

Robot-mikroszkópok a sejtbiológiában

Szabó Bálint

Habilitációs dolgozat

ELTE TTK Biológiai Fizika Tanszék

2015

[Tartalom](#)

Előszó.....	3
Köszönetnyilvánítás.....	3
1 Bevezetés.....	4
1.1 Optikai mikroszkópok fejlődése	4
1.1.1 Fáziskontraszt mikroszkóp.....	4
1.1.2 Fluoreszcens mikroszkóp.....	5
1.2 Genetikailag módosított fluoreszcens sejtek	6
1.3 Nagy áteresztőképességű (<i>high-throughput</i>) műszerek a sejtbiológiában	7
1.3.1 Robotok a sejtbiológiában.....	8
1.4 Sejtmozgás.....	11
1.5 Egyedi sejtek molekuláris vizsgálata	12
2 Eredmények.....	13
2.1 Sejtmozgás követése automatizált mikroszkóppal	13
2.1.1 A sejtmag mozgásának vizsgálata	16
2.1.2 Kollektív sejtmozgás vizsgálata.....	22
2.2 Szelektív sík-megvilágítású mikroszkóp fejlesztése.....	24
2.3 Egyedi sejtek manipulációja robot-mikroszkóppal.....	26
2.3.1 Fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás mikroszkópon	26
2.3.2 Egyedi sejtek kis térfogatban történő lerakása	31
2.3.3 Egyedi sejtek adhézíós erejének mérése.....	34
3 Diskusszió.....	41
4 Szakmai terveim	43
5 Tézisek	45
Hivatkozások.....	46

Előszó

Az alábbi dolgozatot a PhD-m megszerzése óta megjelent cikkeim közül azok alapján írtam, melyekben első vagy utolsó szerző voltam. Három-három ilyen munkát közöltünk. A szokásoknak megfelelően első szerző voltam, amikor a kísérletek és a kiértékelés döntő részét én végeztem. Utolsó szerző voltam, amikor a kutatás témavezetése volt a feladatomban.

Munkánk a tudományos cikkek mellett a hivatkozott találmányra és szabadalmakra épül. A dolgozat bevezetésében a *teljesség igénye nélkül* röviden bemutatom a tudomány jelenlegi állását és munkánk motivációját. Átfogó irodalomjegyzék a (szögletes zárójelben lévő arab számokkal) hivatkozott cikkeinkben található. Meggyőződésem, hogy a tudományterülettel való első ismerkedésben az összefoglaló cikkek, oktató internetes felületek és a *Wikipedia* olvasása célravezetőbb a primer publikációk átrágásánál. Ezért a szokásoktól némiképp eltérő módon lábjegyzetben hivatkozom ezekre, az érdeklődő olvasót segítő forrásokra. Remélem, hogy így a dolgozat könnyen emészthető, hasznos olvasmány lehet fizikus és biológus hallgatók számára egyaránt.

A dolgozat írása során törekedtem a magyar nyelv megfelelő használatára. Az ábrák feliratában azonban meghagytam az eredeti cikkekben szereplő angol szöveget, amely az érthetőséget talán nem rontja, ugyanakkor jelzi, hogy a tudományos irodalom nyelve az angol.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm társszerzőimnek és diákjaimnak az izgalmas együtt töltött időt, a közös erőfeszítéseket. Vicsek Tamástól a szakmai ismereteken túl nagyon sok mást is tanultam, ami jelentősen alakította világnézetemet. Horváth Róberttel a csoportja tagjaként az utóbbi években dolgoztam együtt: neki is sokat köszönhetek, tőle is nagyon sokat tanultam. A hardverfejlesztést Csiszér Miklóssal, a szoftverfejlesztést Mizera Ferencsel és Vida Zsolttal végeztük. Az ELTE Biológiai Fizika Tanszékének köszönöm a kutató munkához biztosított (egyáltalán nem automatikusan adódó) kellemes, nyugodt légkört és az infrastrukturális háttérrel a kísérletek elvégzéséhez.

Kutatásainak és a műszerfejlesztéseket az NKFP 3A/0005/2002 (Vicsek Tamás), az OTKA F49795 (Szabó Bálint), T049674 (Vicsek Tamás), T47055 (Czirók András), K104838 (Bajtay Zsuzsa), a GVOP-3.3.1-05/1.-2005-07-0003/3.0 (CellMovie Bt.) az Innocsekk KM-CSEKK-2006-00282 (CellSorter Bt.), az ELTE Cell-Kom RET (Vicsek Tamás), a Lendület Program (Horváth Róbert), a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0025 (Salánki Rita) és a Bolyai Ösztöndíj (Szabó Bálint) támogatta.

1 Bevezetés

1.1 Optikai mikroszkópok fejlődése

Az optikai mikroszkópot a XVI-XVII. században találták fel¹. A feltaláló kiléte vitatott. Az azonban bizonyos, hogy a mikroszkópok a tudományos megismerés egyik legfontosabb eszközévé váltak. A biológiai kutatásokban a mai napig nélkülözhetetlenek az optikai mikroszkópok. Nemcsak rutin feladatok ellátására találhatók meg a legtöbb laboratóriumban, hanem a sejt- és molekuláris biológia szédületes tempójával lépést tartva újabb és újabb mikroszkópos technikák jelennek meg, melyek korábban elképzelhetetlen teljesítményre képesek².

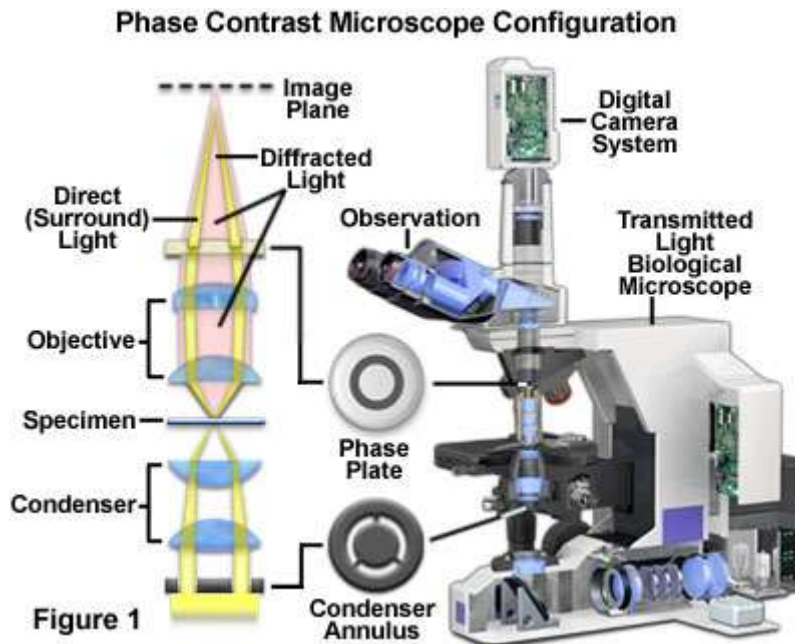
1.1.1 Fáziskontraszt mikroszkóp

Az élő állati sejtek mikroszkópos megfigyelését erősen nehezíti a tény, hogy a legtöbb sejtípus a látható tartományban alig nyeli el a fényt. (A vörösvérsejt a kivételek közé tartozik.) Ennek megfelelően kevésbé kontrasztosak a fény elnyelésén alapuló képek. A problémára Zernike, holland fizikus talált ötletes megoldást 1934-ben, melyet 1953-ban fizikai Nobel-díjjal jutalmaztak. A fáziskontraszt mikroszkóp a minta lokális törésmutatójára érzékeny az abszorpció helyett³. A gyűrű alakú diafragmán át a megvilágításból az objektívbe diffrakció nélkül érkező ún. háttér fénynyaláb 90 fokos fázistolást szenved az objektív mögött elhelyezett fázisgyűrűn áthaladva. A mintán diffraktált fény viszont általában nem a fázisgyűrűn halad át, így nem szenved fázistolást. A háttér és a diffraktált nyaláb interferenciája rajzolja ki a minta képét. A törésmutatót tehát intenzitássá kódolja át a fáziskontraszt mikroszkóp.

¹ http://en.wikipedia.org/wiki/Optical_microscope#Invention

² <http://www.microscopyu.com>

³ <http://www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/phasemicroscopy.html>



1. ábra. A modern fáziskontraszt mikroszkópok fényútja és felépítése ³.

Ez a technika képes az igen lapos, néhány μm vastagságú sejtnyúlványokat, a sejtmagban lévő nukleoluszokat, ill. egyéb parányi sejtalkotókat is láthatóvá tenni mesterséges festékek vagy más jelölő anyagok bevetése nélkül. Az élő sejtekre általában nincs káros hatása, így akár napokon, heteken keresztül is megfigyelhető a sejtek *in vitro* mozgása, osztódása, fejlődése.

A fáziskontraszt mikroszkóphoz hasonló, jelölésmentes, de annál összetettebb műszer a differenciális interferencia kontraszt mikroszkóp (DIC) ⁴. Ebben a fény polarizációja alapján, kettőtörő kristályból készült prizmák segítségével különböztetik meg, és osztják ketté a később interferáló fénysugarakat. Ez a technika a törésmutató gradiensére érzékeny, azzal arányos jelet ad. Biológiai minták esetén a fáziskontraszt mikroszkópnál általában részletgazdagabb képet ad.

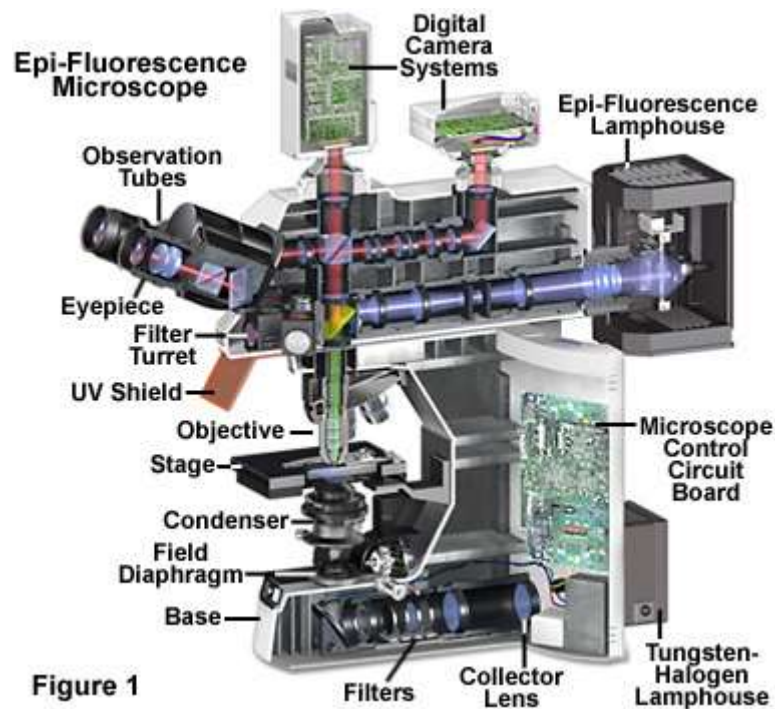
1.1.2 Fluoreszcens mikroszkóp

Sejteket vizsgálva molekuláris szintű információ kinyerésére azonban sem a fáziskontraszt, sem a DIC mikroszkóp nem alkalmas. Ez általában igaz a teljesen jelölésmentes technikákra. Elsősorban nem a diffrakció-limitált felbontás az oka ennek, hanem a kontraszt hiánya. Hiába az elektronmikroszkóp, vagy más, elvben akár atomi felbontású képalkotó eszköz, ha a két különböző fehérje vagy más biomolekula egymástól nem különböztethető meg a képen. A kontraszt növelése érdekében specifikus jelölő anyagokra van szükség. Ha sikerül a sejtet alkotó egyes makromolekulákat fluoreszcens anyaggal megjelölni úgy, hogy a jelölés minél kevésbé perturbálja a makromolekula és a sejt viselkedését, akkor bevethetjük a kimagasló jel/zaj arányt nyújtó fluoreszcens mikroszkópot ⁵. Kellően érzékeny fotodetektor vagy kamera alkalmazásával egyedi makromolekulák is láthatóvá

⁴ <http://www.microscopyu.com/articles/dic/index.html>

⁵ <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>

tehetők a fluoreszcens képen. Az ún. epifluoreszcens elrendezés a legegyszerűbb és legelterjedtebb. Ilyenkor egy széles spektrumú (fehér) és nagy intenzitású gerjesztő fényforrással (általában higanygőz vagy fémhalogén lámpával) világítjuk meg a teljes látóteret az objektíven keresztül. A fluoreszcens detektálás is az objektíven keresztül történik. A gerjesztő fényt a fluoreszcens fénytől dikroikus tükröt tartalmazó színszűrővel választjuk el.



2. ábra. A modern epifluoreszcens mikroszkóp felépítése ⁵.

1.2 Genetikailag módosított fluoreszcens sejtek

Az állati és emberi sejtek, illetve a sejtet alkotó molekulák döntő többsége nem fluoreszkál a látható tartományban. (Néhány aromás aminosavnak vagy más biomolekulának van autofluoreszcenciája, azonban ez a sejtekről készült fluoreszcens képeken csak gyenge háttérzajként jelenik meg.)

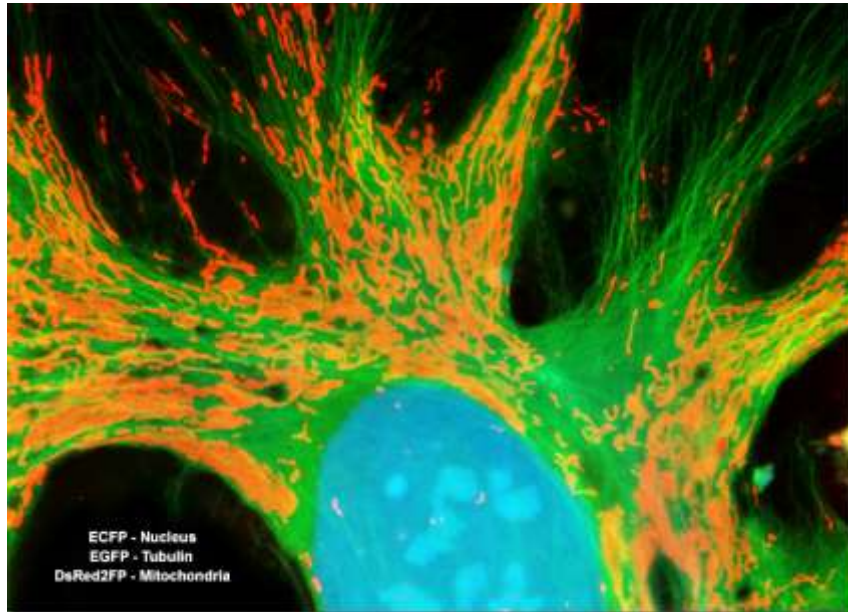
Léteznek ugyanakkor egzotikus tengeri állatok, melyek fény kibocsátására képesek. Egyikük az *Aequorea victoria*, egy medúzafaj. Ebben a medúzában az aequorin nevű lumineszcens fehérje Ca^{2+} ionokkal kölcsönhatva kék fényt bocsát ki. A kék fény egy részét egy másik fehérje, a természetes GFP (*green fluorescent protein*: zöld fluoreszcens fehérje) zöld fénné konvertálja ⁶.

{A szentjánosbogár ettől eltérő módon világít: a luciferáz nevű enzim a kis molekulájú luciferint két lépésben oxidálja ⁷. Az ATP hasításával nyert szabadenergia egy része fénné alakul, amikor az oxidált luciferin alapállapotba tér vissza. Ezt a reakciót is használják laboratóriumi kísérletekben, de itt nincs szó fluoreszcens fehérjéről.}

⁶ http://en.wikipedia.org/wiki/Green_fluorescent_protein

⁷ <http://en.wikipedia.org/wiki/Luciferase>

A GFP híres, „Nobel-díjas” fehérje lett a közelmúltban, 2008-ban ⁸. Ennek oka, hogy a természetes fehérjét kódoló gént más állatokba, sejtekbe is sikerült mesterséges úton bejuttatni. A GFP kifejeződése akkor válik hasznossá, amikor fúziós fehérjék alegységeként jelenik meg. Tehát úgy kell a GFP génjét az adott sejt DNS-ébe illeszteni, hogy egy másik fehérjével együtt, azzal fúziót alkotva jelenjen meg a GFP. Így a másik, vizsgálandó fehérje fluoreszcens jelölést kap. Ez a technika forradalmasította a molekuláris sejtbiológiát. A fluoreszcens mikroszkópia a genetikailag kódolt fluoreszcens jelöléseknek köszönhetően robbanásszerű fejlődésen ment keresztül az utóbbi évtizedekben.



3. ábra. Egy oposszum veséjéből származó epitelsejt három különböző színű fluoreszcens fehérjével jelölve, melyek külön-külön a sejtmagot, a mikrotubulusokat alkotó tubulint és a mitokondriumokat festik meg ⁸.

1.3 Nagy áteresztőképességű (*high-throughput*) műszerek a sejtbiológiában

A biológiai rendszerek még a parányi sejtek szintjén is komplex viselkedést mutatnak. A mérhető mennyiségek szórása a legtöbbször igen nagy. A gyakorlatban nincs mód arra, hogy két sejtet ugyanabba az állapotba preparáljunk. Hiába azonos a genetikája két sejtnek, különbözőképp viselkednek.

A különbségek eredete részben ismert, ahogy a testünkben lévő különböző szövetek sejtjeinek fenotípusa is eltérő. A DNS átírásának szabályozása több szinten, visszacsatolásokkal működik. Transzkripciós faktorok, azaz fehérjék közvetlenül a gének szabályozó régióihoz kötődve képesek ki- és bekapcsolni adott gént vagy géneket. A DNS-en elhelyezett molekuláris motívumok, pl. metiláció révén a DNS-ben tárolt primer információ egy szekunder mintázattal egészül ki, elsősorban ezt nevezzük epigenetikának ⁹. Ugyanakkor számos további mechanizmus szabályozza az állati sejtekben

⁸ <http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/fpintro.html>

⁹ <http://en.wikipedia.org/wiki/Epigenetics>

a DNS fehérjévé történő konvertálását. Ilyen a köztes, RNS szinten zajló ún. RNS csendesítés. Tehát két hasonló eredetű sejt is kerülhet eltérő állapotba a környezetükkel való kölcsönhatások eredményeképp. Erre legjobb példa az embriogenezis, amikor egyetlen sejtől alakul ki a végül rengeteg sejttípusból felépülő állat.

Ezen felül általában genetikailag sem egyformák a sejtek, melyeket a laboratóriumokban vizsgálunk. Két embertől vett vérből preparált sejtek lehetnek más okból is különbözőek, pl. azért, mert az egyik ember épp egy (látens) betegségen esett át.

A sejtek komplexitása miatt nem elvárható a mérési hibák olyan alacsony szintje egy sejtbiológiai mérésben, mint ami a kísérleti fizikában szokásos. Hogy a mért mennyiség átlagát kisebb hibával tudjuk becsülni, növelni kell a mérések számát. A párhuzamosan végzett mérések számát nagy áteresztőképességű (*high-throughput*) technikákkal lehet növelni¹⁰.

A nagy áteresztőképesség nemcsak a mért mennyiség nagy szórása, hanem a sok paraméteres vizsgálatok miatt is szükséges. Természetesen ez is a komplexitással függ össze: a mért mennyiség számtalan paramétertől függ, melyek közül sokat kísérletileg is kontrollálni tudunk.

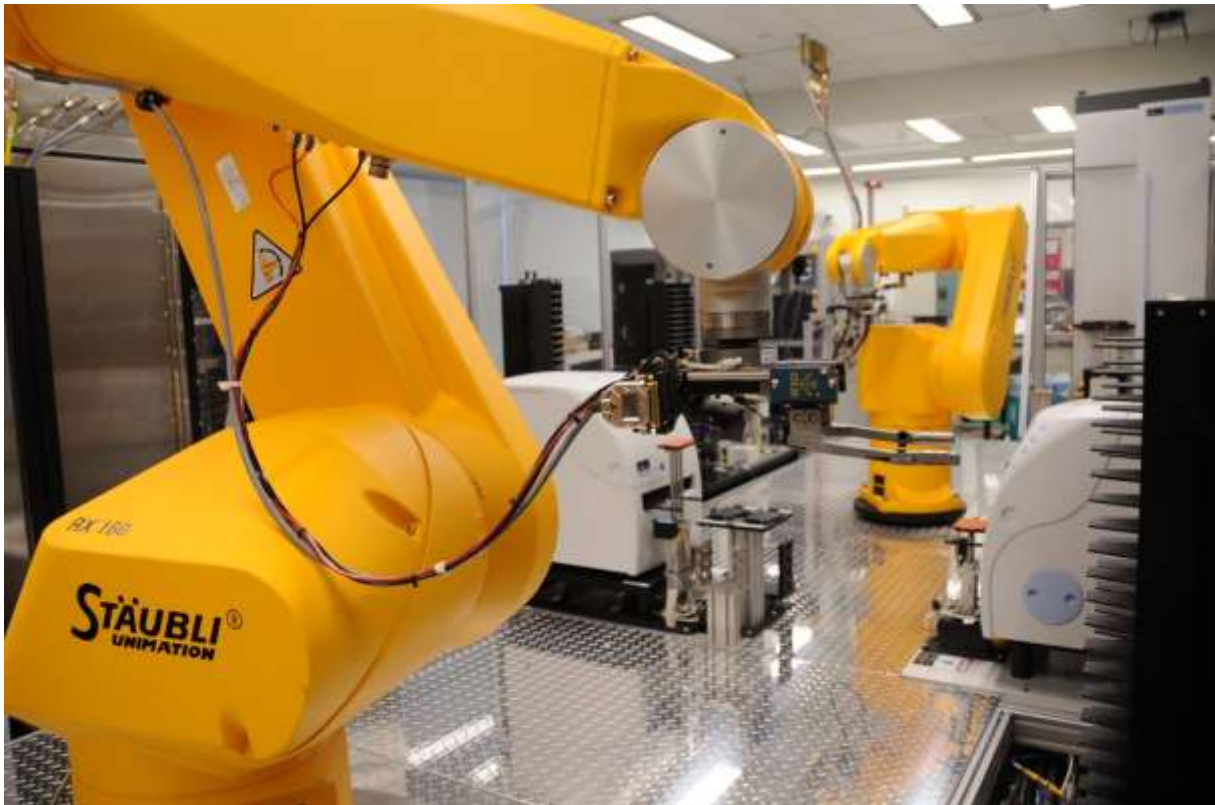
Bizonyos esetekben csak egyetlen paramétert változtatnak, ez azonban nagyon sok különböző értéket vehet fel. Tipikus példa erre a gyógyszermolekulák (könyvtárak) tesztelése, amikor akár sok ezer molekula közül kell kiválasztani a hatásos drogot.

A nagyszámú, hasonló mérés elvégzéséhez automatizált folyamatokra van szükség, melyeket robotok végeznek.

1.3.1 Robotok a sejtbiológiában

A fentiek következtében a sejtbiológiában nagy igény van az automatizált berendezésekre, robotokra. Ez minden bizonnyal összefügg azzal is, hogy ez a tudomány sok tekintetben kezd ipari méreteket ölteni, így nem csoda, hogy az iparban, példának okáért az autógyártásban már régen használt robotok itt is megjelennek. Ugyan a kísérleteket (és kiértékelést) végző emberek teljes mértékű helyettesítése robotokkal továbbra is csak a képzeletben létezik, sok részfeladatot már számítógépek irányítanak. Az alábbi két fejezetben két tipikus alkalmazást mutatok be.

¹⁰ http://en.wikipedia.org/wiki/High_throughput_biology, http://en.wikipedia.org/wiki/High-throughput_screening



4. ábra. Inkubátorból a mintákat kiszedő és automata folyadékadagoló valamint optikai kiolvasását végző berendezéseket kiszolgáló robotkarok az amerikai Humán Genom Kutatóintézetben ¹⁰.

1.3.1.1 Automatizált optikai kiolvasását végző berendezések (plate reader-ek)

A sejtbiológiában az egyik legelterjedtebb automatizált műszer a sok kutas műanyag, ritkábban üveg fenekű mintatartó edények (*multiwell plate*-ek) optikai kiolvasását, lényegében szkennelését végző ún. *plate reader* ¹¹. (Találó magyar elnevezés eddig nem terjedt el.) A jó tenyérnyi méretű, téglalap alakú *plate*-eket sikerült standardizálni, ezekben a kutak száma 6 és 1536 között lehet. A kutak számának növelésével a minta térfogata csökken egészen a mikroliteres tartományig. A *plate*-ek egyszer használatos eszközök. Rendkívül elterjedtek: nagy számban alkalmazzák őket a biológia és biokémia legtöbb területén. Mondhatjuk, hogy a nagy áteresztőképességű technikák szimbólumaivá váltak. Gyakori elvárás, hogy a sok kutas standard *plate*-eket képes legyen befogadni a *high-throughput* műszer.

¹¹ http://en.wikipedia.org/wiki/Plate_reader



5. ábra. Egy plate reader 96 kutas plate-tel a mintatartó fiókjában ¹¹.

A *plate reader*-ek a legegyszerűbb abszorpciós méréseken túl képesek fluoreszcens vagy lumineszcens jel kiolvasására. A műszer teljesítőképességét az érzékenység (jel/zaj arány), a térbeli feloldóképesség és a sebesség mellett a megbízhatóság, rövid és hosszú távú stabilitás valamint a homogenitás jellemzi. A homogenitás azt méri, hogy a *plate* különböző kutjaiban lévő azonos mintákon mért jel valóban egyforma-e.

Az általunk használt és fejlesztett automatizált mikroszkóp is használható *plate reader*-ként. A *time-lapse* mikroszkópos kísérletekben lényegében ez történik. Az idő előrehaladtával újra és újra kiolvassuk a mintát sok különböző területen, ami akár egy *plate* is lehet.

1.3.1.2 Folyadékkezelő robotok

Aki járt már biokémiai vagy sejtbiológiai laboratóriumban, az tudja, hogy az egyik leggyakrabban használt, mindenhol fellelhető eszköz a pipetta. Korábban üveg kapillárisból készültek, manapság automata pipettákat használunk, melyek végén egyszer használatos műanyag hegybe szívjuk fel a kívánt mennyiségű folyadékot, legtöbbször vizes oldatot. Az „automata” ebben az esetben csak annyit jelent, hogy a felszívott térfogat beállítható, nem pedig az üveg csőben kell figyelni a folyadékszintet. A laborokban végzett emberi munka jelentős részét a pipettázás teszi ki. Ezért elterjedtek a folyadékkezelő robotok, amik legtöbbször csak pipettázni tudnak ¹². A folyadék megfelelő kezelése ezen a méretskálán sem triviális, az általunk fejlesztett automata mikropipetta esetében pedig számos fizikai effektus nehezíti a precíz és megbízható folyadékkezelést. Ilyenek a cseppentés során jelentős felületi feszültség, a rugalmas elemek (csövek és tömítések) térfogatának változása a nyomás függvényében, az oldatok gyors beszáradása, és egy sor egyéb technikai probléma.

¹² http://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_handling_robot

A számítógépes látással vezérelt automata mikropipetta tekinthető egy *plate reader* és egy folyadékkezelő robot házasításának, amely azonban komoly fizikai és technikai akadályokba ütközhet a gyakorlati megvalósítás során. Nekünk ezeket az akadályokat sikerült kikerülnünk illetve elhárítanunk.



6. ábra. Antropomorf pipettázó robot ¹². Általában azonban derékszögű koordinátarendszerben mozgó és speciális, nem az emberek számára készült pipettát vezérelnek a robotok.

1.4 Sejtmozgás

A sok sejtes állatok és az ember szervezetében lévő sejtek lassan ugyan, de mozognak, vándorolnak lokális környezetükhöz képest. Elsősorban az embriogenezis, a tumorok kialakulása és terjedése, valamint a fehérvérsejtek mindennapi „munkája” és a sebek gyógyulása során jelentős a sejtmozgás. A sejtek mozgását motorfehérjék hajtják, amelyek a sejtvázhoz kapcsolódnak ¹³. A sejtmozgás molekuláris hátterének feltárásához szükséges tudnunk, hogy melyik motorfehérje és mi módon hajtja az adott mozgást.

A biológiai információ kinyerése érdekében az volna az ideális, ha *in vivo*, vagyis az élő állatban lehetne követni a sejtek mozgását. Ez azonban néhány kivételtől eltekintve kivitelezhetetlen. A kivételek közé tartozik a kisebb, átlátszó állatok mikroszkópos megfigyelése. Elsősorban zebrahalról készültek nagy felbontású és hosszú időtartamú mikroszkópos mozgóképek, melyen az egyedi sejtek

¹³ B. Alberts et al.: Molecular biology of the Cell, 16. fejezet, 6. kiadás, Garland Science, 2014.

is követhetők¹⁴. A másik kivétel a 2-foton mikroszkóp¹⁵, mely néhány mm-es mélységig képes „belátni” akár az élő egér agyába. A nem optikai 3-dimenziós képalkotó technikák (CT, MRI, ultrahang, PET) felbontása általában nem éri el a sejtek szintjét.

A legtöbb kísérlet *in vitro* körülmények közt zajlik, azaz nem az egész állat, hanem az állatból preparált szövetszelet vagy sejtek egy átlátszó csészébe kerülnek, és így figyeljük a sejtek mozgását a mikroszkópban. Az *in vivo* és az *in vitro* határán van a mikroszkópban rögzített zebrahal mellett a csirke embrió is, mely kvázi 2-dimenziós alakja miatt látható fénnel is átvilágítható a fejlődés korai stádiumában¹⁶.

1.5 Egyedi sejtek molekuláris vizsgálata

A sejt mint biológiai egység sok hasonlóságot mutat a fizika atomjaihoz. Ez az élet legkisebb egysége, de önmagában is hihetetlenül komplex rendszer. Az atomfizika fejlődése a XX. század első felében korábban példa nélküli, forradalmi változásokat hozott mind az elméleti, mind a kísérleti és alkalmazott fizikában. A biológiában a molekuláris sejtbiológia a XX. század végétől hasonlóan korszakalkotó áttöréseken megy keresztül.

A humán genom program¹⁷ (1990-2003) óta, amely során az emberi DNS-állomány térképét elkészítették, megjelent a DNS-szekvenáló technikák ún. második generációja¹⁸. Ezek, a genom szekvenálását, újra szekvenálását, az ún. transzkriptóm, tehát az mRNS-ek szekvenálását (*RNA-seq*¹⁹), a DNS-fehérje kölcsönhatások (*ChIP-seq*) és az epigenom vizsgálatát lehetővé tevő nagy áteresztőképességű, költséghatékony módszerek napjainkban forradalmasítják a molekuláris biológiát.

A technikai fejlődés egyik eredménye, hogy akár egyedi sejtek teljes DNS és/vagy mRNS állományának szekvenálása is lehetővé vált²⁰. A kutatások többek közt a rákos betegségek hátteréről adhatnak a gyógyításban is hasznosítható információkat²¹, ugyanis a rákos szövet egyik alapvető tulajdonsága, hogy a benne lévő sejtek genetikai és transzkripció szempontból is nagyon variábilisak. Emellett az embriógenézisben és a szöveteink közti különbségek feltárásában is központi jelentőségű az egyedi sejtek transzkripció mintázata. A tudomány már-már utópisztikus felhasználása, hogy beültetés előtti emberi embriókból egyetlen sejtet izolálva a születendő baba teljes genetikai háttere megismerhető²².

¹⁴ <http://www.microscopyu.com/references/superresolution/lightsheet.html>

¹⁵ <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/multiphoton/multiphotonintro.html>

¹⁶ A. Czirók et al.: Multi-field 3D scanning light microscopy of early embryogenesis, *J Microsc.* 206, 209 (2002)

¹⁷ http://en.wikipedia.org/wiki/Human_Genome_Project

¹⁸ http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_sequencing#Next-generation_methods

¹⁹ Z. Wang et al.: RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics, *Nature Genetics* 10, 57 (2009)

²⁰ K. R. Chi: Singled out for sequencing, *Nature Methods* 11, 13 (2014)

²¹ N. Navin and J. Hicks, Future medical applications of single-cell sequencing in cancer, *Genome Med.* 3, 31 (2011)

²² L. Yan et al., Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells, *Nature Structural & Molecular Biology* 20, 1131 (2013)

2 Eredmények

2.1 Sejtmozgás követése automatizált mikroszkóppal

1996 óta hosszú éveken keresztül folyt és folyik ma is az ELTE Biológiai Tanszékén az élő sejtek megfigyelésén alapuló kutatás²³. A technikát korábban magyarul videomikroszkópiának hívták, az angol irodalomban azonban *time-lapse microscopy*-ként ismert. A hosszú távú *time-lapse* mikroszkópiához motorizált, automata mikroszkóp szükséges, melyet számítógép vezérel²⁴. Az egyébként manuálisan állítható alkatrészeket kell automatizálni. Ilyenek a mikroszkópasztal, amivel a minta megfelelő területét lehet az objektív látóterébe hozni, és a fókuszt, vagyis az objektív és a minta távolságát állító csavar. A mikroszkópos alkalmazás miatt nagy pontosságú, akár μm -nél is finomabb mozgásra van szükség nagy bejárható úthossz mellett, hogy egyszerre sok mintát vizsgálhassunk. Ez a két követelmény együtt a finommechanika csúcsteljesítményét igényli.

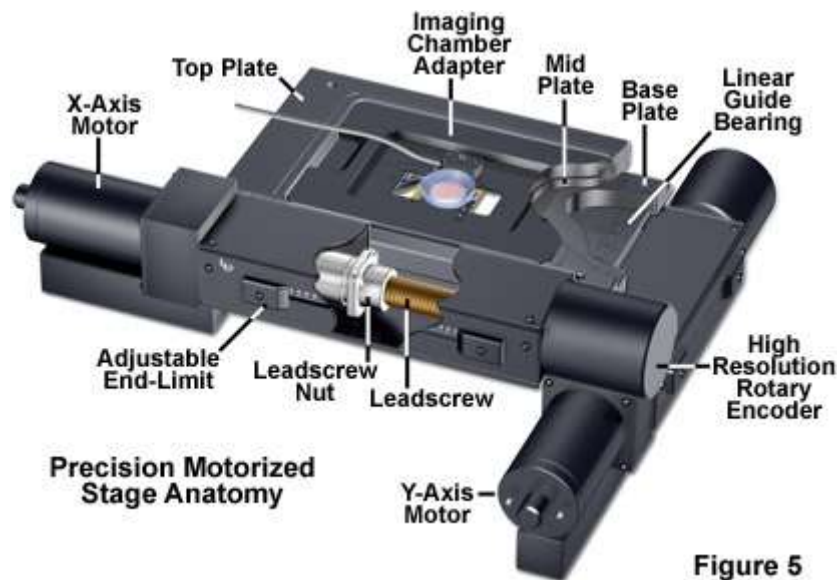


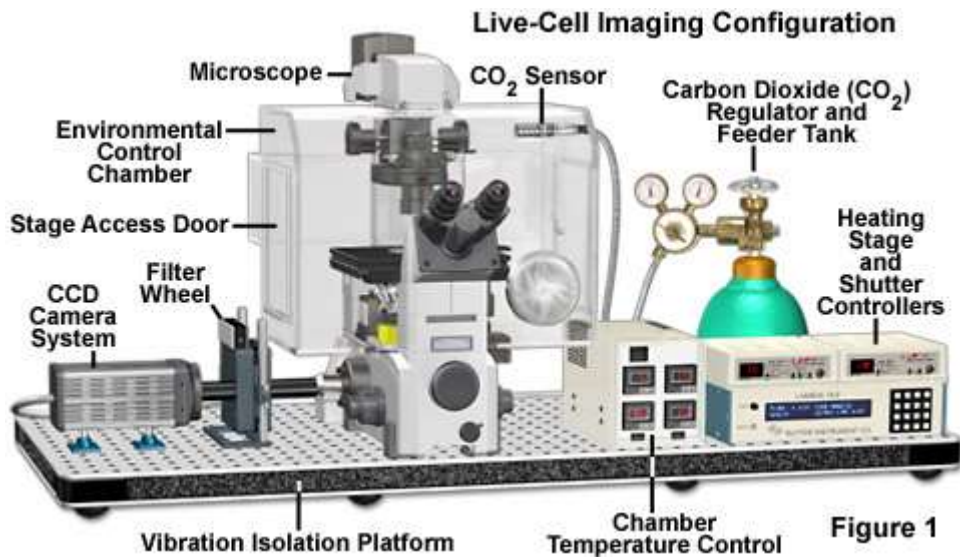
Figure 5

7. ábra. 2-dimenziós motorizált mikroszkópasztal. Általában léptetőmotorok hajtják a finommechanikai orsókat a nagy pontosság elérése érdekében. Azasztal pozícióját nagyfelbontású (optikai) jeladóval, ún. encoder-rel lehet beolvasni, amit azonban ritkán alkalmaznak²⁴.

Ezen túl az áteső és a fluoreszcens megvilágítást is célszerű vezérelni, különben a minta állandóan fényt kap. Fluoreszcens képalkotás esetén rövid idő alatt kiéghetnek a fluofórok. A nagy intenzitású fényforrás blendével való kapcsolása (kapuzása) szükséges, mivel a higanygőz vagy fémhalogén lámpát nem lehet gyakran ki- és bekapcsolni. A teljesen automata mikroszkópokban a fluoreszcens szűrőket és az objektíveket is motor állítja.

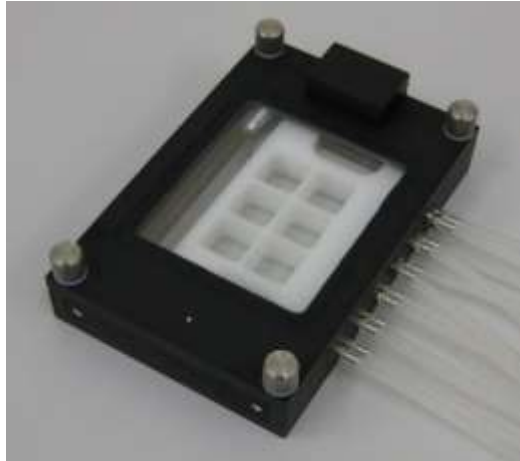
²³ <http://angel.elte.hu/cellmot/>

²⁴ <http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/automaticmicroscope.html>



8. ábra. Élő sejtek hosszú távú megfigyelésére alkalmas automatizált mikroszkóp átlátszó nagy inkubátorral felszerelve²⁴.

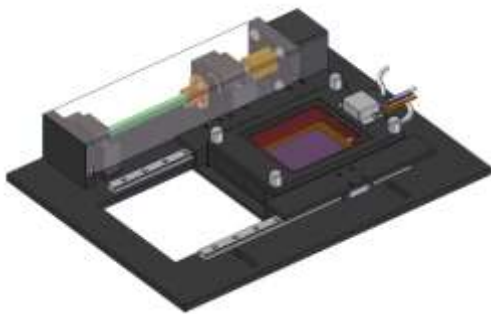
Jómagam 2002 óta veszek részt *time-lapse* mikroszkópos kísérletekben. A műszert mi magunk is fejlesztettük Csizsér Miklós segítségével. Egyik szabadalmunk [1] sejtinkubátort mutat be, melyet azóta is sikeresen alkalmazunk. Lényege, hogy a mikroszkóp asztalára helyezve a kisméretű inkubátor az egész műszer bedobozolása nélkül képes az emlős sejtek számára szükséges 37 ± 0.1 °C fokot, 100% páratartalmat és 5% CO₂ légkört biztosítani anélkül, hogy a képkötőhöz szükséges ablakok párasodnának. A találmány hasznosítására CellMovie néven *spin-off* céget alapítottunk Vicsek Tamással közösen. Sikeresen értékesítettük az általunk tervezett és gyártott műszereket a világpiacon. Automatizált mikroszkópot és így a *time-lapse* kísérleteket vezérlő szoftvert is fejlesztettünk. Kezdetben Czirók András, később Selmeczi Dávid, ezt követően Mizera Ferenc és Vida Zsolt kollégáim írták a kódokat. A kísérleti eredmények kiértékelésére szintén írtunk saját programokat és szkripteket Selmeczi Dáviddal és Gönci Balázssal.



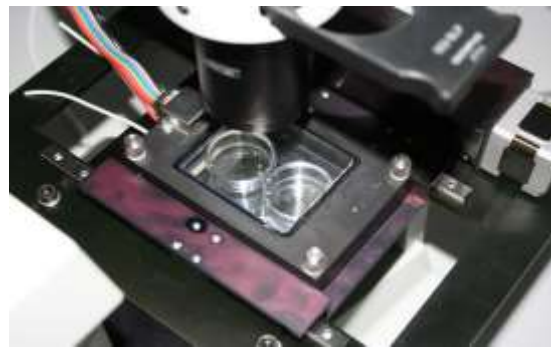
a: Egyterű CellMovie mikroszkóp-inkubátor. 6 tenyészet vizsgálatára alkalmas *plate*-et fejlesztettünk az automatikus tápcseréhez és drogek beadásához mikrofluidikai csatornákkal ellátva.



b: A CellMovie CNC marógépe, melyen az ELTE Biológiai Fizika Tanszékén az inkubátorokat gyártottuk.



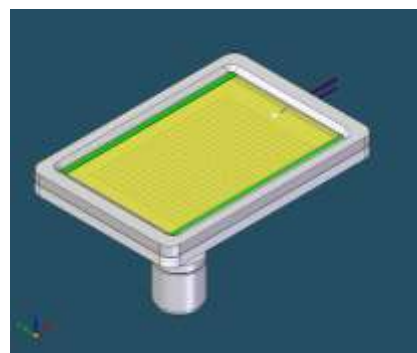
c: CellMovie egyterű inkubátor és a lineáris motorizált mozgatóasztal tervrajza.



d: CellMovie egyterű inkubátor lineáris motorizált mozgatóasztalon Olympus inverz mikroszkópban.



e: 4-kutas mikroszkóp-inkubátorunk Leica inverz mikroszkóp motorizált asztalán.

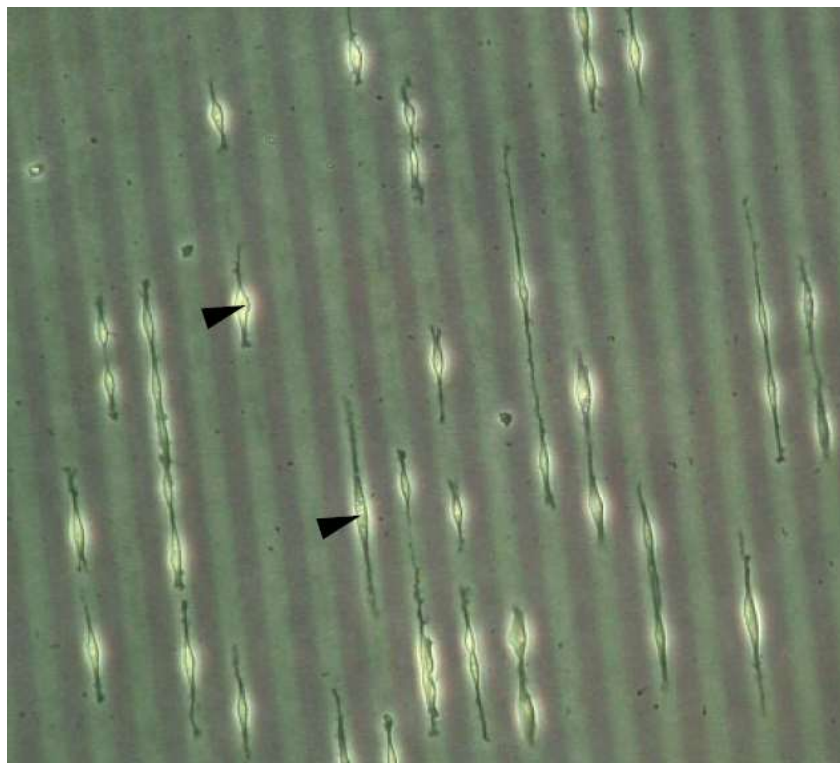


f: Mikroszkóp-inkubátoraink legújabb verziójának tervrajza, amely 384 kutas *plate* befogadására képes, és tetszőleges felbontású (munkatávolságú) objektívvel használható.

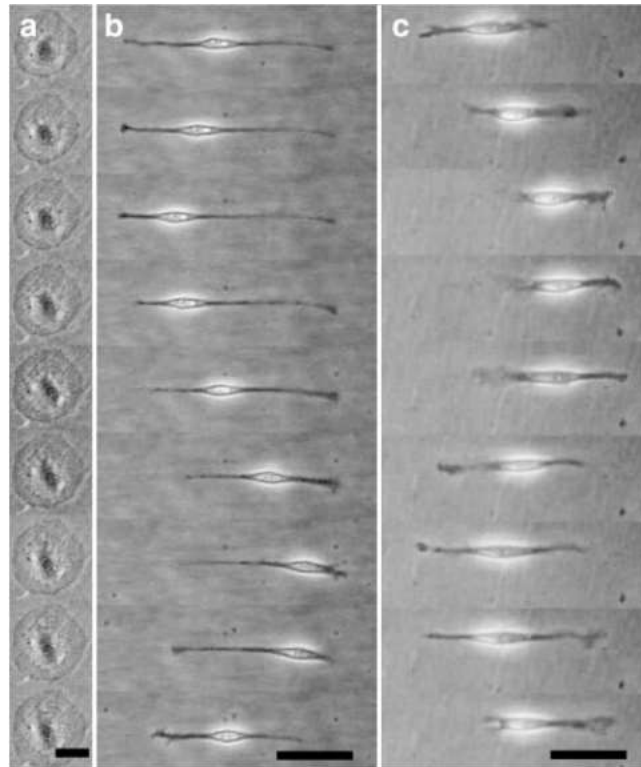
9. ábra. Az általunk az ELTE Biológiai Fizika Tanszékén illetve a CellMovie Bt-ben fejlesztett mikroszkóp-inkubátorok hosszú távú sejtbiológiai mikroszkópos megfigyelésekhez.

2.1.1 A sejtmag mozgásának vizsgálata

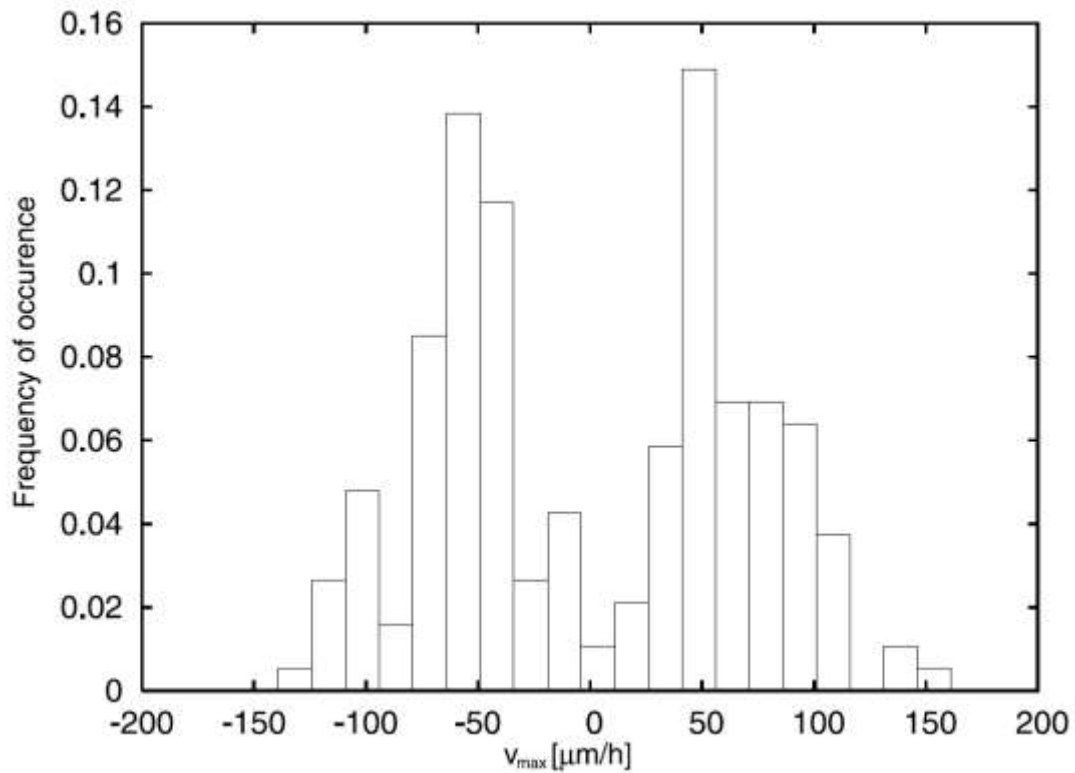
Kifejlesztettünk egy új eljárást az emlős sejtek mozgásának *in vitro* vizsgálatára mikromintázatokat időfüggő mikroszkópiát alkalmazva [2]. 10-20 μm széles, a sejtek kitapadását lehetővé tevő csíkokon az általunk vizsgált C6 patkány glióma és primer egér kötőszöveti sejtek egyébként szokásos mozgása leáll. Ugyanakkor a keskeny csíkokon az elnyúlt sejtek magja nem várt módon, oszcilláló mozgást végez. Amikor a vándorló mag a sejt elejéhez közelít, lelassít, visszafordul, majd az ellenkező irányba gyorsulni kezd. A sejt polarizációja a mag mozgásának irányával összhangban változik. A sejtmag megfigyelt mozgása működő mikrotubuláris rendszert igényel, amit a sejtváz fő komponenseinek működését gátló drogok, azaz kis molekulák alkalmazásával derítettük fel. Eredményeink alapján amellet érvelünk, hogy a sejtmag oszcillációját a mikrotubulus-dinamika hajtja úgy, hogy a sejtmagra ható erő iránya a centroszóma, azaz a mikrotubulusok központjának a sejtmaghoz képesti pozíciójával változik. Módszerünk a sejtmag vándorlásának fő ismérveit (sejtpolarizációt, oszcilláló sejtmagmozgást) megőrizve képes nagyszámú egyedi sejt szisztematikus vizsgálatára. Kísérleteink elsőként mutatták, hogy pusztán a sejtek alakjának befolyásolásával oszcilláló sejtmagmozgást lehet kiváltani emlős sejtekben.



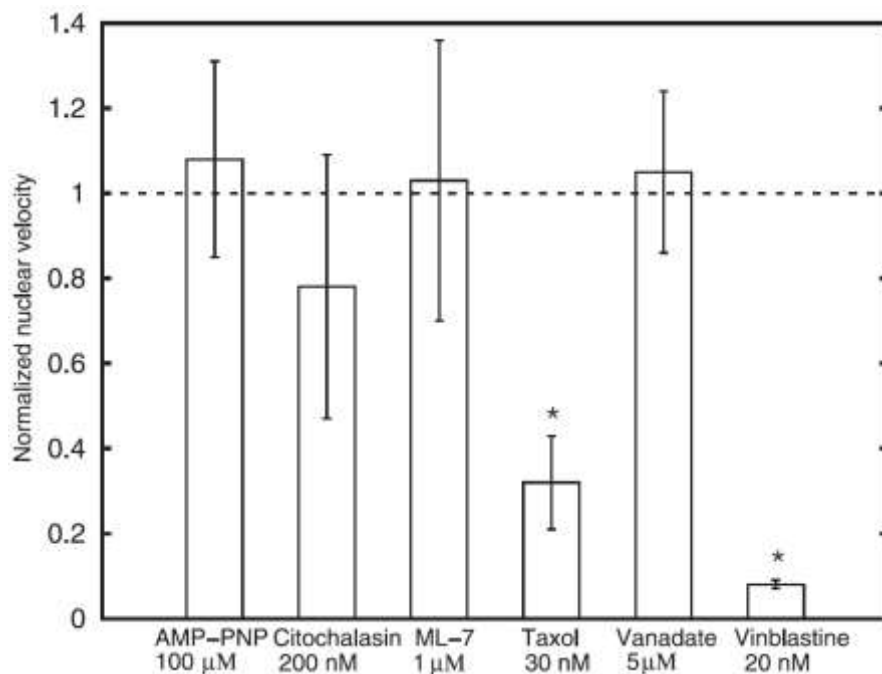
10. ábra. C6 patkány glióma sejtek mikromintázattal bevont felületen. A sejtek alakját mutató fáziskontraszt kép a 20 μm széles, sejtek kitapadását lehetővé tevő FITC-poli-l-lizin csíkokon, melyeket fluoreszcens felvételen rögzítettünk. A kitapadás geometriai korlátozása miatt a sejtek elnyúlt, bipoláris alakot vettek fel. A sejtmag pozíciója világosan kivehető: a nyilak ezt mutatják.



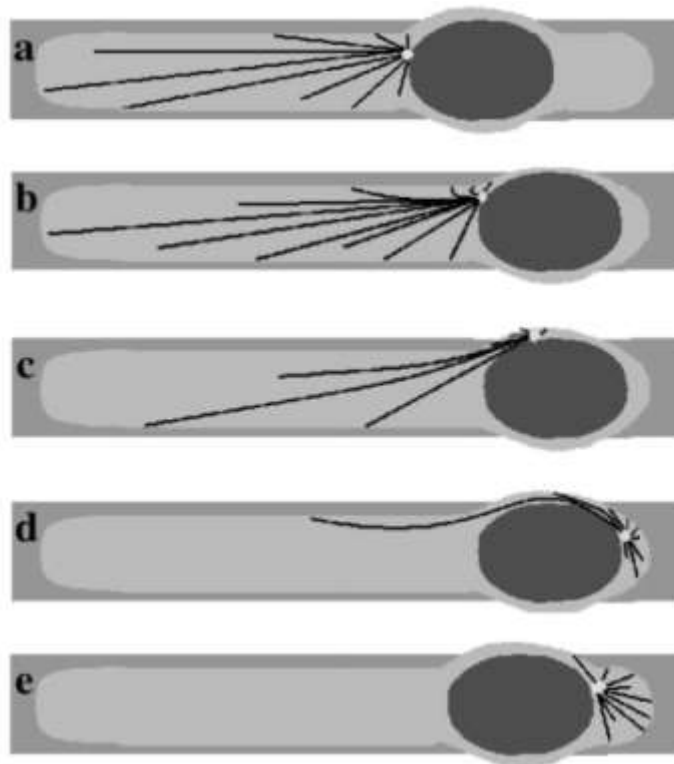
11. ábra. A vékony csíkokra kényszerített sejtekben megfigyelhető oszcilláló magmozgás. A jól kiterült C6 sejtek magja nem vándorol, ahogy az a bal oldali oszlopban látható. Ugyanez a sejtípus ugyanolyan kémiaájú, de mikromintázatokkal ellátott felületen, amely a sejtekre polarizált morfológiát kényszerít, jól mutatja az oszcilláló sejtmagmozgást (középen). Hasonló jelenséget figyeltünk meg primer kötőszöveti sejtekben (jobbra) rövidebb periódusidővel. A C6 (illetve kötőszöveti) sejteket mutató felvételek közt 1 óra (illetve 10 perc) telt el. A skálavonalak hossza 50 μm .



12. ábra. Az egyes periódusokban megfigyelt maximális sebességek eloszlása alapján a magmozgás tipikus sebessége $\sim 50 \mu\text{m/h}$.

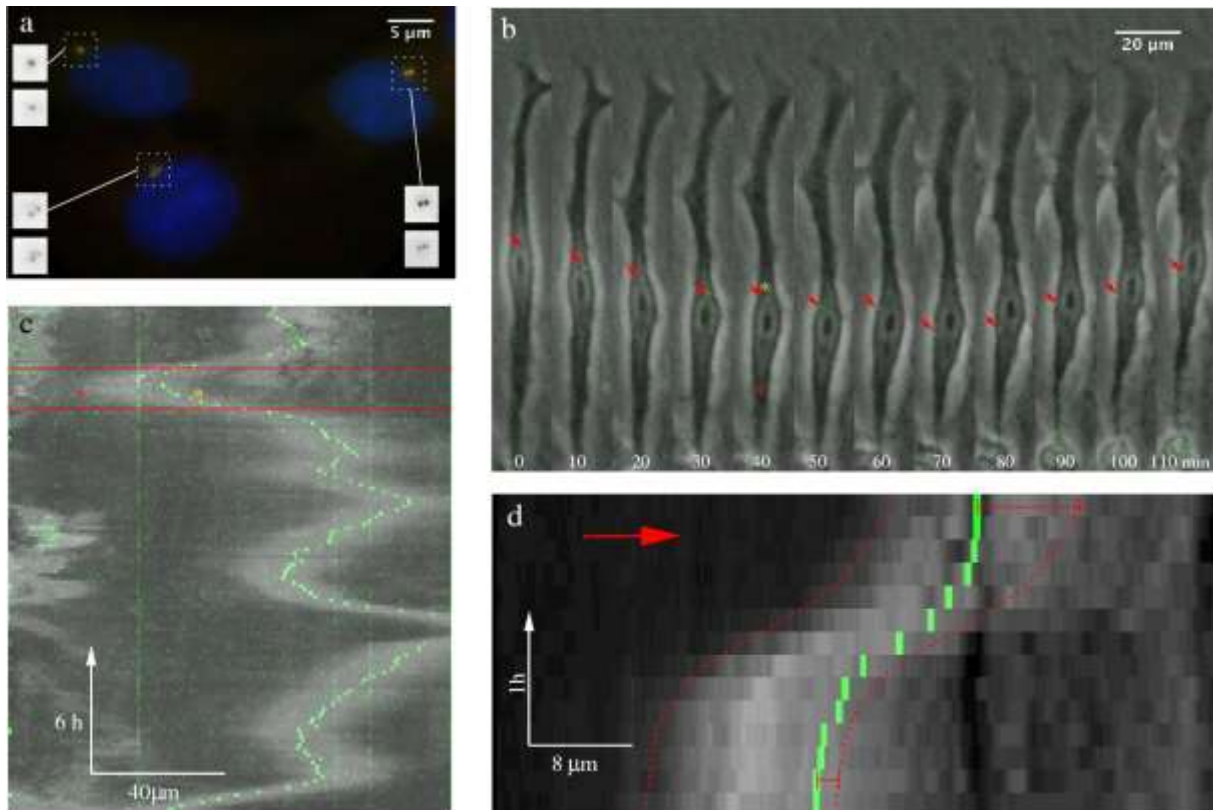


13. ábra. A sejtváza ható drogok képesek csökkenteni a sejtmag mozgását a C6 sejtekben. A drogok hatását a beadásuk előtti és utáni átlagos sejtmagsebesség arányával jellemeztük. A hibaszávok a szórást mutatják. A mikrotubulusokra ható vinblasztinnak és taxolnak robusztus gátló hatása volt ($P < 10^{-4}$), míg a többi drognak nem volt szignifikáns hatása a magmozgásra ($P > 0.1$). A csillag szignifikáns hatást jelöl.

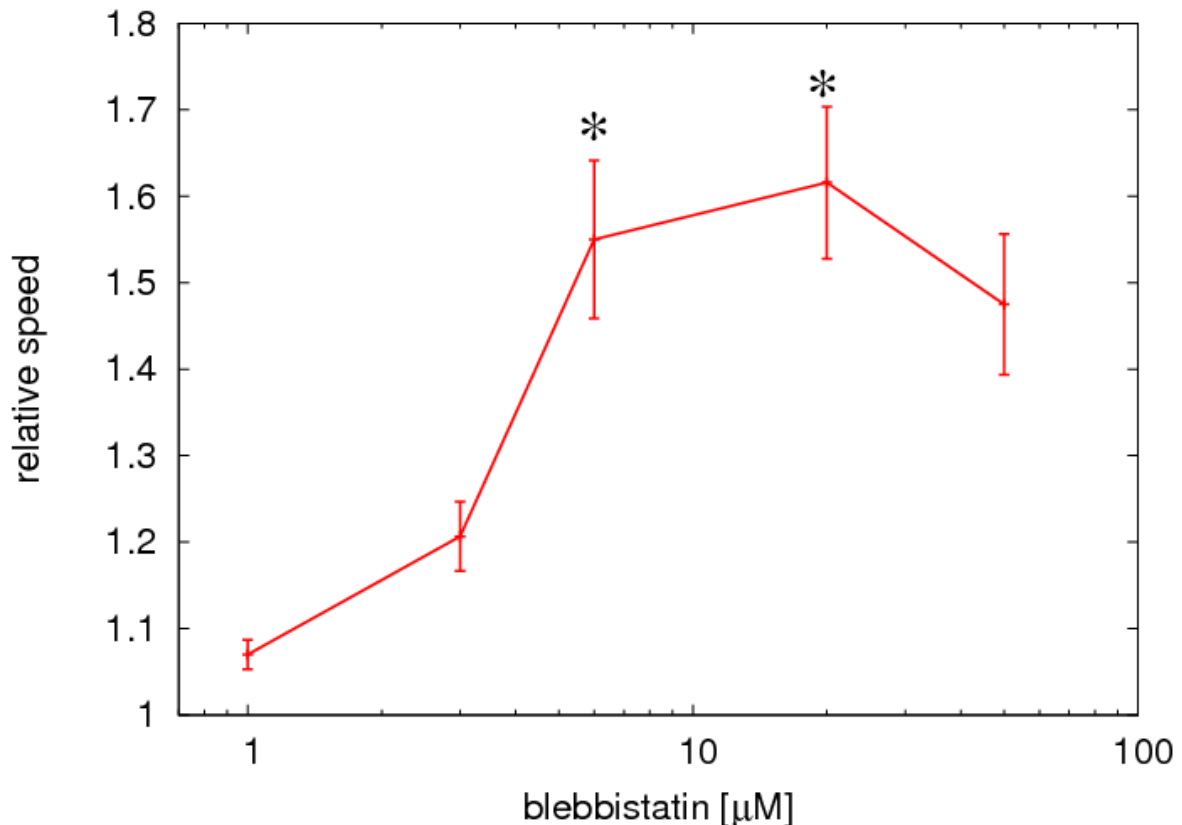


14. ábra. A mikrotubulusok polimerizációja okozta magmozgás sematikus modellje. **a:** a sejtmag és a centroszóma szoros közelsége aszimmetrikus mikrotubulos-eloszlást okoz. A mikrotubulusok sejtmagtól távoli végükön növekszenek, az így ébredő erő a centroszómán keresztül hat a sejtmagra. **b-d:** amikor a sejtmag a sejt elejéhez közeledve lelassul, a centroszómára ható erő továbbra is fennáll: a sejtmag mögötti centroszóma-pozíció instabillá válik. Így a sejtmag túlsó felére nyomódik át a centroszóma. **e:** a mikrotubulusok jól ismert dinamikus instabilitása miatt új mikrotubulusok kezdenek kinőni a centroszómából, melyek visszafelé nyomják a sejtmagot.

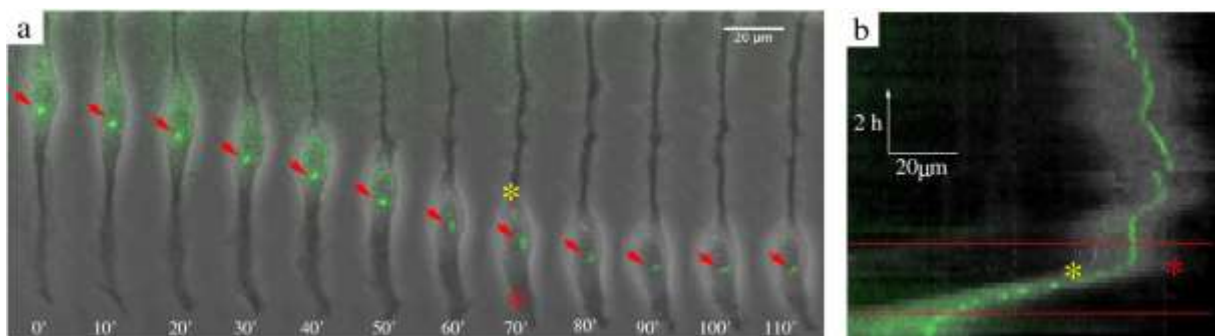
Vizsgáltuk a miozin-II-es motorfehérje gátlásának a sejtek alakjára és a sejtmag mozgására kifejtett hatását egér radiális gliát modellező neuronális progenitor valamint C6 sejteken [3]. Meglepő módon ahelyett, hogy a miozin-II-t gátló blebbisztatin csökkentette volna a magmozgást, elnyúlt, bipoláris sejthalakot váltott ki, és fokozta a sejtmagok mozgását. Amikor a miozin-II aktív volt, húzó erőt mértünk a sejt vezető éle és a sejtmag közt időbeli aljzat-deformációs mikroszkópia (*traction force microscopy*) segítségével a C6 sejteken. Miozin-II aktivitás hiányában az aljzat-deformációs erők a detektálhatóság alatt maradtak kísérleti rendszerünkben. GFP-centrin segítségével jelöltük meg fluoreszcensen a centroszómát, és azt láttuk, hogy miozin-II aktivitás mellett a centroszóma rendszerint lemarad a sejtmag mögött, míg ennek híján megelőzi a sejtmagot. A megfigyelések értelmezése céljából egy viszonylag egyszerű viszkoelasztikus modellt alkottunk a sejtváz leírására, amely aktívan összehúzódó és passzív, összenyomható elemekből áll.



15. ábra. A centroszóma helyzete a sejtmag mozgása során C6 sejtekben. **a**: a GFP-centrin fúziós fehérje segítségével az epifluoreszcens képeken zölden láthatóvá tett centroszóma a C6 sejtek egy tipikus csoportjában. Az anti-centrin ellenanyaggal végzett piros immunjelölés pontos kolokalizációt mutat (sárgán) a zöld GFP-centrinnel 100-szoros nagyítású olaj-immériós objektívvel megfigyelve. A sejtmagokat kék Hoechst reagenssel jelöltük. A kis képeken felül a piros, alul a zöld csatornát mutatjuk szürke skálán, invertálva a jobb láthatóság kedvéért. **b**: 20 µm-es fibronektin csíkon kitapadt C6 sejt GFP-centrinnel jelölve egymást követő időpontokban. A szürke skálájú fáziskontraszt és a zöld fluoreszcens képeket egymásra téve jól kivehető a centroszóma helyzete. A piros nyilak a centroszómára mutatnak. A sejtmag elejét és végét (a 40. percben) piros illetve sárga csillaggal jelöltük. A képsor a mag megfordulását mutatja be. Ebben az esetben a centroszóma „ugrásszerűen” került a sejtmag túlsó felére a 60. és 70. perc között. **c**: a centroszóma helyzete miközben a sejtmag oszcillál. Az egyes képkockákból 1-dimenziós pixelsort (intenzitás profilt) nyertünk úgy, hogy a sejt képét kivágtuk az eredeti felvételből, majd a sejt hossz tengelyére merőlegesen megkerestük a legfényesebb pixelt. Így a **c** panel vízszintes sorai a sejt egy adott időben felvett képeit reprezentálják. A világosszürke régiók jelzik a sejtmag helyét: a sejtmag területén magasabb a sejt, ezért a fáziskontraszt képeken egy fényes sáv jelenik meg körülötte (**b** panel). A zöld pötty a centroszómát jelzi. A **b** panel ábrái a két piros vonal közti időszaknak felelnek meg. A piros és a sárga csillag ugyanazt a szakaszt ugyanabban az időpontban jelzi, mint a **b** panelen. Néhány, de nem minden sejtmag visszafordulás jár „ugrásszerű” centroszóma áthelyezéssel, mint amit a **b** panel mutat. **d**: A sejtmag a visszafordulások közti időben általában le hagyja a centroszómát. A **c** panelhez hasonló intenzitás profilok a sejtmag és a centroszóma mozgását mutatják két sejtmag-visszafordulás közt. A sejtmag elejét és végét piros pontozott vonallal jelöltük közelítőleg. Míg a centroszóma kezdetben a sejtmag elejénél van, később lemarad, azaz a felső piros mérővonal hosszabb, mint az alsó.



16. ábra. A sejtmag normált sebessége C6 sejtekben a blebbisztatin koncentráció függvényében. A miozin-II gátlása még viszonylag nagy koncentrációk mellett is kiváltja a sejtmag fokozott mozgását. Az adott tenyészetben mért átlagos sejtmag-sebességet (amely populációs átlag) párhuzamosan vizsgált kezeltlen sejtek adataival normáltuk. Az átlagos sejtmag-sebesség a kezeltlen kontrol tenyészetekben $7 \pm 0.6 \mu\text{m}/\text{h}$ volt. A hibaszávok az átlag becsült hibáját mutatják. A szignifikáns eltérést (t-próba, $p < 0.05$) csillaggal jelöltük. Az adatok minden koncentráció esetén minimum 200 sejtől származnak.

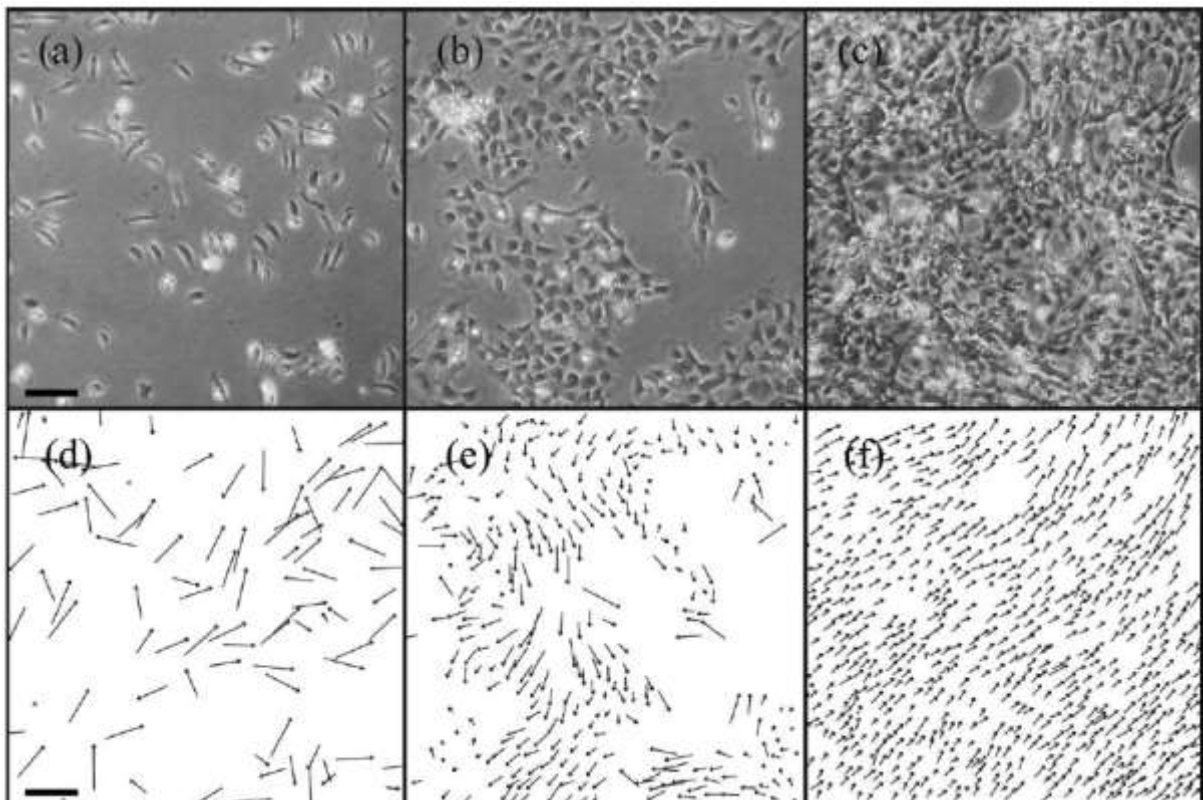


17. ábra. A centroszóma helyzete a miozin-II gátló blebbisztatin által indukált sejtmag-mozgás során C6 sejtekben. **a**: fluoreszcens GFP-centrin segítségével láthatóvá tett centroszóma egy tipikus C6 sejtben, melyet $20 \mu\text{M}$ blebbisztatinnal kezeltünk. A szürke skálájú fáziskontraszt és a zöld fluoreszcens képeket egymásra tettük a centroszóma helyzetének megjelenítésére. A piros nyilak a centroszómát mutatják. A 15. ábrához hasonlóan piros és sárga csillaggal jelöltük a sejtmag végeit.

(Pontosabban a sejtmag körül megjelenő fényes gyűrű határait, amely fáziskontraszt effektus miatt jelenik meg.) **b**: a centroszóma helyzete a sejtmag mozgása során a 15. ábrához hasonlóan. Az **a** panelen bemutatott képkockák a piros vonalak közti soroknak felelnek meg. A piros és sárga csillag ugyanazt a régiót jelöli, mint az **a** panelen. A centroszóma általában a mozgó sejtmag előtt halad. A sejtmag gyors visszafordulásait nem figyeltünk meg blebbisztatinnal kezelt sejtekben.

2.1.2 Kollektív sejtmozgás vizsgálata

Hosszú távú fáziskontraszt mikroszkópos megfigyelések segítségével rögzítettük nagyszámú (aranyhal pikkelyéből származó) keratocita sejt kollektív mozgását [4]. Ezek a szöveti sejtek a halakhoz, madarakhoz vagy marhacsordákhoz hasonló módon rajokba rendeződve mozogtak. A sejtek sűrűségét, azaz az adott területre jutó sejtek számát növelve a rendezetlenből rendezett fázisba történő kinetikus fázisátalakulást figyeltünk meg. A kritikus sűrűség közelében komplex kép alakul ki egymással kölcsönható sejtcsoportokkal. A kísérletek alapján felépítettünk egy pusztán rövid távú kölcsönhatásra alapuló szimulációs modellt, amely folytonos fázisátalakulást mutat a rendezett fázisba. A modell-sejteknek nincs explicit információjuk a szomszédos sejtek mozgásának irányáról, csak a rájuk ható erőket érzékelik. Mikrofabrikált arénákban látványosan örvénylő kollektív sejtmozgást figyeltünk meg, melyet a szimulációk is reprodukáltak.

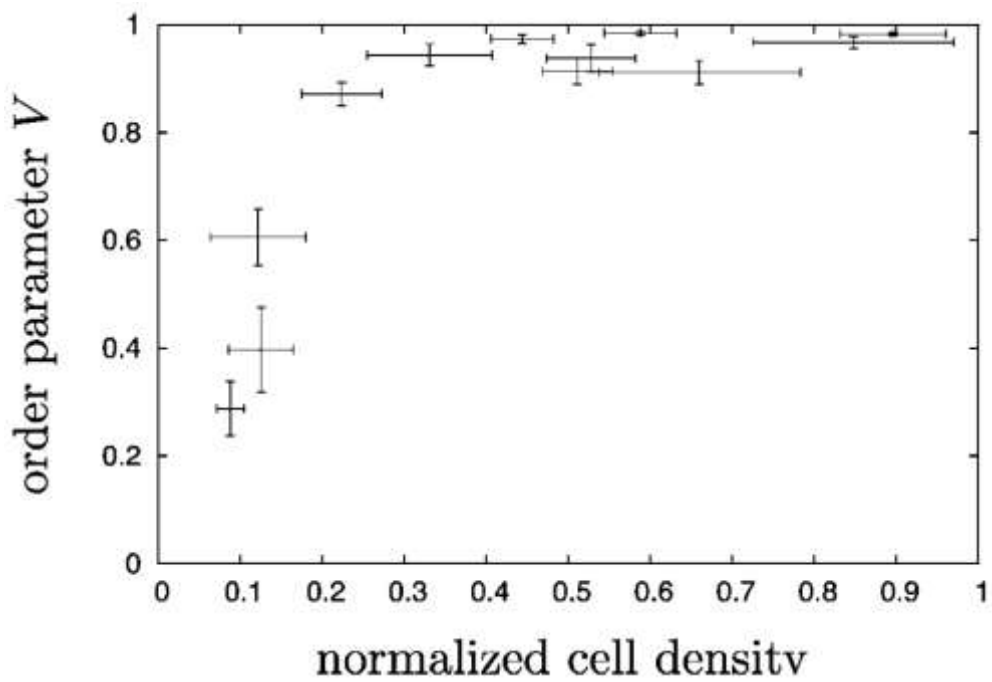


18. ábra. A sejtek tipikus viselkedését mutató fáziskontraszt felvételek különböző sejtsűrűség mellett. **a**: 1.8, **b**: 5.3, **c**: 14.7 sejt/ 100x100 μm^2 . A sejtsűrűség növelésével kollektív rendeződés jelenik meg a sejtmozgásban. Az egyedi sejtek sebessége nagyobb, mint a csoportokban mozgó sejteké. A skálavonal hossza 200 μm . **d-f**: a sejtek sebessége. Skálavonal hossza: 50 $\mu\text{m}/\text{perc}$.

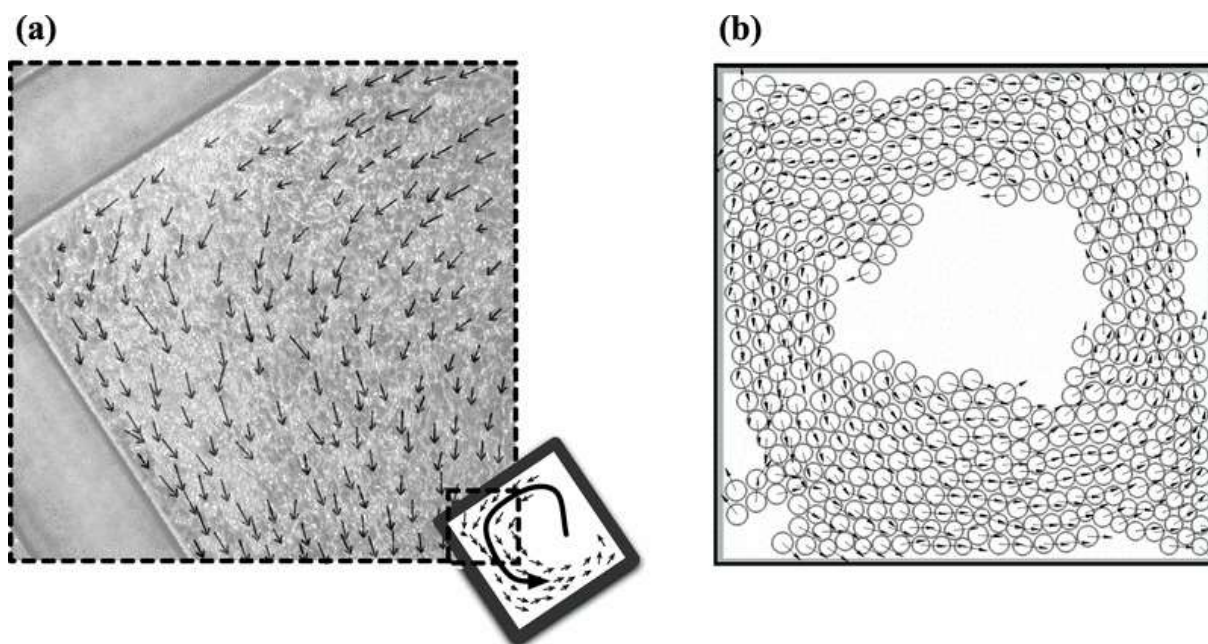
A következő rendparamétert vezettük be:

$$\bar{V} = \left\langle \frac{1}{N} \left| \sum_{i=1}^N \frac{\mathbf{v}_i(t_k)}{|\mathbf{v}_i(t_k)|} \right| \right\rangle_{t_k}$$

Ahol \bar{V} az átlagos sebességirány, $\mathbf{v}_i(t_k)$ az i -edik sejt sebességvektora a k -adik időintervallumban. N a sejtek száma.



19. ábra. A \bar{V} rendparaméter a normált sejtsűrűség függvényében. A sejtsűrűséget a legnagyobb megfigyelt sűrűséggel, 2.5×10^3 sejt/ μm^2 -rel normáltuk. A hibasávok a sejtsűrűség és a rendparaméter standard hibáját mutatják.



20. ábra. **a:** kísérleti pillanatkép egy körmozgást végző sejtcsoportról egy $2 \times 2 \text{ mm}^2$ -es mikrofabrikált aréna egyik sarkánál. A nyilak az egyes sejtek sebességét mutatják. **b:** négyzet alakú arénába kényszerített modell sejtek, melyek a szimulációkban örvénylő körmozgást végeznek a modell-paraméterek széles tartományában.

2.2 Szelektív sík-megvilágítású mikroszkóp fejlesztése

A 3-dimenzióban kiterjedt vastag minták mikroszkópos vizsgálata mindig is nehézkes volt. A mikroszkópok felbontása az optikai tengely (z) irányában sokkal gyengébb, mint a laterális felbontás. Vagyis az elrendezés anizotrop volta miatt a képalkotás is anizotrop: a pontszétterületi függvény (*point spread function*, PSF), amely a mintában lévő pontforrás képét mutatja, nagyon elnyúlt a z irányban. Ezen a problémán a konfokális mikroszkópok²⁵ sem tudnak sokat javítani. A problémára ötletes megoldást kínál a szelektív sík-megvilágítású mikroszkóp (*selective plane illumination microscope* SPIM)²⁶. Ez az utóbbi évtizedben elterjedt technika a fluoreszcens detektálást nem, csak a megvilágítást/gerjesztést módosítja a szokásos epifluoreszcens elrendezéshez képest. A mintának csak egy vékony, az objektív lencse optikai tengelyére merőleges síkját világítjuk meg, így az egyéb síkokban lévő fluofórokat nem gerjesztjük, ezek nem zavarják a képalkotást. A vékony fénysíkot hengerlencsét is tartalmazó bonyolult lencserendszerrel állítják elő, amit a minta közvetlen közelébe kell helyezni.

Az általunk fejlesztett SPIM megvilágításban a bonyolult lencserendszer helyett egy egyszerű diffrakciós vonalgenerátort alkalmaztunk [5]. Ez a lézerdióda fénynyalábjának alakját megváltoztatva a megvilágított folt helyett vonalat eredményez. A diffraktív optikai elem munkatávolsága igen nagy is lehet, esetünkben 200 mm-re volt az optika mintától. Így az élő szövetek vizsgálatakor szokásos komplex mikroszkópos elrendezésben kevésbé zavaró, mint a minta közvetlen közelébe helyezett lencse. Hátránya, hogy a lencsékkel elérhetőnél gyengébb marad a z irányú felbontás. Azonban még így is jelentős javulást értünk el az epifluoreszcens megvilágításhoz képest.

²⁵ <http://www.microscopyu.com/articles/confocal/confocalintrobasics.html>

²⁶ <http://www.microscopyu.com/references/superresolution/lightsheet.html>



21. ábra. Vízhűtéses kék lézerdióával és diffrakciós vonalgenerátor optikával felszerelt mikromanipulátor szelektív sík-megvilágítású mikroszkópiához.

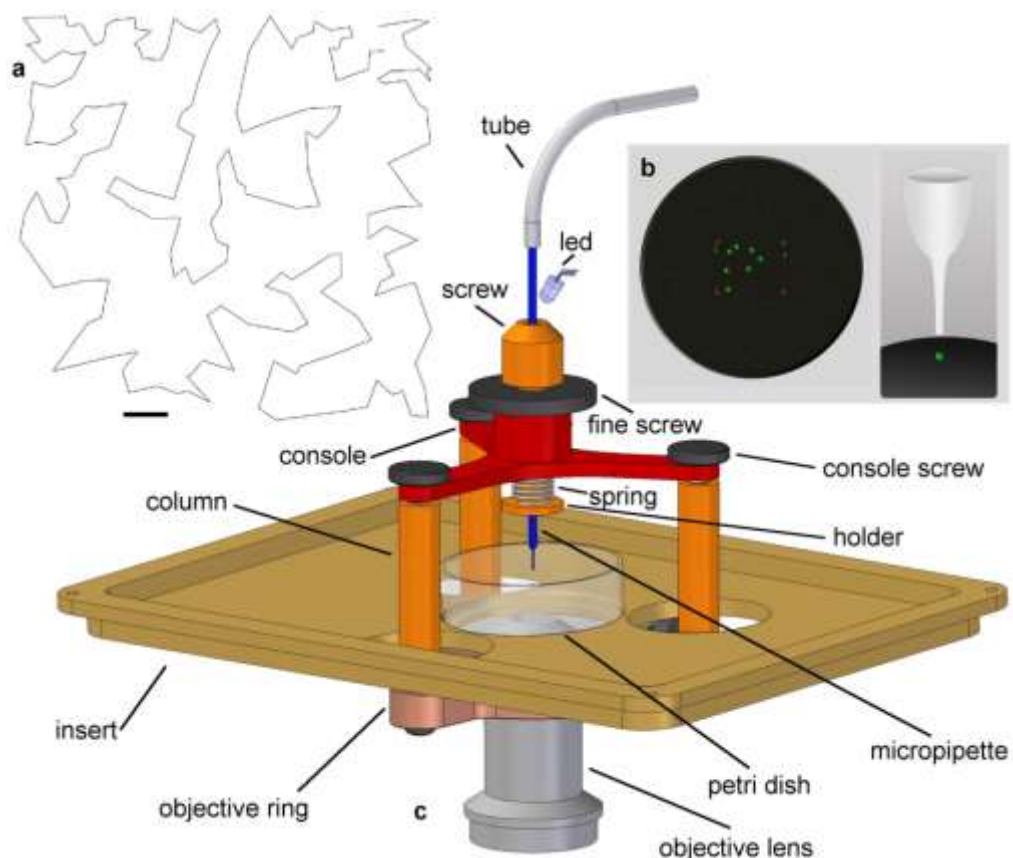


22. ábra. Az általunk fejlesztett szelektív sík-megvilágítással (SPIM) készített felvétel a normál epifluoreszcens megvilágítással összevetve. Átlátszó 5%-os Agar gélbe ágyasztunk $2\ \mu\text{m}$ -es zölden fluorszekáló gyöngyöket. A SPIM érdemben csökkentette a nem a fókuszsíkban lévő gyöngyökből érkező háttérrel. (20x-os nagyítású objektív, NA 0.4.)

2.3 Egyedi sejtek manipulációja robot-mikroszkóppal

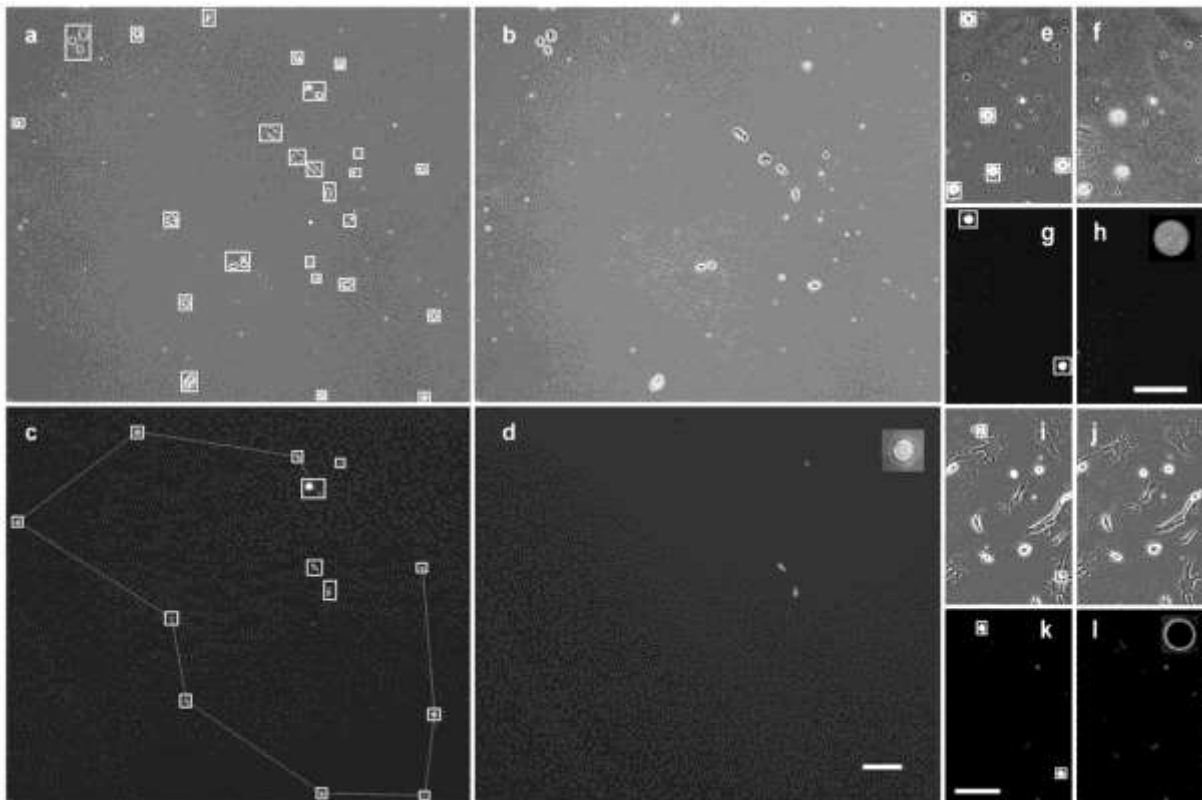
2.3.1 Fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás mikroszkópon

A mára elterjedt fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás (*fluorescence-activated cell sorting: FACS*) áramlási citometria alkalmazásával molekuláris alapon képes sejteket szeparálni. Megmutattuk, hogy a fluoreszcens és a jelöletlen sejtek is automatikusan detektálhatók mikroszkóp és számítógépes látás (*computer vision*) segítségével Petri csészében, és ezt követően egyenként izolálhatók egy számítógép-vezérelt mikropipettával [6]. Módszerünk rutinszerűen és nagy szelektivitással alkalmazható FACS-ként egészen az egyedi sejtek szintjéig. A válogatás felbontása, vagyis az a legkisebb távolság két sejt középpontja közt, amely esetén még az egyik sejt izolálható a másik elmozdítása nélkül, 50-70 μm volt. A válogatást túlélő sejtek aránya 3T3 egér kötőszöveti sejtek illetve NE-4C neuroektodermális egér őssejtek esetén $66\pm 12\%$ illetve $88\pm 16\%$ volt. Fluoreszcens NE-GFP-4C sejteket izolálva a nem fluoreszcens NE-4C sejtekkel kevert kultúrából az izolált kultúrák tisztasága, azaz a fluoreszcens sejtek aránya $95\pm 2\%$ volt $62\pm 7\%$ -os túlélési ráta mellett. A mikropipettában és körülötte a Petri csészében kialakuló folyadékáramlás számítógépes szimulációja megerősítette a kísérletileg tapasztalt válogatási hatékonyságot és a normál FACS-hoz hasonló mértékű sejtkárosító kockázatot.

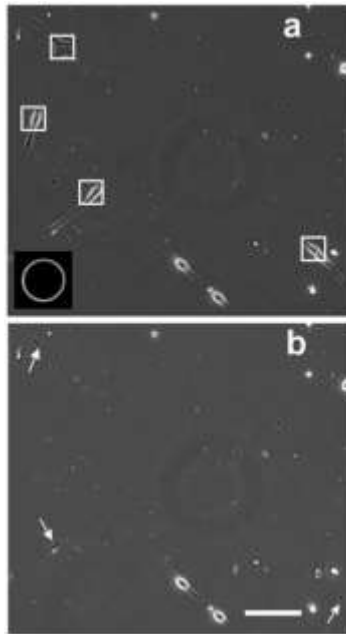


23. ábra. **a**: a mikropipetta által bejárt útvonal egy tipikus válogatás során, amikor 200 sejtet izoláltunk a Petri csészéből. A skála vonalhossza 100 μm . **b**: A vezérlő szoftver hardvert szimuláló

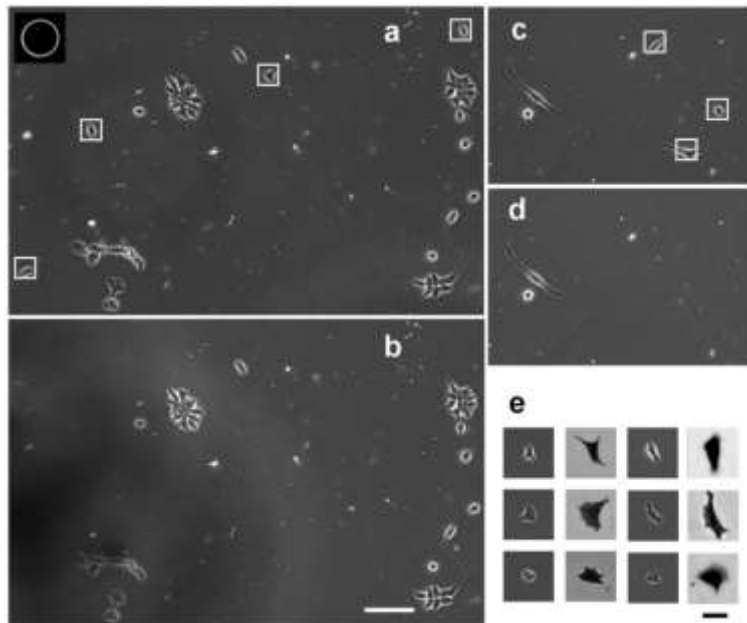
modulja. Az izolálandó fluoreszcens sejteket zöld gömbök szimbolizálják a Petri csészében. **c**: a mikropipetta pozicionálására szolgáló eszköz [7]. Az üveg mikropipettát az objektívhez rögzített háromlábú konzol tartja az optikai tengelyben. A konzol közepén hengeres befogó szorítja a mikropipettát tokmányhoz hasonlóan. A mikropipetta magassága nagy pontossággal állítható egy finommenetes csavar segítségével. A mikropipetta hegyét LED fénye világítja meg, melyet maga a mikropipetta vezet az objektívbe. A Petri csésze a mintatartó középső nyílásába illeszkedik. A konzol 3 oszlopát az inwert 3 kör alakú nyílásán vezettük át, amely lehetővé teszi a mikroszkópasztal és így a Petri csésze vízszintes irányú mozgását. A mikropipetta felső vége egy flexibilis csőhöz kapcsolódik. A cső másik végén nagy sebességű folyadékselepe és fecskendőpumpa vezérli az áramlást.



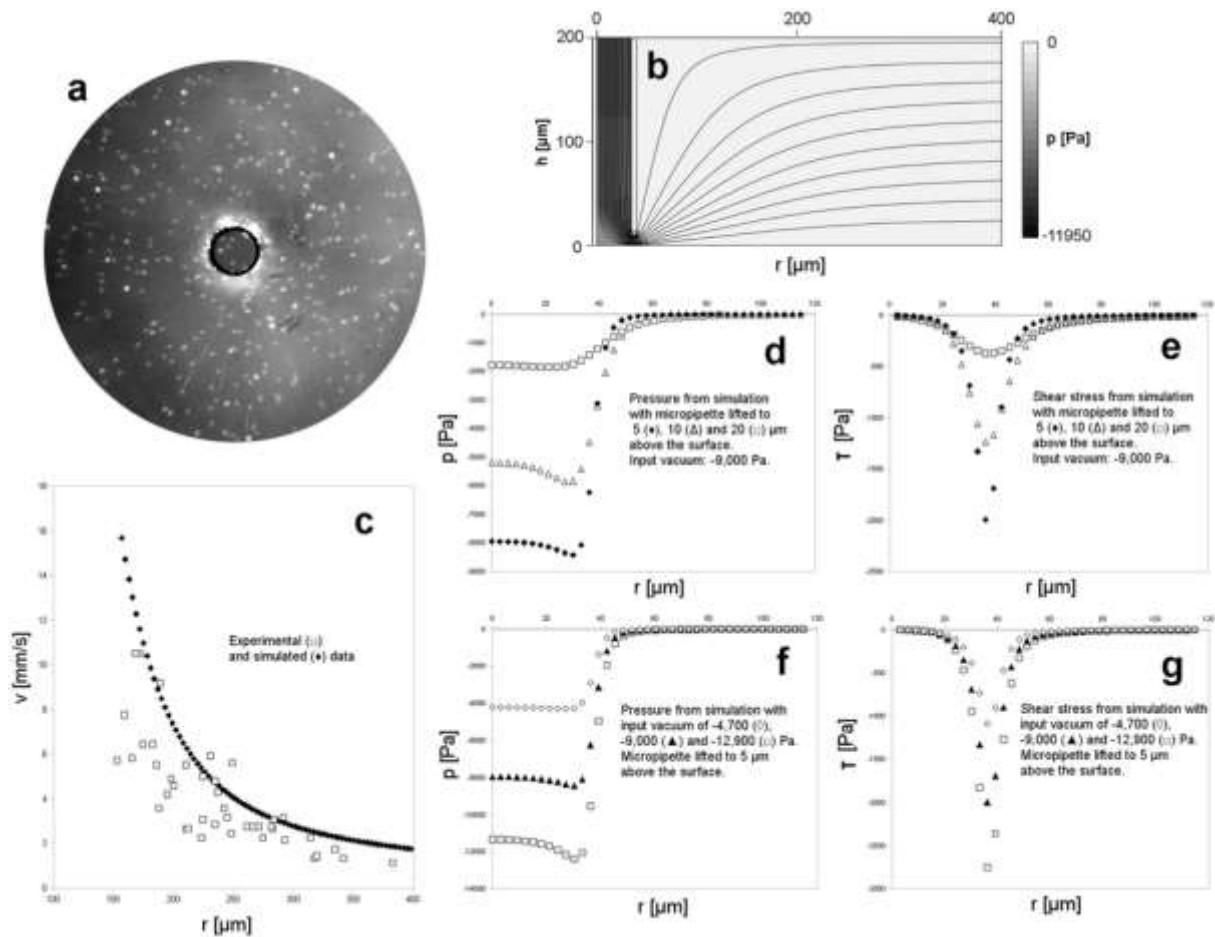
24. ábra. **a, b, c, d**: NE-4C; **e, f, g, h**: 3T3; **i, j, k, l**: asztroglia-mikroglia sejt kultúrák. Az **a, c, e, g, i, k** panelek a válogatás előtti, míg **b, d, f, h, j, l** képek a válogatás utáni állapotot mutatják. A bal oldali panelek tehát válogatás előtt, a jobb oldaliak utána készültek. A mikropipetta hegyét (apertúráját) a **d, h, l** panelek sarkában mutatjuk. Az NE-4C sejtek egy része és az összes mikroglia sejt volt GFP-vel jelölve. A 3T3 sejtek egy részét a szintén fluoreszcens, Dil nevű sejtmembrán-festékkal jelöltük. Szoftveres sejt detektálás után a mikropipetta izolálta a fluoreszcens sejteket. A fáziskontraszt és fluoreszcens képeken a válogatás előtt detektált sejteket fehér keret jelzi. A **c** panelen a sejteket összekötő egyenes vonalak a mikropipetta útját mutatják: az útvonalon kívüli három sejtet kizártuk a válogatásból, mert a mikropipetta belső átmérőjének megfelelő, 50 μm -es válogatási felbontásnál közelebbi szomszédjuk volt. Az asztroglia sejteket nem volt szükséges detektálnunk a fáziskontraszt képeken (**i**), mert a GFP-vel jelölt mikroglia sejteket a felületre erősebben kitapad asztrogliaák közvetlen környezetéből is izolálni tudtuk az asztrogliaák elmozdítása és károsítása nélkül. **i**-ben a keretek a **k** panelen detektált mikrogliaikat jelölik. A skálavonalak hossza 100 μm .



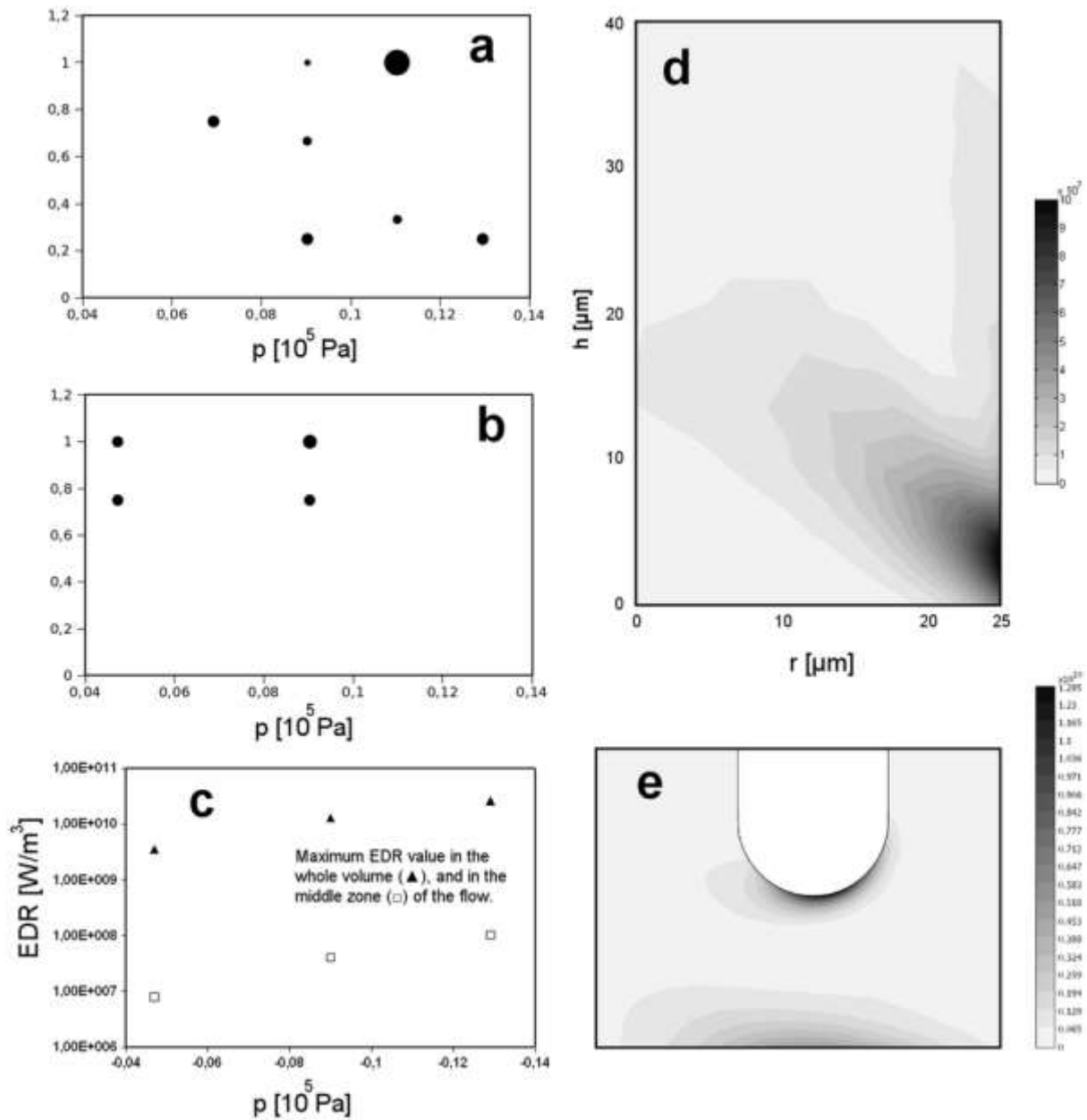
25. ábra. 3T3 sejt kultúra az **a** panelen keretekkel jelölt négy sejt izolálása előtt (**a**) és után (**b**). A **b** panelen nyilakkal jelölt sejtnyúlványok a sejtek elmozdítása után is a felületen maradtak. A négy sejt közül csak egy élte túl a válogatást. Az **a** panel sarkában látható a mikropipetta apertúrája. A skálavonal hossza 100 μm .



26. ábra. NE-4C (**a, b**) és 3T3 (**c, d**) sejt kultúrák válogatás előtt (**a, c**) és után (**b, d**). A felső panelek tehát a válogatás előtti, míg az alsók az ezt követő állapotot mutatják. Az izolálásra manuálisan kijelölt sejteket fehér keret jelzi. Az **e** panelen az izolálást túlélő sejtek láthatók a válogatás után két órával. Balról az első oszlop: a négy NE-4C sejt közül három túlélő fáziskontraszt képe. Második oszlop: ugyanezek a sejtek metilén kézzel megfestve és 20x objektívvel lefényképezve. A harmadik és negyedik oszlop a háromból három 3T3 túlélőt mutatja. Válogatás előtt tripszin-EDTA-val kezeltük a sejteket az adhézió csökkentése érdekében. Az **a** panel sarkában látható a mikropipetta apertúrája. A fáziskontraszt képek skálavonala a **b** panelen látható: 100 μm . Az **e** panelen bemutatott világos látóterű képek skála vonala 25 μm .



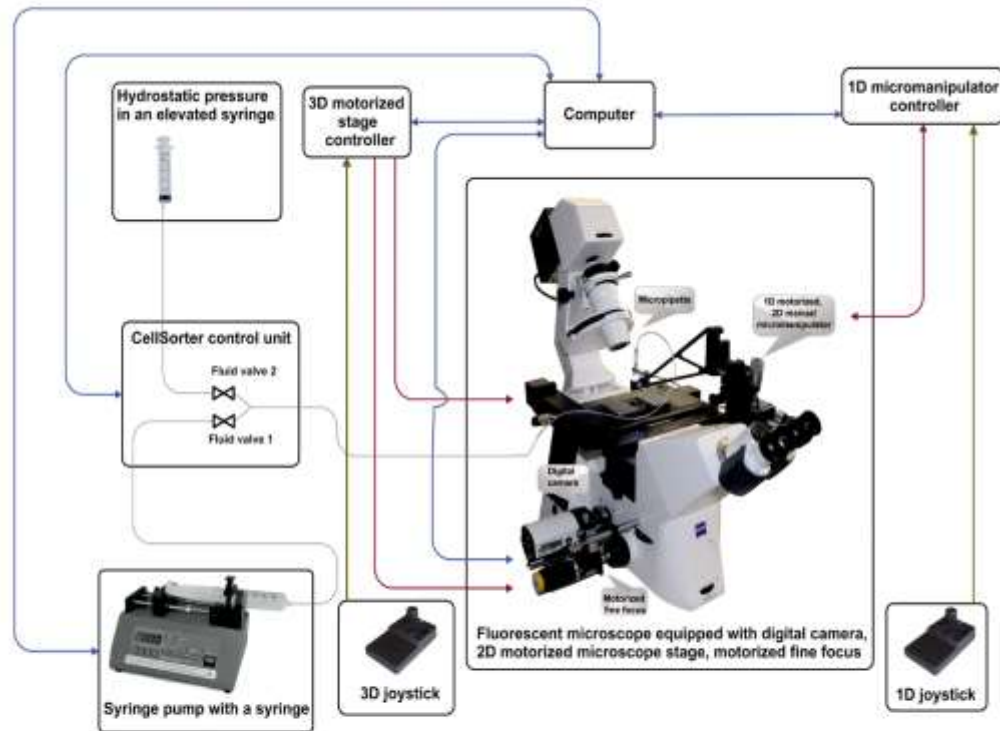
27. ábra. **a:** a Petri csésze alján lévő fluoreszcens gyöngyök, melyek a közepén látható 69 μm -es mikropipetta által keltett áramlással együtt mozognak. A felület fölött 10 μm -rel mozgó gyöngyök vékony radiális vonalként jelennek meg, míg a felülethez tapad gyöngyök fókuszon kívüli, elmosódottabb foltnak látszanak mivel az objektívet 10 μm -rel a felület fölé fókuszáltuk. A gyöngyök hajlamosak voltak a mikropipetta külső pereméhez tapadni. A vákuum -8700 Pa volt, expozíciós idő 10 ms, a gyöngyök mérete 2 μm . **b:** a vízszintes felület közelébe helyezett függőleges mikropipetta számítógépen szimulált áramlási terének sebesség és nyomás térképe oldalnézetben. A geometria azonos a kísérleti elrendezéssel, a vákuum -9000 Pa . Panel mérete $0.4 \times 0.2\text{ mm}$. A sebességet áramfonalak, a nyomást színek jelöli: minél alacsonyabb a nyomás, annál sötétebb a szín 0 és -11950 Pa közt. **c:** radiális áramlási sebesség a mikropipetta közepétől mért távolság függvényében. Kísérleti (\square) illetve szimulált (\blacklozenge) adatok az **a** panelen bemutatott gyöngyök elmozdulásából illetve a **b** panelen vázolt modellből számolva 10 μm -es magasságban. **d:** a felületen kialakuló nyomás a pipetta közepétől mért távolság függvényében három különböző szimulációból számolva: a mikropipetta hegye és a felület közti távolság 5 (\blacklozenge), 10 (\blacktriangle) illetve 20 (\square) μm . A vákuum -9000 Pa . **e:** a **d**-hez hasonló grafikon, amely a nyíró feszültséget mutatja a felület mentén. **f:** a felületen kialakuló nyomás a pipetta közepétől mért távolság függvényében a vákuum három különböző értéke mellett: -4700 (\blacklozenge), -9000 (\blacktriangle) illetve -12900 (\square) Pa . A mikropipetta és a felület közti távolság 5 μm . **g:** az **f**-hez hasonló grafikon, amely a nyíró feszültséget mutatja a felület mentén.



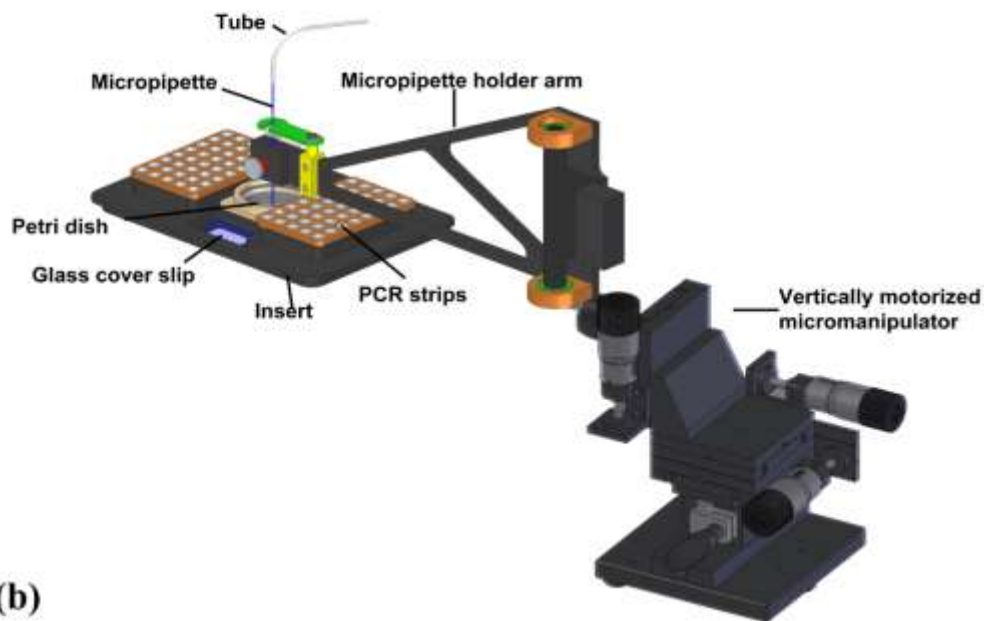
28. ábra. 3T3 **(a)** és NE-4C **(b)** sejtek túlélési rátája a fecskendőpumpa által generált vákuum függvényében. A korongok átmérője arányos a minta méretével, vagyis az izolált sejtek számával. **c:** a szimulációkból számolt maximális energia disszipációs ráta (EDR) a vákuum függvényében logaritmikus skálán. A maximális EDR-t kiszámoltuk a teljes térfogatban (▲), valamint a **d** panelen bemutatott áramlás középső, $r = 20 \mu\text{m}$ -ig terjedő zónájában (□). Az EDR vákuumtól való függése gyengébb, mint a térfüggés. **d:** az áramlás EDR térképe a mikropipetta középső zónájában $r = 25 \mu\text{m}$ -ig -9000 Pa vákuum mellett. **e:** az áramlás EDR térképe a mikropipetta hegyéhez (pereméhez) közel, mely fehér színben látható a panel közepén. A **c**, **d**, **e** paneleken a mikropipetta apertúrája illetve falvastagsága 69 illetve $5 \mu\text{m}$ volt. A mikropipetta hegye és a felület közti távolság $5 \mu\text{m}$. Az EDR értékeket színskála mutatja W/m^3 egységben a **d** panelen 0-tól 10^8 míg az **e** panelen 0-tól $1.285 \cdot 10^{10}$ -ig.

2.3.2 Egyedi sejtek kis térfogatban történő lerakása

Az egyedi sejtek automatizált manipulációja és válogatása komoly kihívást jelent, ha a további vizsgálatok, például DNS vagy RNS szekvenálás ép sejteket kívánnak meg. Számítógép-vezérelt mikroszkópot és mikropipettát használtunk, hogy 80 db PCR (*polymerase chain reaction*) műanyag csövet egyedi sejtekkel töltsünk fel egy működési ciklus alatt [8]. A Laplace nyomás következtében csak egy kritikus nyomás fölött kezd a folyadék a mikropipettából kifolyni, ami megakadályozza a csepp térfogatának pontos szabályozását a mikroliter alatti tartományban. Találtunk egy anomális nyomást, ami hozzáadódik a Laplace nyomáshoz. Ezt a csepp párolgásának tulajdonítjuk. A kritikus cseppentési nyomás problémáját gyors folyadékszelepek egymás utáni, milliszekundumos pontossággal időzített nyitásával oldottuk meg. A minimális csepptérfogat 0.4–0.7 μl volt 3-4 sejt/perces válogatási sebesség mellett. Miután NE-4C neuroektodermális egér őssejteket és primer humán immunsejteket (monocitákat) vettünk fel standard műanyag Petri csészéből, az egyedi sejteket parányi cseppekben, kíméletesen tudtuk letenni. A lerakott cseppek $94 \pm 3\%$ illetve $54 \pm 7\%$ tartalmazott egyedi sejteket az NE-4C illetve a monociták esetében. A cseppek $7.5 \pm 4\%$ tartalmazott egynél több sejtet a monociták esetében. A többi csepp üres volt. A cseppekben lerakott sejtek számát dokumentálni tudtuk a Petri csésze megfelelő területének a válogatás előtt és után történő (mikroszkópos) lefényképezésével. A sejtek adhézíós erejét a manipulációk sikere érdekében hangoltuk, így nem volt szükség a sejteket csapdázó mikrostruktúrákra sem. Véleményem szerint az általunk alkalmazott, bonyolult megoldásokat nélkülöző, ugyanakkor flexibilis berendezés az egyedi sejtek izolálásában áttörést hozhat.

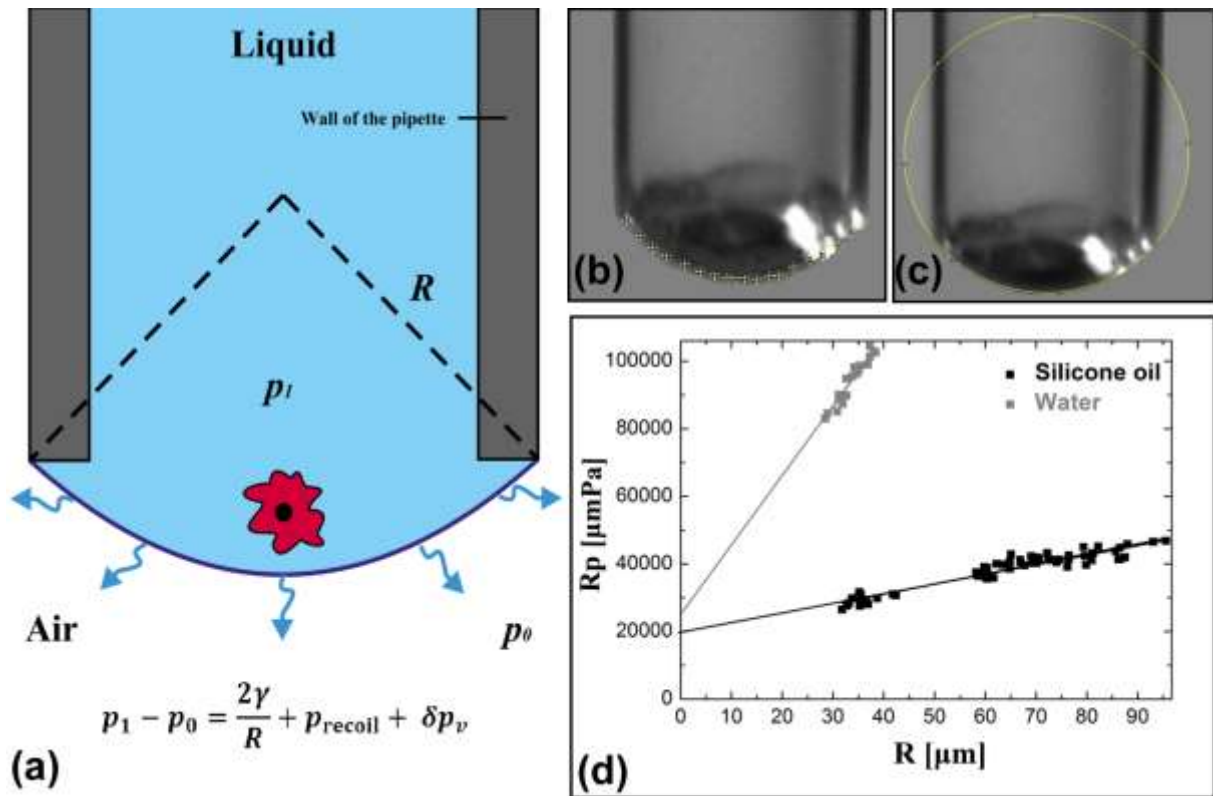


(a)



(b)

29. ábra. **a:** az általunk használt CellSorter elrendezés egyedi sejtek automatizált válogatására és lerakására. A rendszer fő komponensei: inverz mikroszkóp digitális kamerával; motorizált fókusz és 2D motoros mikroszkópasztal; függőleges irányban motorizált mikromanipulátor; CellSorter vezérlő egység a folyadékáramlás szabályozására; vákuumot előállító 1-es fecskendő a fecskendőpumpában és gravitációs túlnyomást előállító 2-es fecskendő; a CellSorter szoftvert futtató számítógép. **b:** az egyedi sejtek felszedését végző 70 μm belső átmérőjű üveg mikropipettát egy manuálisan forgatható kar tartja, ami a függőleges irányban motorizált mikromanipulátorhoz kapcsolódik. A sejteket egy 35 mm átmérőjű Petri csészéből szedjük fel, és PCR csövekbe vagy egy vékony üveglemezre tesszük le.

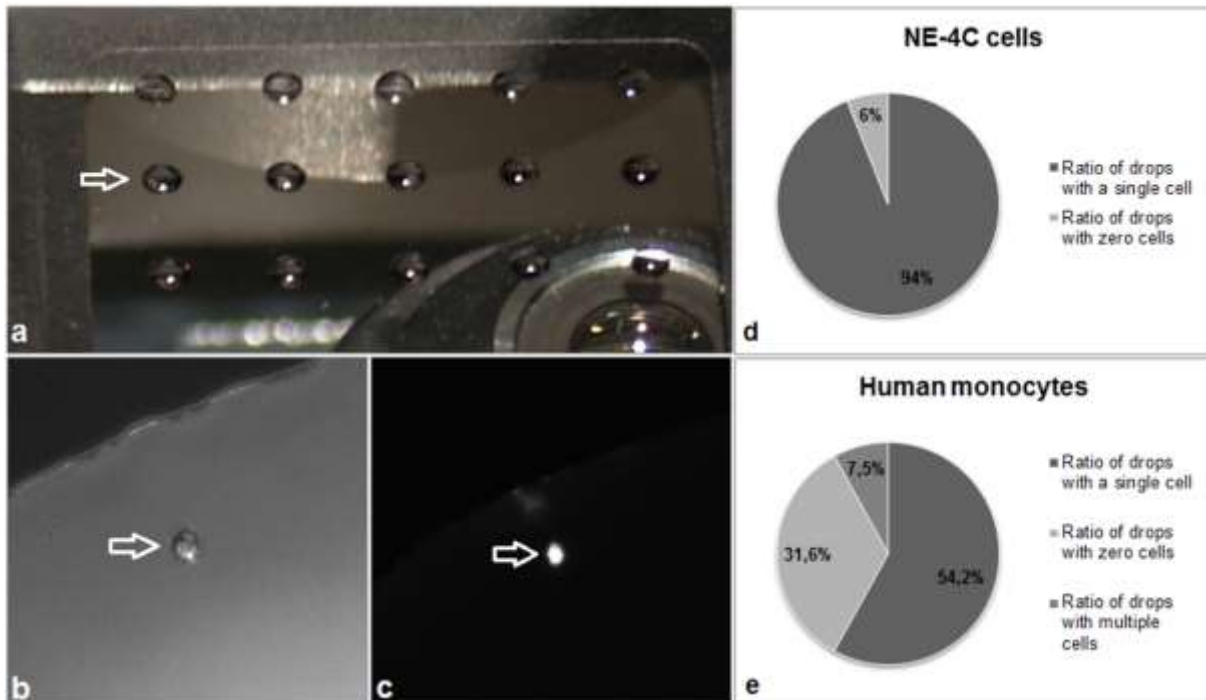


30. ábra. A mikropipettára kapcsolt nyomás függvényében mértük a mikropipetta hegyénél kitüremkedő víz felületének görbületi nyomását. Az **a** panel mutatja a mérés elvét. A Young-Laplace egyenletnek megfelelően a folyadékban lévő p_1 nyomásnak nagyobbnak kell lennie a külső p_0 értéknél ahhoz, hogy a folyadék kidudorodjék a pipettából. A mikropipettában lévő egyedi sejtet a piros szimbólum ábrázolja. Az imageJ szoftver segítségével kört illesztettünk a mikropipettát oldalnézetből mutató képeken a víz felületére (**b**, **c**). Azt találtuk, hogy a $p = p_1 - p_0$ nyomás az R görbületi sugár függvényében szisztematikusan eltért a Young-Laplace egyenlettől. Ábrázoltuk az Rp szorzatot az R függvényében (**d**), amely víz esetén lineáris korrelációt mutat ($R^2 = 0.93$) 2130 ± 135 Pa meredekséggel a konstans függvény helyett. Szilikon olajjal megismételve a kísérletet hasonló korrelációt ($R^2 = 0.92$) találtunk, de egy nagyságrenddel kisebb meredekséggel: 297 ± 11 Pa. Az anomális nyomás megjelenését a csepp párolgásának tulajdonítjuk, és két additív taggal írjuk le a Young-Laplace egyenletet kiegészítve (**a**).

Ha az $a = \sqrt{\frac{\gamma}{\rho g}}$ kapilláris hossz a vizsgált rendszer karakterisztikus méreténél nagyobb, akkor a gravitáció elhanyagolható, és a felületi feszültség határozza meg a folyadékcsepp viselkedését. (γ a felületi feszültség, ρ a folyadék sűrűsége, g a gravitációs gyorsulás. 25°C fokon víz esetében $a = 2.7$ mm.) A Young-Laplace egyenlet értelmében a folyadék csak akkor fog lecseppenni, ha a nyomás eléri a $p_c = \frac{2\gamma}{R_p}$ kritikus értéket, ahol R_p a pipetta nyílásának a sugara. Megfigyeléseink a 30. ábrán bemutatott módon eltértek a Young-Laplace egyenlettől. A Laplace nyomás mellett egy additív, anomális nyomás jelent meg, melyet a csepp párolgásának tulajdonítunk:

$$p_1 - p_0 = \frac{2\gamma}{R} + p_{\text{recoil}} + \delta p_v$$

ahol p_1 a folyadékcsepp belsejében mérhető nyomás, p_0 a csepptől távol mért légnyomás, γ a felületi feszültség, R a csepp sugara, p_{recoil} a párolgás következtében a csepp felületére ható visszalökődési nyomás, δp_v pedig a csepp körüli gőztérben felépülő nyomásesés [8]. Esetünkben a párolgás üteméből meghatározott p_{recoil} elhanyagolható volt.

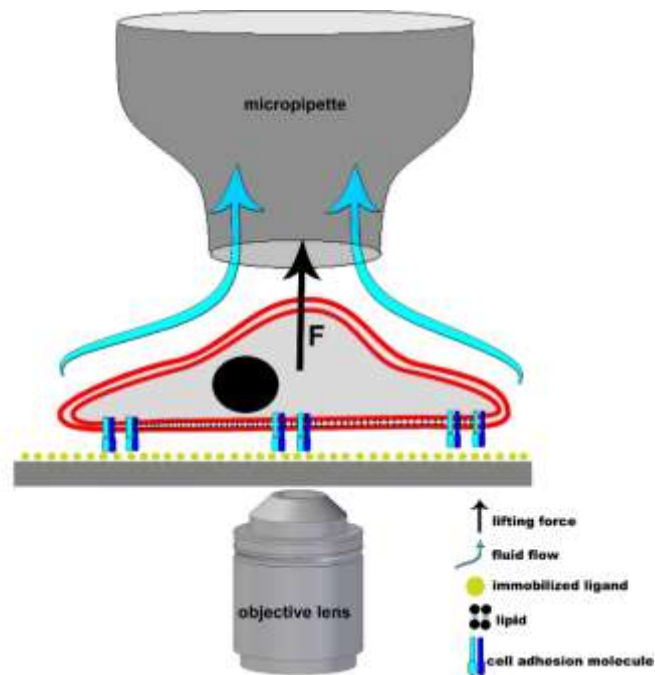


31. ábra. Egyedi sejtek kis cseppekben. Az **a** panel összesen 15 egyedi NE-4C sejtet tartalmazó cseppeket mutat egy vékony üveglemezen az objektívlencse fölött. A cseppek közti távolság 5 mm. Az egyik cseppben lévő sejt fáziskontraszt (b) és fluoreszcens (c) mikroszkópos képe. A nyilak a cseppben lévő sejtre mutatnak. A cseppek térfogata $0.7 \pm 0.03 \mu\text{l}$ illetve $0.37 \pm 0.05 \mu\text{l}$ volt NE-4C illetve monocita sejtek esetében. Az egyedi sejtlerakás hatékonyságát mutató statisztika látható a **(d)** és **(e)** panelen NE-4C sejtekre valamint monocitákra.

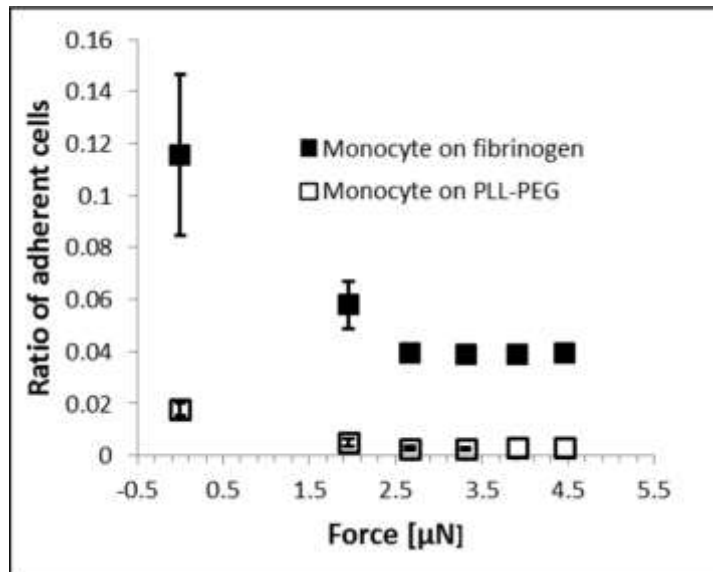
2.3.3 Egyedi sejtek adhéziós erejének mérése

A sejtadhézió a biológia egyik alapvető jelensége, amely létfontosságú a sok sejtes élőlényekben. A specifikus makromolekulák felismerése és a hozzájuk való kötődés a fehérvérsejtek nélkülözhetetlen feladata az immunválasz kiváltása során. Ahhoz, hogy statisztikai értelemben megbízható információt nyerjünk a sejtadhézióról, nagyszámú sejtet kell lemérni. Ugyanakkor az egyedi sejtek adhéziós erejének direkt mérése komoly kihívás, és az ismert technikák áteresztőképessége (*throughput*) igen alacsony: tipikusan napi 5-10 sejt. Az inverz mikroszkópra épített számítógép-vezérelt mikropipettát bevetettük egyedi sejtek specifikus makromolekulákkal való kölcsönhatásának vizsgálatára [9]. A mikropipettában kialakuló áramlás számítógépes szimulációja segítségével kiszámoltuk a célzott

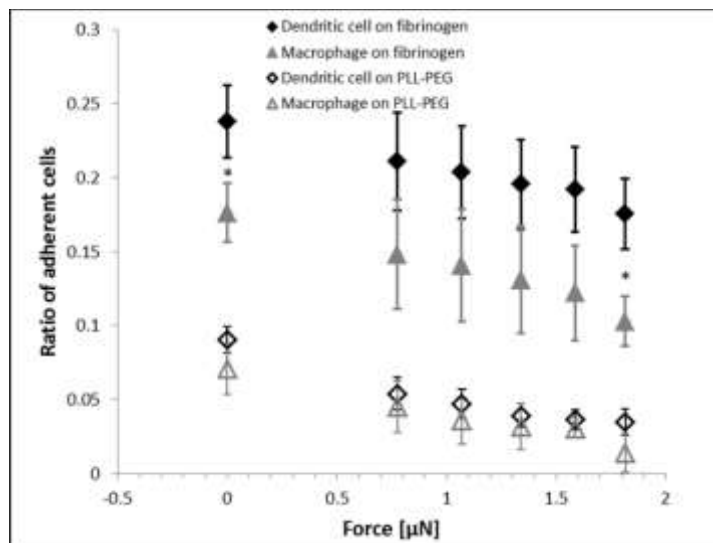
sejtekre ható hidrodinamikai emelő erő becslött értékét. A felületre kitapadt sejtek adhéziós erejét nagy pontossággal tudtuk mérni úgy, hogy többször egymás után, egyre nagyobb vákuum mellett próbáltuk felkapni a pipetta alá pozícionált vizsgálandó sejtet. Az általunk bevezetett módszerrel rövid idő, ~30 perc alatt több száz sejtet mértünk le egyenként, melyek a felületet borító specifikus makromolekulákhoz kapcsolódtak. A nem specifikus sejtadhéziót a fehérjéket taszító PLL-g-PEG polimer bevonattal gátoltuk. Azt találtuk, hogy az emberi primer (vérből preparált) monociták kevésbé tapadnak a fibrinogénhez, mint az *in vitro* körülmények közt differenciáltatott leszármazottaik: a makrofágok és dendritikus sejtek. A legnagyobb átlagos adhéziós erőt a dendritikus sejtek mutatták. Az általunk bevezetett módszert a már bevált hidrosztatikus mikropipetta manipulációs technikával érvényesítettük. Ezen túl az eredményeket megerősítettük standard mikrofluidikai csatornában mérve a kitapadt sejtekre ható nyíró erőt. Az automatizált mikropipetta ugyanakkor nagyobb érzékenységet nyújtott a mikrofluidikai csatornákkal összevetve és kevesebb mellékhatást okozott a sejtekben. Módszerünkkel a vizsgált egyedi sejtek könnyedén felkaphatók, izolálhatók és más technikákkal tovább vizsgálhatók, amely a számítógép-vezérelt mikropipetta határozott előnye. Kísérleteink felfedtek egy a fibrinogénhez erősen kitapadó sejtpopulációt, amely megjelenik a makrofágokban, még jelentősebb hányadát teszi ki a dendritikus sejteknek, de hiányzik a monociták közül.



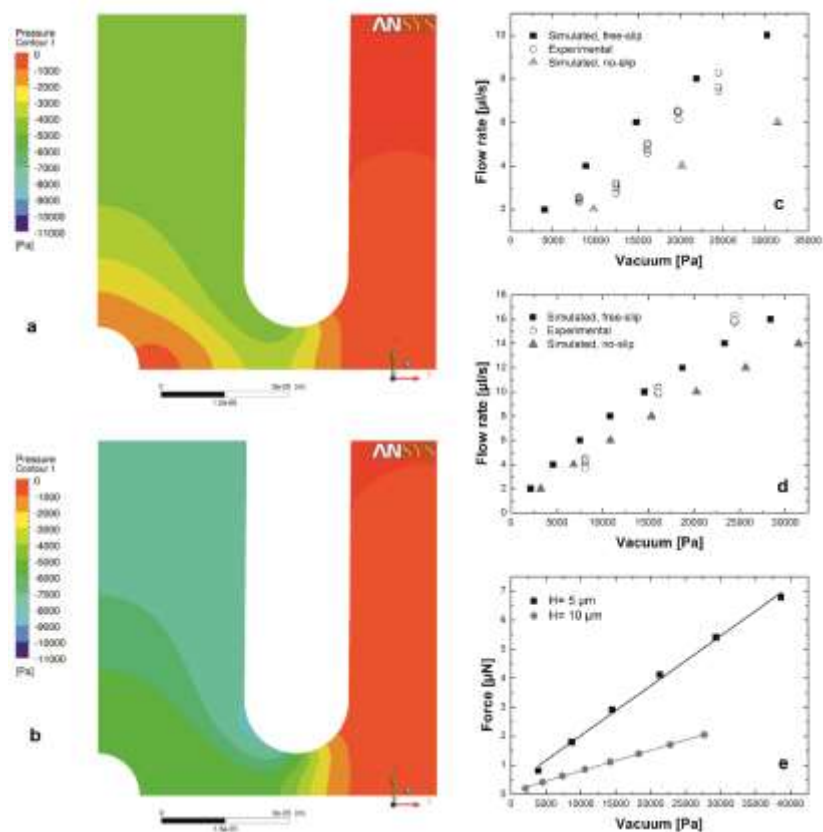
32. ábra. Az egyedi sejtek adhéziós erejét mikropipettával mérő hidrodinamikai módszer sematikus ábrája. A sejtet a sejttaggal és a sejtadhéziós molekulák feltüntetésével ábrázoljuk. A fibrinogénnel bevont műanyag felületet a fehérjéket taszító PLL-g-PEG polimerrel kezeltük, hogy a nem specifikus sejtadhéziót gátoljuk. (A PLL-g-PEG a műanyag fibrinogénnel le nem fedett területeihez tapad, és így gátolja a sejtek tapadását közvetlenül a műanyaghoz.) A felületre kitapadt sejteket beszkeneltük, majd a szoftver a motorizált inverz mikroszkóp által készített képeken felismerte a sejteket. Az objektív lencse a sejt alatt látható. Az ábrán szürkeszínű üveg mikropipetta végigjárta az összes detektált sejtet egyenként. A sejtadhéziót a mikropipettával keltett és nagy pontossággal kontrollált folyadékáramlás segítségével mértük. Hidrodinamikai szimulációk alapján konvertáltuk a mikropipettához csatlakozó fecskendőben beállított vákuum értéket az egyedi sejtekre ható emelő erővé.



33. ábra. A kitapadt monociták aránya fibrinogén és kontroll PLL-g-PEG felületen különböző emelő erők mellett, ahogy azt az automata mikropipettával mértük. Hidrodinamikai szimulációk alapján konvertáltuk a mikropipettához csatlakozó fecskendőben beállított vákuum értéket az egyedi sejtekre ható emelő erővé.

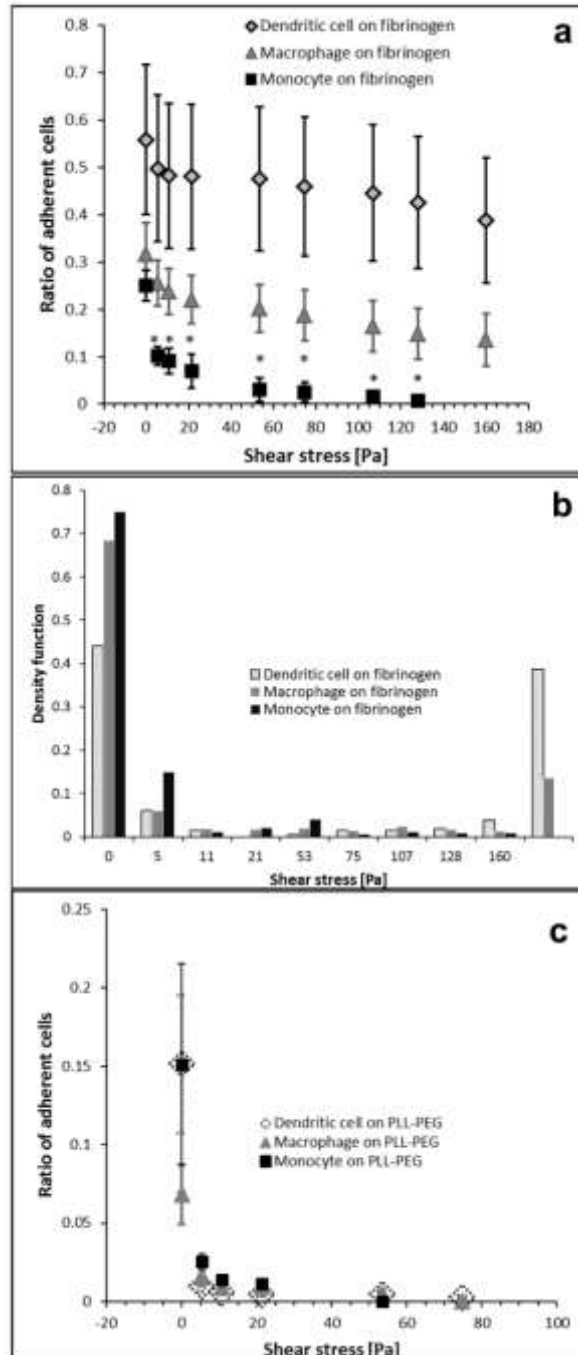


34. ábra. Fibrinogén és kontroll PLL-g-PEG felületen a kitapadt sejtek aránya dendritikus sejtek és makrofágok esetében az emelő elő különböző értékei mellett, ahogy azt az automata mikropipettával mértük. A csillag szignifikáns eltérést jelöl a dendritikus sejtek és a makrofágok közt a fibrinogén felületen ($P < 0.05$ t-próba).

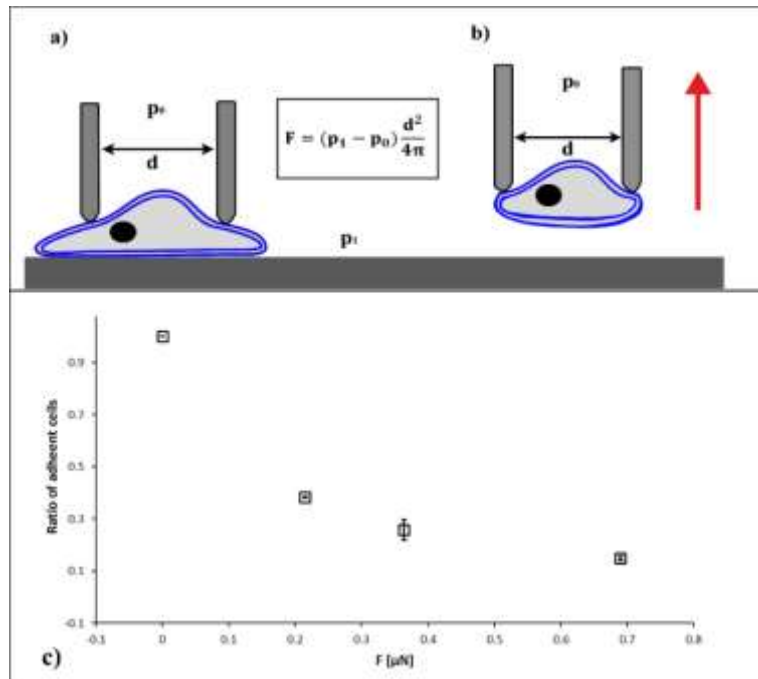


35. ábra. A numerikus szimulációk eredménye. Tipikus nyomás-eloszlás szabadon csúszó **(a)** és meg nem csúszó **(b)** peremfeltételt kiróva a Petri csésze alján. Az áramlási tér hengerszimmetrikus, így az oldalnézeti ábrákon csak a geometria jobb felét mutatjuk. A valóságos sebességprofil (és más lényeges mennyiségek, mint például a nyomásesés) ezen két végletnek megfelelő értékek közé esik. A mikropipetta hegye és a Petri csésze feneké közötti távolság: $H = 10 \mu\text{m}$. Az áramlási ráta $6 \mu\text{l/s}$. A szimulációs eredmények ellenőrzése érdekében összehasonlítottuk a mikropipetta szimulált áramlási rátáját a kísérleti értékekkel a vákuum függvényében $H = 5 \mu\text{m}$ **(c)** és $H = 10 \mu\text{m}$ **(d)** mellett.

Figyelembe vettük a gravitációs, a mikropipettát és a fecskendőt összekötő vékony PTFE csőben fellépő nyomásesés miatti valamint a mikropipettában kialakuló áramlás sebessége folytán fellépő korrekciókat. A Petri csésze fenekén szabadon csúszó peremfeltétellel számolva a kísérleti értékeket jobban közelítő szimulációs eredményeket kaptunk a meg nem csúszó peremfeltétellel összevetve. Ezért a sejtet modellező félgömbre ható emelő erőt **(e)** a szabadon csúszó peremfeltétellel számoltuk ki a mikropipettára kapcsolt vákuum függvényében. Lineáris illesztéssel a következő összefüggést találtuk a hidrodinamikai emelő erő (F_L) és a mikropipettára kapcsolt vákuum (V) közt. $F_L = 0.172 \text{ [nN/Pa]} * V + 311 \text{ [nN]}$ ($R^2 = 0.996$), ha $H = 5 \mu\text{m}$. $F_L = 0.071 \text{ [nN/Pa]} * V + 961 \text{ [nN]}$ ($R^2 = 0.999$), ha $H = 10 \mu\text{m}$. Ezeket az együtthatókat használtuk a kísérleti vákuum értékek becsült emelő erővé való konvertálására.



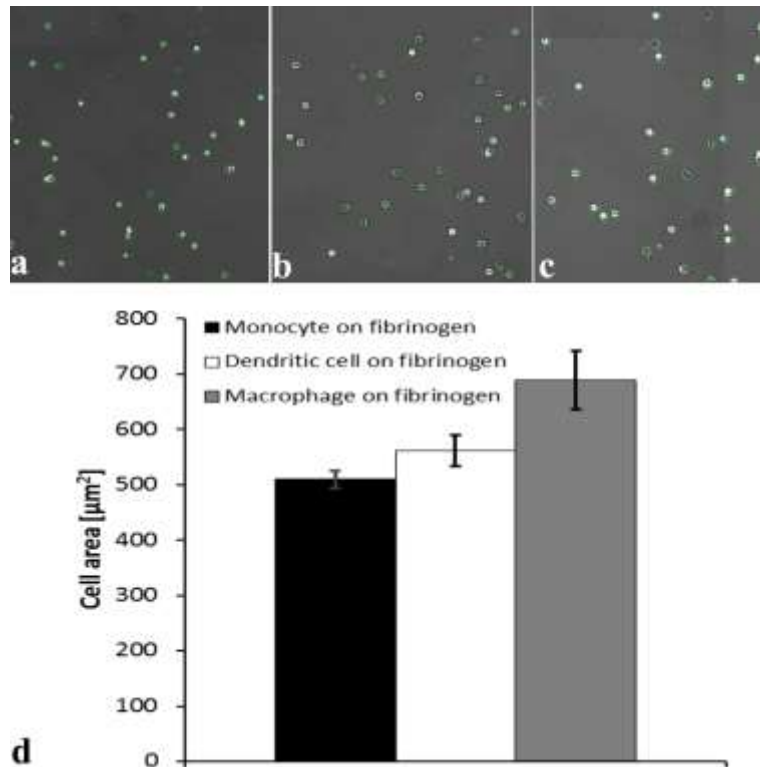
36. ábra. A nyíró erővel végzett kísérletek eredménye. **a**: a kitapadt sejtek aránya dendritikus sejtek, makrofágok és monociták esetében a nyíró feszültség függvényében. A kísérleteket fibrinogénnel bevont, majd PLL-g-PEG-gel inaktivált mikrofluidikai kamrákban végeztük. A csillag szignifikáns eltérést jelöl a monociták és a differenciált sejtek közt a fibrinogénnel ($P < 0.05$ t-próba). A makrofágok és a dendritikus sejtek közti különbség nem volt szignifikáns ebben a kísérletben. **b**: az **a** panelen bemutatott eredmények a sejtek eloszlásának sűrűségfüggvényeként ábrázolva. Ahelyett, hogy a monocitáknál mért eloszlás eltolódna, egy új csúcs jelenik meg a makrofágok és a dendritikus sejtek esetében nagy adhéziós erőnél. **c**: Sejtadhézió a PLL-g-PEG-gel bevont kontroll felületen az **a** panelhez hasonlóképp mérve és bemutatva. A három sejtípus adatai egyetlen görbévé esnek össze ezen a gyengén adherens felületen. A legtöbb sejt már nagyon alacsony nyíró feszültség mellett lemosódik.



37. ábra. Mikropipetta manipulációs technikával (hidrosztatikus körülmények közt) végzett sejtheadhézió mérés egyedi monocitákon. A sejtek adhéziós erejét a következő képletből számoltuk:

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

ahol p illetve p_0 a mikropipetában illetve a Petri csészében lévő nyomás és d a mikropipetta belső átmérője. **a:** az $5 \mu\text{m}$ apertúrájú mikropipettát a fibrinogénnel bevont felületen kitapadt $\sim 15 \mu\text{m}$ -es sejt fölé vittük. A vákuum beállítása után a mikropipettán átfolyó áramlást szabályozó szelepet folyamatosan nyitva tartottuk. A mikromanipulátort joystickkal szabályozva óvatosan megérintettük a sejtet a mikropipetta hegyével. **b:** ezután ismét $30 \mu\text{m}$ -rel a felület fölé emeltük a hegyet. A piros nyíl a mikropipetta mozgását mutatja, miközben a sejtet felemeli. Ha a sejt levált a felületről, áttértünk a következő sejtre. Ha a sejt a felületen maradt, növeltük a vákuumot. A szívó erőt egészen addig emeltük, amíg a sejt levált a felületről. **c:** kiszámoltuk az adott vákuum alkalmazása után még kitapadt sejtek arányát. (A kitapadt sejtek számát az összes lement sejt számával normáltuk. A kísérlet előkészítéskor lemosott sejteket itt nem vesszük figyelembe a mérési hiba csökkentése érdekében. Hogy a grafikon a 33. ábrával összehasonlítható legyen, az adatokat újra kell skálázni, vagyis az egyáltalán kitapadó sejtek számával normálni.) Ezen kísérleteink megerősítették a $70 \mu\text{m}$ -es mikropipetta hidrodinamikai áramlásával mért adhéziós erő nagyságát.



38. ábra. Vizsgáltuk az átlagos sejterület és a sejtheadhéziós erő közti összefüggést. A fibrinogén felületen kitapadt, két különböző donortól származó monocitákat (**a** panel, $n=709$), makrofágokat (**b** panel, $n=2250$), és dendritikus sejteket (**c** panel, $n=2946$) automatikusan detektáltuk a sok látóteres mozaik fáziskontraszt képeken a CellSorter szoftver segítségével. (n a vizsgált sejtek száma.) A sejteket befoglaló keretek (Δx) szélessége és (Δy) magassága alapján a sejtek (A) területét a következőképp becsültük meg:

$$A = (\pi * \Delta x \Delta y) / 4$$

Azokat a ritka eseteket, amikor egynél több sejt került ugyanabba a keretbe, kihagytuk a számolásból. A makrofágok átlagos területe volt a legnagyobb, a monocitáké pedig a legkisebb (**d** panel). Ugyanakkor a legerősebben kitapadt sejtek a dendritikus sejtek voltak, a leggyengébben tapadó pedig a monociták. Így arra a következtetésre jutottunk, hogy nincs nyilvánvaló korreláció a sejtek mérete (területe) és az adhéziós erő közt a vizsgált fehérvérsejtek esetében.

3 Diszkusszió

Automatizált mikroszkópokkal végzett kísérleteinkben élő sejteket vizsgáltunk. Kifejlesztettünk a célnak leginkább megfelelő mikroszkóp-inkubátorokat, melyeket szabadalmaztattunk. Saját programot fejlesztettünk a mikroszkóp és a kiegészítő berendezések *time-lapse* kísérletekben történő automatikus vezérléséhez.

A sejtmag oszcilláló mozgásának hátterét mikrofabrikált biokémiai bevonatokon kutattuk. Amellett érveltünk, hogy a sejtmag oszcillációját a mikrotubulus-dinamika hajtja úgy, hogy a sejtmagra ható erő iránya a centroszóma, azaz a mikrotubulusok központjának a sejtmaghoz képesti pozíciójával változik. Módszerünk a sejtmag vándorlásának fő ismérveit megőrizve képes nagyszámú egyedi sejt szisztematikus vizsgálatára. Kísérleteink elsőként mutatták, hogy pusztán a sejtek alakjának befolyásolásával oszcilláló sejtmagmozgást lehet kiváltani emlős sejtekben.

Vizsgáltuk a miozin-II-es motorfehérje gátlásának a sejtek alakjára és a sejtmag mozgására kifejtett hatását. Meglepő módon ahelyett, hogy a miozin-II-t gátló blebbisztatin csökkentette volna a magmozgást, elnyúlt, bipoláris sejtalakot váltott ki, és fokozta a sejtmagok mozgását. GFP-centrin segítségével jelöltük meg fluorezcensen a centroszómát, és azt láttuk, hogy miozin-II aktivitás mellett a centroszóma rendszerint lemarad a sejtmag mögött, míg ennek híján megelőzi a sejtmagot. A megfigyelések értelmezése céljából egy viszonylag egyszerű viszkoelasztikus modellt alkottunk a sejtvezérlésére, amely aktívan összehúzódó és passzív, összenyomható elemekből áll.

Rögzítettük nagyszámú (aranyhal pikkelyéből származó) keratocita sejt kollektív mozgását. Ezek a szöveti sejtek a halakhoz, madarakhoz vagy marhacsordákhoz hasonló módon rajokba rendeződve mozogtak. A sejtek sűrűségét, azaz az adott területre jutó sejtek számát növelve a rendezetlenből rendezett fázisba történő kinetikus fázisátalakulást figyeltünk meg. A kritikus sűrűség közelében komplex kép alakul ki egymással kölcsönható sejtcsoportokkal. A kísérletek alapján felépítettünk egy pusztán rövid távú kölcsönhatásra alapuló szimulációs modellt, amely folytonos fázisátalakulást mutatott a rendezett fázisba. Mikrofabrikált arénákban látványosan örvénylő kollektív sejtmozgást figyeltünk meg, melyet a szimulációk is reprodukáltak.

Kiterjedt, 3-dimenziós minták vizsgálatához egy új szelektív sík-megvilágítású mikroszkópot (SPIM-et) fejlesztettünk, amely hengerlencse helyett diffrakciós optikával állítja elő a vékony fénysíkot. Az elrendezés egyik előnye, hogy nem kell a minta közvetlen közelébe helyezni a megvilágító egységet, ami egyébként erősen limitálja az eszköz alkalmazhatóságát. Emellett rendkívüli módon leegyszerűsödik a SPIM-ekben szokásos bonyolult megvilágító rendszer, ezáltal a hibaforrások száma és a berendezés költsége is jelentősen csökken. Az általunk fejlesztett eszköz érdemben javította a 3-dimenziós mintákról készült fluorezcens képet a szokásos epifluorezcens megvilágítással összevetve.

Megmutattuk, hogy a fluorezcens és a jelöletlen sejtek is automatikusan detektálhatók mikroszkóp és számítógépes látás (*computer vision*) segítségével Petri csészében, és ezt követően egyenként izolálhatóak egy számítógép-vezérelt mikropipettával. Módszerünk rutinszerűen és nagy szelektivitással alkalmazható FACS-ként egészen az egyedi sejtek szintjéig. A mikropipettában és körülötte a Petri csészében kialakuló folyadékáramlás számítógépes szimulációja megerősítette a kísérletileg tapasztalt válogatási hatékonyságot és a normál FACS-hoz hasonló mértékű sejtkárosító kockázatot.

Az egyedi sejtek automatizált manipulációja és válogatása komoly kihívást jelent, ha a további vizsgálatok, például DNS vagy RNS szekvenálás ép sejteket kívánnak meg. Számítógép-vezérelt

mikroszkópot és mikropipettát használtunk, hogy 80 db PCR (*polymerase chain reaction*) műanyag csövet egyedi sejtekkel töltsünk fel egyetlen működési ciklus alatt. A Laplace nyomás következtében csak egy kritikus nyomás fölött kezd a folyadék a mikropipettából kifolyni, ami megakadályozza a csepp térfogatának pontos szabályozását a mikroliter alatti tartományban. Találtunk egy anomális nyomást, ami hozzáadódik a Laplace nyomáshoz. Ezt a csepp párolgásának tulajdonítjuk. A kritikus cseppentési nyomás problémáját gyors folyadékszelepek egymás utáni, milliszekundumos pontossággal időzített nyitásával oldottuk meg. Az egyedi sejteket parányi cseppekben tettük le. A minimális csepptérfogat 0.4–0.7 μl volt 3-4 sejt/perces válogatási sebesség mellett. A sejtek adhéziós erejét a manipulációk sikere érdekében hangoltuk, így nem volt szükség a sejteket csapdázó mikrostruktúrákra sem.

Ahhoz, hogy statisztikai értelemben megbízható információt nyerjünk a sejtadhézióról, nagyszámú sejtet kell lemérni. Ugyanakkor az egyedi sejtek adhéziós erejének direkt mérése komoly kihívás, és az ismert technikák áteresztőképessége (*throughput*) igen alacsony: tipikusan napi 5-10 sejt. Az inverz mikroszkópra épített számítógép-vezérelt mikropipettát bevetettük egyedi sejtek specifikus makromolekulákkal való kölcsönhatásának vizsgálatára. A mikropipettában kialakuló áramlás számítógépes szimulációja segítségével kiszámoltuk a célzott sejtekre ható hidrodinamikai emelő erő becsült értékét. A felületre kitapadt sejtek adhéziós erejét nagy pontossággal tudtuk mérni úgy, hogy többször egymás után, egyre nagyobb vákuum mellett próbáltuk felkapni a pipetta alá pozícionált vizsgálandó sejtet. Az általunk bevezetett módszerrel rövid idő, ~30 perc alatt több száz sejtet mértünk le egyenként. Azt találtuk, hogy az emberi primer (vérből preparált) monociták kevésbé tapadnak a fibrinogénhez, mint az *in vitro* körülmények közt differenciáltatott leszármazottaik: a makrofágok és dendritikus sejtek. A legnagyobb átlagos adhéziós erőt a dendritikus sejtek mutatták. Az általunk bevezetett módszert a már bevált hidrosztatikus mikropipetta manipulációs technikával érvényesítettük. Ezen túl az eredményeket megerősítettük standard mikrofluidikai csatornában mérve a kitapadt sejtekre ható nyíró erőt. Az automatizált mikropipetta ugyanakkor nagyobb érzékenységet nyújtott a mikrofluidikai csatornákkal összevetve és kevesebb mellékhatást okozott a sejtekben. Kísérleteink felfedtek egy a fibrinogénhez erősen kitapadó sejtpopulációt, amely megjelenik a makrofágokban, még jelentősebb hányadát teszi ki a dendritikus sejteknek, de hiányzik a monociták közül.

4 Szakmai terveim

Az utóbbi öt év nemzetközi tendenciái azt mutatják, hogy az egyedi sejtek vizsgálata rendkívüli mértékben fejlődik, nagy szükség van új technikákra. A biofizikában, biológiában, biokémiában legrangosabb technikai folyóirat, a *Nature Methods* a 2013-as év módszerének választotta az egyedi sejtek szekvenálást. A *Science* és *Nature* folyóiratokban sorra jelennek meg a cikkek ezen a területen. Mindez jól mutatja egy új tudományág születését és a benne rejlő potenciált.

Jelenleg tagja vagyok Horváth Róbert Lendület kutatócsoportjának, elnyertem a Bolyai ösztöndíjat három évre 2013-ban, elnyertük 2015. első félévére a MEDinPROT Szinergia II-es pályázatot Kellermayer Miklóssal, Sándor Noémivel és Székács Innával közösen.

Az alábbi három, még el nem nyert pályázatban vagyok résztvevő:

1. Témavezető: Horváth Róbert, biofizikus, MTA-MFA, ERC pályázat
2. Témavezető: Bajtay Zsuzsa, immunológus, ELTE Immunológiai Tanszék, OTKA pályázat
3. Témavezető: Szabó Ildikó, kémikus, ELTE TTK Kémiai Intézet, OTKA pályázat

A futó és megpályázott projektek szakmai tevével összhangban a következő években az egyedi sejtek automatizált, mikroszkópon történő hidrodinamikai manipulációjára fogok koncentrálni. Ezen belül a következő kísérleteket, fejlesztéseket tervezem:

1. **Szuszpenzióban lévő egyedi sejtek automatikus felismerése és izolálása mikropipettával.** A jelenleg használt eljárásunkban ugyanis kritikus a sejtek felületre történő kitapadása. Ezt tervezem kiiktatni a vékony, kvázi 2-dimenziós folyadékrétegben szuszpendált sejtek válogatásával. A konvekció lényegében megszűnik az olajjal lefedett vékony vízrétegben, így a sejtek rögzítés nélkül sem mozdulnak el, csak Brown-mozgást végeznek. Kis, a sejtek méreténél alig nagyobb keresztmetszetű mikroipettával elvégeztük a bevezető kísérleteket, melyek igen biztatóak. Eredményeink közel állnak a publikációhoz.
2. **Olaj környezetben pikoliteres vízcseppekbe zárjuk az egyedi sejteket speciális mikrofluidika nélkül, majd az egy-sejt kapszulákat a mikroszkópos kép alapján mikropipettával válogatjuk.** A jelenleg elterjedt eljárás szerint mikrofluidikai csatornák, elágazások segítségével zárnak egyedi sejteket pikoliteres, nanoliteres vízcseppekbe olaj környezetben²⁷. Egy másodperc alatt sok ezer egy-sejt kapszula legyártható, melyeken aztán speciális, ún. *lab-on-a-chip* kísérletek végezhetők. A mi rendszerünkben hasonló egy-sejt kapszulákat állítottunk elő hasonló hozammal, de pusztán a mikropipetta felhasználásával speciális mikrofluidika nélkül. A Petri csésze aljára kitapadnak a (sejteknél alig nagyobb) vízcseppek, melyeket automatikus detektálás és szelektálás után képesek vagyunk egyenként felszedni. Eredményeink közel állnak a publikációhoz.
3. **Immunsejtek specifikus makromolekulákkal történő kölcsönhatásának vizsgálata számítógép-vezérelt mikropipettával.** Az ELTE Immunológiai Tanszékével együttműködve vizsgáljuk különböző emberi immunsejtek kölcsönhatását fibrinogénnel és más makromolekulákkal. A műanyag és üveg felületek nem bevont régióit a fehérje- és sejttaszító PLL-g-PEG mesterséges polimerrel inaktíváljuk. Az inaktíválás minősége döntő fontosságú, tervezzük bevetni a PLL-g-PEG-nél is hatékonyabb, nemrég publikált szilán alapú bevonatokat

²⁷ J. Clausell-Tormos et al.: Droplet-Based Microfluidic Platforms for the Encapsulation and Screening of Mammalian Cells and Multicellular Organisms, *Chemistry and Biology* 15, 427 (2008)

²⁸. Két hasonló, de eltérő funkciójú integrin receptor szerepét kívánjuk tisztázni monocitákban, makrofágokban és dendritikus sejtekben. Egy eddig ismeretlen természetes gyulladásgátló mechanizmust sejtünk a háttérben. A jövőben B sejteket is tervezünk vizsgálni, melyeknél az ún. komplement rendszer molekuláival való kölcsönhatást fogjuk mérni.

²⁸ B. Hua et al.: An improved surface passivation method for single-molecule studies, Nature Methods 12, 1233 (2014)

5 Tézisek

1. Megmutattam, hogy az automatizált mikroszkópia a sejtmag vándorlásának fő ismérveit megőrizve képes nagyszámú egyedi sejt szisztematikus vizsgálatára mikrofabrikált biokémiai bevonatokon.
2. Kísérleteim elsőként mutatták, hogy pusztán a sejtek alakjának befolyásolásával oszcilláló magmozgást lehet kiváltani emlős sejtekben.
3. Ahelyett, hogy a miozin-II-t gátló blebbisztatin csökkentette volna a magmozgást, elnyúlt, bipoláris sejtalakot váltott ki, és fokozta a sejtmagok mozgását.
4. Miozin-II aktivitás mellett a centroszóma rendszerint lemarad a sejtmag mögött, míg ennek híján megelőzi azt.
5. Rögzítettem nagyszámú (aranyhal pikkelyéből származó) keratocita sejt kollektív mozgását.
6. A sejtek sűrűségét, azaz az adott területre jutó sejtek számát növelve a rendezetlenből rendezett fázisba történő kinetikus fázisátalakulást figyeltem meg.
7. Mikrofabrikált arénákban látványosan örvénylő kollektív sejtmozgást figyeltem meg, melyet számítógépes szimulációk is reprodukáltak.
8. 3-dimenzióban kiterjedt minták vizsgálatához egy új szelektív sík-megvilágítású mikroszkópot fejlesztettem, amely hengerlencse helyett diffrakciós optikával állítja elő a vékony fénysíkot, és érdemben javította a képalkotást a szokásos epifluoreszcens megvilágítással összevetve.
9. Megmutattam, hogy a fluoreszcens és a jelöletlen sejtek is detektálhatók automatizált mikroszkóp és számítógépes látás (*computer vision*) segítségével Petri csészében, és ezt követően egyenként izolálhatóak számítógép-vezérelt mikropipettával.
10. A számítógép-vezérelt mikropipetta rutinszerűen és nagy szelektivitással alkalmazható FACS-ként egészen az egyedi sejtek szintjéig.
11. Megmutattam, hogy a számítógép-vezérelt mikroszkóp és mikropipetta képes a kis vízcseppekbe zárt élő sejteket jó hatékonysággal és nagy áteresztőképességgel egyenként műanyag csövekbe helyezni.
12. A kritikus cseppentési (Laplace) nyomás problémáját gyors folyadékszelepek egymás utáni, milliszekundumos pontossággal időzített nyitásával oldottam meg a csepp térfogatának csökkentése érdekében.
13. Az automatizált mikropipetta segítségével specifikus makromolekulákra kitapadt immunsejtek adhéziós erejét nagy érzékenységgel és nagy áteresztőképességgel mértük.
14. Az általam bevezetett sejtdhéziót mérő módszert a már bevált manuális hidrosztatikus mikropipettával érvényesítettük.

Hivatkozások

- [1]. Csiszér Miklós, Selmeczi Dávid, Szabó Bálint, Vicsek Tamás: Eljárás és inkubátor élő sejtek mikroszkópos megfigyeléséhez (Incubator and procedure for observing living cells with microscope) Szabadalmi lajstromszám: HU227211. Benyújtás éve: 2007. Közzététel éve: 2009. Benyújtás helye: Magyarország.
- [2]. B. Szabó, Zs. Környei, J. Zách, D. Selmeczi, G. Csúcs, A. Czirók and T. Vicsek: Auto-reverse nuclear migration in bipolar mammalian cells on micropatterned surfaces, *Cell Motility and the Cytoskeleton* 59(1), 38-49 (2004)
- [3]. B. Szabó, R. Ünneper, K. Markó, Z. Környei, E. Méhes, A. Czirók: Inhibition of myosin II triggers morphological transition and increased nuclear motility in cell culture, *Cytoskeleton* 68(6), 325-39 (2011)
- [4]. B. Szabó, G. Szőlósi, B. Gönci, Zs. Jurányi, D. Selmeczi, and T. Vicsek: Phase transition in the collective migration of tissue cells: experiment and model, *Phys Rev E* 74, 061908 (2006)
- [5]. Szabó Bálint, Vicsek Tamás: Gerjesztő berendezés szelektív sík megvilágítású mikroszkóphoz, valamint ilyen gerjesztő berendezéssel ellátott mikroszkóp (EXCITING EQUIPMENT FOR SELECTIVE PLANE ILLUMINATION MICROSCOPE, AS WELL AS MICROSCOPE HAVING SUCH EQUIPMENT) NSZO: G02B 21/00, G02B 21/06. Ügyszám: P0900540. Benyújtás éve: 2009. Közzététel éve: 2011. Benyújtás helye: Magyarország.
- [6]. Z. Környei, S. Beke, T. Mihálffy, M. Jelítai, K. J. Kovács, Z. Szabó, B. Szabó: Cell sorting in a Petri dish controlled by computer vision, *Scientific Reports* 3, Article number: 1088 (2013)
- [7]. Szabó Bálint: Objektívhez képest pozícionált pipettarögzítő elrendezés, valamint eljárás a pipetta pozícionálására (PIPETTE FASTENING ARRANGEMENT POSITIONED TO AN OBJECTIVE AND METHOD FOR POSITIONING A PIPETTE). Szabadalmi lajstromszám: 228969. Benyújtás éve: 2010. Közzététel éve: 2012. Benyújtás helye: Magyarország.
- [8]. R. Salánki, T. Gerecsei, N. Orgovan, N. Sándor, B. Péter, Z. Bajtay, A. Erdei, R. Horvath, B. Szabó: Automated single cell sorting and deposition in submicroliter drops, *Appl. Phys. Lett.* 105, 083703 (2014)
- [9]. R. Salánki, C. Hős, N. Orgovan, B. Péter, N. Sándor, Z. Bajtay, A. Erdei, R. Horvath, B. Szabó: Single cell adhesion assay using computer controlled micropipette, *PLoS ONE* 9(10): e111450 (2014)