**Kutatási terv 2018-2021**

**Élő sejtek manipulációja és vizsgálata FluidFM-mel (Nanofluidikai Atomerő Mikroszkópia) és jelölésmentes bioérzékelőkkel**

**Nagy Ágoston Gábor**

**Munkavégzés helye: BME Elektronikai Technológia Tanszék / MTA Energiatudományi Kutatóközpont, Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Intézet Nanobioszenzorika Kutatócsoport**

**Helyszín rövidítve: BME-ETT / MTA EK MFA**

**Témavezető: Dr. Bonyár Attila (50%), Dr. Horváth Róbert (50%)**

**Absztrakt:**

Köszönhetően az informatika és az elektronika robbanásszerű fejlődésének manapság számos technológia elérhető, amelyek az elő sejtek fiziológiáját, viselkedését, migrációját, gén-és fehérjeexpresszióját hivatottak vizsgálni. Jellemzően ezek a technikák jelölőmolekulás (fluoreszcens) expresszión és érzékelésen alapulnak, melyek számos esetben alapvetően képesek megváltoztatni az elő sejtek működését és ezzel befolyásolni a kutatási eredményeket is.

Az MTA EK MFA Nanobioszenzorika laboratóriumában elérhetőek ezzel szemben olyan technológiák, melyek jelelölésmentesen képesek betekintést nyerni egyes sejtek viselkedésébe, ezzel pontosabb eredményeket elérve a gyógyszerkutatás, sejt-sejt és sejt-mátrix kapcsolatok terén is. 2017 júniusától Rendelkezésünkre áll a laborban a FluidFM mérőeszköz(André Meister 2009), amely egy nagy áteresztő képességű nanofluidikai robot, amellyel képesek vagyunk célzottan vizsgálni egyedi sejtek adhézióját a pico-Newton skálán(Martin Benoit 2002), valamint injektálni vagy extrahálni nanoliteres mennyiségeket élő sejtekből. Az eszköz segítségével nano- és mikrométeres mintázatok is nyomtathatóak biológiai molekulákból, akár cm-es skálán. Ezen lehetőségek új irányokat nyitnak meg a bioszenzorikai, biológiai, orvosi és biofizikai kutatásokban egyaránt.

Kutatásom során igyekszem felhasználni a rendelkezésemre álló lehetőségeket és széleskörűen tanulmányozni egyes sejtvonalak adhéziójának mértéket, valamint agresszív rákos sejtvonalak(Cheresh 2010) viszonyát más sejtekhez - a manapság egyre nagyobb jelentőséggel bíró - természetes hatóanyagok hozzáadása mellett. Felhasználok továbbá olyan jelölésmentes bioszenzorokat is, amelyek a FluidFM által szolgáltatott adhéziós értékeket kiegészítik és alátámasztják.

**Tudományos Háttér:**

A biológiai jelek érzékelését két kategóriába lehet osztani: jelöléses, illetve jelölésmentes bioszenzorokkal történhet a biológiai változások mérése. A jelölésintezív módszerek sok esetben nem célravezetőek, mert a jelölőmolekula befolyásolhatja a vizsgálni kívánt biológiai rendszert. Sok esetben, pl. fragmens alapú gyógyszerfejlesztés, olyan pici molekulák bekötődéseit kell kimutatni, melyeket nem csak megjelölni nehéz (vagy éppen lehetetlen), de detektálni is. Sok esetben a kölcsönhatások kimutatásához kapcsolódó kutatási folyamat idő és költségigényes. Ezen problémákra a jelölésmentes bioszenzorok fontos alternatívát kínálnak.

Az utóbbi években számos jelölésmentes módszer látott napvilágot, amelyek megváltoztatták a biotechnológiai kutatásokat (Shengbo Sang 2016). A legmodernebb technológiák közé soroljuk a felületi plazmon rezonancián, tömegspektrometrián, akusztikus hullámterjedésen, elektromos jelenségeken alapuló bioszenzorokat. Mindegyik érzékelő más fizikai vagy kémiai alapon képes érzékelni a biológiai jeleket. A kutatási tervemben kiválasztott jelölésmentes bioszenzorok az optikai hullámvezetés elvét aknázzák ki. Lényegében egy nagy törésmutatójú fényvezető rétegbe becsatolt lézerfény teljes visszaverődések véges sorozatát szenvedi el, amely során a hullámvezető felületén létrejövő ún. evaneszcens hullám képes a hullámtéren belüli törésmutató változásokat detektálni (David Erickson 2008).

A jelölésmentes bioszenzorok felhasználásával lehetőség nyílik valós időben, fiziológiás körülmények között vizsgálni egyedi sejtek vagy sejtpopulációk viselkedéseit. Emiatt is érdemes olyan témaköröket feldolgozni, ahol gyógyszerek és természetes hatóanyagok akár femto-literes térfogatú és nanogramm per milliliteres koncentrációjának jelenlétében mérjük élő sejtek kitapadásának, migrációjának és elhalálozásának mértékét. Ennek jelentősége többek között a rákkutatásban (Cheresh 2010), az érfalat borító endotél sejtek kapcsolatának felderítésében és mesterséges protézisek anyagainak vizsgálataiban nyilvánulhat meg.

Mivel az MFA EK MTA Nanobioszenzorika kutatócsoportban elérhető sejtvonalak között megtalálhatóak mind rákos, egészséges valamint endotél sejtek is, ezért meglehetősen kiterjedt vizsgálatokat lehet végezni, különösképpen, ha a jelölésmentes bioszenzorikát kombináljuk a rendkívül újszerű FluidFM-mel. Ennek a módszertannak a kidolgozása és alkalmazása olyan interdiszciplináris kutatási területet alkotna, amelyre eddig tudományos körökben nem volt példa. Lehetőségünk nyílna az endotél sejtréteg valós idejű vizsgálatára sejtszinten fiziológiás körülmények között és hatóanyagok jelenlétében is, illetve ennek a sejtrétegnek FluidFM-mel vizsgálni tudnánk a mechanikai tulajdonságait is.

Rákos megbetegedések során fontos szerepet játszanak a sejt-sejt és a sejt-mátrix kapcsolatok, amelyek hozzájárulnak a betegség súlyosságához és meghatározzák a tumor áttétképző képességét is. Gyógyszeres kezelés során a rákos sejtek elpusztítására törekedünk, azonban egy ilyen betegség több kompenensből épül fel és egy nagyon lényeges pontja, hogy a tumoros áttét hogyan és mikor alakul ki, hiszen ez nagymértékben befolyásolja a kezelés sikerességét (Agnieszka Blazejczyk 2015). Az áttétképződésben fontos szerepet játszik, hogy a véráramban úszó tumorsejtek képesek-e hatékonyan megtapadni, majd átfurakodni az érfalon, ahol elsődlegesen egy endotél sejtréteggel találkoznak.

Kísérleti szempontból fontos lenne, ha olyan rendszerben lehetne vizsgálni rákos sejtek kölcsönhatásait, amellyel egyértelműen azonosítani lehetne sejteket és a hozzájuk köthető fizikai paramétereket is, valamint a mesterséges és természetes hatóanyagok által kiváltott válaszokat egy komplex rendszerben.

**Nyitott kérdések:**

1. Az endotél sejtréteg milyen mechanikai tulajdonságokkal bír?
2. Hogyan hatnak különböző természetes hatóanyagok a fenti tulajdonságokra?
   1. Az MTA EK MFA Nanobioszenzorika kutatócsoport laboratóriumában használatos zöld tea polifenol (EGCG) hogyan hat az endotél sejtekre, az endotél-rákos sejt kölcsönhatásra?
   2. Más természetes hatóanyag hogy hat?
3. Rákos sejtek milyen erővel próbálnak meg átjutni az endotél sejtek által képzett kompakt rétegen?
4. Hatóanyagok nanogramm per milliliteres lokális expozíciója hogyan befolyásolja egy sejt adhéziós képességét az általános globális expozícióval ellentétben?

Ezekre a kérdésekre úgy adhatunk válaszokat, hogy felhasználjuk a jelölésmentes bioszenzorika tudományát és a FluidFM nagyáteresztő képességű modern technológiáját.

**Hipotézisek:**

Kísérleteim során a következő állításokat szeretném bebizonyítani jelölésmentes bioszenzorokkal és FluidFM-mel:

* Az endotél sejtréteg bizonyos molekulák hatására megváltoztatja morfológiáját és mechanikai tulajdonságait.
* Rákos sejtek egy adott erővel tapadnak ki az endotél sejtréteghez, amely fontos szerepet játszik a metasztázis kialakulásában. Ezen erő hatóanyagok hozzáadásával lecsökkenthető, így a megtapadás nem jön létre az érfalban.
* Hatóanyagok lokális femto-literes expozíciója máshogy hat a sejtekre, mintha kitennénk a sejteket egy oldatos formában jelenlévő hatóanyagnak.

**Célkitűzések:**

Kutatás-fejlesztési tervem szerint a következő főbb célokat kívánom elérni:

* Sejtvonalak és baktériumok adhéziós erejének nagy pontosságú mérése biomimetikus felületeken FluidFM-mel, az adatok összehasonlítása jelölésmentes bioszenzorokkal rögzített adhéziós jelekkel. Természetes hatóanyagok (pl. zöld tea polifenolok, rákellenes szerek) sejtadhézióra gyakorolt hatásaink részletes vizsgálata (Beatrix Peter 2018).
* Endotél sejtréteg (érfal modell) létrehozása a fenti műszerek vizsgálati felületein, a sejtrétegek fizikai jellemzőinek meghatározása, valamint rákos sejtek és az endotél sejtréteg között fellépő erőhatások vizsgálata.

Jelölésmentes nanobioszenzorikai műszerekhez hőmérséklet és szén-dioxid szabályozó eszköz és automatizált pippetázórobot fejlesztése, amivel képesek vagyunk növelni az élő sejtes méréseink időtartamát a jelenlegi pár óráról akár több napra.

**Részletes kutatási terv:**

Kutatásom során nagy hangsúlyt kívánok fektetni a FluidFM lehetőségeinek teljes mértékű kiaknázásra, valamint újfajta módszerek és metodikák kidolgozására.

A doktoranduszi képzésem ideje alatt számos cikket tervezek írni, amelyek felölelik a FluidFM és a bioszenzorok összehangolását.

Éves szintre lebontva a következőket tervezem:

* 1. év – FluidFM kezelésének és alkalmazásának elsajátítása, önálló kísérletek végzése, más jelölésmentes bioérzékelőkkel való összehangolása, endotél sejtréteg növesztése, a körülmények optimalizálása, irodalmazás, publikálás
  + Endotél sejtréteg növesztése
  + Az endotél rétegnek bioszenzorokkal történő detektálása
  + FluidFM-mel kimérni az endotél sejtréteg mechanikai tulajdonságait, a laterális és vertikális erőkomponensek szétválasztása.
  + Sejtek viselkedése hatóanyagok lokálisan expozált femto-literes jelenlétében a FluidFM mikorpipetta mérőfejének segítségével
  + FluidFM cikkek írása: A bioszenzorok és a FluidFM által szolgáltatott adatok összehasonlításából, összefoglaló kézirat.
* 2. év – A megnevezett kísérletek folytatása, módszerek tökéletesítése, hőmérséklet és szén-dioxid szabályozó gép és pipettázórobot kifejlesztésének megkezdése, irodalmazás, publikálás nemzetközi konferencián és referált folyóiratban
  + Rákos sejtek mozgása és penetrációja endotél sejtrétegen
  + Az eddig elért endotél sejtekkel kapcsolatos eredmények publikálása
  + A számunkra hasznos géppark bővítése egyedileg fejlesztett hőmérséklet és szén-dioxid szabályozó egységgel, valamint pipettázó robottal, hogy növeljük a valós időben történő sejtes méréseink hosszát
* 3. év – Mérések kiterjesztése, természetes hatóanyagok vizsgálata nagy áteresztő képességű kísérletekben, hőmérséklet és szén-dioxid szabályozó gép és pipettázórobot továbbfejlesztése, irodalmazás, publikálás
  + Endotél sejtréteg viselkedésének vizsgálata különböző hatóanyagok oldatos jelenlétében biozenzorokkal és FluidFM-mel
  + Az endotél sejtréteg egyes sejtjeinek viselkedése hatóanyagok femto-literes expozíciójának hatására
  + A hőmérséklet és szén-dioxid szabályozó gép, és a pipettázórobot készítése, kalibrálása, működtetésének automatizálása
* 4. év –Hőmérséklet és szén-dioxid szabályozó gép és pipettázórobot fejlesztésének befejezése, a technikai részlete publikálása, esetleges szabadalmaztatása
  + Minden eddigi kísérlet véglegesítése
  + Az általunk fejlesztett, az automatizálást és detektálást segítő gépek véglegesítése a metodikákban való meghonosítása, valamint bizottság előtti prezentálása
  + Az eddigi eredmények publikálása, jövőbeni tervek készítése
  + A PhD dolgozat elkészítése

**A befogadó intézmények kutatási kompetenciái:**

MTA EK MFA Nanobioszenzorika Lendület Kutatócsoport:

* 2009 óta fennálló csoport Dr. Horváth Róbert vezetése alatt, amely csoport célja olyan jelölésmentes modern biofizikai módszerek fejlesztése és alkalmazása az élettudományok különböző területein, amelyek ipari és tudományos szignifikanciával bírnak.
* Felszereltség:
  + 3 szintű tisztasági laboratórium
    1. Szint: Vegyifülke, Mosogató, Vegyszerek, Szárítószekrény, Autokláv
    2. Szint: Pormentesító Lambox, OWLS Bioszenzor, Kvarckristály Bioszenzor, Creoptix Bioszenzor, Egyéb felületkezelési eljáráshoz szükséges berendezések
    3. Szint: Sejtlabor, Sejtkezelő fülke, Inkubátor, 3D holomonitor, EPIC BT Bioszenzor, EPIC Cardio Bioszenzor, Zeiss Fluoreszcens Mikroszkóp automatizált robotpippettával kombinálva, FluidFM-Bot

BME – Elektronikai Technológia Tanszék:

* A Dr. Harsányi Gábor által vezetett tanszéken a 2000-es évek első fele óta foglalkoznak elektrokémiai és optikai elvű bioérzékelők kutatás-fejlesztésével. A Nanotechnológia Laboratórium (laborvezető Dr. Bonyár Attila) és az Érzékelők és Mikrofluidika Laboratórium (Dr. Sántha Hunor) kompetenciái hatékonyan támogathatják a kutatómunka sikeres végrehajtását.
* Kapcsolódó felszereltség:
  + SPR Imaging bioérzékelő
  + Voltalab potenciosztátok
  + Veeco diInnova AFM
  + 3D gyorsprototipizáló és PDMS alapú mikrofluidikai megmunkáló állomások

**Publikálási lehetőségek:**

Konferencia: Biosensors, Europtode, Eurosensors

Folyóirat: Nature journals, Biosensors and Bioelectronics, Sensors and Actuators B, Scientific Reports, relevant RSC and ACS journals

**Irodalmi háttér:**

Agnieszka Blazejczyk, Diana Papiernik, Kseniia Porshneva, Joanna Sadowska. 2015. „Endothelium and cancer metastasis: Perspectives for antimetastatic therapy.” *Pharmacological Reports* 67:711–718.

André Meister, Michael Gabi, Pascal Behr, Philipp Studer, János Vörös, Philippe Niedermann, Joanna Bitterli, Jérôme Polesel-Maris, Martha Liley, Harry Heinzelmann and Tomaso Zambelli. 2009. „FluidFM: Combining Atomic Force Microscopy and Nanofluidics in a Universal Liquid Delivery System for Single Cell Applications and Beyond.” *Nano Lett.* 9 (6):2501–2507.

Beatrix Peter, Rita Ungai-Salanki, Bálint Szabó, Inna Szekacs, Agoston G. Nagy, Szilvia Bosze and Robert Horvath. 2018. „High resolution adhesion kinetics of EGCG exposed tumor cells on biomimetic interfaces: comparative monitoring of cell viability using label-free biosensor and classic end point assays.”

Cheresh, Jay S. Desgrosselier and David A. 2010. „Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. .” *Nature Reviews Cancer* 10:9-22.

David Erickson, Sudeep Mandal, Allen H. J. Yang. 2008. „Nanobiosensors: optofluidic, electrical and mechanical approaches.” *Microfluid Nanofluid* 4:33–52.

Martin Benoit, Hermann E. Gaub. 2002. „Measuring Cell Adhesion Forces with the Atomic Force Microscope at the Molecular Level.” *Cells Tissues Organs* 172:174-189.

Shengbo Sang, Yajun Wang, Qiliang Feng, Ye Wei, Jianlong Ji & Wndong Zhang. 2016. "Progress of new label-free techniques for biosensors: a review." *Critical Reviews in Biotechnology* (Critical Reviews in Biotechnology Volume 36, Issue 3) Volume 36, Issue 3, Pages 465-481.