellin layers on hydrophobic surfaces in the presence of Hofmeister salts", publikáció alatt

8.2. *A disszertációhoz kapcsolódó szóbeli és poszteres előadások*

Kovács B., Orgován N., Patkó D., Székács I., Tóth B., Vonderviszt F., Horváth R: Élő sejtek adhéziójának vizsgálata genetikailag módosított flagellinrétegeken, MTA Természettudományi Kutatóközpont Doktori Konferencia, Budapest, 2014. december 10-12., szóbeli előadás

B. Kovacs, N. Orgovan, D. Patko, I. Szekacs, B. Toth, F. Vonderviszt, R. Horvath: The dynamics of living cell adhesion on nanostructured genetically engineered molecular layers revealed by label-free optical biosensors, 4th International Conference on Bio-Sensing Technology, Portugália, Lisszabon, 2015. május 10-13., poszter

Kovács B., Orgován N., Patkó D., Székács I., Tóth B., Vonderviszt F., Horváth R.: Genetikailag módosított protein rétegeken élő sejtek adhéziójának nyomon követése jelölésmentes optikai bioszenzorokkal, 44. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2015. május 19-22., poszter

Kovács B., Orgován N., Patkó D., Székács I., Tóth B., Vonderviszt F., Horváth R.: Élő sejtek adhéziójának tanulmányozása jelölésmentes optikai bioszenzorokkal genetikailag módosított flagellinrétegeken, A Magyar Biofizikai Társaság XXV. Kongresszusa, Budapest, 2015. augusztus 25-28., poszter

B. Kovacs, D. Patko, I. Szekacs, N. Orgovan, S. Kurunczi, B. Toth, F. Vonderviszt, R. Horvath: The modulation of human cell adhesion by genetically modified flagellin monolayers revealed by label-free optical biosensors, Műszaki Kémiai Napok, Veszprém, 2016. április 26-28., szóbeli előadás

B. Kovacs, N. Orgovan, D. Patko, I. Szekacs, B. Toth, F. Vonderviszt, R. Horvath: The modulation of human cell adhesion by oriented flagellin monolayers revealed by label-free optical biosensors, 26th Anniversary World Congress on Biosensors, Svédország, Göteborg, 2016. május 25-27., poszter

Kakasi B., Kovács B., Tóth É., Jankovics H., Horváth R., Vonderviszt F., Adhéziós motívumokkal rendelkező flagellin variánsok létrehozása sejtadhéziós vizsgálatokra, Műszaki Kémiai Napok, Veszprém, 2017. április 25-27., szóbeli előadás

B. Kovacs, I. Szekacs, S. Kurunczi, B. Kakasi, F. Vonderviszt, R. Horvath: Biomimetic coatings from genetically engineered flagellin variants to control cell adhesion, Biological Surfaces and Interfaces: Interface Dynamics, Spanyolország, Sant Feliu de Guixols, 2017. július 2-7., poszter

Kovács B., Székács I., Kakasi B., Kurunczi S., Vonderviszt F., Horváth R., Genetikailag módosított flagellinrétegeken élő sejtek adhéziójának nyomon követése jelölésmentes optikai bioszenzorokkal, A Magyar Biofizikai Társaság XXVI. Kongresszusa, Szeged, 2017. augusztus 22-25., szóbeli előadás

Kovács B., Székács I., Kakasi B., Kurunczi S., Vonderviszt F., Horváth R., Élő sejtek adhéziójának nyomon követése jelölésmentes optikai bioszenzorokkal genetikailag módosított flagellinrétegeken, MKE előadói ülés, Budapest, 2017. november 10., szóbeli előadás

8.3. *A disszertációhoz szorosan nem kapcsolódó publikációk*

N. Orgovan, B. Kovacs, E. Farkas, B. Szabó, N. Zaytseva, Y. Fang, and R. Horvath, “Bulk and surface sensitivity of a resonant waveguide grating imager,” Appl. Phys. Lett., vol. 104, no. 8, p. 83506, Feb. 2014.

D. Patko, Z. Mártonfalvi, B. Kovacs, F. Vonderviszt, M. Kellermayer, and R. Horvath, “Microfluidic channels laser-cut in thin double-sided tapes: Cost-effective biocompatible fluidics in minutes from design to final integration with optical biochips,” Sensors Actuators, B Chem., vol. 196, pp. 352–356, 2014.

B. Peter, E. Farkas, E. Forgacs, A. Saftics, B. Kovacs, S. Kurunczi, I. Szekacs, A. Csampai, S. Bosze, and R. Horvath, “Green tea polyphenol tailors cell adhesivity of RGD displaying surfaces: multicomponent models monitored optically,” Sci. Rep., vol. 7, no. January, p. 42220, 2017.

I. Szekacs, N. Orgovan, B. Peter, B. Kovacs, R. Horvath, Receptor specific adhesion assay for the quantification of integrin-ligand interactions in intact cells using a microplate based, label-free optical biosensor, Sensors and Actuators B: Chemical, 256 (2018) 729–734

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Horváth Róbertnek és Prof. Vonderviszt Ferencnek, amiért lehetőséget biztosítottak számomra, hogy a kutatócsoport tagja lehessenek. Hálás vagyok rengeteg segítségükért, támogatásukért és szakmai útmutatásukért, amit az évek során kaptam tőlük. Kutatásom és a disszertációm írása során mindvégig bátran fordulhattam hozzájuk útmutatásért.

Köszönettel tartozom Dr. Székács Innának a sejtes kísérletek és az elméleti kérdésekben nyújtott segítségéért és jó tanácsaiért. Köszönöm Dr. Kurunczi Sándor segítségét, akihez bármikor bátran fordulhattam, ha a kutatásaim során kémiai és felületmódosítási problémákba ütköztem.

Szeretném hálámat kifejezni Dr. Patkó Dánielnek, Dr. Nádor Juditnak és Saftics Andrásnak, akik mindig a rendelkezésemre álltak és bátorítottak a kísérleteim elvégzése és ezen disszertáció írása közben. Köszönöm a barátságos légkört és hogy mindig készek voltak kijavítani a hibáimat.

Szeretnék köszönetet mondani a Nanobioszenzorika Kutatócsoport munkatársainak: Biró Attilának, Farkas Enikőnek, Gerecsei Tamásnak, Hámori Andrásnak, Orgován Norbertnek, Dr. Péter Beatrixnak, Dr. Ungai-Salánki Ritának, Türk Barbarának, Szuja Annának.

Köszönöm a Bio-Nanorendszerek Kutatólaboratórium munkatársainak Dr. Jankovics Hajnalkának, Kakasi Balázsnak, Klein Ágnesnek és Dr. Tóth Balázsnak a filamentum minták elkészítését és a segítséget a fehérje munkák során.

Köszönöm a cikkeim társzerzőinek segítségét: Dr. Sulyok Attilának az XPS méréseket és értékelésüket, Dr. Nguyen Quoc Khanhnek az aranyréteg litográfiát és Dr. Dér Andrásnak a Hofmeister sókkal végzett kísérletekben nyújtott szakmai támogatást. A kinetikai kiértékelések és a MATLAB kód fejlesztését köszönöm Dr. Horváth Róbertnek és Saftics Andrásnak.

Köszönettel tartozom a Creoptix AG munkatársainak Kaspar Cottiernek, Fabio Spiganak és Dusko Trivunnek a munkám során nyújtott szakmai tanácsokért.

Köszönöm Prof. Kristóf Jánosnak, a Vegyészmérnöki és Anyagtudományok Doktori Iskola vezetőjének, Prof. Bársony Istvánnak és Dr. Pécz Bélának a Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet vezetőinek, hogy helyszínt és háttérrel biztosítottak doktori tanulmányaimhoz és kutatásomhoz.

Kutatásom a BIONANO_GINOP-2.3.2-15-2016-00017, az OTKA NN117849 projektek, az MTA Lendület és az NKFIH ERC_HU kutatási programok támogatása nélkül nem valósulhatott volna meg.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni szüleimnek, férjemnek és barátaimnak végtelen támogatásukat, bátorításukat, segítségüket és szeretetüket.

10. Irodalomjegyzék

- [1] S. Vesterlund, J. Paltta, M. Karp, and A. C. Ouwehand, "Measurement of bacterial adhesion-in vitro evaluation of different methods," *J. Microbiol. Methods*, vol. 60, no. 2, pp. 225–233, 2005.
- [2] C. R. Taitt, G. P. Anderson, and F. S. Ligler, "Evanescence wave fluorescence biosensors," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 20, no. July, pp. 2470–2487, 2005.
- [3] N. Adányi, Z. Bori, I. Szendro, K. Erdélyi, X. Wang, H. C. Schröder, and W. E. G. Müller, "Bacterial sensors based on biosilica immobilization for label-free OWLS detection," *N. Biotechnol.*, vol. 30, no. 5, pp. 493–499, 2013.
- [4] A. L. J. Olsson, H. C. van der Mei, H. J. Busscher, and P. K. Sharma, "Acoustic sensing of the bacterium-substratum interface using QCM-D and the influence of extracellular polymeric substances," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 357, no. 1, pp. 135–138, 2011.
- [5] H. Baccar, M. B. Mejri, I. Hafaiedh, T. Ktari, M. Aouni, and A. Abdelghani, "Surface plasmon resonance immunosensor for bacteria detection," *Talanta*, vol. 82, no. 2, pp. 810–814, 2010.
- [6] B. M. Gumbiner, "Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis," *Cell*, vol. 84, pp. 345–357, 1996.
- [7] H. Shroff, C. G. Galbraith, J. A. Galbraith, and E. Betzig, "Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics," *Nat. Methods*, vol. 5, no. 5, pp. 417–423, 2008.
- [8] P. Vallotton, S. L. Gupton, C. M. Waterman-Storer, and G. Danuser, "Simultaneous mapping of filamentous actin flow and turnover in migrating cells by quantitative fluorescent speckle microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 26, pp. 9660–5, 2004.
- [9] C. M. Franz and P.-H. Puech, "Atomic Force Microscopy: A Versatile Tool for Studying Cell Morphology, Adhesion and Mechanics," *Cell. Mol. Bioeng.*, vol. 1, no. 4, pp. 289–300, 2008.
- [10] R. Salánki, C. Hős, N. Orgovan, B. Péter, N. Sándor, Z. Bajtay, A. Erdei, R. Horvath, and B. Szabó, "Single cell adhesion assay using computer controlled micropipette," *PLoS One*, vol. 9, no. 10, p. e111450, 2014.
- [11] N. Orgovan, B. Peter, S. Bösze, J. J. Ramsden, B. Szabó, and R. Horvath, "Dependence of cancer cell adhesion kinetics on integrin ligand surface density measured by a high-throughput label-free resonant waveguide grating biosensor," *Sci. Rep.*, vol. 4, p. 4034, Jan. 2014.
- [12] T. S. Hug, J. E. Prenosil, P. Maier, and M. Morbidelli, "Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy (OWLS) to Monitor Cell Proliferation Quantitatively," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 80, no. 2, pp. 213–221, 2002.
- [13] M. Katsikogianni and Y. F. Missirlis, "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions," *Eur. Cells Mater.*, vol. 8, no. January 2005, pp. 37–57, 2004.
- [14] J. J. Ramsden and M. Máté, "Kinetics of monolayer particle deposition," *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, vol. 94, no. 6, pp. 783–788, 1998.
- [15] I. Armentano, C. R. Arciola, E. Fortunati, D. Ferrari, S. Mattioli, C. F. Amoroso, J. Rizzo, J. M. Kenny, M. Imbriani, and L. Visai, "The interaction of bacteria with engineered nanostructured polymeric materials: A review," *Scientific World Journal*. 2014.
- [16] K. Hori and S. Matsumoto, "Bacterial adhesion: From mechanism to control,"

- Biochem. Eng. J.*, vol. 48, no. 3, pp. 424–434, 2010.
- [17] J. A. Lichter, K. J. Van Vlietpa, and M. F. Rubner, “Design of antibacterial surfaces and interfaces: Polyelectrolyte multilayers as a multifunctional platform,” *Macromolecules*, vol. 42, no. 22, pp. 8573–8586, 2009.
- [18] B. Gottenbos, H. J. Busscher, H. C. Van Der Mei, and P. Nieuwenhuis, “Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 13, no. 8, pp. 717–722, 2002.
- [19] T. R. Garrett, M. Bhakoo, and Z. Zhang, “Bacterial adhesion and biofilms on surfaces,” *Prog. Nat. Sci.*, vol. 18, no. 9, pp. 1049–1056, Sep. 2008.
- [20] Y. H. An and R. J. Friedman, “Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 43, no. 3, pp. 338–348, 1998.
- [21] J. M. Patti, B. L. Allen, M. J. McGavin, and M. Höök, “MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 48, pp. 585–617, 1994.
- [22] P. Speziale, L. Visai, S. Rindi, G. Pietrocola, G. Provenza, and M. Provenzano, “Prevention and treatment of Staphylococcus biofilms,” *Curr. Med. Chem.*, vol. 15, no. 30, pp. 3185–3195, 2008.
- [23] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, 4th edition. 2000.
- [24] J. D. Humphries, A. Byron, and M. J. Humphries, “Integrin ligands at a glance,” *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. Pt 19, pp. 3901–3, Oct. 2006.
- [25] R. O. Hynes, “Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines,” *Cell*, vol. 110, no. 6, pp. 673–687, 2002.
- [26] M. Barczyk, S. Carracedo, and D. Gullberg, “Integrins,” *Cell Tissue Res.*, vol. 339, no. 1, pp. 269–280, 2010.
- [27] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, and J. W. Smith, “Ligand binding to integrins,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 29, pp. 21785–21788, 2000.
- [28] I. D. Campbell and M. J. Humphries, “Integrin Structure, Activation, and Interactions,” *Cold Spring Harb. Lab. Press*, vol. 3, no. 3, pp. 1–14, 2011.
- [29] I. D. Campbell and M. J. Humphries, “Integrin Structure , Activation , and Interactions,” pp. 1–15, 2011.
- [30] J. Takagi, “Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 32, no. 3, pp. 403–406, 2004.
- [31] K. Burridge, G. Nuckolls, C. Otey, F. Pavalko, K. Simon, and C. Turner, “Actin-membrane interaction in focal adhesions,” *Cell Differ. Dev.*, vol. 32, no. 3, pp. 337–342, 1990.
- [32] A. Bretscher, B. Drees, E. Harsay, D. Schott, and T. Wang, “What are the basic functions of microfilaments? Insights from studies in budding yeast,” *J. Cell Biol.*, vol. 126, no. 4, pp. 821–825, 1994.
- [33] E. Turner and K. Burridge, “Transmembrane molecular matrix assemblies interactions in cell-extracellular,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 3, no. 5, pp. 849–53, 1991.
- [34] A. Gahlmann and W. E. Moerner, “Exploring bacterial cell biology with single-molecule tracking and super-resolution imaging,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 12, no. 1, pp. 9–22, 2014.
- [35] H. D. Lee, S. J. Lord, S. Iwanaga, K. Zhan, H. Xie, J. C. Williams, H. Wang, G. R. Bowman, E. D. Goley, L. Shapiro, R. J. Twieg, J. Rao, and W. E. Moerner, “Superresolution imaging of targeted proteins in fixed and living cells using photoactivatable organic fluorophores,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 43, pp.

- 15099–15101, 2010.
- [36] R. Thompson, *Fluorescence sensors and biosensors*. CRC Press, 2005.
- [37] S. Zadran, S. Standley, K. Wong, E. Otiniano, A. Amighi, and M. Baudry, “Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors: Visualizing cellular dynamics and bioenergetics,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 96, no. 4, pp. 895–902, 2012.
- [38] S. Vigneshvar, C. C. Sudhakumari, B. Senthilkumaran, and H. Prakash, “Recent Advances in Biosensor Technology for Potential Applications – An Overview,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 4, no. February, pp. 1–9, 2016.
- [39] M. A. Cooper, “Optical biosensors in drug discovery,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 1, no. 7, pp. 515–28, Jul. 2002.
- [40] M. Holzinger, A. Le Goff, and S. Cosnier, “Nanomaterials for biosensing applications: a review,” *Front. Chem.*, vol. 2, no. August, pp. 1–10, 2014.
- [41] D. Dey and T. Goswami, “Optical biosensors: A revolution towards quantum nanoscale electronics device fabrication,” *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011.
- [42] Y. Fang, “Label-Free and Non-invasive Biosensor Cellular Assays for Cell Adhesion,” *J. Adhes. Sci. Technol.*, vol. 24, no. 5, pp. 1011–1021, 2010.
- [43] B. Agnarsson, A. Jonsdottir, N. Arnfinnsdottir, and K. Leosson, “On-chip modulation of evanescent illumination and live-cell imaging with polymer waveguides,” *Opt. Express*, vol. 19, no. 23, pp. 22929–22935, 2011.
- [44] X. Wang, M. Sieger, and B. Mizaikoff, “Toward on-chip mid-infrared chem/bio sensors using quantum cascade lasers and substrate-integrated semiconductor waveguides,” *Proc. SPIE*, vol. 8631, p. 86312M, 2013.
- [45] J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz, “Surface plasmon resonance sensors: review,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 54, no. 1, pp. 3–15, 1999.
- [46] M. Mrksich, G. B. Sigal, and G. M. Whitesides, “Surface Plasmon Resonance Permits in Situ Measurement of Protein Adsorption on Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Gold,” *Langmuir*, no. 13, pp. 4383–4385, 1995.
- [47] W. Lukosz, “Principles and sensitivities of integrated optical and surface plasmon sensors for direct affinity sensing and immunosensing,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 6, no. 3, pp. 215–225, 1991.
- [48] J. Homola, “Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species,” *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 2, pp. 462–493, 2008.
- [49] J. Vörös, J. J. Ramsden, G. Csúcs, I. Szendro, S. M. De Paul, M. Textor, and N. D. Spencer, “Optical grating coupler biosensors,” *Biomaterials*, vol. 23, no. 17, pp. 3699–3710, 2002.
- [50] R. Horvath and J. J. Ramsden, “Quasi-isotropic analysis of anisotropic thin films on optical waveguides,” *Langmuir*, vol. 23, no. 18, pp. 9330–4, 2007.
- [51] K. Cottier and R. Horvath, “Imageless microscopy of surface patterns using optical waveguides,” *Appl. Phys. B*, vol. 91, no. 2, pp. 319–327, 2008.
- [52] N. Kovacs, D. Patko, N. Orgovan, S. Kurunczi, J. J. Ramsden, F. Vonderviszt, and R. Horvath, “Optical anisotropy of flagellin layers: in situ and label-free measurement of adsorbed protein orientation using OWLS,” *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 11, pp. 5382–9, Jun. 2013.
- [53] J. A. De Feijter, J. Benjamins, and F. A. Veer, “Ellipsometry as a tool to study the adsorption behaviour of polymers at the air-water interface,” *Biopolymers*, vol. 17, p. 1759, 1978.
- [54] B. Cunningham, P. Li, B. Lin, and J. Pepper, “Colorimetric resonant reflection as a direct biochemical assay technique,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 81, no.

- 2–3, pp. 316–328, 2002.
- [55] N. Orgovan, D. Patko, C. Hos, S. Kurunczi, B. Szabó, J. J. Ramsden, and R. Horvath, “Sample handling in surface sensitive chemical and biological sensing: A practical review of basic fluidics and analyte transport,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 211, pp. 1–16, 2014.
- [56] “OW 2400 - Optical Waveguide Grating Coupler Sensor Chip.” [Online]. Available: http://www.owls-sensors.com/sensorchip_ow2400.
- [57] S. Kurunczi, A. Hainard, K. Juhasz, D. Patko, N. Orgovan, N. Turck, J. C. Sanchez, and R. Horvath, “Polyethylene imine-based receptor immobilization for label free bioassays,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 181, pp. 71–76, 2013.
- [58] F. Hook, J. Voros, M. Rodahl, R. Kurrat, P. Boni, J. J. Ramsden, M. Textor, N. D. Spencer, P. Tengvall, J. Gold, and B. Kasemo, “A comparative study of protein adsorption on titanium oxide surfaces using in situ ellipsometry , optical waveguide lightmode spectroscopy , and quartz crystal microbalance / dissipation,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 24, pp. 155–170, 2002.
- [59] I. R. Cooper, S. T. Meikle, G. Standen, G. W. Hanlon, and M. Santin, “The rapid and specific real-time detection of *Legionella pneumophila* in water samples using Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 78, no. 1, pp. 40–44, 2009.
- [60] N. Orgovan, R. Salánki, N. Sándor, Z. Bajtay, A. Erdei, B. Szabó, and 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,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 54, pp. 339–344, 2014.
- [61] K. Majer-Baranyi, A. Székács, I. Szendrő, A. Kiss, and N. Adányi, “Optical waveguide lightmode spectroscopy technique – based immunosensor development for deoxynivalenol determination in wheat samples,” *Eur Food Res Technol*, vol. 233, pp. 1041–1047, 2011.
- [62] N. Orgovan, R. Ungai-Salánki, S. Lukácsi, N. Sándor, Z. Bajtay, A. Erdei, B. Szabó, and R. Horvath, “Adhesion kinetics of human primary monocytes, dendritic cells, and macrophages: Dynamic cell adhesion measurements with a label-free optical biosensor and their comparison with end-point assays,” *Biointerphases*, vol. 11, no. 3, p. 31001, 2016.
- [63] G. H. Cross, A. A. Reeves, S. Brand, J. F. Popplewell, L. L. Peel, M. J. Swann, and N. J. Freeman, “A new quantitative optical biosensor for protein characterisation,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, no. 4, pp. 383–390, 2003.
- [64] “Dual Polarization Interferometry (DPI).” [Online]. Available: <https://itn-snal.net/2014/10/dual-polarization-interferometry-dpi/>.
- [65] R. Horvath, K. Cottier, H. C. Pedersen, and J. J. Ramsden, “Multidepth screening of living cells using optical waveguides,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 4, pp. 799–804, 2008.
- [66] P. Kozma, A. Hamori, K. Cottier, S. Kurunczi, and R. Horvath, “Grating coupled interferometry for optical sensing,” *Appl. Phys. B Lasers Opt.*, vol. 97, no. 1, pp. 5–8, 2009.
- [67] D. Patko, K. Cottier, A. Hamori, and R. Horvath, “Single beam grating coupled interferometry: high resolution miniaturized label-free sensor for plate based parallel screening,” *Opt. Express*, vol. 20, no. 21, p. 23162, Sep. 2012.
- [68] R. Horváth, L. R. Lindvold, and N. B. Larsen, “Reverse-symmetry waveguides: Theory and fabrication,” *Appl. Phys. B Lasers Opt.*, vol. 74, no. 4–5, pp. 383–393, 2002.
- [69] M. Minunni, M. Mascini, G. G. Guilbault, and B. Hock, “The Quartz Crystal

- Microbalance as Biosensor. A Status Report on Its Future,” *Anal. Lett.*, vol. 28, no. 5, pp. 749–764, 1995.
- [70] P. Sedlak, J. Majzner, J. Šikula, and K. Hajek, “Noise Measurement Setup for Quartz Crystal Microbalance,” *Radioengineering*, vol. 21, no. 1, pp. 207–212, 2012.
- [71] H. Stadler, M. Mondon, and C. Ziegler, “Protein adsorption on surfaces: Dynamic contact-angle (DCA) and quartz-crystal microbalance (QCM) measurements,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 375, no. 1, pp. 53–61, 2003.
- [72] T. Hianik, V. Ostatná, Z. Zajacová, E. Stoikova, and G. Evtugyn, “Detection of aptamer-protein interactions using QCM and electrochemical indicator methods,” *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 15, no. 2, pp. 291–295, 2005.
- [73] C. Yao, T. Zhu, J. Tang, R. Wu, Q. Chen, M. Chen, B. Zhang, J. Huang, and W. Fu, “Hybridization assay of hepatitis B virus by QCM peptide nucleic acid biosensor,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, no. 6, pp. 879–885, 2008.
- [74] S. J. Braunhut, K. Marx, T. Zhou, and H. Schulze, “A Quartz Crystal Microbalance cell biosensor: Detection of microtubule alterations in living endothelial cells,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 11, p. 1874, 2000.
- [75] Y. Fang, A. M. Ferrie, N. H. Fontaine, J. Mauro, and J. Balakrishnan, “Resonant waveguide grating biosensor for living cell sensing,” *Biophys. J.*, vol. 91, no. 5, pp. 1925–1940, 2006.
- [76] D. Falconnet, G. Csucs, H. Michelle Grandin, and M. Textor, “Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 16, pp. 3044–3063, 2006.
- [77] A. Khademhosseini, R. Langer, J. T. Borenstein, and J. P. Vacanti, “Microscale technologies for tissue engineering and biology,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 8, pp. 2480–2487, 2006.
- [78] I. C. Saldarriaga Fernández, H. C. van der Mei, M. J. Lochhead, D. W. Grainger, and H. J. Busscher, “The inhibition of the adhesion of clinically isolated bacterial strains on multi-component cross-linked poly(ethylene glycol)-based polymer coatings,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 28, pp. 4105–4112, 2007.
- [79] D. Campoccia, L. Montanaro, and C. R. Arciola, “A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces,” *Biomaterials*, vol. 34, pp. 8533–8554, 2013.
- [80] Q. Yu, Y. Zhang, H. Wang, J. Brash, and H. Chen, “Anti-fouling bioactive surfaces,” *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 4, pp. 1550–1557, 2011.
- [81] K. M. McLean, G. Johnson, R. C. Chatelier, G. J. Beumer, J. G. Steele, and H. J. Griesser, “Method of immobilization of carboxymethyl-dextran affects resistance to tissue and cell colonization,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 18, no. 3–4, pp. 221–234, 2000.
- [82] P. Francois, D. Letourneur, D. P. Lew, J. Jozefonwicz, and P. Vaudaux, “Inhibition by heparin and derivatized dextrans of Staphylococcus epidermidis adhesion to in vitro fibronectin-coated or explanted polymer surfaces,” *J. Biomater. Sci. Ed.*, vol. 10, no. 12, pp. 1207–1221, 1999.
- [83] X. Cao, M. E. Pettit, S. L. Conlan, W. Wagner, A. D. Ho, A. S. Clare, J. A. Callow, M. E. Callow, M. Grunze, and A. Rosenhahn, “Resistance of polysaccharide coatings to proteins, hematopoietic cells, and marine organisms,” *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 4, pp. 907–915, 2009.
- [84] M. Morra and C. Cassineli, “Non-fouling properties of polysaccharide-coated surfaces,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 10, no. 10, pp. 1107–1124, 1999.
- [85] J. Fu, J. Ji, W. Yuan, and J. Shen, “Construction of anti-adhesive and

- antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 33, pp. 6684–6692, 2005.
- [86] S. Xu, J. Li, A. He, W. Liu, X. Jiang, J. Zheng, C. C. Han, B. S. Hsiao, B. Chu, and D. Fang, “Chemical crosslinking and biophysical properties of electrospun hyaluronic acid based ultra-thin fibrous membranes,” *Polymer (Guildf)*, vol. 50, no. 15, pp. 3762–3769, 2009.
- [87] T. Crouzier, H. Jang, J. Ahn, R. Stocker, and K. Ribbeck, “Cell patterning with mucin biopolymers,” *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 9, pp. 3010–3016, 2013.
- [88] A. K. Muszanska, H. J. Busscher, A. Herrmann, H. C. Van der Mei, and W. Norde, “Pluronic-lysozyme conjugates as anti-adhesive and antibacterial bifunctional polymers for surface coating,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 26, pp. 6333–6341, 2011.
- [89] N. Liao, A. R. Unnithan, M. K. Joshi, A. P. Tiwari, S. T. Hong, C. H. Park, and C. S. Kim, “Electrospun bioactive poly (ε-caprolactone)-cellulose acetate-dextran antibacterial composite mats for wound dressing applications,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 469, pp. 194–201, 2015.
- [90] M. A. Aziz, J. D. Cabral, H. J. L. Brooks, S. C. Moratti, and L. R. Hanton, “Antimicrobial properties of a chitosan dextran-based hydrogel for surgical use,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, no. 1, pp. 280–287, 2012.
- [91] B. Geiger, J. P. Spatz, and A. D. Bershadsky, “Environmental sensing through focal adhesions,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 1, pp. 21–33, 2009.
- [92] J. E. Raynor, J. R. Capadona, D. M. Collard, T. A. Petrie, and A. J. García, “Polymer brushes and self-assembled monolayers: Versatile platforms to control cell adhesion to biomaterials,” *Biointerphases*, vol. 4, no. 2, p. FA3-FA16, 2009.
- [93] S. VandeVondele, J. Vörös, and J. A. Hubbell, “RGD-grafted poly-L-lysine-graft-(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 82, no. 7, pp. 784–90, Jun. 2003.
- [94] U. Hersel, C. Dahmen, and H. Kessler, “RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 24, pp. 4385–4415, 2003.
- [95] C. G. Knight, L. F. Morton, A. R. Peachey, D. S. Tuckwell, R. W. Farndale, and M. J. Barnes, “The collagen-binding α-domains of integrins α1/β1 and α2/β1 recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 1, pp. 35–40, 2000.
- [96] “SuSoS PLL-g-PEG Polymers.” [Online]. Available: <http://susos.com/en/beschichtungstechnologien/pll-g-peg-polymere/>.
- [97] D. Vonwil, M. Schuler, A. Barbero, S. Ströbel, D. Wendt, M. Textor, U. Aebi, and I. Martin, “An RGD-restricted substrate interface is sufficient for the adhesion, growth and cartilage forming capacity of human chondrocytes,” *Eur. Cells Mater.*, vol. 20, no. July, pp. 316–328, 2010.
- [98] K. Namba and F. Vonderviszt, “Molecular architecture of bacterial flagellum,” *Q. Rev. Biophys.*, vol. 30, no. 1, pp. 1–65, 1997.
- [99] J. Haiko and B. Westerlund-Wikström, “The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence,” *Biology (Basel)*, vol. 2, no. 4, pp. 1242–67, Jan. 2013.
- [100] K. Yonekura, S. Maki-Yonekura, and K. Namba, “Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy,” *Nature*, vol. 424, no. 6949, pp. 643–650, 2003.
- [101] S. Asakura and T. Iino, “Polymorphism of Salmonella flagella as investigated by means of in vitro copolymerization of flagellins derived from various strains,” *J.*

- Mol. Biol.*, vol. 64, no. 1, pp. 251–268, 1972.
- [102] S. A. Beatson, T. Minamino, and M. J. Pallen, “Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure,” *Trends Microbiol.*, vol. 14, no. 4, pp. 149–151, 2006.
- [103] D. R. Wilson and T. J. Beveridge, “Bacterial flagellar filaments and their component flagellins,” *Can. J. Microbiol.*, vol. 39, pp. 451–472, 1993.
- [104] F. A. Samatey, K. Imada, S. Nagashima, F. Vonderviszt, T. Kumasaka, M. Yamamoto, and K. Namba, “Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling,” *Nature*, vol. 410, no. 6826, pp. 331–337, 2001.
- [105] S. I. Aizawa, F. Vonderviszt, R. Ishima, and K. Akasaka, “Termini of Salmonella flagellin are disordered and become organized upon polymerization into flagellar filament,” *J. Mol. Biol.*, vol. 211, pp. 673–677, 1990.
- [106] F. Vonderviszt, R. Ishima, K. Akasaka, and S. I. Aizawa, “Terminal disorder: A common structural feature of the axial proteins of bacterial flagellum?,” *J. Mol. Biol.*, vol. 226, no. 3, pp. 575–579, 1992.
- [107] F. Vonderviszt, H. Uedaira, S. I. Kidokoro, and K. Namba, “Structural organization of flagellin,” *J. Mol. Biol.*, vol. 214, no. 1, pp. 97–104, 1990.
- [108] Á. Klein, B. Tóth, H. Jankovics, A. Muskotál, and F. Vonderviszt, “A polymerizable GFP variant,” *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 25, no. 4, pp. 153–157, 2012.
- [109] A. Muskotál, C. Seregélyes, A. Sebestyén, and F. Vonderviszt, “Structural basis for stabilization of the hypervariable D3 domain of Salmonella flagellin upon filament formation,” *J. Mol. Biol.*, vol. 403, no. 4, pp. 607–15, 2010.
- [110] G. Kuwajima, “Construction of a minimum-size functional flagellin of Escherichia coli,” *J. Bacteriol.*, vol. 170, no. 7, pp. 3305–3309, 1988.
- [111] É. Bereczk-Tompa, M. Pósfai, B. Tóth, and F. Vonderviszt, “Magnetite-Binding Flagellar Filaments Displaying the MamI Loop Motif,” *ChemBioChem*, vol. 17, no. 21, pp. 2075–2082, 2016.
- [112] V. Szabó, A. Muskotál, B. Tóth, M. D. Mihovilovic, and F. Vonderviszt, “Construction of a xylanase a variant capable of polymerization,” *PLoS One*, vol. 6, no. 9, 2011.
- [113] Á. Klein, V. Szabó, M. Kovács, D. Patkó, B. Tóth, and F. Vonderviszt, “Xylan-Degrading Catalytic Flagellar Nanorods,” *Mol. Biotechnol.*, vol. 57, no. 9, pp. 814–819, 2015.
- [114] A. González Orive, D. E. Pissinis, C. Diaz, A. Miñán, G. a. Benítez, A. Rubert, A. Daza Millone, M. Rumbo, A. Hernández Creus, R. C. Salvarezza, and P. L. Schilardi, “Self-assembly of flagellin on Au(111) surfaces,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 433, pp. 86–93, 2014.
- [115] M. Rabe, D. Verdes, and S. Seeger, “Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 162, no. 1–2, pp. 87–106, 2011.
- [116] K. L. Jones and C. R. O. Melia, “Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: effects of pH and ionic strength,” *J. Memb. Sci.*, vol. 165, pp. 31–46, 2000.
- [117] M. G. Cacace, E. M. Landau, and J. J. Ramsden, “The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena,” *Q. Rev. Biophys.*, vol. 30, no. 3, pp. 241–277, 1997.
- [118] Y. Zhang and P. S. Cremer, “Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 10, no. 6, pp. 658–663, 2006.

- [119] S. Dengler, G. J. T. Tiddy, L. Zahnweh, and W. Kunz, "Specific ion adsorption on alkyl carboxylate surfactant layers," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 457, no. 1, pp. 414–418, 2014.
- [120] B. Szalontai, G. Nagy, S. Krumova, E. Fodor, T. Páli, S. G. Taneva, G. Garab, J. Peters, and A. Dér, "Hofmeister ions control protein dynamics," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1830, no. 10, pp. 4564–4572, 2013.
- [121] F. Bogár, F. Bartha, Z. Násztor, L. Fábián, B. Leitgeb, and A. Dér, "On the Hofmeister effect: Fluctuations at the protein-water interface and the surface tension," *J. Phys. Chem. B*, vol. 118, no. 29, pp. 8496–8504, 2014.
- [122] A. Dér, L. Kelemen, L. Fábián, S. G. Taneva, E. Fodor, T. Páli, A. Cupane, M. G. Cacace, and J. J. Ramsden, "Interfacial Water Structure Controls Protein Conformation," *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 19, pp. 5344–5350, 2007.
- [123] Z. Násztor, F. Bogár, and A. Dér, "The interfacial tension concept, as revealed by fluctuations," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 23, pp. 29–40, 2016.
- [124] J. M. Peula-García, J. L. Ortega-Vinuesa, and D. Bastos-González, "Inversion of Hofmeister series by changing the surface of colloidal particles from hydrophobic to hydrophilic," *J. Phys. Chem. C*, vol. 114, no. 25, pp. 11133–11139, 2010.
- [125] S. Finet, F. Skouri-Panet, M. Casselyn, F. Bonnete, and A. Tardieu, "The Hofmeister effect as seen by SAXS in protein solutions," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, vol. 9, pp. 112–116, 2004.
- [126] V. Ball, A. Lustig, and J. J. Ramsden, "Lag phases in the adsorption of lysozyme to Si (Ti) O₂ surfaces in the presence of sodium thiocyanate. Part I. Phenomenology," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 1, no. 15, pp. 3667–3671, 1999.
- [127] L. A. Belyakova and A. M. Varvarin, "Surfaces properties of silica gels modified with hydrophobic groups," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 154, no. 3, pp. 285–294, Aug. 1999.
- [128] A. F. Stalder, G. Kulik, D. Sage, L. Barbieri, and P. Hoffmann, "A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 286, no. 1–3, pp. 92–103, 2006.
- [129] D. Nečas and P. Klapetek, "Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis," *Open Phys.*, vol. 10, no. 1, pp. 181–188, 2012.
- [130] B. Crist Vincent, *Handbook of Monochromatic XPS Spectra: The Elements and Native Oxides*. Wilmington: Wiley, 2000.
- [131] R. Kurrat, "ASI evaluation program manual Version 2.0." p. 14, 1995.
- [132] R. Kurrat, J. E. Prenosil, and J. J. Ramsden, "Kinetics of Human and Bovine Serum Albumin Adsorption at Silica-Titania Surfaces," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 185, no. 1, pp. 1–8, 1997.
- [133] F. Zernike, "Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects," *Physica*, vol. 9, no. 10, pp. 974–986, 1942.
- [134] F. Zernike, "Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II," *Physica*, vol. 9, no. 10, pp. 974–986, 1942.
- [135] "Introduction to Phase Contrast Microscopy." [Online]. Available: <http://www.bwoptics.com/newsend2.asp?id=3>.
- [136] "Introduction to Fluorescence Microscopy." [Online]. Available: <http://www.bwoptics.com/newsend2.asp?id=5>.
- [137] J. S. Stevens, A. C. De Luca, M. Pelendritis, G. Terenghi, S. Downes, and S. L. M. Schroeder, "Quantitative analysis of complex amino acids and RGD peptides

- by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS),” *Surf. Interface Anal.*, vol. 45, no. 8, pp. 1238–1246, 2013.
- [138] Y. Rossez, E. B. Wolfson, A. Holmes, D. L. Gally, and N. J. Holden, “Bacterial flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms,” *PLoS Pathog.*, vol. 11, no. 1, p. e1004483, 2015.
- [139] B. Chaban, H. V. Hughes, and M. Beeby, “The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 46, pp. 91–103, 2015.
- [140] J. J. Ramsden and R. Horvath, “Optical biosensors for cell adhesion,” *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, vol. 29, no. 3–4, pp. 211–223, 2009.
- [141] R. Horvath, J. Voros, R. Graf, G. Fricovsky, M. Textor, L. R. Lindvold, N. D. Spencer, and E. Papp, “Effect of patterns and inhomogeneities on the surface of waveguides used for optical waveguide lightmode spectroscopy applications,” *Appl. Phys. B*, vol. 72, pp. 441–447, 2001.
- [142] B. Geiger, J. P. Spatz, and A. D. Bershadsky, “Environmental sensing through focal adhesions,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 1, pp. 21–33, 2009.
- [143] M. Arnold, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blümmel, W. Eck, M. Kantlehner, H. Kessler, and J. P. Spatz, “Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces,” *ChemPhysChem*, vol. 5, no. 3, pp. 383–388, 2004.
- [144] M. Schuler, G. R. Owen, D. W. Hamilton, M. de Wild, M. Textor, D. M. Brunette, and S. G. P. Tosatti, “Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: A cell morphology study,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 21, pp. 4003–4015, 2006.
- [145] J. Huang, S. V. Grater, F. Corbellini, S. Rinck, E. Bock, R. Kemkemer, H. Kessler, J. Ding, and J. P. Spatz, “Impact of order and disorder in RGD nanopatterns on cell adhesion,” *Nano Lett.*, vol. 9, no. 3, pp. 1111–6, 2009.
- [146] B. T. Houseman and M. Mrksich, “The microenvironment of immobilized Arg-Gly-Asp peptides is an important determinant of cell adhesion,” *Biomaterials*, vol. 22, no. 9, pp. 943–955, 2001.