

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2110.

BARNA LÁSZLÓ

Neuromorfológia és sejtbiológia
című program

Programvezető: Dr. Palkovits Miklós, professor emeritus

Konzulens: Dr. Katona István, tudományos tanácsadó

Molekuláris képalkotás korrelatív konfokális és STORM szuperfelbontású mikroszkópia segítségével

Doktori értekezés

Barna László

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Konzulens:

Dr. Katona István, az MTA doktora,
tudományos tanácsadó

Hivatalos bírálók:

Dr. Ábrahám István, az MTA doktora,
egyetemi tanár

Dr. Schay Gusztáv, PhD, tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Réthelyi Miklós, az MTA doktora,
ny. egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Kittel Ágnes, az MTA doktora,
tudományos tanácsadó

Dr. Osváth Szabolcs, PhD,
tudományos főmunkatárs

Budapest

2017

Tartalom

1. BEVEZETÉS.....	9
1.1. Fényelhajlás-korlátozott felbontású fénymikroszkópia	11
1.2. Szuperfelbontású fénymikroszkópia.....	15
1.2.1. Kényszerített Emissziós Kioltási Mikroszkópia (STED).....	16
1.2.2. Strukturált megvilágításon alapuló mikroszkópia (SIM).....	19
1.2.3. Egyedi Molekula Lokalizációs Mikroszkópia (PALM és STORM).....	21
1.3. STORM mikroszkópia az idegtudományokban.....	38
1.3.1. A retrográd szinaptikus jelátvitel	39
1.3.2. Az endokannabinoid rendszer felépítése.....	40
1.3.3. A 2-AG-közvetítette endokannabinoid jelátvitel	42
1.3.4. A 2-AG jelpálya nanoskálájú szerveződésének kórélettani jelentősége	43
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	45
3. MÓDSZEREK.....	48
3.1. Minta előkészítés az elektrofiziológiai és anatómiai kísérletekhez	48
3.1.1. HEK293 sejtek kezelése, transzfekciója és immunfestése.....	48
3.1.2. Szövetpreparátum készítése immunfestéshez	49
3.1.3. Akut, túlélő agyszelet preparátum készítése és elektrofiziológiai elvezetések	49
3.1.3. Egerek krónikus THC kezelése	50
3.2. Szöveti minták immunfestése	51
3.2.1. Akut, túlélő szeletekben biocitinnel töltött sejtek előhívása	51
3.2.2. Immunfestés STORM mikroszkópiára	51
3.2.3. Antitest jelölése aktivátor-riporter STORM képalkotáshoz.....	52
3.3. Konfokális és korrelatív konfokális STORM képalkotás	52

3.3.1. Képképzés biocitinnel töltött sejtekről	52
3.3.2. Korrelatív konfokális és STORM képképzés	52
3.3.3. A 3D kalibrációs görbe meghatározása.....	55
3.4. Konfokális és korrelatív konfokális/STORM képelemzés	57
3.4.1. Konfokális Z-sorozatok dekonvolúciója, transzformációja	57
3.4.2. A STORM képek analízise.....	57
3.4.3. Biocitinnel jelölt sejtek axonterminálisainak korrelatív konfokális és STORM képeinek elemzése.....	59
3.4.4. A STORM mikroszkópiás képek megjelenítése	59
3.5. Személyes hozzájárulás	60
4. EREDMÉNYEK.....	62
4.1. A STORM mikroszkópos képképzés optimalizálása sejt kultúrában és idegszövet preparátumon	62
4.1.1. A képképzés optimalizálása felbontás alatti méretű fényforrásokkal. A megvilágítás centrálása, az objektív korrekciós gyűrűjének beállítása, a megvilágítás szögének beállítása, 3D kalibráció, kromatikus aberráció korrekció.....	62
4.1.2. A Nikon N-STORM mikroszkóp felbontásának mérése.....	65
4.1.3. A STORM mikroszkópia kvantitatív tulajdonságainak vizsgálata	67
4.1.4. Mintakezelési és festési módszer kidolgozása idegszövet esetében	69
4.1.5. A STORM képképzési paraméterek optimalizálása agyszövet esetében	71
4.1.6. A CB ₁ receptor jelölés specificitásának vizsgálata egér hippocampusban STORM képképzésben	75
4.1.7. CB ₁ festés mennyiségi vizsgálata agyszövetben különböző minta előkészítési körülmények között.....	77
4.1.8. A STORM képképzésének felbontását befolyásoló paraméterek vizsgálata CB ₁ immunfestett idegszövet preparátumban	79
4.2. Korrelatív konfokális és egyedi molekula lokalizációs szuperfelbontású fénymikroszkópia.....	81

4.2.1. A korrelatív konfokális és egyedi molekula lokalizációs mikroszkóp felépítése.....	81
4.2.2. A korrelatív konfokális és STORM képalkotás	85
4.3. Korrelatív konfokális és STORM mikroszkópos képek megjelenítése adatalemzések a vividSTORM szoftverrel	87
4.3.1. VividSTORM korrelatív konfokális és STORM szuperfelbontású mikroszkópos analízis program.....	87
4.3.2. Konfokális és STORM képek egymásra illesztése VividSTORM-ban	90
4.3.3. A releváns STORM lokalizációs pontok kiválasztása VividSTORM-ban ...	92
4.3.4. Molekuláris távolságok mérése egyedi molekula lokalizációs mikroszkópos képeken.....	94
4.3.5. Konvex burkoló két pontja között mért legrövidebb felszín menti távolság számítása	96
4.3.6. Molekuláris sűrűségek mérése lokalizációs mikroszkópos képeken.	97
4.3.7. Klaszterezettség vizsgálata lokalizációs mikroszkópiás képeken	100
4.3.8. Receptor internalizáció mérése CB ₁ -pozitív interneuron terminálisokban .	102
4.3.9. A STORM képalkotás kiterjesztése további szövettípusokra	103
5. MEGBESZÉLÉS	106
5.1. A STORM egyedi molekula lokalizációs mikroszkópia optimalizálása idegszöveti képalkotásra	107
5.1.1. STORM mikroszkóp beállítása az optimális képalkotáshoz.....	107
5.1.2. A STORM mikroszkóp felbontásának mérése.....	108
5.2. A STORM képalkotás kvantitatív tulajdonságainak vizsgálata.....	110
5.3. Hippokampális agymetszetek STORM képalkotása.....	111
5.4. Korrelatív konfokális és egyedi molekula lokalizációs mikroszkópia	113
5.5. Korrelatív konfokális és egyedi molekula lokalizációs mikroszkópos képek analízise	115

6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	118
7. ÖSSZEFOGLALÁS	119
8. SUMMARY	120
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	121
10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	140
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	142

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACSF	Mesterséges agy-gerincvelői folyadék (Artificial Cerebrospinal Fluid)
AF647	Alexa Fluor 647 (fluoreszcens festék)
CA	Ammon-szarv (Cornu Ammonis), a hippocampus egy alrégiója
CARS	Koherens Anti-Stokes Raman spektroszkópia (Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy)
Cy3	Cyanine3 (fluoreszcens festék)
DAG	1,2-diacil-glicerin
DIC	Differenciál interferencia kontraszt mikroszkópia (Differential Interference Contrast)
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DPBS	Dulbecco-féle foszfát-pufferelt sóoldat (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)
dSTORM	Közvetlen sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia (direct STORM)
EMCCD	Elektron-sokszorozó töltés-kapcsolt eszközzel rendelkező kamera (Electron Multiplying Charge-Coupled Device)
GFP	Zöld fluoreszcens fehérje (Green Fluorescent Protein)
GPCR	G-fehérje kapcsolt receptor (G-protein coupled receptor)
HEK293	Humán embrionális vese sejtvonat (Human Embryonic Kidney cell line)
HEPES	4-(2-hydroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav
HILO	Erősen ferde megvilágítás (Highly Inclined Illumination)
HSA	Humán szérum albumin

ICS	Mikroszkópos képformátum (Image Cytometry Standard)
IP3	Inozitol-1,4,5-triszfoszfát
JZL184	4-nitrofenil-4-[bis(1,3-benzodioxol-5-il)(hidroxi)metil]piperidin-1-karboxilát, monoacilglicerin lipáz gátlószer
KO	Génkiütött egér (knockout mice)
LIIT	Hosszúszigeti Jegestea (Long Island Iced Tea)
LP	Lokalizációs pont (Localization Point)
NA	Numerikus Apertúra
NLP	Lokalizációs pontok száma (Number of Localization Points)
PALM	Photoactivated Localization Microscopy
PB	Foszfát-puffer (Phosphate Buffer)
PF3845	N-3-piridinil-4-([3-([5-(trifluorometil)-2-piridinil]oxi)fenil]metil)-1-piperidinkarboxamid, zsírsavamid hidroláz gátlószer
PFA	Paraformaldehid
PFS	Fókusz-zár rendszer (Perfect Focus System)
PIP2	Foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
PLC β	Foszfolipáz C β
PSF	Pontátviteli függvény (Point Spread Function)
PV ^{+,-}	Parvalbumin-pozitív, illetve parvalbumin-negatív
ROI	Leképezendő terület a mintában (Region Of Interest)
sCMOS	Tudományos komplementer fém-oxid félvezető kamera (Scientific Complementary Metal–Oxide–Semiconductor)

SHG	Másodharmónikus keltéses mikroszkópia (Second Harmonic Generation microscopy)
SIM	Strukturált megvilágításon alapuló mikroszkópia (Structured Illumination Microscopy)
SMLM	Egyedi molekula lokalizációs mikroszkópia (Single Molecule Localization Microscopy)
SSIM	Telített strukturált megvilágításon alapuló mikroszkópia (Saturated Structured Illumination Microscopy)
STED	Kényszerített emissziós kioltási mikroszkópia (Stimulated Emission Depletion Microscopy)
STORM	Sztocasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)
TBS	Trisz-pufferelt sóoldat (TRIS-buffered saline)
THC	Δ 9-tetrahidrokannabinol
TIRF	Teljes felszíni visszaverődés fluoreszencia (Total Internal Reflection Fluorescence)
TOM20	mitokondriális külső membrán transzlokáz 20 (Translocase of Outer Membrane 20)
TRISZ	Trisz(hidroximetil)-aminometán
WT	Vad típusú egér (wild-type mice)
$W_{x,y}$	A pontátviteli függvény x és y irányú félérték-szélessége

1. BEVEZETÉS

Az idegrendszer működése az idegsejtek és a gliasejtek térben, valamint időben precízen összehangolt szinaptikus és nem-szinaptikus jelátviteli folyamatain alapszik. Napjaink egyik legforróbb idegtudományi kutatási irányzata például a konnektomika, amely a számos jelátviteli kapcsolat közül az idegsejtek közötti kémiai szinapszisok térbeli azonosítására fókuszálva huzalozási térképet készít az egyes neuronhálózatokról (Schröter és mtsai., 2017). A *C. elegans* talajféreg idegrendszerében mindössze 302 idegsejt és körülbelül 7500 szinaptikus kapcsolat található (White és mtsai., 1986). Érdekes módon még ez a viszonylag egyszerű idegsejthálózat is képes nagyon bonyolult érzékelési folyamatok és viselkedési formák kódolására. Az emberi agy nagyságrendekkel összetettebb felépítésű. Körülbelül 86 milliárd neuronja (Azevedo és mtsai., 2009), amelyek feltehetően több száz vagy akár ezernél is több eltérő típusba sorolhatóak (Poulin és mtsai., 2016) körülbelül 1.5×10^{14} szinapszist formálnak egymással. Azonban az idegrendszer működésének megértéséhez nem elegendő a kapcsolatrendszerek feltérképezése, mert a szinapszisok hatékonysága nem állandó térben és időben. A szinaptikus jelátviteli folyamatok hatékonyságának folyamatos, aktivitás-függő módon szabályozott változása pedig nélkülözhetetlen többek között az összetett kognitív folyamatok megvalósulásához is. Ezért az idegsejtek közötti kapcsolatrendszerek anatómiai feltérképezése mellett a szinaptikus kapcsolatok molekuláris és élettani vizsgálata szintén régóta az idegtudományi kutatások fókuszában áll, és alapvető fontosságú, hogy megérthessük az idegrendszer működésének és betegségeinek hátterében álló jelátviteli folyamatokat.

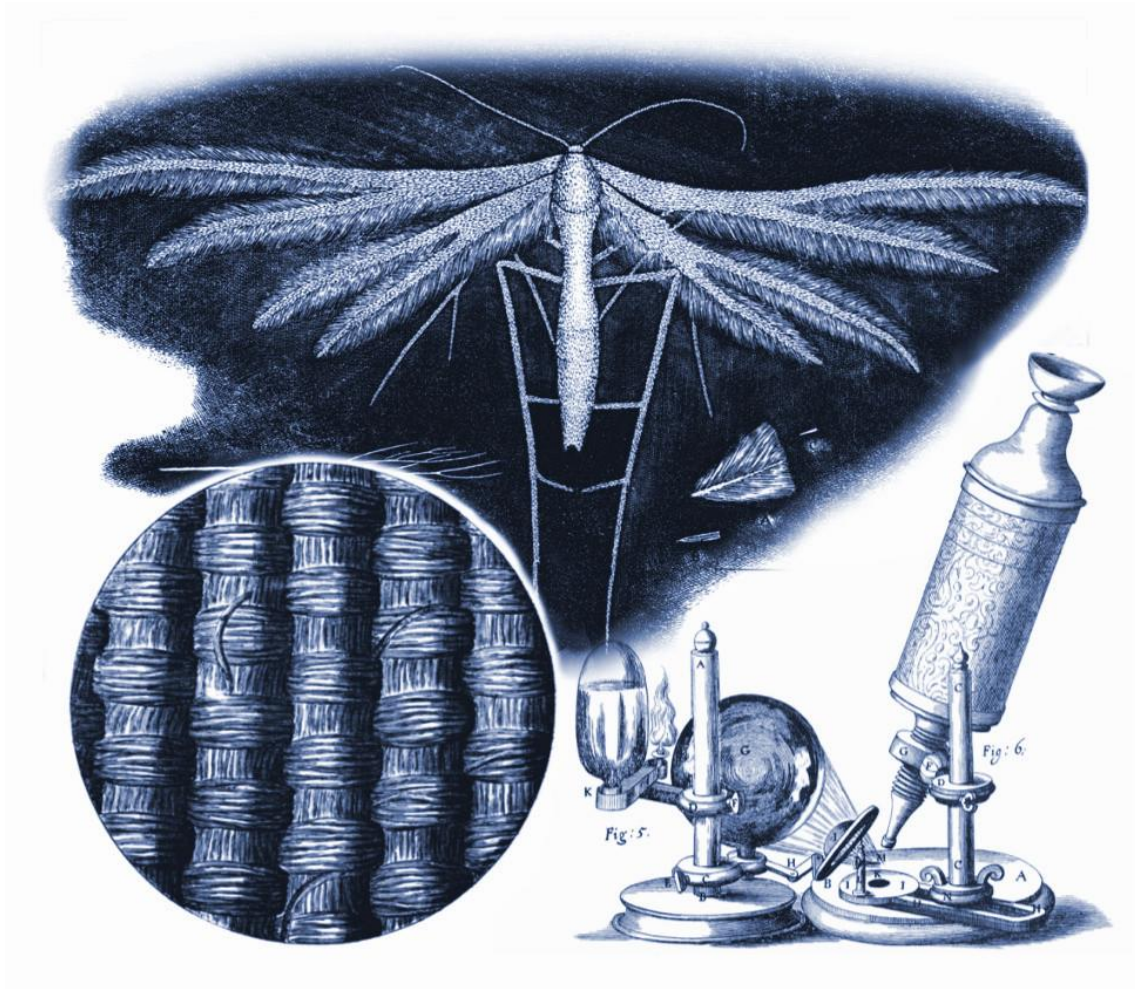
A kémiai szinapszisok molekuláris összetétele, morfológiai felépítése, jelátviteli hatékonysága jelentős mértékben függ az adott szinapszis és a szinapszist létrehozó két idegsejt aktivitásmintázatának történetétől. Ez a tény jelentősen megnöveli az adott biológiai paraméterek variabilitását. Ezért a kémiai szinapszisok kutatásának egyik fontos célkitűzése, hogy képesek legyünk a lehető legpontosabban egyedileg megmérni a vizsgálni kívánt molekuláris, anatómiai és fiziológiai paramétereket, valamint élettani és kórélettani folyamatokkal asszociált megváltozásukat. Azonban ennek a célnak az elérését technikailag rendkívül megnehezíti a szinapszisok nagy száma egy adott neuronhálózatban, illetve sejtípus-függő és aktivitás-függő sokféleségük mellett a kémiai szinapszis rendkívül kis mérete is. A szinaptikus rés azaz a két idegsejt sejthártyája

közötti távolság például átlagosan mindössze 20 ± 2.8 nm; a klasszikus aminosav transzmittereket tartalmazó szinaptikus hólyagocskák átmérője mindössze 35 ± 0.3 nm; a preszinaptikus aktív zóna hosszúsága pedig 300 ± 150 nm (Ribault és mtsai., 2011). Ezek a mérettartományok azonban már a határán vannak vagy akár kívül is esnek a hagyományos molekuláris képalkotási eljárások, például a napjainkban legelterjedtebb konfokális mikroszkópia térbeli felbontási korlátain. Ráadásul az idegrendszeri betegségekkel kapcsolatos molekuláris változások mérettartománya szintén nanoskálájú lehet. Például kutatócsoportunk nemrég felfedezte, hogy a retrográd szinaptikus jelátvitelben fontos endokannabinoid jelpálya egyik fontos molekuláris alkotóeleme, az endokannabinoid-szintetizáló diacilglicerinnél lipáz- α enzim a szinapszisokon belül 100 nm-el távolabb kerül a Törékeny X szindróma elnevezésű, súlyos szellemi fogyatékossgal járó betegség egérmodelljében (Jung és mtsai., 2012). Ez a látszólag apró térbeli változás az endokannabinoid-mediálta hosszú távú szinaptikus plaszticitás teljes hiányát eredményezte szinapszis típus-specifikus módon a beteg egerekben.

A kémiai szinapszisok egészséges és kóros működésének hátterében álló molekuláris folyamatok tanulmányozásához tehát olyan módszerekre van szükség, amelyekkel lehetővé válik az egyedi szinapszisokban egy adott jelpályában kulcsszerepet játszó molekuláris alkotóelemek térbeli eloszlásának és mennyiségi változásainak lehető legnagyobb pontosságú, nanométeres tartományokban történő mérése. További fontos cél, hogy ezek a vizsgálatok olyan szövetpreparátumokban történjenek, amelyekben a neuronhálózatok molekuláris és celluláris felépítése minél jobban tükrözi az eredeti *in vivo* állapotot és így értékes sejttípus- és szubcelluláris kompartment-specifikus információkhoz juthassunk az adott szinapszis típusok működéséről. Végül szintén fontos szempont, hogy a molekuláris mérések a morfológiai és az élettani vizsgálatokkal párhuzamosan lehetőleg ugyanazokból a szinapszisokból gyűjtsenek adatokat, mert az egyes paraméterek változásai közötti korrelációk feltárása segítség lehet a molekuláris folyamatok és az élettani jelenségek közötti ok-okozati kapcsolatokat igazoló célzott kísérletek tervezéséhez. Ezért doktori munkám során egy olyan módszertani eljárást dolgoztam ki kollégáimmal együttműködésben, amelyben az ideglettani mérések és az egyedi idegsejtek szelektív jelölése anatómiai kísérletekre egy olyan új szuperfelbontású fénymikroszkópiával kombinálható, amelynek molekuláris képalkotási pontossága 20 nm körül van és ezért a fenti célok elérésére lehetőséget ad.

1.1. Fényelhajlás-korlátozott felbontású fénymikroszkópia

A természettudományos érdeklődés kikényszerítette, a XVII. század technikai színvonala pedig lehetővé tette annak az eszköznek a megjelenését, amely olyan részleteket tett láthatóvá az élő és az élettelen anyag szerkezetéről, amelyre az emberi szem önmagában már nem képes. A fénymikroszkóp feltalálásában két úttörő személyiség az angol Robert Hooke (1638–1703) és a holland Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) voltak. Hooke *Micrographia* című könyvében (Hooke, 1664) ismertette az általa használt mikroszkóp felépítését és megmutatta biológiai és anyagtudományi felhasználhatóságát is (1. ábra).



1. ábra Illusztrációk Robert Hooke 1664-ben megjelent *Mikrográfia* cikkéből (Hooke, 1664 módosítva).

Leeuwenhoek nevéhez pedig számos felfedezés például a mikrobiológiát megalapozó megfigyelések sorozata köthető. A későbbi fejlesztések elsősorban az egyre nagyobb részletgazdagságú kép elérésére irányultak, azaz a felbontás növelésére, amit a nagyítás növelésével kívántak elérni. Kiderült azonban, hogy az egyre nagyobb nagyítások nem feltétlenül járnak a kép részletgazdagságának növekedésével. A felbontás növekedésének korlátot szabó jelenségre először George Airy (1801-1892) mutatott rá a kis nyíláson áthaladó fény elhajlásából származó mintázatról (az úgynevezett Airy-korongról) szóló munkájában (Airy, 1835). Az Airy-korongok mérete megszabja a felbontási határt.

A fénymikroszkópia (illetve bármely hullám mikroszkópia) felbontásának fényelhajlás miatti korlátozottságának teljes matematikai leírását végül Ernst Abbe (1840-1905) adta meg. Legismertebb munkájában kimutatta, hogy a felbontóképesség nem lehet nagyobb, mint a használt fény hullámhosszának a fele (Abbe, 1873). Későbbi dolgozataiban a felbontásra vonatkozó képlet kiegészült a törésmutatóval (n) és a fókuszált fénykúp szögével (α), illetve a numerikus apertúrával ($NA = n * \sin \alpha$):

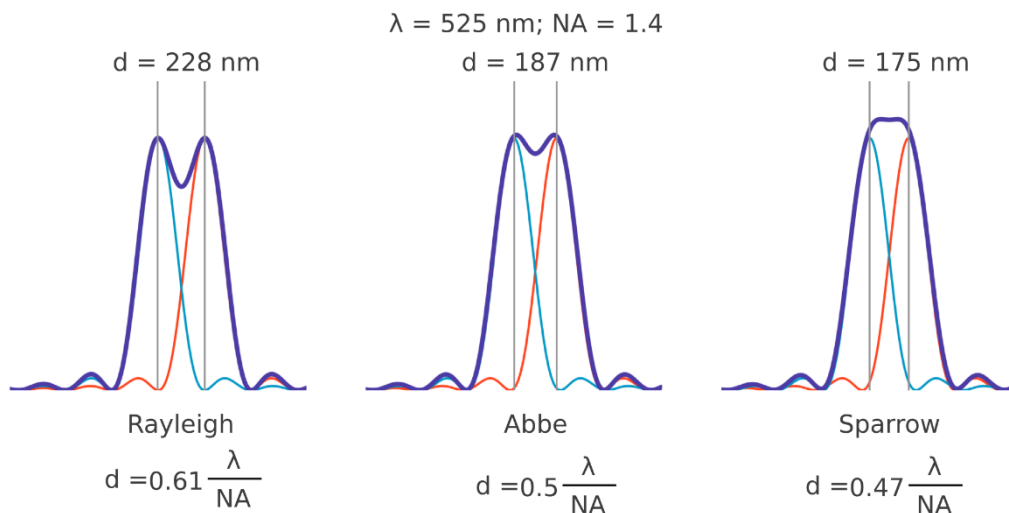
$$d_{xy} = \frac{\lambda}{2NA} = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad (1)$$

A felbontás definíciója kissé önkényes, így nem véletlen, hogy felbukkantak más, de mégis nagyon hasonló definíciók erre a kritikus paraméterre. Jelenleg a leginkább használt a Lord Rayleigh (1842-1919)-féle megközelítés, amely szerint két pont akkor megkülönböztethető, ha az egyik pont fényelhajlási képének, azaz pontátviteli függvényének (PSF; Point Spread Function) maximuma a másik pont képének első minimumával esik egybe. A Sparrow-féle definíció szerint pedig a két PSF képe között eltűnik a helyi minimum érték és az összeggörbe ellaposodik (2. ábra).

Egy tipikusan használt hullámhosszt (525 nm) és az egyik legmagasabb numerikus apertúrájú olajos objektívet figyelembe véve tehát a fénymikroszkópia laterális (XY síkra vonatkozó) feloldása 200 nm körül van. A PSF egy háromdimenziós függvény, amelyre jellemző, hogy az axiális (Z irányú, vagy optikai tengely irányú) kiterjedése nagyobb a laterálisnál, így ebben az irányban a képalkotás alacsonyabb felbontású:

$$d_z = \frac{2\lambda}{(n \sin \alpha)^2} = \frac{2\lambda}{NA^2} \quad (2)$$

($\lambda = 525 \text{ nm}$ és $NA = 1.4$, $d_z = 535 \text{ nm}$). A képletekből világosan látszik, hogy a felbontás növeléséhez csökkenteni kell a hullámhosszt vagy növelni a numerikus apertúrát. A hullámhossz csökkentés nagy kihívás elé állítja az objektív tervezőket, mert az ultraviola irányában az üvegek átlátszósága drámaian csökken, ezenkívül a biológiai minták elpusztulnak vagy degradálódnak a nagyenergiájú sugárzástól. A numerikus apertúra növelése sem megoldható geometriai okokból és a magas törésmutatójú közeg előállításának nehézségei miatt.



2. ábra A felbontási határ három különböző definíciója és a hozzájuk tartozó képletek (Rayleigh, Abbe, Sparrow). Két pontszerű forrás képének laterális intenzitáseloszlása (kék és piros) és az általuk létrehozott összintenzitás (lila) eloszlását mutatják a görbék. A görbék felett olvasható d értékek a különböző definíciókból számított felbontási határok, tipikusnak vehető hullámhosszon és nagy numerikus apertúrájú (NA) objektívvel.

A kvantummechanika fejlődésével új lehetőség kínálkozott a hullámhossz csökkentésére. Az anyag részecske-hullám kettős természete azt sugallta, hogy a fényen kívül mással is lehet képalkotást végezni, ha a megfelelő sugárforrás és leképző rendszer rendelkezésre áll. Az elektronsugarak viszonylagos könnyű előállíthatósága és az elektrodinamika részletes ismerete, (ami a fókuszáláshoz szükséges), hozzásegítette Ernst

Ruskát, hogy 1933-ban bemutassa az első működő elektronmikroszkópot (összefoglalásként lásd: Ruska, 1987). Az elektronok energiájának változtatásával a hullámhossz is változtatható és könnyen elérhető a pikométeres felbontási tartomány. Az elektronmikroszkópok leképezési hibái miatt a felbontásuk praktikusán 0.5-1 nm, de ez bőven elegendő a biológiai kutatásokban. Az elektronmikroszkópia azonban számos hátránnyal is rendelkezik a fénymikroszkópiával szemben. A mintát egy vákuumcsőben kell elhelyezni, mert máskülönben nem lehet fókuszált elektronsugarat létrehozni. Ez az élősejtes képalkotással összeegyeztethetetlen. Áteső képalkotás esetén csak nagyon vékony (30-150 nm) mintákon lehet igazán nagy felbontást elérni, ami a minta előkészítést és metszést időigényessé teszi, továbbá nagy szakmai rutin kell a folyamathoz. A több fehérje és más biomolekulák együttes jelölése is általában technikai nehézségekbe ütközik.

Az élettudományi kutatásokban ezért egyre nagyobb igény mutatkozott a felbontás növelésére a látható vagy ennél hosszabb hullámhosszú képalkotó fény megtartása mellett. Marvin Minsky 1957-ben bejelentett, konfokális mikroszkópiáról szóló szabadalma jelentette az első lépést, ami a felbontás növekedés irányába vitt. A konfokális mikroszkópia jelenleg is az egyik legelterjedtebb fénymikroszkópos technika a biológiai kutatásokban. A hagyományos fénymikroszkópos eljárásokhoz képest a felbontás jelentősen nő axiális irányban (~1.4x) és kis mértékben az XY síkban is (Wilson, 2011). A lézer pásztázó konfokális mikroszkóp viszonylagos lassú képalkotása megkerülhető a pörgő-korong konfokális megoldással. Fontos még megjegyezni, hogy a képalkotás végső felbontására jelentős hatást gyakorol a mintavételezési frekvencia és a detektorok érzékenysége a Jel/Zaj viszonyon keresztül. Végül érdemes kiemelni, hogy a mikroszkópos képalkotás matematikailag az eredeti struktúra és a PSF konvolúciójának tekinthető. Ha tehát ismerjük a PSF-t, akkor az eredetileg készített mikroszkópos képet ezzel dekonvolválhatjuk, így visszkapva a minta eredeti struktúrájához sokkal közelebb eső képet. Az egyre szélesebb körben elterjedt dekonvolúciós algoritmusok megfelelően felvett képek esetén jelentősen javítanak a kép kontrasztján és csökkentik a zajt, továbbá kis mértékben javítják a felbontást is (Biggs, 2010; Schaefer és mtsai., 2001).

1.2. Szuperfelbontású fénymikroszkópia

Az 1990-es években sok olyan megoldás született, amely jelentősen növelte a fénymikroszkópia felbontását, de a műszerek felépítése és a mintával szemben támasztott elvárások miatt nem tudtak teret nyerni a napi mérési rutinban. A numerikus apertúra növelésére megjelentek a mintát két oldalról leképező, két objektívvel felszerelt interferometrikus mikroszkópok, mint például a 4Pi konfokális mikroszkóp és ennek variációi (Hell és Stelzer, 1992). Ezzel a technikával már el lehetett érni a 100 nm-es felbontást is. Egy másik két objektívvel megközelítés a képinterferencia módszer (I2M, I3M és I5M) és változatai, amelyek CCD kamerát használnak, inkoherens fényforrást és a 100 nm-es feloldás szintén elérhető (Gustafsson és mtsai., 1995).

Az élősejtes, szöveti képkalkotásban egy újabb mérföldkövet jelentett a két vagy több-foton mikroszkópia megjelenése (Denek és mtsai., 1990). A hagyományos egy-fotonos gerjesztési folyamat helyett ebben az esetben a fluoreszcens jelölőanyagot kettő, térben és időben egyszerre érkező, de fele akkora energiájú foton gerjeszti. Ez a nemlineáris jelenség számos előnnyel jár. A hosszú hullámhosszú (700-900 nm) megvilágítás tökéletesen beleillik a szövetek optimális elnyelési ablakába, azaz abba a tartományba, ahol a legkisebb a kölcsönhatás a főbb szöveti összetevők és a fény között. A megvilágítás így mélyebbre hatol (megfelelő objektívvel akár 2 mm mélységbe is) és gerjesztés csak a fókuszpontban lehetséges, ahol a fotonok sűrűsége eléri azt a szintet, hogy az egyidejűség megvalósulhasson. Az emittált fluoreszcens fotonok pedig túlyuk (pinhole) nélkül, azaz veszteség nélkül összegyűjthetők a képkalkotáshoz, így az amúgy is alacsonyabb fototoxicitású gerjesztés energiája tovább csökkenthető. Egyes élettudományi kutatás területeken egyre elterjedtebbek még a jelölésmentes nemlineáris képkalkotási eljárások, mint például a másodharmonikus-keltő (SHG) és a koherens anti-Stokes Raman szórás (CARS) mikroszkópia is (Campagnola és mtsai., 2002). Végül felszínek szuperfelbontású leképezésére szintén többféle megoldás áll rendelkezésre (NSOM; Near-field scanning optical microscope, SPR; Surface Plasmon Resonance), amelyek közül a legelterjedtebb a membránfolyamatok követésére kiválóan alkalmas teljes felszíni visszaverődési (TIRF) mikroszkópia (Axelrod, 1981).

Az eddig említett szuperfelbontású mikroszkópiák mellett az élettudományi kutatásokban legújabb áttörésekhez vezető, nagy jelentőségű eljárások a következő

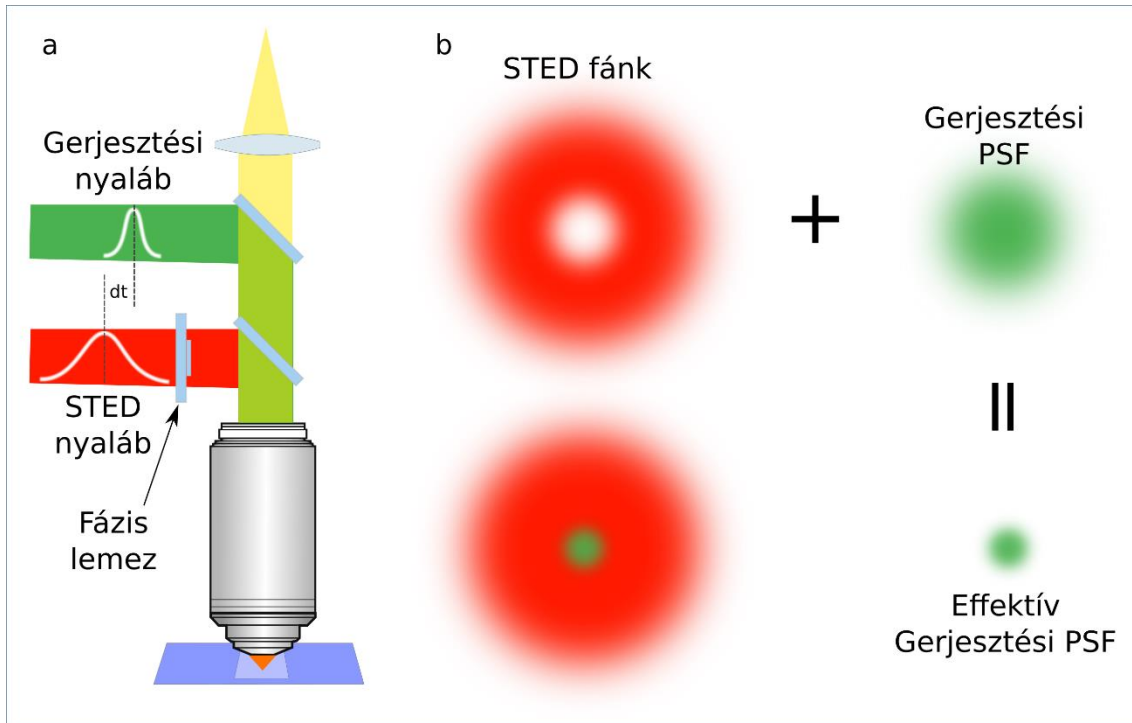
fejezetekben ismertetésre kerülő három teljesen más elven működő megoldás: a kényszerített emisszió kioltási (STED), a strukturált megvilágítási (SIM) és az egyedi molekula lokalizációs (SML) mikroszkópiák, melyek közül a STED-ért és az egyik SMLM (Single-Molecule Localization Microscopy) a PALM-ért (Photoactivated Localization Microscopy) rendre Stefan Hell és Eric Betzig kémiai Nobel-díjat kapott.

1.2.1. Kényszerített Emissziós Kioltási Mikroszkópia (STED)

A kényszerített kibocsátás az a folyamat, amikor egy bizonyos hullámhosszú foton kölcsönhat egy gerjesztett atomi vagy molekuláris elektronnal, amelynek hatására az elektron visszatér egy alacsonyabb energiaállapotba és a felszabaduló energia távozik egy foton formájában, amelynek fázisa, hullámhossza, polarizációja és kilépési iránya is megegyezik a beeső fotonéval. A jelenségen alapuló STED mikroszkóp alapfelépítésében megegyezik egy hagyományos pont pásztázó fluoreszcens mikroszkóppal, ahol a minta egyetlen fényelhajlás korlátozott méretű pontja van megvilágítva (gerjesztő nyaláb), majd ez a pont végigpásztázza a mintát általában tükrök segítségével vagy annak mozgatásával. A megvilágítás azonban ebben az esetben kiegészül egy olyan fánkserű intenzitás profillal rendelkező nyalábbal is, amely pontosan körülveszi a gerjesztési megvilágítás PSF-ét, a neve STED nyaláb (3. ábra). A STED nyaláb hullámhosszának megfelelő megválasztásával a gerjesztett fluorofórokat kényszerített emisszióval alapállapotba lehet juttatni, így az általuk kibocsátott foton nem járul hozzá a képalkotáshoz, ezért a gerjesztési PSF effektív mérete csökken, a felbontás növekszik (Hell és Wichmann, 1994; Klar és Hell, 1999). A STED hullámhosszt úgy kell megválasztani, hogy a fluorofór emissziós tartományába essen, de a gerjesztési tartományba ne lógjon bele. A STED nyaláb intenzitásának növelésével egyre inkább csak a fánk megvilágítás közepén maradnak gerjesztett fluorofórok, így a felbontás tovább növekszik a következő közelítő függvény szerint (Westphal és Hell, 2005):

$$\Delta r \cong \frac{\lambda}{2NA\sqrt{1 + \frac{I}{I_s}}} \quad (3)$$

ahol λ a STED nyaláb hullámhossza, NA az objektív numerikus apertúrája, I a STED nyaláb intenzitása, I_s pedig a fluoreszcens jelölő anyag hullámhossz függő jellemzője, az az intenzitás, ahol a fluoreszcencia az eredeti $1/e$ -ad részére csökken.

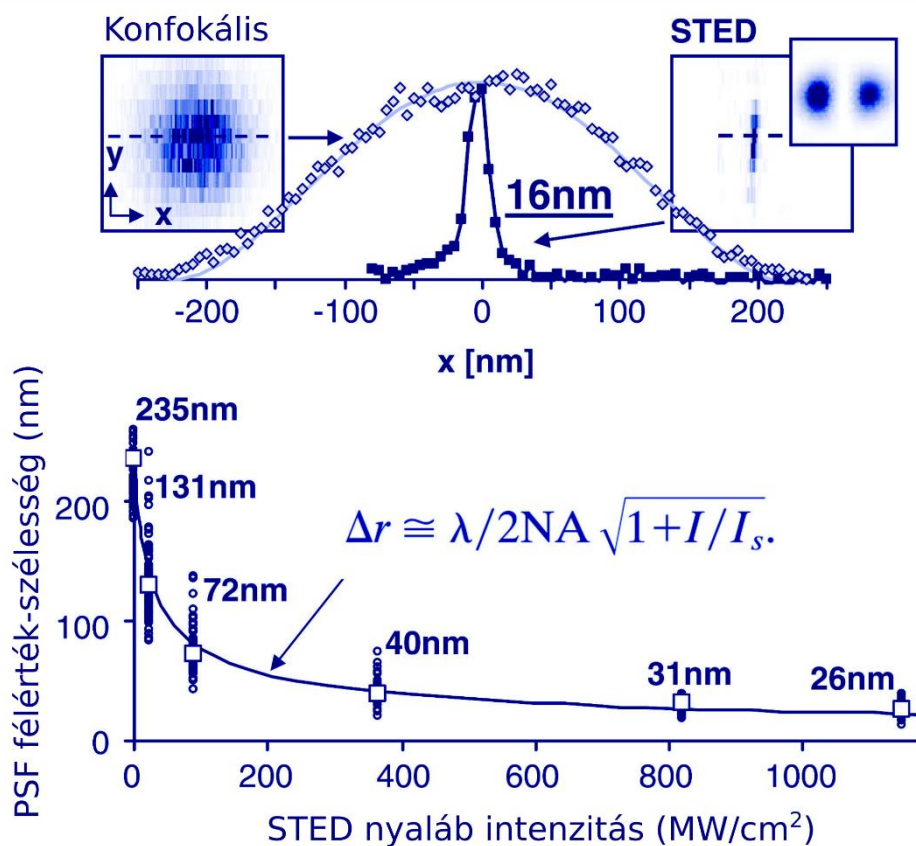


3. ábra A STED mikroszkóp működési elve. (a) A gerjesztési és STED nyalábok pontosan átfedve csatolódnak az optikai útba. A pulzus üzemű megoldásban a gerjesztés kis idővel (dt) hamarabb történik mint a kioltás. (b) A STED nyaláb fánk formájú profilja és a gerjesztési PSF. A két megvilágítás eredménye a csökkent effektív méretű PSF.

Megfelelően nagy STED lézerintenzitást használva elérhető a 30 nm körüli laterális felbontás (4. ábra). A fázislemezzel létrehozott fánkformájú STED kivilágítás azonban csak az X-Y síkban növeli meg a felbontást a Z irányt érintetlenül hagyja. Ezért az axiális irányú felbontás növelése érdekében létre kell hozni egy Z irányú fánkot is egy második STED nyalábbal (3D STED).

A kezdetekben csak nagyon drága pulzuslézerrel működő STED mikroszkópoknál megjelent a jóval költséghatékonyabb folyamatos hullámú (CW) lézerrel működő hasonló feloldású verzió is. A CW lézerrel működő 3D STED-el élősejtek endoplazmatikus retikulumát lehetett vizsgálni 50 nm-es XY és 200 nm-es Z felbontásban (Hein és mtsai., 2008). A felbontás megnöveléséhez azonban olyan erőteljes intenzitású

STED megvilágítás (0.1-1GW/cm²) szükséges, amely az élő sejteket jelentősen károsítja, akár el is pusztíthatja, ezért újabb fejlesztésekre volt szükség. Ha megvizsgáljuk a STED fánkon belüli fluorofórok fluoreszcencia élettartamát, akkor azt látjuk, hogy a fánk közepétől kifelé ez csökken, a STED megvilágítás csökkenti a fluoreszcencia élettartamot (Vicidomini és mtsai., 2011). Ez a jelenség kihasználható arra, hogy pulzus üzemi gerjesztést és CW-STED-et használva a gerjesztési pulzus végétől csak bizonyos idő (kapuidő) elteltével számláljuk a fotonokat, mert azok a hosszabb életidejű fánk-közepi fluorofórokból származnak. Ezzel az eljárással tízszer kisebb STED intenzitás mellett lehet elérni ugyanazt a felbontást.



4. ábra A STED mikroszkóp felbontás növekedése. (a) Konfokális PSF intenzitás eloszlása (balra fent) és az effektív PSF a STED nyáláb profiljával (jobbra fent, X-Z sík). A konfokális és effektív STED PFS intenzitás eloszlásának összehasonlítása (középen). (b) Az STED effektív PSF félérték-szélessége a STED nyáláb intenzitásának függvényében (Westphal és Hell, 2005)

A STED mikroszkópia általános előnye, hogy a szuperfelbontású kép optikai úton azonnal keletkezik, nem igényel matematikai képrekonstrukciót, a felbontás a STED intenzitással szabályozható. Hátránya, hogy a pont pásztázás miatt viszonylag lassú, a nagy felbontáshoz szükséges STED intenzitás a mintát roncsolhatja, speciális fluorezcens jelölőanyagokat igényel és a többes jelölés megoldása pedig nehézkes. Ennek ellenére a közelmúltban számos idegtudományi kísérletben sikerült fontos eredményeket elérni STED mikroszkópiával, például a dendrittüskék nyakának morfológiai plaszticitásával kapcsolatban (Tønnesen és mtsai., 2014), ami igazolja, hogy a STED mikroszkópiának komoly létjogosultsága lehet a jövőben is.

1.2.2. Strukturált megvilágításon alapuló mikroszkópia (SIM)

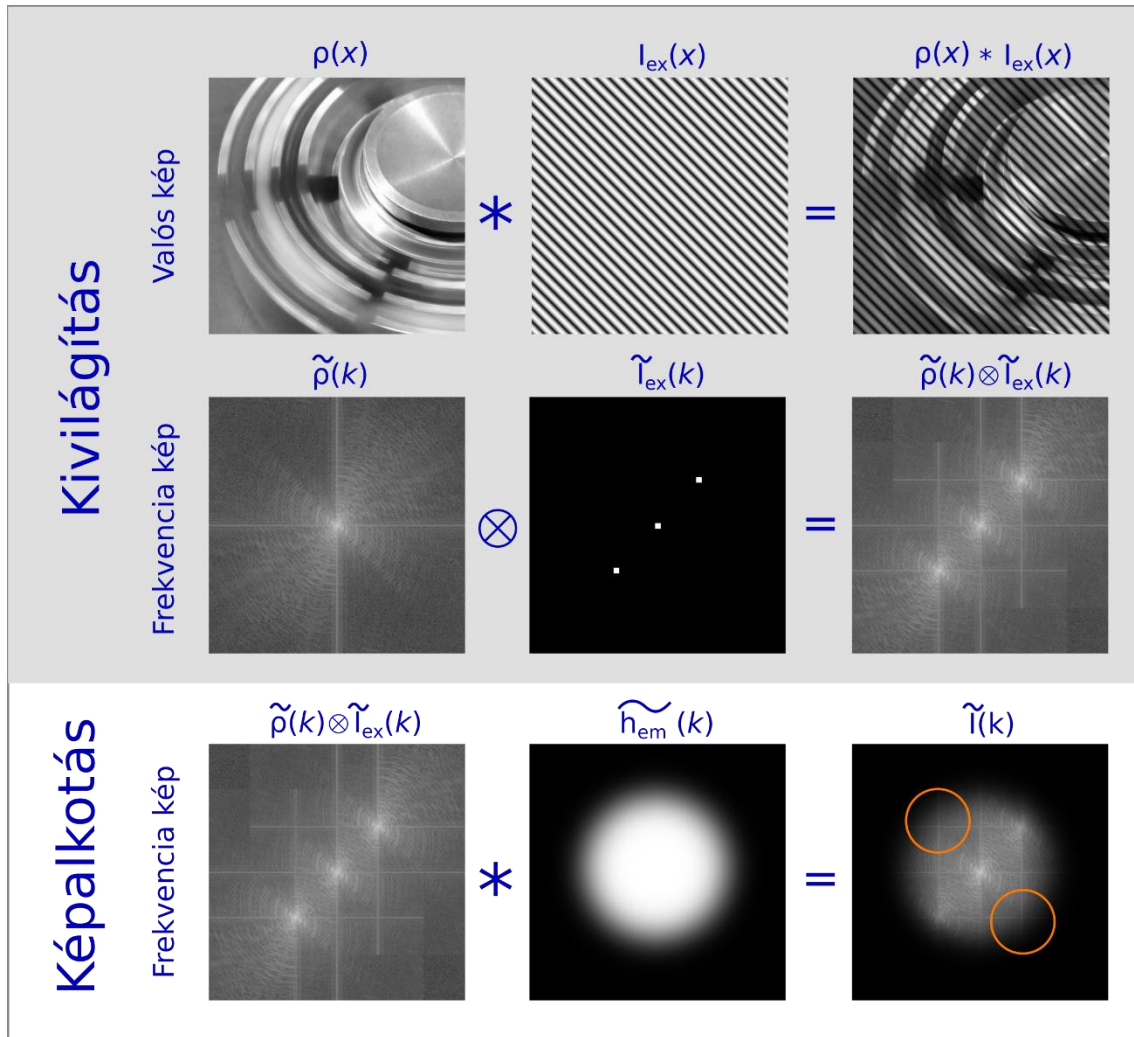
Az eddig említett lineáris távoli terű szuperfelbontású eljárások mind a PSF formálásával lépték át az Abbe-féle felbontási határt. A mért mikroszkópos kép $I(\mathbf{x})$ a minta struktúráját leíró $\rho(\mathbf{x})$ jelölési sűrűségeloszlás és a megvilágítás $I_{ex}(\mathbf{x})$ intenzitás eloszlás függvények szorzatának és a PSF ($h_{em}(\mathbf{x})$) konvolúciója:

$$I(\mathbf{x}) = h_{em}(\mathbf{x}) \otimes (I_{ex}(\mathbf{x})\rho(\mathbf{x})) \quad (4)$$

ahol \otimes a konvolúció operátora. A konvolúció egyik matematikai tulajdonsága, hogy a frekvencia térben (a függvények Fourier transzformáltjai terében), a függvények szorzásának felel meg, így a (4) egyenlet a következőképpen írható fel:

$$\tilde{I}(\mathbf{k}) = \tilde{h}_{em}(\mathbf{k}) (\tilde{I}_{ex}(\mathbf{k})\tilde{\rho}(\mathbf{k})) \quad (5)$$

Az itt megjelent megvilágítási függvény és fluorezcencia koncentráció eloszlás függvény ($\rho(\mathbf{x})$) konvolúciója teremt lehetőséget a felbontás növelésére. Ha a megvilágítás eloszlást alkalmasan választjuk meg, akkor az az eredeti kép Fourier transzformáltjával ($\tilde{\rho}(\mathbf{k})$) való konvolúciójának következtében, olyan tartományokat hoz a képbe, amit amúgy a képpalkotás (frekvencia térben $\tilde{h}_{em}(\mathbf{k})$ -el szorzás) kizárna a végső képből.



5. ábra A SIM képképzés működésének alapja. A minta valós képe a jelölés sűrűségfüggvényének és a kivilágítás intenzitás eloszlási függvényének szorzata. A frekvencia, vagy reciprok térben ez a két eloszlás Fourier transzformáltjának konvolúciója (második sor). A mikroszkópos kép Fourier transzformáltja pedig a minta valós képének Fourier transzformáltjának és a PSF Fourier transzformáltjának szorzata. Az alsó sor eredményképén látható narancs körök a strukturált megvilágítás által átvitt új információt mutatják. Többféle irányú megvilágítás feltérképezi azt a frekvenciatartományt, amit az OTF (Optical Transfer Function, $\tilde{h}_{em}(\mathbf{k})$) kinulláz a képképzéskor.

Ha például megvilágításként egy szinusz profilú csíkos megvilágítást alkalmazunk, akkor annak Fourier transzformáltja egy központi és két másik pont lesz a hullámhossznak és a hullámok irányának megfelelően ($\tilde{I}_{ex}(\mathbf{k})$). A konvolúció szemléletesen azt jelenti ebben az esetben, hogy az eredeti képünk Fourier transzformáltjához hozzáadjuk önmagát, csak

eltolva a megvilágítás szinuszainak megfelelő két vektorral. Ez a 'művelet' még a képalkotás előtt megtörténik, így a leképezés után több információt kapunk $\tilde{\rho}(\mathbf{k})$ -ról (5. ábra). Egy ilyen strukturált megvilágítású képalkotás persze a kieső frekvencia információknak csak egy részletét tartalmazza, ezért több irányú csíkos megvilágításra van szükség, hogy feltérképezzük maradék frekvencia eloszlást is. Mivel a csíkos megvilágítás frekvenciája is korlátozott az átviteli függvény által, így ezzel a módszerrel a felbontás a duplájára nőhet (Gustafsson, 2000; Heintzmann és mtsai., 2002). Ha a csíkos megvilágítási mintázatot 3D-ben hozzuk létre, akkor nem csak az XY, de a Z felbontás is a kétszeresére nő. Meg kell jegyezni, hogy nemlineáris megvilágítással (SSIM) a felbontás akár 40nm-ig is növelhető, de ez mérés technikailag nagy nehézséget okoz (Gustafsson, 2005).

A SIM nagy előnye, hogy nem kell hozzá speciális fluorofór, alacsony lézerintenzitással működik és annak ellenére, hogy egy SIM kép elkészítéséhez kb. 15 képet kell felvenni (5 megvilágítási irány, irányonként három eltolás) a képalkotás modern kamerákkal és megvilágítással így is elérheti a 11 Hz-t (Kner és mtsai., 2009). A módszer hátránya viszont, hogy jelentős a veszélye a műtermékeknek ha a rendszer nem elég stabil és a képrekonstrukció összetett matematikai apparátust igényel.

1.2.3. Egyedi Molekula Lokalizációs Mikroszkópia (PALM és STORM)

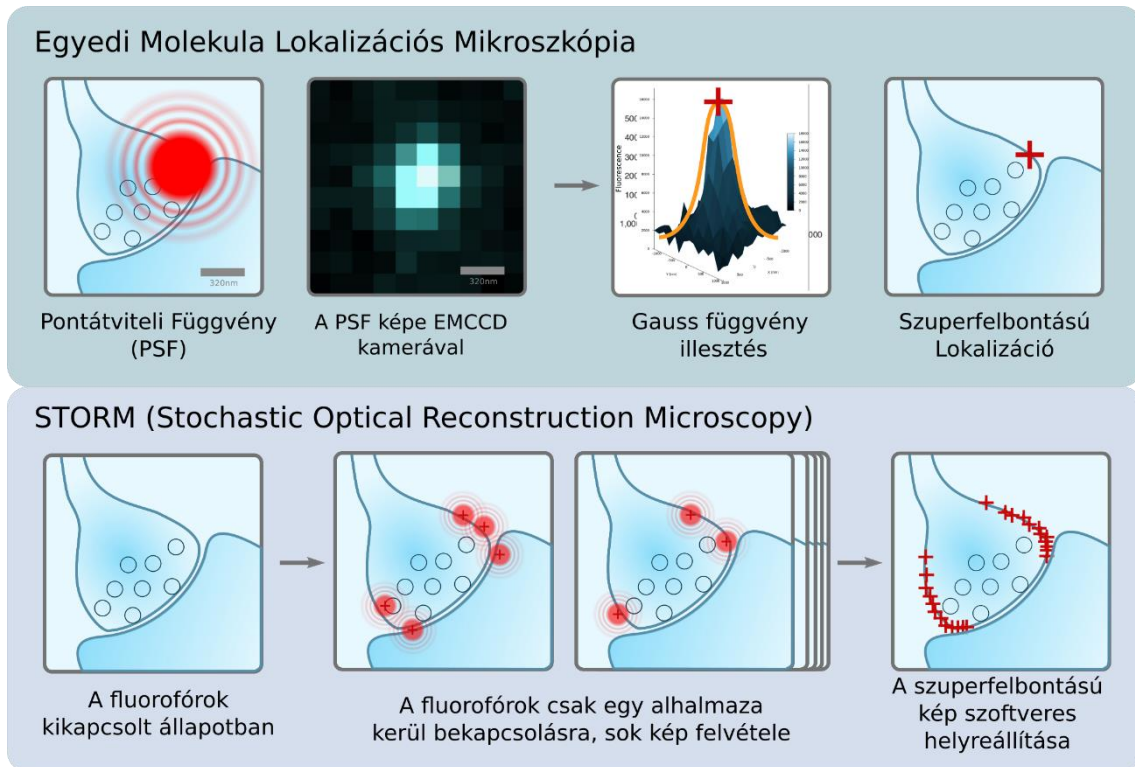
A fény hullámtermészete miatt egy pontszerű fényforrás mikroszkópos képe egy kiterjedt eloszlást mutat, ami egyúttal megadja a leképző rendszer átviteli függvényét, másnéven a pontátviteli függvényt (PSF). A PSF mind elméleti megfontolások, mind kísérletes tapasztalatok alapján az optikai tengelyre (legalábbis a fókusz síkban) hengersizmetrikusnak tekinthető. Ez a tény azt sugallja, hogy ha a pontszerű forrás 2D képére valamilyen megfelelően megválasztott hengersizmetrikus függvényt illesztünk, akkor ennek centroidja megadja a forrás pozícióját a diffrakció limitált képnél jóval nagyobb pontossággal. A digitális video-mikroszkópia megjelenésével ezzel az eljárással lehetett például a kinezin motorfehérje mozgását megfigyelni néhány nanométeres pontossággal vagy kolloidok Brown-mozgását vizsgálni 10 nm-es felbontásban (Crocker és Grier, 1996; Gelles és mtsai., 1988; Kellermayer, 2005). Egy Gauss-görbe illesztése az egyedi források képére alkalmas a szuperfelbontású lokalizáció meghatározására (Stallinga és Rieger, 2010). A gondot az okozza, ha a források olyan közel vannak egymáshoz, hogy

két szomszédos PSF már átfed egymással a képen (sűrű jelölés), mert ilyenkor a Gauss-illesztés nem valósítható meg torzításmentesen. A kilencvenes évek közepén publikált elképzelés szerint a sűrű jelölésekről is készíthető szuperfelbontású egyedi molekula lokalizáción alapuló kép, abban az esetben, ha valamilyen paraméter szerint a források képét meg lehet különböztetni. Ilyen paraméter lehet az, hogy a források képe időben nem egyszerre jelenik meg, más a polarizáltságuk, más a spektrumuk, illetve ezek kombinációi, de elképzelhetők egyéb jellemzők is (Betzig, 1995).

Az átfedő PSF-ek szétválasztására a legmegfelelőbbnek az idő tűnt és 2006-ban egyszerre három, sűrű jelölésen működő egyedi molekula lokalizációs módszer is megjelent, amelyek közül kettő a PALM és az FPALM (Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy) módszer fotoaktiválható GFP-t (PA-GFP) használt; egy harmadik eljárás a STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy) módszer pedig fluoreszcens kismolekulákon alapul (Betzig és mtsai., 2006; Hess és mtsai., 2006; Rust és mtsai., 2006). Az inspiráló kezdeti sikerek hatására egyre több hasonló alapelven nyugvó technika jelent meg például a dSTORM (directSTORM) (Heilemann és mtsai., 2008) és a GSDIM (Ground State Depletion microscopy followed by Individual Molecule return) (Fölling és mtsai., 2008). A fenti eljárások logikailag mind azon az alapelven működnek, hogy az eredetileg kikapcsolt állapotban lévő fluoreszcens jelölő anyagok közül minden képalkotási ciklusban csak éppen annyit kapcsolunk be, hogy két szomszédos PSF még éppen ne fedjen át. A bekapcsolt fluorofórok a képkészítés alatt ismét sötét állapotba kerülnek (végleg kifakulnak vagy átmenetileg kikapcsolnak), ami teret ad újabb fluorofórok bekapcsolására. A képalkotás során annyi képet veszünk fel, hogy elérjük a célul kitűzött térbeli felbontást (strukturális információ) vagy amíg a jelölés helyzete megállapítható egy struktúrán (6. ábra).

Az eddig említett módszerek alapján véve teljesen megegyeznek, csak a felhasznált fluoreszcens jelölő anyagokban különböznek. A PALM eljárásban egy fotokonvertálható fehérje szolgál jelölésre. Ezek a fehérjék nyugalmi konformációs állapotban nem bocsátanak ki fotonokat, de megfelelő hullámhosszal bekapcsolhatóak (PA-GFP, 405nm bekapcsolás), vagy olyan fehérjék, amelyeknek emissziós spektruma megvilágítás hatására változtatható (mEOS zöld-piros, 405 nm átváltás). A STORM esetében először a Cy5 fluorofórt használták egy antitesten kombinálva AF405 fluorofórral vagy Cy3 fluorofórral, ekkor a 405 nm-es vagy az 532 nm-es megvilágítás

elősegíti a sötét Cy5 bekapcsolását. Az első tanulmányok megjelenése óta kiderült, hogy számos más kismolekulájú fluorofór is alkalmas szuperfelbontású mikroszkópos vizsgálatokra (Dempsey és mtsai., 2011).



6. ábra A sűrű jelölésű egyedi molekula lokalizációs mikroszkópia működési elve. A felső sorban az egyedi molekula lokalizációs képalkotás fázisai láthatók. Egy jellemző méretű szinapsziszra vetített távoli vörös fényforrás PSF-e nagy területet borít be. A PFS képének EMCCD kamerával rögzített intenzitás eloszlására Gauss függvényt illesztve meghatározhatjuk a forrás szuperfelbontású helyzetét. Az alsó sorban a sűrű jelölésű SML képalkotás koncepciója látszik. Az első lépésben a forrásokat kikapcsolt állapotba hozzuk, vagy eleve abban vannak. Aktiváció hatására a fluorofórok egy részhalmaza kapcsol be, így alkalmazható a felső sorban bemutatott lokalizáció. A képalkotás során a fluorofórok kikapcsolnak, eztán újra ismétlődik az aktiváció-képalkotás fázis. Az utolsó lépésben ábrázoljuk a szuperfelbontású képet.

1.2.3.1. A STORM képalkotás felbontóképessége

A sűrű jelölésen alapuló egyedi molekula lokalizációs technikák feloldóképességének meghatározásához több tényezőt is figyelembe kell venni. Az egyes lokalizációk pontossága elsősorban attól függ, hogy hány fotont érzékeltünk a PSF mérése alatt. A legegyszerűbb esetben a mérési hibát az átlag standard hibájával definiálhatjuk:

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{s^2}{N} \quad (6)$$

ahol Δx a lokalizációs hiba, s a PSF standard deviációja, N pedig a fotonszám. Látható, hogy a fotonok számának növelésével a lokalizációs hiba csökken, növekszik a felbontás $\sim 1/\sqrt{N}$ -arányban. Ugyanakkor a pontos értékek meghatározásához figyelembe kell venni, hogy a PSF mérése egy EMCCD kamerával történik és a pixel méret, valamint a háttérzaj módosítja a lokalizációs pontosságot az alábbi egyenlet alapján:

$$\sigma = \sqrt{\frac{s^2}{N} + \frac{\left(\frac{a^2}{12}\right)}{N} + \frac{4\sqrt{\pi}s^3b^2}{aN^2}} \quad (7)$$

ahol a a pixelméret, b a háttérzaj, s a PSF standard deviációja és N a foton szám, σ pedig a lokalizációs pontosság (Thompson és mtsai., 2002). Ha a pixelméretet nagyon kicsinek választjuk, hogy a Gauss-illesztéshez sok adatpontunk legyen, akkor egy pixelre kevés foton jut, ami a foton zaj miatt alacsony Jel/Zaj arányhoz vezet. Ha a pixelméretet nagyra választjuk, hogy sok fotonunk legyen egy pixelben és ez növelje a Jel/Zaj viszonyt, akkor csökken az illesztési pontok száma, így végül a lokalizációs pontosság csökken. A pixelméret szempontjából létezik tehát egy optimum, ami a PSF standard deviációjával egyezik meg. Az (7) képlet segítségével tehát a lokalizációs pontosság meghatározható a mikroszkóp fizikai paramétereinek ismeretében és a mért pixelintenzitások foton számmá konvertálásával. A STORM képalkotás azonban több száz, ezer vagy tízezer kép felvételével jár, ami akár fél óras képalkotást is jelenthet. A mikroszkópok mechanikai stabilitása nem elég nagy ahhoz, hogy ezalatt az idő alatt a minta ne mozduljon el az objektívhez képest. Ha képenként sok lokalizációs pont van, akkor a mikroszkóp

elmozdulásából származó hibát megfelelő algoritmussal csökkenteni lehet. A végső lokalizációs pontosságot befolyásolja tehát az egyes felvillanások foton száma, ami becsülhető a (7) képlettel és a mechanikai stabilitás, amit nem tudunk becsülni, mert nagyban függ a környezeti hatásoktól. A STORM-ban használt fluorofórok mindegyike a képalkotás során többször bekapcsolt és kikapcsolt állapotba kerül, mielőtt végleg kifakul. Ezért a képeken azonosítani lehet olyan lokalizációs halmazokat, amelyek feltehetően egy fluorofórtól származnak. Ehhez ismerni kell az adott fluorofór fotokémiai tulajdonságait és a fotonok számából várható lokalizációs pontosságot. Ezeket a halmazokat tömegközéppontjuk szerint össze lehet rendezni és ezen az adathalmazon megmérni a lokalizációk standard devianciáját. Ez az érték már tartalmazza a lokalizációs pontosságot és a mechanikai instabilitásból származó felbontás veszteséget is (Huang és mtsai., 2008).

Abban az esetben, ha egy folytonos struktúrát szeretnénk leképezni, például egy membránszakaszt vagy sejtváz fehérjéket és feltételezzük, hogy a jelölés sűrűsége a lokalizációs pontosság alatt van, akkor ki kell tűznünk egy felbontási határt, amit el szeretnénk érni a képalkotás során. A STORM képalkotást addig kell folytatni, amíg a lokalizációs pontok közötti átlagos legközelebbi szomszéd távolság nem egyezik meg a kitűzött felbontási cél felével, azaz megfelel a Nyquist-mintavételezésnek (Shannon, 1949). Fordított esetben pedig a már elkészült képen meg kell határozni a lokalizációs sűrűséget, azt kompenzálni kell az egyedi fluorofórok többszörös felvillanás számának várható értékével, és a következő formulával meghatározni a Nyquist felbontást:

$$\alpha_{Nyquist} = \frac{2}{a\bar{d}} \quad (8)$$

ahol a a lokalizációs sűrűség, d a képalkotás dimenziója (2D vagy 3D). A végső felbontás a lokalizációs felbontás és a Nyquist-felbontás konvolúciója (Lakadamyali és mtsai., 2012):

$$\alpha_{Teljes}^2 = \alpha_{Lokalizációs}^2 + \alpha_{Nyquist}^2 \quad (9)$$

1.2.3.2. Egyedi molekula lokalizációs mikroszkópia 3D módban

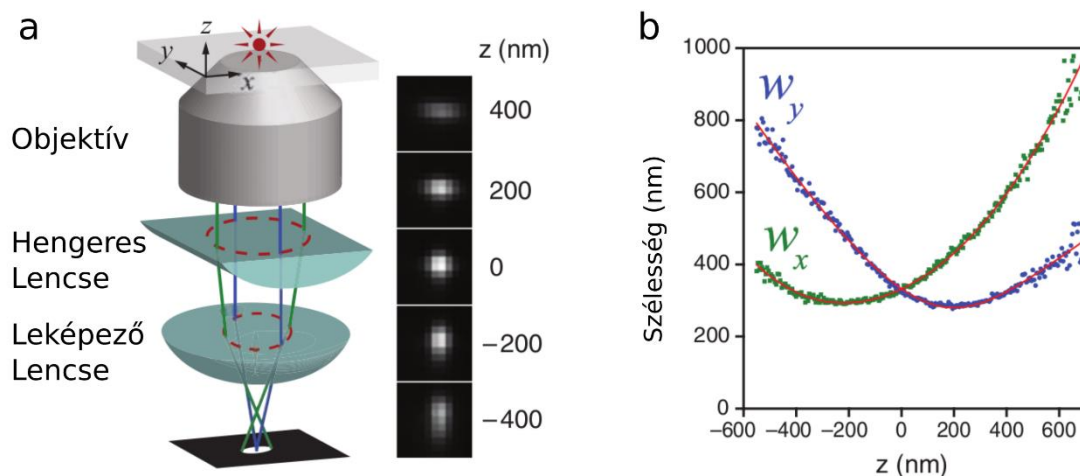
Az egyedi PSF-re illesztett Gauss görbe centroidja megadja a forrás X,Y koordinátáját, de nem mond semmit a Z pozícióról. Habár a laterális felbontás körülbelül egy nagyságrenddel növekedett a hagyományos fényelhajlás-korlátozott felbontású fénymikroszkópiához képest, de ezzel párhuzamosan szükséges az axiális feloldást is növelni a molekulák pontos térbeli lokalizációjának meghatározásához a szövetekben. A PSF pontosan a fókusz síkban a legkisebb átmérőjű és legnagyobb intenzitású. A fókusz síktól távolodva azonban a félérték-szélessége növekszik és csökken az intenzitása. A fókusz síktól mért távolságot a PSF félérték-szélességéből ki lehet számítani a megfelelő kalibráció után, de azt nem lehet megállapítani, hogy a fókusz sík felett vagy alatt van a fényforrás. Ennek eldöntésére a kamera elé egy hengeres lencsét kell helyezni, amelynek asztigmatikus torzítása a fókusz sík alatti források PSF-ét függőlegesen, a fókusz sík feletti forrásokat pedig vízszintesen nyújtja meg. A PSF-re elliptikus 2D Gauss-függvényt illesztve megkapjuk az X, Y pozíciót és a W_x és W_y csúcshélességeket (Huang és mtsai., 2008; Kao és Verkman, 1994). Felbontás alatti méretű fényforrások pl. 100 nm-es vagy kisebb fluoreszcens gyöngy felhasználásával felvehető a Z pozíció és a hozzá tartozó W_x , W_y értékek kalibrációs görbéje (7. ábra).

A kalibrációs görbe alapján az adott molekulához tartozó Z pozíció már meghatározható a lokalizációs mikroszkópos képen, de természetesen csak abban a Z tartományban, ahol a PSF még megfelelő Jel/Zaj arányt ad, nem tűnik el a háttérben. A Z irányú felbontás ezzel a módszerrel elérheti az 55 nm-t, a Z irányú tartomány pedig az 1,2 μm -t. A nagyon egyszerűen megvalósítható asztigmatikus 3D eljárás mellett léteznek egyéb megoldások is a Z pozíció meghatározására, mint pl. a kétsíkú leképezés 75 nm-es felbontással (Juette és mtsai., 2008) (Juette 2008), a két objektíves interferometrikus módszer 20 nm-es felbontással (Shtengel és mtsai., 2009), és a dupla hélix rendszer 20 nm-es felbontással (Pavani és Piestun, 2008). Egyszerűsége miatt azonban leginkább az asztigmatikus 3D eljárás terjedt el.

1.2.3.3. Az egyedi molekula lokalizációs mikroszkóp felépítése

Az egyedi molekula lokalizációs mikroszkópok általában valamilyen ferde, teljes látóteret megvilágításra alkalmas, lézerforrású és EMCCD vagy sCMOS érzékelővel

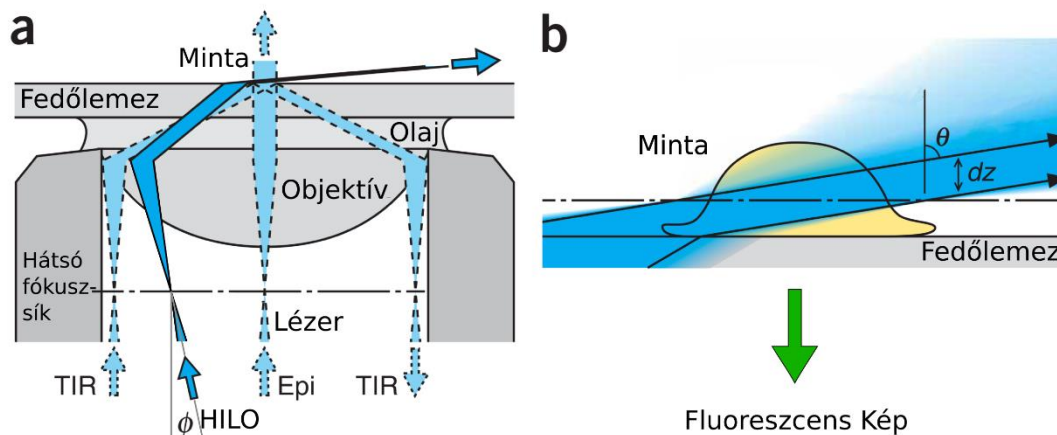
ellátott fluoreszcens mikroszkópok. A kereskedelemben megjelent megoldások többnyire TIRF (teljes felszíni visszaverődés fluoreszcencia) kivilágítást használnak és fordított állású mikroszkópvázra épültek.



7. ábra Az asztigmatizmus alapú 3D képalkotás elve. (a) A leképező lencse elé helyezett hengeres lencse aztigmatikus torzítás viszi a PSF képébe. A PSF a fókusz sík felett vízszintesen, alatta pedig függőlegesen nyúlik meg. Néhány fókuszpozícióban látszik a PSF képe a jobb oldalon. (b) A PSF szélességének (W_x és W_y) értékei a fókuszpozíció függvényében. Pontosan az objektív fókuszában ($z=0$), a két érték egyenlő (Huang és mtsai., 2008).

A fényforrással szemben támasztott követelmény, hogy a képalkotó hullámhosszon nagy intenzitású legyen, hogy a fluorofórok bekapcsolt állapota alatt a lehető legtöbb fotont érzékelhessük a legrövidebb idő alatt, továbbá a nagy intenzitás elősegíti a fluorofór kikapcsolását is. A minta kivilágításánál fontos szempont, hogy teljes látótér minél homogénebb kivilágítása mellett lehetőleg egy vékony Z tartományt érítsen csak, ezzel ugyanis csökkenthető a fókusz síkon kívülről érkező háttér és így növelhető a Jel/Zaj arány. Ennek elérésére a TIRF kivilágító rendszer megfelelő, hiszen ott szabadon be lehet állítani az optimális Jel/Zaj arányhoz tartozó kivilágítási szöget. Ha csak a fedőlemez közvetlen közelében (50 nm-150 nm mélységben) veszünk fel képet, akkor a kivilágítás szögével valóban el lehet érni a teljes visszaverődést. Abban az esetben, ha ennél mélyebben történik a képalkotás, ami szöveti preparátumokban általános, de még mindig a felszínhez közel van, akkor a kritikus szöghöz (a teljes visszaverődés szöge) közeli

kivilágítási dőlésszög ad jó eredményt. A TIRF egyik módosított változata a HILO (Highly Inclined and Laminated Optical) eljárás pedig a minta mélyebb rétegeiben ad optimális kivilágítást (Tokunaga és mtsai., 2008) (8. ábra).



8. ábra Az egyedi molekula lokalizációs mikroszkópiában használt főbb kivilágítási megoldások. (a) EPI, TIR és HILO kivilágítás fényútja. A HILO esetében a lézert az objektív optikai tengelyéhez képest kis szögben (ϕ) fókuszáljuk az objektív hátsó fókusz-síkjára. **(b)** A HILO kivilágítás vékony (dz) megvilágítást eredményez a fókusz-síkban, így a képalkotás Jel/Zaj aránya növelhető (Tokunaga és mtsai., 2008).

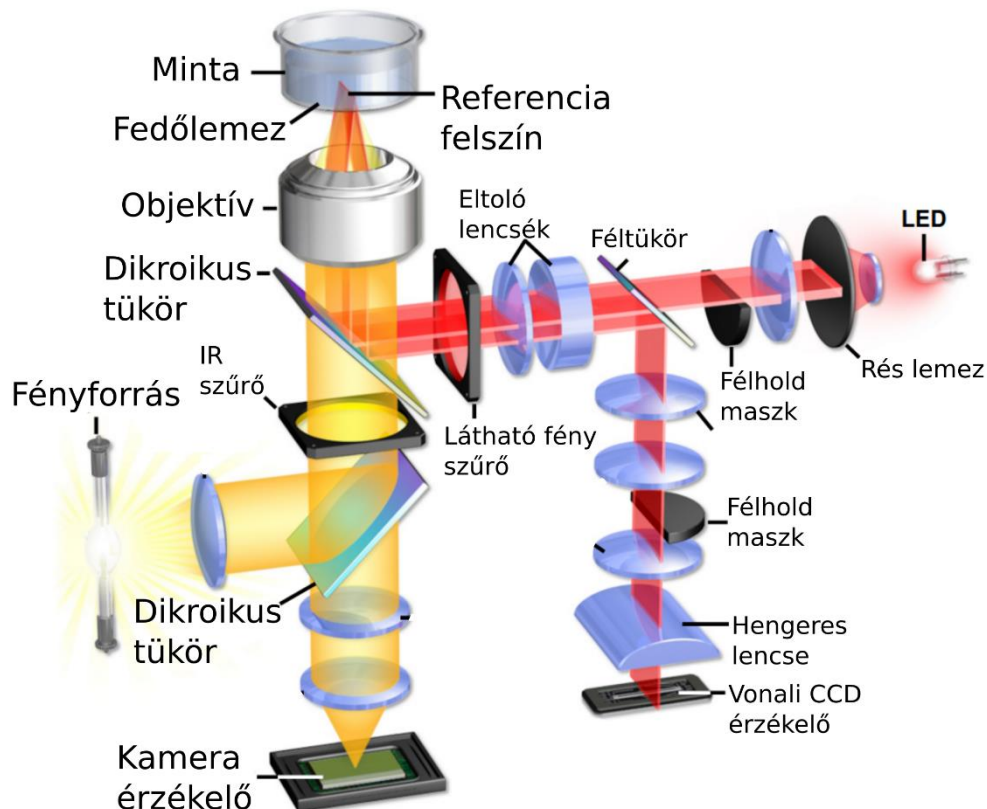
A képalkotáshoz olyan nagy pontosságú (extra laposságú dikroikus tükör) szűrőköcka szükséges, ami az adott fluorofórhoz tartozó gerjesztési hullámhosszon kívül a fluorofór visszakapcsolását elősegítő fényt (aktivátor) is az objektívbe juttatja, emissziós szűrője pedig megfelel a fluorofór emissziós spektrumának. A szűrő és a tükrök karakterisztikájának olyannak kell lennie, hogy a lehető legkevesebb nem kívánt gerjesztési fény jusson a kamerára, miközben a kibocsátott fotonokból a lehető legtöbb detektálható. Az emissziós oldalon a többcsatornás képalkotáshoz használható még kettős kamerarendszer vagy a kamera fél-fél területét használó megosztás, az úgynevezett DualCam vagy DualView eljárások. A leképezéshez célszerű olyan TIRF objektívet használni, amely a lehető legtöbb hibára korrigált, rendelkezik hőmérsékleti korrekciós gyűrűvel, nagyítása pedig megfelelő az optimális pixelméret eléréséhez. Általában 100x-os nagyítású objektíveket használnak ezek a mikroszkópok, de lehet 60x-os nagyítású objektívvel is megfelelő képeket készíteni. A mintához használt fedőlemeznek

illeszkednie kell az objektív specifikációjához és a megfelelő törésmutatójú alacsony autofluoreszcenciájú immerziós olaj helyes megválasztása is fontos szempont.

A teljes látótér megvilágítás miatt az SML mikroszkópiában a PSF leképezéséhez valamilyen tömb érzékelőt kell alkalmazni, mint például a CCD (charge-coupled device) vagy CMOS (complementary metal oxide semiconductor) kamerák. Az egyedi molekulák fénykibocsátása nagyon alacsony. Ezért mindenképpen nagy kvantumhatásfokú kamerát kell választani, mert az érzékelőt elért fotonoknak minél nagyobb százalékban kell elektronokká konvertálódni, hogy a lehető legtöbb foton begyűjtésével a legnagyobb elérhető lokalizációs pontosságot érhessük el. Másfelől a képalkotás sok ezer kép felvételéből áll, így az érzékelőnek egyúttal gyorsnak is kell lennie. Korábban a CMOS kamerákhoz képest a CCD-k sokkal magasabb kvantumhatásfoka (90%) miatt egyértelmű választásnak tűntek, azonban ma már a tudományos szintű CMOS (sCMOS) érzékelőknek is megvan a szükséges érzékenységük (>80%). A lokalizációs pontosságban (7. egyenlet) szerepel a zaj is, ezért az érzékelőknek nagyon alacsony zajjal is kell rendelkezniük. Az elektron-sokszorozó CCD-ben (EMCCD) még a kiolvasás előtt megtörténik egy erősítés (EM gain), aminek következtében a jelentős mértékű kiolvasási zaj nem kerül erősítésre, így kiváló Jel/Zaj arány lehet elérni. A mostani EMCCD kamerák kiolvasási sebessége is megfelelő a fluorofórok villogási sebességének követésére, ami megszabja az optimális képfelvételi gyakoriságot. A sötétárami zaj és az EMCCD-kre jellemző időzítés-keltett töltés (Clocking Induced Charge) zaj csökkentésére az érzékelő lapkákat -70°C - -100°C -ra hűtik. A jelenlegi kameratechnológiák közül a SML mikroszkópiához a legalkalmasabbak az EMCCD-k (pl. 512×512 pixel, $16 \mu\text{m}$ fizikai pixel méret), de bizonyos esetekben a sCMOS-ok is megfelelőek (Huang és mtsai., 2013).

A sűrű jelölésű SML mikroszkópia időigényes képalkotás a már sokszor említett sok ezres nagyságrendű kép elkészítése miatt. Ezért fontos követelmény az egész optikai rendszerrel szemben a felbontásról szóló részben már említett mechanikai stabilitás. A hagyományos felépítésű egyenes vagy fordított állású mikroszkópok esetében a legkritikusabb a Z irányú stabilitás azaz a leggyakoribb probléma a fókuszszívvesztés. A Z irányú stabilitás növelésének egyik elterjedt módja a hardveres fókusz-zár. Ebben a megoldásban a fényútba egy dikroikus tükör segítségével egy infravörös mérőnyalábot csatolunk. A mérőnyaláb visszaverődik a fedőlemez és a mintabeágyazó közeg (STORM

esetében törésmutató szempontjából tulajdonképpen víz) határfelületéről, majd visszajut az objektívbe és a dikroikus tükrön visszaverődve elhagyja a fényutat és egy négyosztatú fotodiódára vetül. Ha változik az objektív és a minta felszíne (azaz a törésmutató határ) közötti távolság, akkor a nyaláb pozíciója változik a fotodiódán, amit egy szoftveres vezérlés korrigálni tud a mikroszkóp motoros fókuszán keresztül (Dempsey és mtsai., 2009a). A kereskedelmi forgalomban kapható hasonló megoldások közül érdemes megemlíteni a Nikon PFS (Perfect Focus System) fókusz-zárát (9. ábra).



9. ábra A Nikon Perfect Focus System nevű hardveres fókusz-zár megoldása. A hagyományos EPI, DIA vagy konfokális fényútba egy infravörös dikroikus keskenysávú tükörrel egy 840nm-es megvilágítást csatolunk. Az infra nyaláb a fedőlemez - minta közeg törésmutató különbség felszínéről visszaverődik (referencia felszín), az objektíven keresztül a dikroikus tükrön kicsatolódik, majd egy féltükör a vonali CCD érzékelőre vetíti. A kiválasztott fókusz sík CCD pozícióját a PFS állandóan tartja a mikroszkóp fókuszának állandó korrigálásával (forrás:www.microscopyu.com).

1.2.3.4. A STORM képalkotás fluoreszcens jelölőanyagai

A sűrű jelölésű SML képalkotásban jelenleg az egymással szomszédos fluorofórokhoz tartozó PSF szétválasztására az idő domén használatos, azaz azt várjuk a jelölőanyagoktól, hogy villogjanak, amivel elérhető, hogy a szomszédos pontátviteli függvények képei időben ne fedjenek át, ne jelenjenek meg ugyanazokon a felvett képeken. A villogás tehát fontos paraméter, aminek időbeliségével kapcsolatos elvárás, hogy a jelölőanyag életidejének hosszabb szakaszát töltse kikapcsolt állapotban és rövidebbet bekapcsolt állapotban, azaz az aktív ciklusa (duty cycle) alacsony érték legyen (Dempsey és mtsai., 2011). A fluorofórok abszolút mennyiségi jellemzése szempontjából előnyös lenne, ha egy fluorofór csak egyszer villanna fel, ám a lokalizációs pontosság megítélése szempontjából a többszöri felvillanás a kívánatos. A jelölőanyagok átlagos felvillanási száma ezért szintén értékes paraméter. Mivel a lokalizációs pontosság a foton számtól erősen függ, ezért az egy adott bekapcsolt állapot alatt kibocsátott fotonok várható száma szintén egyik legegyszerűbb jellemzője a festéknek. Ez az érték az adott hullámhosszon mért extinkciós koefficienssel és a kvantumhozammal függ össze. A STORM-hoz használt fluorofórok villogási tulajdonsága alapvetően függ a molekuláris szerkezetüktől, de meghatározó az őket körülvevő kémiai környezet is. Az első STORM méréseket Cy5 távoli vörös festékkel végezték, amely régóta használatos a biológiai jelölésekben is (Rust és mtsai., 2006). A szokásos nagy törésmutatójú lefedőanyag helyett egy optikai szempontból előnytelenebb, DPBS puffer alapú, víz törésmutatójú képalkotási közeget használtak, amelynek összetevői megnövelik a Cy5 festék kikapcsolt életidejét azaz csökkentik az aktív ciklus idejét. A fluorofórok fontos jellemzője tehát a STORM képalkotás szempontjából, hogy milyen összetételű lefedőközegben működnek optimálisan. A fent említett fotokémiai paraméterek részletes értékei több átfogó tanulmányban elérhetőek (Chozinski és mtsai., 2014; Dempsey és mtsai., 2011; van de Linde és mtsai., 2011; Xu és mtsai., 2013a).

1.2.3.5. Fluorofór kapcsolási mechanizmusok a SML mikroszkópiában

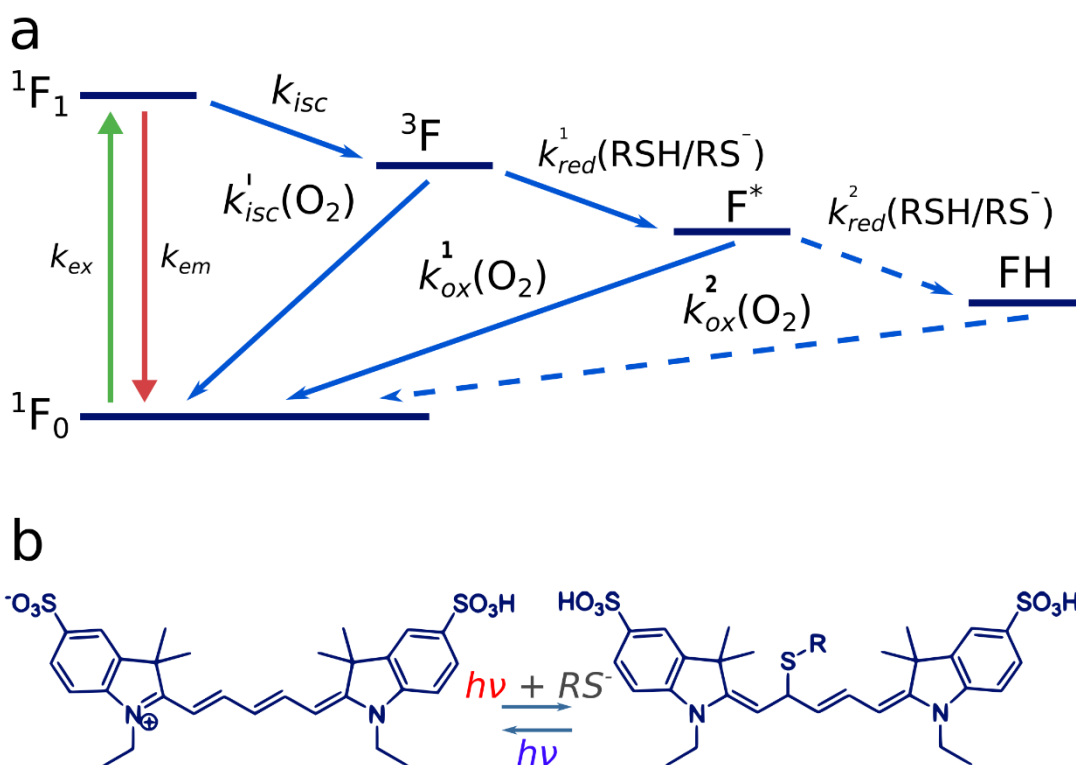
A sűrű jelölésű SML képalkotások egyik legfontosabb alapfeltétele az időbeli szétválasztás esetén, hogy megfelelő ki-be kapcsolható jelölőanyag álljon rendelkezésre. A ki-be kapcsolás dinamikája pedig a korábban bemutatott módon jelentősen befolyásolja

a képalkotás minőségét, így a folyamat fotokémiai megismerése utat nyithat újabb, kedvezőbb tulajdonságú jelölőanyagok racionális tervezéséhez. Alapvetően a képalkotás szempontjából a fluorofóroknak háromféle állapota lehetséges:

1. bekapcsolt (fluoreszcens állapot),
2. kikapcsolt (nincs fluoreszcencia)
3. kifakult állapot, mikor a jelölőanyag molekuláris szerkezete úgy változik meg, hogy már nem képes visszatérni az **1.** vagy **2.** állapotba.

Az átmenetek azonban sok esetben többször megisméltődhetnek az **1.**→**2.** illetve a **2.**→**1.** állapotok között, a jelölőanyag többszöri felvillanását eredményezve. A fluoreszcens jelölőanyagok elektron energiaszintje a bekapcsolt állapotban a gerjesztő fény hatására az alapállapotú szintről egy magasabb szintre emelkedik, majd foton kibocsátás mellett újra az alapállapotba kerül, de bizonyos valószínűséggel olyan hosszabb élettartamú metastabil (triplett) állapotba is juthat, amelyből sugárzásmentes átmenetek során jut újra az alapállapotba. A jelölő molekula környezetével olyan kémiai kölcsönhatásokban vehet részt, amelyek hatására újabb hosszú élettartamú metastabil állapotok jöhetnek létre, ahonnan szintén sugárzásmentesen jut vissza a rendszer az alapállapotba (kikapcsolt állapot). Ezek a kémiai reakciók megváltoztatják a jelölőanyag molekuláris szerkezetét, aminek hatására fényabszorpciós spektruma is változhat (Dempsey és mtsai., 2009b; van de Linde és mtsai., 2011).

A STORM képalkotásban leggyakrabban használt Cy5 vagy AF647 molekulák esetében a hosszú élettartamú metastabil állapotokból az alapállapotba jutást a környezetben jelenlévő molekuláris oxigén elősegíti. Ezért a lefedőközegben glükóz és glükóz-oxidáz enzim található, amely az oxigént felhasználja a glükóz oxidációjához. Ebben a reakcióban azonban hidrogén-peroxid is keletkezik, ami elősegíti a fluorofórok kifakulását, ezért ezt hozzáadott kataláz enzim segítségével kell eltávolítani a közegeből. Végül fontos kiemelni, hogy szükség van tiol forrásra is megfelelő koncentrációban (például β -merkaptóetilaminra vagy β -merkaptóetanolra). Ezekkel a molekulákkal a festékek reagálnak és létrejönnek azok a hosszú élettartamú állapotok, ahol nincs fluoreszcencia, de az alapállapotba való visszajutást később elősegítheti valamilyen UV tartományba eső (pl. 405 nm) megvilágítás (10. ábra).



10. ábra Alexa Fluor és ATTO festékek be és kikapcsolt állapotainak diagramja tiol (RSH) jelenlétében. (a) A fluorofór a szingulett alapállapot energiáján ($1F_0$) és a gerjesztett ($1F_1$) állapot között ugrál, foton abszorpció és emisszió által vagy spinváltó átmenettel $3F$ tripllett állapotba jut. A gerjesztett elektron állapotban a tiol redukálja a festéket de az $1F_1$ áll. állapot nagyon rövid nanoszekundumos életidejében ez nem valószínű. Az $3F$ tripllett állapot miliszekundumos ideje alatt viszont már megtörténhet a kölcsönhatás, például MEA vagy glutation vizes oldatának jelenlétében és a rendszer F^* félig redukált állapotba jut. Az F^* állapotú festék egy újabb elektron felvételével leuko állapotba juthat (FH). Az $3F$, F^* és FH állapotokból a rendszer szabad oxigéngyökök jelenlétében visszajuthat a szingulett alapállapotba ($1F_0$) (van de Linde 2010 4.ábra). (b) Az Cy5 festék reakciója tiollal a hosszú élettartamú kikapcsolt állapotot eredményezi az UV megvilágítás a visszakapcsolást segíti elő (Dempsey 2009 2.séma).

Mivel a fluorofórok összetett kémiai környezete biztosíthatja a megnövekedett kikapcsolt élettartamot, ezért egyre újabb lefedőközeg keverékek jelennek meg, köztük olyanok is, amelyek már élősejtes kísérletekhez is alkalmazhatóak (Jones és mtsai.,

2011). A kémiai környezet fontosságát jelzi az is, hogy az eredeti STORM cikkben a Cy5 festék közelében egy Cy3 fluorofórt is kötöttek az antitestre. Ennek következtében 532nm-es megvilágítás hatására a Cy5 kikapcsolt ideje lerövidült, így a villogás gyakoriságát befolyásolni lehetett. Ezt a jelenséget használja fel az aktivátor-riporter típusú többszörös képalkotás (lásd később). Később megjelent a dSTORM (direct STORM) technika, amely már csak a hagyományos fluorofórokat használja, nem kell mellé aktivátor molekula (Heilemann és mtsai., 2008; van de Linde és mtsai., 2011). A bekapcsolást az AF647 vagy a Cy5 esetében ugyanúgy elő lehet segíteni, mintha lenne mellettük aktivátor, csak nagyobb aktivációs lézerintenzitásra van szükség (405nm). A PALM módszer esetében a fluoreszcens fehérjék ki-be kapcsolása inkább a gerjesztő fény hatására bekövetkező konformációs változásokon vagy fakuláson keresztül valósul meg, így a lefedőközeg összetétele nem olyan fontos, mint a STORM esetében.

1.2.3.6. Képelemzési módszerek a SML mikroszkópiában

A lokalizációs szuperfelbontású mikroszkópia kulcskérdése, hogy az egyedi molekulákból származó, át nem fedő pontátviteli függvényképeknek megtalálja a középpontját. Ez mindenképpen azzal jár, hogy a SML képsorozatok felvétele után egy megfelelő algoritmussal minden képen azonosítani kell az egyedi felvillanásokhoz tartozó PSF-t, majd a lehető legnagyobb precizitással kell meghatározni a középpont koordinátáit. A pontosság mellett fontos szempont még a gyorsaság is. A legelterjedtebb megoldás a Gauss-függvény illesztés, ami kellően jól közelíti az Airy korongot a centroid számítás szempontjából, de más algoritmusok is lehetségesek, mint például a tömegközéppont alapú (Henriques és mtsai., 2010), háromszögelés alapú (Hedde és mtsai., 2009) vagy a sugárirány szimmetria alapú (Parthasarathy, 2012) módszerek. A lokalizációs algoritmusok összehasonlító vizsgálata azt mutatta, hogy a legpontosabb a Gauss-függvény illesztés (Sage és mtsai., 2015) abban az esetben, ha teljesül az a feltétel, hogy két szomszédos PSF nem fed át a képeken. Ezt a feltételt sokszor nehéz teljesíteni, hiszen képfelvétel közben nem lehet szabad szemmel eldönteni, hogy mekkora arányban lehetnek átfedések. Ha sok van, akkor akár jelentős műtermékeket is okozhatnak a rekonstruált képen (Erdélyi és mtsai., 2015). Ennek a problémának a kezelésére születtek meg a részleges átfedést is kezelni tudó algoritmusok, amelyek egy részét eredetileg a

csillagászatban használták a csillagokkal sűrűn fedett területek vizsgálatára (Babcock és mtsai., 2012; Cox és mtsai., 2011; Holden és mtsai., 2011; Quan és mtsai., 2011). Egy gyors, de nem feltétlenül a legpontosabb analízis is nagyon hasznos lehet, ha már a képkötés közben, valós időben láthatjuk a szuperfelbontású kép felépülését. Jelenleg hozzávetőlegesen hetven SML mikroszkópiára készült elemzőszoftver létezik, számos közülük szabad felhasználású. A megoldások hatékonyságát rendszeresen megszervezett versenyeken hasonlítják össze (Biomedical Imaging Group, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland (Sage és mtsai., 2015)). Az analízisprogramok egy felvillanási eseményről számos értékes információt tárolnak, természetesen a felvillanás koordinátáit, a fotonszámot, hányadik képen tűnt fel, stb., majd ezeket az adatokat szöveges formában elmentik (lásd részletesen Módszerek fejezetben). Az illesztett 2D elliptikus Gauss függvények W_x és W_y szélesség aránya alapján kiszűrhetőek a feltehetően nem egy molekulából származó felvillanások, mert 2D képkötésnél (asztigmatizmus nélkül) ilyen esetben a két szélesség aránya jelentősen eltér az egytől. Eldobhatóak azok a felvillanások is, amelyek vonatkozó PSF szélessége túl nagy az adott hullámhosszon várható PSF szélességéhez képest és így valamilyen nagyobb méretű forrásból származik. 3D esetben, lehetnek olyan lokalizációk, melyek W_x és W_y pontja a $W_x - W_y$ grafikonon túl messzire esik a Z kalibrációból meghatározott $W_y = \mathcal{F}(W_x)$ függvénytől. A program ezeket a lokalizációkat egy külön csatornába gyűjti (Z rejected). A képfelvétel során a kamera záridejét úgy kell beállítani, hogy a festék bekapcsolt állapotban töltött idejével összemérhető legyen. Így is előfordulnak esetek, amikor egy felvillanás több képen keresztül tart. Ekkor meg kell vizsgálni, hogy az egymást követő képeken látható felvillanás ugyanabból a forrásból származik-e. Ha igen, akkor a végső képen az adott felvillanáshoz tartozó egymás utáni lokalizációk átlagát lehet ábrázolni.

1.2.3.7. SML mikroszkópos képek megjelenítése

Az analízis után rendelkezésre álló szöveges állomány formátumú adatokból valamilyen módszerrel képet kell készíteni. A legegyszerűbb módszer, hogy a látótérben minden egyes lokalizációt például egy kereszttel jelölünk. Ennél informatívabb és a hagyományos pixeles képekhez hasonlóbb eredményt kapunk, ha minden lokalizációt helyettesítünk

egy olyan normalizált Gauss-intenzitás eloszlással, amelynek szélessége megegyezik az adott felvillanáshoz tartozó fotonszámból számolt lokalizációs pontossággal. Készíthetünk egy hőterképet is, amelyen a lokalizációk sűrűségét vetítjük a színskálára. Az adatok hagyományos képként való megjelenítésének algoritmusai a végső kép felbontását is befolyásolja. Az egyik legpontosabb módszer a Delaunay-háromszögelés, ami a megjelenítésnél figyelembe veszi a mintavételezési gyakoriságot és ezáltal képes elnyomni az alacsony mintavételezésű területeket, de nem okoz felbontás veszteséget a nagysűrűségű területeken (Baddeley és mtsai., 2010).

1.2.3.8. Többszörös jelölés a STORM mikroszkópiában

A biológiai képalkotásban alapvető igény, hogy egyszerre több molekuláris célpontot is láthatóvá lehessen tenni. A szuperfelbontású fénymikroszkópia több más előny mellett azért is versenyképes az elektron mikroszkópiával, mert a többes, akár hatszoros multiplex jelölés is megoldható (Bates és mtsai., 2012). Két különböző megközelítés áll rendelkezésre ennek megvalósítására.

1. Aktivátor-riporter alapú többszörös jelölés megközelítés:

A ki-be kapcsolás ciklus vizsgálatakor kiderült, hogy a visszakapcsolást többé-kevésbé specifikusan el lehet végezni, ha a Cy5 vagy AF647 közvetlen közelébe (például ugyanarra az antitestre) olyan fluorofórt kötnek, amelynek abszorpciós spektrumának csúcsa körül van az aktivátor lézer hullámhossza. Ha egy antitestre három AF405 és egy AF647 molekula kapcsolódik, akkor az AF647 nagyon érzékeny lesz a 405 nm-es aktivátor lézere és bekapcsol. Létre lehet hozni ugyanilyen módon Cy2-AF647 és Cy3-AF647 antitest jelöléseket is, ebben az esetben a 488 nm és 561 nm-es hullámhosszú megvilágításra lesznek érzékenyek az AF647 fluorofórok. Habár a jelenség pontos fotokémiai magyarázata még nem ismert, de könnyű felhasználhatósága miatt az aktivátor-riporter eljárás nagyon elterjedt. Három jelölést feltételezve ebben az esetben a képalkotás a következő sorrendben történik:

1. Erős 647 nm-es megvilágítással a mintában található összes AF647 molekulát kikapcsolt állapotba hozható.
2. Gyenge intenzitású 405 nm-es megvilágítással bekapcsolható sztochasztikus módon néhány olyan AF647 fluorofór, amelyek közelében AF405 található. A következő

lépésben ismét a riporter lézer segítségével az AF647 megvilágításával több képen keresztül létrejön az egyedi lokalizáció képe, végül a bekapcsolt AF647-ek újra kikapcsolt állapotba juthatóak.

3. A második célmolekula vizualizációjához ezután a következő aktiváció már 488 nm-es megvilágítással történik. Ekkor a Cy2-AF647 konstrukcióban lévő AF647 kapcsolható be, majd ismét képalkotás és AF647 kikapcsolás következik.

4. A harmadik célmolekula 561 nm-es lézer aktivációval jeleníthető meg, amely a Cy3-AF647 fluorofórpárt kapcsolja be, majd képalkotás közben az AF647 emisszió ki is kapcsolódik.

A képalkotás során a 2,3,4 lépések ismétlődnek. A megoldás nagy előnye, hogy riporter molekulának a képalkotáshoz kiváló paraméterekkel rendelkező AF647-et használja mind a három csatornában, ezért nem kell foglalkozni a különböző hullámhosszkból származó leképezési hibákkal (pl. a kromatikus aberrációval). Hátránya viszont, hogy az aktiváció nem teljesen specifikus, így a nagyon közeli lokalizációkhoz tartozó csatornák között jelentős lehet az áthallás (Bates és mtsai., 2007; Dani és mtsai., 2010; Lakadamyali és mtsai., 2012).

2. Spektrális szétválasztás alapú megközelítés:

A hagyományos többcsatornás fluoreszcens képalkotáshoz hasonlóan más és más fluorofór használható jelölőanyagként az egyes célmolekulák vizualizációjához és directSTORM üzemmódban végezhető a mérés (Bates és mtsai., 2012; Lampe és mtsai., 2012; Zhang és mtsai., 2015). Ennek a technikának nagy előnye, hogy a csatorna áthallást meg lehet vele szüntetni, de nagy hátránya, hogy jelenleg nincs az AF647-hez hasonlóan kimagaslóan jó villogási paraméterekkel rendelkező STORM festék más színtartományban. Persze számos alternatív festék (CF568, Cy3, AF555, AF532, AF488) is használható STORM képalkotáshoz, ha elegendően nagy kópiaszámban van jelen a mintában a célmolekula (lásd Eredmények fejezet), de alacsony kópiaszámú célmolekulák esetében számolni kell azzal, hogy a többi csatornában a kép minősége jelentősen rosszabb lehet. További nehézség a színhibák például a kromatikus aberráció megjelenése, amelyre több kezelési megoldás is létezik, közülük leginkább elterjedt az úgynevezett warp-korrekciónak (Boult és Wolberg, 1992). A multiplex dSTORM

képalkotásban az is nehézséget okoz, hogy a különböző fluorofórok eltérő kémiai összetételű lefedőközegben működnek a legjobban. A többcsatornás dSTORM képalkotást lehet szekvenciális módon végezni azaz egyszerre csak az egyik hullámhosszú képalkotó lézer világítja a mintát. Ezzel szemben a párhuzamos módszernél a két vagy akár három csatornának megfelelő gerjesztési lézer egyszerre megy, az emissziós oldalon viszont szét kell választani a csatornákat dikroikus tükrökkel és egy DualView kamera külön területeire vetíteni vagy minden csatornához külön kamerát használni. Ezekben az esetekben viszont már számolni kell csatorna áthallással és az egyes képek szuperfelbontás szintű egymásra illesztését meg kell oldani. Előnye ugyanakkor a párhuzamos megvilágításnak, hogy a képalkotási idő viszont jelentősen csökken.

Végül bizonyos esetekben megoldható a tömb tomográfiához (Micheva és Smith, 2007) hasonló szekvenciális festés is, amely során egy AF647 jelölés képalkotása után a fluorofórt kémiaiilag teljesen ki kell fakítani. Ezután a mintán egy másik fehérjét festünk, majd képalkotás után ismét fakítás következik és ez a ciklus folytatható, ameddig a jelölés érzékenysége és specifikussága fenntartható (Tam és mtsai., 2014). Az egyes színekhez tartozó képeket a mintában elhelyezett jelzőpontok, például jól rögzített fluoreszcens gyöngyök segítségével lehet a képalkotás legvégén összeilleszteni.

1.3. STORM mikroszkópia az idegtudományokban

A korábbi fejezetekben bemutatott technológiai áttörések, majd a rengeteg további innovációs fejlesztés az elmúlt években az élettudományi kutatások egyik legfontosabb új eszközévé emelte a szuperfelbontású mikroszkópiát (Lambert és Waters, 2017). Nem kivétel ez alól természetesen az idegtudományok sem. Számos mérföldkő felfedezés született az elmúlt években szuperfelbontású STED és STORM mikroszkópia segítségével, amelyek a dendrittüskék nyakának plaszticitásától (STED, (Tønnesen és mtsai., 2014)), az axonokban található különleges aktinyúrkön át (STORM, (Xu és mtsai., 2013b)) a szinapszisok legfontosabb receptorfehérjéinek részletes nanoskálájú szerveződéséig új koncepciókat eredményeztek a molekuláris neurobiológia területén (MacGillavry és mtsai., 2013; Nair és mtsai., 2013; Specht és mtsai., 2013; Tang és mtsai., 2016). Ugyanakkor, ahogy összefoglaló tanulmányukban a szerzők felhívják a

figyelmet (Lambert és Waters, 2017), a jelentős fejlődés ellenére a szuperfelbontású mikroszkópia még számos megoldatlan technikai nehézséggel és adatelemzési kihívással rendelkezik. Ilyen például a mintapreparátum kérdése, hiszen a szuperfelbontású mikroszkópos kísérletek túlnyomó többségét eddig sejt-kultúra preparátumokon, például primer neuronális tenyészeteken végezték (Bálint és mtsai., 2013; Glebov és mtsai., 2017). Ezzel szemben az idegtudományokban kiemelten fontos, hogy minél jobb megőrzöttségű szövetmintán is méréseket lehessen végezni, mivel minden neuronhálózat másképpen optimalizálja a különböző sejt-típusaiban egy-egy célfehérjének a mennyiségét és nanoskálájú eloszlását. Idegszövetben eddig nagyon kevés STORM mérés készült (lásd például (Dani és mtsai., 2010; Sigal és mtsai., 2015)) és egyedi sejt-típus és kompartment-specifikus szuperfelbontású molekuláris képalkotást használó tanulmány nem született a doktori disszertációm alapját szolgáltatató tanulmányaink (Barna és mtsai., 2016a; Dudok és mtsai., 2014) megjelenéséig. Habár doktori munkám nagy részét az Eredmények fejezetekben részletesen bemutatott módszertani, vizualizációs és adatelemzési fejlesztések képezik, az új eljárásokat először a szinaptikus endokannabinoid jelpálya nanoskálájú szerveződésével kapcsolatos molekuláris neuroanatómiai kérdések megválaszolására alkalmaztuk. Ezért a következő fejezetekben bemutatom ezeknek a kísérleteknek a háttérét az endokannabinoid rendszer felépítésének és működésének rövid összefoglalásán keresztül.

1.3.1. A retrográd szinaptikus jelátvitel

A preszinaptikus sejtől a posztszinaptikus sejt felé történő információáramlást, amely a szinaptikus vezikulákból kvantálisan felszabaduló ingerületátvivő anyag anterográd szinaptikus transzmisszióján alapszik (Fatt és Katz, 1952; Palay, 1956; De Robertis és Bennett, 1955), már több évtizede részletesen vizsgálják anatómiai és élettani módszerekkel. Napjainkra meglehetősen részletes kép alakult ki az anterográd jelátviteli folyamatok mechanizmusairól, illetve a szinaptikus kapcsolatok erősségének aktivitásfüggő dinamikus változásáról (Choquet és Triller, 2013). Ezzel szemben a legutóbbi évtizedig nagyon kevés információ állt rendelkezésre arról, hogy a posztszinaptikus idegsejt milyen módon képes a preszinaptikus neuron felől érkező szinaptikus bemenet erősségének szabályozására.

Ugyanakkor általánosan elfogadott, hogy egy információátviteli rendszerben - beleértve a biológiai rendszereket is - alapvető jelentőségűek a visszacsatolási lehetőségek (Astrom és Murray, 2012; Mitrophanov és Groisman, 2008). Az összetett neuronhálózatokban nagy sűrűségben előfordulnak pozitív visszacsatolások a serkentő idegsejtek rekurrens kollaterális kapcsolatai révén például a hippokampusz CA3 régiójában (Le Duigou és mtsai., 2014). Természetesen a hálózat stabilitása érdekében meg kell jelennie a negatív visszacsatolásnak is, ami a gátló idegsejtek, serkentő sejtekre menő szinaptikus kapcsolatai révén valósul meg. Ilyen feedback gátlósejt például az O-LM (oriens-lacunosum moleculare) interneuron típus a hippokampuszban (Muller és Remy, 2014). Hasonló pozitív és negatív visszacsatolási mechanizmusok már a szinaptikus kapcsolat szintjén is léteznek (Regehr és mtsai., 2009).

Érdekes módon viszonylag későn derült ki, hogy a negatív visszacsatolás egyik legáltalánosabban előforduló formája a kémiai szinapszisokban a retrográd endokannabinoid jelpálya (Kreitzer és Regehr, 2001; Ohno-Shosaku és mtsai., 2001; Wilson és Nicoll, 2001). Ennek egyik oka talán az lehet, hogy az endokannabinoidok a hagyományos neurotranszmitterektől és neuromodulátoroktól eltérő módon nem szinaptikus vezikulákból szabadulnak fel, hanem a plazmamembránban található prekursor molekulákból hidrolízissel keletkeznek aktivitás-függő módon (Katona és Freund, 2012). A posztzinaptikus sejtől felszabaduló endokannabinoid jelmolekulák a preszinaptikus vezikula ürülést rövid vagy hosszú távon csökkenteni tudják a preszinaptikus CB₁ kannabinoid receptorokon keresztül, így visszafelé terjedve szabályozzák a szinaptikus kapcsolat erősségét. Az elmúlt évtizedben kiderült, hogy ez a visszacsatolási mechanizmus előfordul a legtöbb szinapszistípusban az idegrendszer minden területén, és számos élettani, valamint kórélettani folyamatban jelentős szerepet játszik, ezért érdemes részletesebben is megismerni működési alapelveivel.

1.3.2. Az endokannabinoid rendszer felépítése

A kender (*Cannabis sativa*) az emberiség már évezredek óta használja nemcsak pszichoaktív, hanem fájdalomcsillapító hatása miatt is. Mindkét hatás számot tartott a modern orvostudomány érdeklődésére is, ezért a múlt század közepén aktív kutatás folyt a hatóanyag felderítésére. Kiderült, hogy a kannabisz hatásáért nagyrészt a Δ^9 -tetrahydrokannabinol molekula a felelős (THC, (Gaoni és Mechoulam, 1964)). A THC hatás

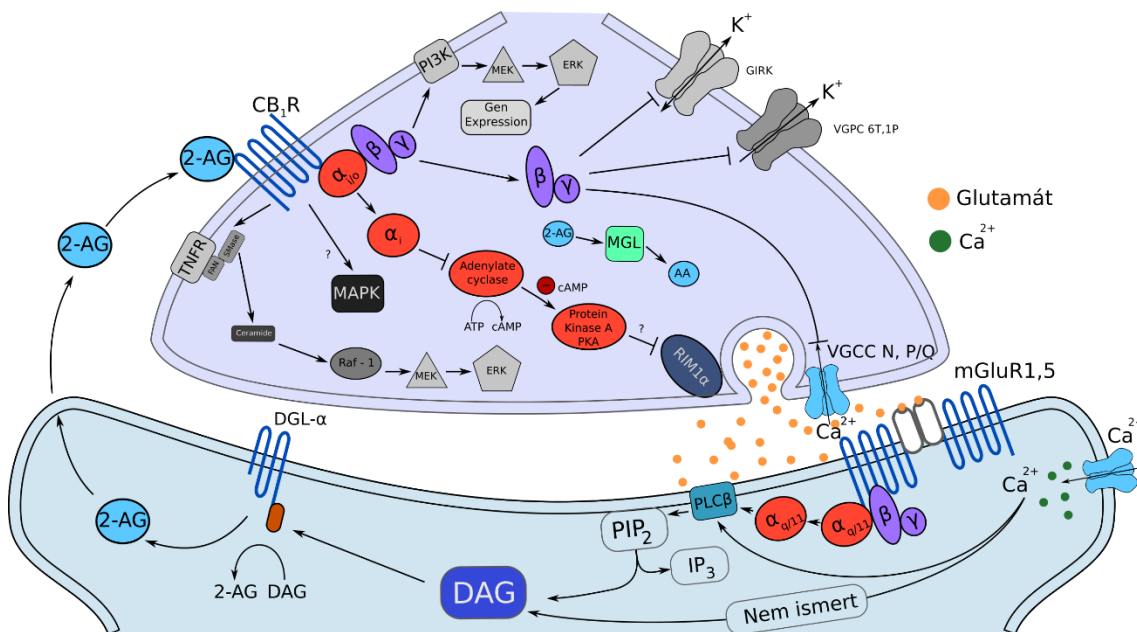
megismerésében a következő nagy lépést a THC receptorának azonosítása jelentette, amely az egyes típusú kannabinoid receptor (CB₁), egy G-fehérje kapcsolt transzmembrán fehérje (Matsuda és mtsai., 1990). A CB₁ mellett a CB₂ receptort is azonosították, mint fitokannabinoid célpont, mely a perifériás immunsejtekben, mikrogliaokban és oligodendrocitákban található de a CB₁ -nek van nagyobb jelentősége a retrográd információ átvitelben. A CB₁ receptor belső ligandjai az anandamid (N-arachidonil-etanolamin, (Devane és mtsai., 1992)) és a 2-AG (2-arachidonil-glicerin, (Mechoulam és mtsai., 1995)). A teljes rendszer megértése szempontjából azt is fontos tudni, hogy a belső, endogén ligandokat, másnéven az endokannabinoidokat milyen enzimek szintetizálják és a lebontásuk hogyan történik. Az anandamid pontos szintézisútvonala máig nem teljesen tisztázott (Maccarrone, 2017). A 2-AG a sejtthártyát alkotó foszfolipidekből keletkezik egy enzimatis kaskádon keresztül, amelynek utolsó lépésében az 1,2-diacil-glicerin (DAG) másodlagos hírvivőből a glicerinváz sn-1 pozíciójában lévő zsírsavat az sn-1-specifikus diacil-glicerin lipáz (DGL) enzim lehasítja (Bisogno és mtsai., 2003; Stella és mtsai., 1997). A két endokannabinoid lebontásáért pedig a 2-AG esetében leginkább az MGL enzim (monoacil-glicerin lipáz, (Blankman és mtsai., 2007)), míg az anandamid esetében a FAAH enzim (zsírsav-amid hidroláz, (Cravatt és mtsai., 1996; Murataeva és mtsai., 2014)) felelős. Még mindig nyitott kérdés, hogy az erősen lipofil endokannabinoidok hogyan jutnak el a poszt-szinaptikus oldalról a preszinaptikus oldalon található CB₁ receptorokig. Valószínű, hogy a retrográd endokannabinoid jelpálya működésében valamilyen transzportfolyamatnak is szerepet kell játszania. A jelenleg legelfogadottabb, de a fentiek miatt még részleges működési modell számos anatómiai és genetikailag módosított egereken végzett élettani kísérleten alapszik. A 2-AG-t termelő DGL- α a poszt-szinaptikus oldalon található (Katona, 2006), a CB₁ receptor és a 2-AG lebontásáért felelős MGL pedig a preszinaptikus oldalon helyezkedik el (Dinh és mtsai., 2002; Katona és mtsai., 1999). Ezzel párhuzamosan a DGL- α és a CB₁ knockout egerekből az endokannabinoid-mediálta rövid távú és hosszú távú szinaptikus depresszió jelensége hiányzik (Tanimura és mtsai., 2010; Wilson és Nicoll, 2001), az MGL knockout egérben pedig időben jelentősen elnyújtott (Pan és mtsai., 2011). Ezért abban konszenzus van, hogy az endokannabinoidok-által közvetített szinaptikus plaszticitásban a 2-AG játszik kulcsszerepet, ugyanakkor nyitott kérdés, hogy vajon mi lehet az anandamid pontos szinaptikus szerepe (Ohno-Shosaku és Kano, 2014).

1.3.3. A 2-AG-közvetítette endokannabinoid jelátvitel

Az endokannabinoid rendszer főbb komponenseinek és azok anatómiai elhelyezkedésének megismerése után a következő fontos kérdés, hogy milyen szinaptikus vagy esetleg nem-szinaptikus élettani folyamatok vezethetnek a 2-AG jelpálya aktivációjához és vajon ugyanazok a mechanizmusok minden sejtípuson és szinapsztípuson hasonló alapelvvel működnek-e? Az eddigi eredmények azt mutatják, hogy alapvetően háromféle módon aktiválódhat a 2-AG útvonala: 1) a posztszinaptikus sejt megfelelő mértékű depolarizációja által kiváltott kalcium beáramlás hatására; 2) a $G_{q/11}$ fehérjével kapcsolt GPCR-ek (G protein-coupled receptor) aktivációjának hatására (pl. $mGluR_{1,5}$ aktiválás); vagy 3) a depolarizáció és a metabotróp receptorok aktivációjának kombinálásával (11. ábra) (Katona és Freund, 2012).

A negatív visszacsatolás elvén alapuló retrográd 2-AG jelpálya jelentőségét az egész neuronhálózat excitabilitásának kialakításában a szinaptikus biztosíték (synaptic circuit-breaker) modell kísérelte meg keretbe foglalni (Katona és Freund, 2008). A modell szerint a serkentő szinapszisokban a 2-AG jelpálya elindulása elsősorban a posztszinaptikus sejtre érkező nagy frekvenciájú serkentő bemenet hatására történik. Az alapszintű szinaptikus transzmisszióhoz képest nagyobb koncentrációban felszabaduló glutamát felhalmozódik a szinaptikus résben és elérheti a szinapszis szélén található periszinaptikus metabotróp $mGluR_{1,5}$ glutamát receptorokat (Luján és mtsai., 1996). Ennek hatására a szintén periszinaptikus $G_{q/11}$ jelátviteli útvonala (Tanaka és mtsai., 2000) beindul és a hasonlóképpen periszinaptikus foszfolipáz $C\beta$ ($PLC\beta_1$) enzim (Fukaya és mtsai., 2008) elbontja a membránalkotó foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP₂), amiből 1,2-diacil-glicerin (DAG) és inozitol-1,4,5-triszfoszfát (IP₃) keletkezik (Hashimoto és mtsai., 2005; Stella és mtsai., 1997). A DAG-ból az sn-1-specifikus diacil-glicerin lipáz (DGL- α) egy zsírsavat lehasít, így keletkezik a 2-AG (Bisogno és mtsai., 2003). A DGL- α szintén egy periszinaptikus transzmembránfehérje (Katona, 2006), így a 2-AG már a plazmamembrán közelében vagy magában a membránban keletkezik, majd egy ismeretlen transzportfolyamat segítségével eléri a preszinaptikus CB_1 kannabinoid receptort. A CB_1 aktiválása elindítja a $G_{i/o}$ jelátviteli útvonalt, amelynek gyors $\beta\gamma$ alegység közvetített hatása a feszültségfüggő kalciumcsatornák blokkolása (Herlitze és mtsai., 1996), így a vezikulafelszabadulás valószínűségének csökkentése. A másik, lassabb $G_{i/o}$ útvonalon az α_i alegység gátolja az adenilát-cikláz,

ami csökkenti a cAMP szintet. Ennek következtében a protein kináz A enzimen keresztül a RIM-1 α fehérje pozícionálása akadályozott, ezért a vezikuladokkolás tartósan gátlódik (Chevalyere és mtsai., 2007).



11. ábra A 2-AG közvetített retrográd endokannabinoid jelpálya sematikus rajza. A jelpálya alapvetően két úton aktiválódhat. Az egyik a posztszinaptikus sejt megfelelő mértékű depolarizációja által kiváltott kalcium beáramlás hatására, a másik a $G_{q/11}$ fehérjével kapcsolt GPCR-ek (pl. $mGluR_{1,5}$) aktivációjának hatására. A rajzon a szinaptikus biztosíték modell szerint a nagy mennyiségű glutamát felszabadulás aktiválja az $mGluR_{1,5}$ -t. A posztszinaptikus Ca^{2+} beáramlást depolarizáció okozza. A Ca^{2+} jelzés a $PLC\beta_1$ enzimet aktiválja illetve még nem azonosított módon közvetlen DAG felszabaduláshoz vezet. A 2-AG a CB_1 receptoron keresztül a $G_{\beta\gamma}$ jelzésen át a preszinaptikus Ca^{2+} csatornát blokkolja az $G_{\alpha_{i/o}}$ -n keresztül pedig a vezikulák ürülését. A CB_1 jelpálya egyéb útvonalait szürkével jelöltük.

1.3.4. A 2-AG jelpálya nanoskálájú szerveződésének kórélettani jelentősége

Az előző fejezetből kiderült, hogy a szinaptikus endokannabinoid jelpálya szabályozásában egy periszinaptikus fehérjékből álló hálózat játszik kulcsszerepet (Katona és Freund, 2008). Felmerül tehát a kérdés, hogy a negatív visszacsatolás

logikáján alapuló szinaptikus biztosítéknak és ennek a különleges periszinaptikus nanodoménben összpontosuló makromolekuláris masinának milyen kórélettani jelentősége van. Valószínűleg a nanométeres tartományban szabályozott periszinaptikus lokalizáció jelentősége a felszabaduló szinaptikus glutamát mennyiségének mérésében rejlik, amelyet utána a rendszer egy negatív szinaptikus visszacsatolásra fordít le. Érdekes módon a periszinaptikus masina molekuláris alkotóelemeinek hiányában epilepszia alakul ki. A $G_{q/11}$, a $PLC\beta_1$ és a $DGL-\alpha$ knockout egerek egyaránt meghalnak spontán epilepsziás rohamokban (Kim és mtsai., 1997; Sugaya és mtsai., 2016; Wettschureck és mtsai., 2006). Ezzel párhuzamosan a CB_1 receptorok sejttípus-specifikus deléciója a serkentő sejtekből szintén fokozott epilepsziás göreskészséghez vezet (Monory és mtsai., 2006). Fontos kiemelni, hogy a sejttípus-specifikus molekuláris folyamatok jelentőségét az emberi agyban is tapasztalhatjuk. A temporális lebeny eredetű epilepsziás betegek hippocampusában a CB_1 receptorok a serkentő sejtekről eltűnnek, ugyanakkor mennyiségük a gátlósejtek idegvégződésein változatlan marad (Ludanyi és mtsai., 2008). Végül, de nem utolsósorban izgalmas tény, hogy a korábban már említett Törékeny X szindrómában a betegek jelentős része szintén epilepsziás rohamoktól szenved. Ennek hátterében pedig a $DGL-\alpha$ enzim hibás, mindössze 100 nm-el elcsúszott lokalizációja állhat (Jung és mtsai., 2012), ami azonban elegendő ahhoz, hogy a szinaptikus biztosíték mögött álló periszinaptikus masina jelátviteli folyamatai szétkapcsoljanak.

Ezek az eredmények kiemelik, hogy a szinaptikus fehérjék, köztük az endokannabinoid jelpálya molekuláris alkotóelemeinek térbeli elhelyezkedése a kémiai szinapszisokban nagyon pontosan, nanométeres tartományban meghatározott. Ennek a jól definiált pozíciónak az elvesztése komoly jelentőségű lehet számos idegrendszeri megbetegedésben. Ráadásul a precíz molekuláris és anatómiai szerveződés, valamint a kórélettani folyamatokkal összefüggő mennyiségi változások egyaránt sejttípus-specifikus és kompartment-specifikus módon épülnek fel és mennek végbe. Ezért doktori munkám kezdetén úgy gondoltuk, hogy komoly jelentősége lehet egy olyan szuperfelbontású mikroszkópos eljárás létrehozásának, amely lehetővé teszi a sejt- és szubcelluláris domén-szelektív nanoskálájú molekuláris képalkotást az idegszövetben.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A biológiai rendszerek anatómiai és élettani vizsgálatainak elengedhetetlen kelléke a mikroszkóp. Az utóbbi években megjelent szuperfelbontású fénymikroszkópos technikák hatalmas tudományos potenciáljuk ellenére viszonylag lassan terjednek, mert az új módszerek átültetése a napi mérési rutinba számos megoldandó problémát vetett fel.

Három alapvető nehézség létezett doktori munkám kezdetén. Először is az eredeti tanulmányokban leírt kísérletek mind egyedi, az adott célfeladatra optimalizált konfigurációjú rendszereken készültek, komoly optikai szakértelemre volt szükség a működtetésükhöz, és kizárólag sejttenyészetek vizsgálatára voltak alkalmasak. A piacon kapható és képalkotó központokban specialisták által működtetett mikroszkópok általában jóval felhasználó-közelibbek és ezért sokkal szélesebb körben alkalmazhatóak tudományos feladatokra. Munkánk kezdetekor jelentek meg az első generációs kereskedelmi rendszerek, de ezek is még számos gyermekbetegséggel rendelkeztek, több típusnak azóta leállították a forgalmazását. Mi a doktori dolgozatban bemutatott kísérleti méréseinket az első generációs kereskedelmileg kapható Nikon N-STORM mikroszkópon végeztük. Az első időszakban a rendszer beállítására és optimalizálására fordítottuk energiáinkat, valamint kidolgoztuk a szövetpreparátumok szuperfelbontású vizsgálatához szükséges módszertani lépéseket.

Másodsorban az eredeti szuperfelbontású rendszerek kizárólag a szuperfelbontás elérésére törekedtek. Hiányzott a technikai lehetőség, hogy a nanoskálájú pontosságú molekuláris lokalizációs információt annak megfelelő celluláris és szubcelluláris kontextusában lehessen értékelni, ami ugyanakkor összetett biológiai rendszerekben alapvető fontosságú. Ezért munkám második szakaszában egybeépítettük a szuperfelbontású rendszerünket egy klasszikus konfokális mikroszkóppal, amely lehetővé tette a korrelatív képalkotást.

Végül hiányzott egy átlagos élettudományi felhasználó számára is könnyen kezelhető, nyilvános és ingyenes hozzáférésű szoftver, amely képes a két mikroszkópos modalitásból származó eltérő adatstruktúrájú képeket egyszerre kezelni, megjeleníteni és új algoritmusokkal a molekuláris adatokat biológiailag releváns kérdésekben kielemezni.

Ezért doktori munkám során a következő megoldandó specifikus célokat tűztük ki:

I. A STORM mikroszkópos képalkotás optimalizálása sejt kultúrában és idegszövet preparátumon

I.1. A képalkotás optimalizálása felbontás alatti méretű fényforrásokkal. A megvilágítás centrálása, az objektív korrekciós gyűrűjének beállítása, a megvilágítás szögének beállítása, 3D kalibráció.

I.2. A Nikon N-STORM mikroszkóp felbontásának mérése.

I.3. A STORM mikroszkópia kvantitatív tulajdonságainak vizsgálata.

I.4. Mintakezelési és festési módszer kidolgozása idegszövet esetében.

I.5. A CB₁ receptor jelölés specificitásának vizsgálata egér hippocampusban STORM képalkotásban.

I.6. A STORM képalkotási paraméterek optimalizálása agyszövet esetében.

I.7. CB₁ immunfestés mennyiségi vizsgálata idegszövetben, különböző minta előkészítési körülmények között.

I.8. A CB₁ immunjelölés STORM képalkotásának felbontás vizsgálata idegszövetben.

II. Korrelatív konfokális és STORM szuperfelbontású mikroszkópia létrehozása

II.1. A korrelatív konfokális és egyedi molekula lokalizációs mikroszkóp felépítése.

II.2. Korrelatív konfokális és STORM képalkotás.

III. Konfokális és STORM szuperfelbontású mikroszkópos képek megjelenítése és nano-szintű adatelemzési módszerek a VividSTORM szoftverben

III.1. A VividSTORM, korrelatív konfokális és STORM szuperfelbontású mikroszkópai analízis program kifejlesztése.

III.2. Konfokális és STORM képek egymásra illesztése VividSTORM-ban.

- III.3. Molekuláris távolságok mérése lokalizációs mikroszkópos képeken.
- III.4. Konvex burkoló két pontja között legrövidebb felszín menti távolság számítása.
- III.5. Molekuláris sűrűségek mérése lokalizációs mikroszkópos képeken.
- III.6. Klaszterezettség vizsgálata lokalizációs mikroszkópiás képeken.
- III.7. Receptor internalizáció mérése hippocampális interneuron terminálisokban.
- III.8. Korrelatív konfokális és STORM képalkotás kiterjesztése többféle szövetpreparátumra.

3. MÓDSZEREK

3.1. Minta előkészítés az elektrofiziológiai és anatómiai kísérletekhez

A doktori disszertációban bemutatott kísérleteinket az MTA KOKI Állatkísérleti Etikai Bizottsága és a Budapest Fővárosi Állat-és Élelmiszerügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás állatkísérleti engedélyével (engedélyszám: XIV-1-001/2332-4/2012) az „Állatok védelméről és kíméletéről” szóló 1998. évi XXVIII. törvény (243/1998) 32.§ alapján végeztük. A kísérletek tervezése és kivitelezése során a 3R (replacement, reduction, refinement) alapelvet követtük.

3.1.1. HEK293 sejtek kezelése, transzfekciója és immunfestése

Kísérleteinkhez a HEK293 sejt vonalat Dr. Gereben Balázs szívélyes hozzájárulásának köszönhetően használhattuk. A tenyésztést a szokásos eljárásnak megfelelően T25-ös tenyésztőflaskában végeztük magas glükóztartalmú (25 mM d-glükóz) Dulbecco-módosított Eagle-médiumban, 10% (v/v) hőinaktivált borjúsérummal kiegészítve 37 °C-on és 5% CO₂ tartalommal. A sejtek mikoplazma fertőzésmentességét rendszeres DAPI festéssel ellenőriztük. A transzfekció előtt a sejteket poly-d-lizinnel (20 µg/ml) borított, üvegaljú edényben (Ibidi, Martinsried, Germany) szélesztettük. Összesen 1 µg mennyiségű, N-végződésén EGFP-vel jelölt CB₁ fehérjét kódoló cDNS-t (Tappe-Theodor és mtsai., 2007) használtunk a transzfekcióhoz, amelyhez a gyártói utasításnak megfelelően 1 µg Lipofektamin 2000-et (Invitrogen) adtunk edényenként. A sejteket tartalmazó edényeket 18 óráig tartottuk 37 °C-on és 5% CO₂ jelenlétében a megfelelő mennyiségű cDNS felvétele és a megfelelő fehérjetermelés elérésére. Az inkubáció után a sejteket fixáltuk 4% (m/v) paraformaldehiddel (PFA) 15 percen keresztül, háromszor mostuk 0.1 M foszfát-pufferben (PB). Az antitestjelölés érdekében a sejtmembránokat átjárhatóvá tettük 0.05 M Trisz-pufferelt sóoldatban (TBS) oldott 0.1% (v/v) Triton X-100 10 percen keresztüli kezeléssel. Az elsődleges CB₁ receptor antitesttel (tengerimalac anti-CB₁ IgG, 1 µg/ml TBS-ben oldva) a mintát egy órán át kezeltük (Fukudome és mtsai., 2004). A mintát háromszori TBS mosás után saját készítésű STORM másodlagos antitesttel (Cy3 és AF647 jelölt tengerimalac elleni szamar antitesttel, 1:50 arányban, TBS-ben oldva) jelöltük, utána TBS-el és PB-vel mostuk. Közvetlenül a STORM

képkalkotás előtt a PB-t lecseréltük STORM képkalkotási lefedő oldatra (lásd később). Az expressziós szint alapján igyekeztünk minél széles intenzitástartományban EGFP-t termelő HEK sejtekről képeket készíteni, összesen 43 sejtet vontunk be az analízisbe. A képkalkotási körülmények a szöveti preparátumok vizsgálatára használt beállításokkal egyeztek meg (lásd később).

3.1.2. Szövetpreparátum készítése immunfestéshez

Egy alomból származó, felnőtt (50-60 napos), hím, $CB_1^{+/+}$ és $CB_1^{-/-}$ (Prof. Andreas Zimmer, University of Bonn, Germany szívélyes hozzájárulásának köszönhetően) C57BL/6H egereket használtunk az immunfestési kísérletekhez (Zimmer és mtsai., 1999). A perfúzió előtt az állatokat mélyaltattuk hasüregbe adott ketamin–xylazin (25 mg/ml ketamin, 5 mg/ml xylazin, 0,1% w/w pipolphen; 1 ml/100 g) injekcióval. Az érrendszert szíven keresztül, fiziológias sóoldattal (0,9% NaCl, 2 perc) mostuk át, majd a szövetek rögzítése céljából 4%-os PFA-tartalmú 0,1 M-os foszfát-pufferrel (PB, pH=7,4) perfundáltuk 20 percen keresztül (100 ml/egér). A perfúzió után az agyat eltávolítottuk a koponyából, blokkokra vágtuk és utófixáltuk 4% PFA-ban 2 órán keresztül. A blokkokból 20 μ m-es metszeteket készítettük Leica (Nussloch, Germany) VT-1000S vibratómmal, majd PB-ben kimostuk a feleslegben maradt PFA-t. A szív és vese mintákat ugyan ezzel a módszerrel készítettük.

3.1.3. Akut, túlélő agyszelet preparátum készítése és elektrofiziológiai elvezetések

Izofluránnal mélyaltatott 25–30 napos, hím, C57BL/6H $CB_1^{+/+}$ vagy $CB_1^{-/-}$ egerek lefejezése után az agyat gyorsan eltávolítottuk a koponyából és jéghideg magas szaharóztartalmú mesterséges agy-gerincvelői folyadékba (ACSF metszőoldat összetétele; NaCl 85 mM, szaharóz 75 mM, KCl 2,5 mM, glükóz 25 mM, NaH_2PO_4 1,25 mM, $MgCl_2$ 4 mM, $CaCl_2$ 0,5 mM, és $NaHCO_3$ 24 mM; egyensúlyban 95% O_2 és 5% CO_2 gázzal) tettük. A 300 μ m-es, koronális szeleteket jéghideg, oxigénnel dúsított, magas szaharóz tartalmú ACSF-ben metszettük vibratómmal. A metszés után a szeleteket 1 órán keresztül 34°C-os magas szaharóz tartalmú ACSF-ben tartottuk ezután a mikroszkóp mintatartó kamrájába helyeztük (Luigs & Neumann, Ratingen, Germany), ahol folyamatosan ACSF-et áramoltattunk (ACSF mérőoldat összetétele; NaCl 126 mM, KCl 2,5 mM, glükóz 10 mM, NaH_2PO_4 1,25 mM, $MgCl_2$ 2 mM, $CaCl_2$ 2 mM, és $NaHCO_3$ 26

mM; egyensúlyban 95% O₂ és 5% CO₂ gázzal áramoltatva). A sejteket 900 nm-es infra tartományban kivilágított, DIC (Differential Interference Contrast) kontraszt mikroszkóppal (Nikon Eclipse FN-1, Tokyo, Japan), 40x NA:0.8 vízbemerülő objektívvel és interline CCD-vel (Hamamatsu) tettük láthatóvá. A teljes-sejt elvezetéshez patch-clamp pipettát (3–4 MΩ) használtunk, amelyet 0,2% biocytin, 126 mM K-glukonát, 4 mM KCl, 10 mM HEPES, 4 mM ATP-Mg, 0,3 mM GTP-Na, 10 mM foszfo kreatin, tartalmú és pH 7,2, 270–290 mOsm ozmolaritású oldattal töltöttünk fel. A hippokampusz CA1 területének piramisrétegi piramis-sejtjeit és radiátum rétegbeli interneuronokat whole-cell patch-clamp (teljes-sejt folt-áramzár) elrendezésben mértük. Az elektromos jelgörbét MultiClamp700B erősítővel rögzítettük (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). A görbét 3 kHz-es Bessel szűrővel szűrtük és 10kHz-el digitalizáltuk Digidata 1440A analóg–digitális átalakítóval (Molecular Devices). A nyugalmi membránpotenciált current-clamp (áramzár) módban mértük, a sejt választ az áramlépcső hatására (-200-tól 300-ig, 50 pA-es lépésekben, 1s) rögzítettük. A sejtet ezután voltage-clamp (feszültségzár) módban 70mV-on tartottuk 10-30 percre a biocitinnel való feltöltés érdekében. A soros ellenállást folyamatosan figyeltük és a mérést elvetettük, ha az értéke több mint 20%-ot változott vagy elérte a 20 MΩ-ot. A felvett görbét Clampfit 10.2 szoftverrel analizáltuk (Molecular Devices). A mérés után a szeleteket 4% PFA tartalmú PB-be tettük 40 órára 4°C-ra, így rögzítettük a szövetet a későbbi mikroszkópos vizsgálatokhoz.

3.1.3. Egerek krónikus THC kezelése

A kezeléseket Prof. Miriam Melis végezte a Cagliari Egyetemen, Olaszországban az Olasz Egészségügyi Minisztérium előírásainak (D.L. 116/92; D.L. 111/94-B) és az Európai Gazdasági Közösség ide vonatkozó irányelveinek (219/1990 és 220/1990) megfelelően. A kísérletben hím, C57BL/6J, 21-33 napos egereket (Harlan) használtunk. A kezelés elején az egereket közös helyen tartották ellenőrzött körülmények között (hőmérséklet: 21 ± 1 °C, páratartalom: 60%, 12 órás világos-sötét ciklus, korlátozás nélküli táplálék- és folyadék-hozzáférés). Az állatokat véletlenszerűen két kezelési főcsoportra osztottuk. Az egyik főcsoport Δ^9 -tetrahidrokannabinolt (THC) kapott, 10 mg/kg mennyiségben, a másik főcsoport csak a hordozó sóoldatot kapta hasúri injekció formájában naponta kétszer 6.5 napon keresztül. A THC-t (THC-Pharm GmbH) 1%-os (v/v) ethanol és 2% (v/v) Tween80 sóoldatában elegyítettük. A kezelt állatok hat kísérleti

csoportja közül kettőt az utolsó kezelés után 24 órával izofluránnal altattunk és az elektrofiziológiai méréseket elvégeztük. A harmadik és negyedik csoportbeli állatokon az elektrofiziológiai és anatómiai méréseket a kezelés vége után 11.5 nappal végeztük, amíg az ötödik és hatodik csoportnál a mérésekkel 6 hetet vártunk. Az összes mikroszkópos mérést, festést és képalkotást a kezelésre nézve vakon végeztünk.

3.2. Szöveti minták immunfestése

3.2.1. Akut, túlélő szeletekben biocitinnel töltött sejtek előhívása

A mintákat rögzítés után alaposan mostuk PB-ben és 0.05 M TBS (pH = 7,4) majd 0,5% Triton X-100-al (TBS oldatban) kezeltük 30 percen keresztül. A biocitin megjelenítéséhez a mintára ezután AF488-sztreptavidint (1:1000 hígításban, 016-540-084, Jackson ImmunoResearch) mértünk, majd TBS-el és PB-vel mostuk, végül tárgylemezre húztuk fel és DAPI-tartalmú Vectashield-el fedtük le (Vector Laboratories). A fedőlemezt (24 × 40 mm Thermo Scientific, Menzel-Glaser, # 1.5) körömlakkal (Moyra, Benevia Kft.) rögzítettük.

3.2.2. Immunfestés STORM mikroszkópiára

A 300 µm vastag akut agyszeletet vagy a perfundált állatból származó 60 µm-es metszeteket desztillát vízben oldott 2%-os agarózba ágyasztuk és 20 µm vastag koronális metszeteket készítettünk Leica VT-1000S Vibratommal PB-ben. A metszeteket alaposan mostuk TBS-ben majd blokkoltuk 1% (m/v) marha vagy emberi szérum albuminnal (HSA, Sigma) és a perfundált mintáknál még Triton X-100-at is adtunk. Az affinitástisztított elsődleges antitesteket TBS oldatban hagytuk a metszeteken 24 órára szobahőmérsékleten (20-25 °C) rázógépen. A következő elsődleges antitesteket használtuk munkánk során: (tengerimalac anti-CB₁ 1:1000, egér anti-CCK 1:3000, egér anti-bassoon 1:2000, nyúl anti-CB₁ 1 µg/ml, egér EGFP 1:1000). A mintákat ezután alaposan mostuk TBS-ben, majd a megfelelő másodlagos antitest rámerése után 4 órát vártunk. Végezetül a metszeteket újra alaposan mostuk TBS-ben, illetve PB-ben, a hippokampuszt kivágtuk és fedőlemezre húztuk fel PB-ben, úgy, hogy minden fedőlemezre egy metszet került, majd hagytuk megszáradni. A fedőlemezre száradt mintákat 4°C-on tároltuk.

3.2.3. Antitest jelölése aktivátor-riporter STORM képalkotáshoz

A másodlagos antitestek fluorofórokkal jelöléséhez a következő festékek amino-reaktív szukcinimidil-észteres változatát használtuk: AF405, AF647 (Molecular Probes, Carlsbad, USA), és Cy3 (GE Healthcare Little Chalfont, UK), amelyeket 0,2 mg/ml töménységben oldottunk DMSO-ban. Az antitestet (50 µl) és a festékeket (aktivátor: AF405, 4 µl vagy Cy3, 1,5 µl; és riporter AF647, 0,6 µl) egy kémcsőben vegyítettük és 6 µl, 1M-os NaHCO₃-at adtunk hozzá a reakció elindulásához. Az elegyet 30 percig szobahőmérsékleten tartottuk végül 140 µl DPBS-t adtunk, hogy a reakciót megállítsuk. Az antitestekhez nem kötött jelölő anyagoktól való megszabadulás érdekében az elegyet egy Sephadex G-25 kromatográfiás oszlopon (GE Healthcare) átszűrtük úgy, hogy az első 550 µl térfogatnyi lemosott oldatot eldobtuk, majd a következő eluálás során kapott 300 µl térfogatnyi oldatot begyűjtöttük. A végső oldat antitest koncentrációját és az egy antitestre eső aktivátor/riporter arányt spektrofotométerrel ellenőriztük (SmartSpec Plus, Bio-Rad, Hercules, USA).

3.3. Konfokális és korrelatív konfokális STORM képalkotás

3.3.1. Képalkotás biocitinnel töltött sejtekről

Az akut túlélő agyszeletekből származó preparátumban (lásd korábban) Nikon A1R konfokális mikroszkóppal alacsony nagyításon 4x vagy 10x objektívvel, nyitott pinhole-al, folyamatos 512x512 pixeles pásztázással, 488 nm-es megvilágítással és 550/20 emisszió mellett megkerestük a töltött sejteket. CFI Plan Apo VC 20× NA: 0,75 objektívvel Z-sorozatot vettünk fel a látótérbe optimálisan elhelyezett sejtről (2048 x 2048 pixel, 131 nm/px, 0,75-1µm Z lépésközzel, 100-150 µm Z tartományban, 488 nm megvilágítással, 550/50 emissziós tartományban) Nikon A1R vagy Nikon C2 konfokális fejjel Nikon Eclipse Ti-E, illetve Nikon Eclipse Ni-E mikroszkópokon.

3.3.2. Korrelatív konfokális és STORM képalkotás

Minden csak STORM és korrelatív konfokális/STORM képalkotást Nikon Eclipse Ti-E mikroszkópvázra illesztett Nikon C2 konfokális fejjel, Andor iXon DU-897, hátsó megvilágítású, -70°C-ra hűtött érzékelőjű, elektron-sokszorozó töltés-csatolt eszközzel

(EMCCD) készítettünk. Fényforrásként a Nikon LU4 lézerdobozát használtuk, a felhasznált lézerek pontos jellemzőit az **1. táblázat** tartalmazza.

1. táblázat A mérésekhez használt Nikon LU4 lézerdoboz fényforrásainak adatai

Hullámhossz	Gyártó	Típus	Teljesítmény
647 nm	MPB Communications Inc.	2RU-VFL-P-300-647-B1	300 mW
561 nm	Coherent Sapphire	561-100 CW CDRH	100 mW
488 nm	Coherent Sapphire	488-200 CW CDRH	200 mW
405 nm	CVI Melles Griot	56RCS/S2780	40 mW

A STORM epifluoreszcens kivilágítását egy irányban motoros, másik irányban manuálisan dönthető megvilágítási szögű TIRF karral végeztük, amelyben egy 2x nagyítású lencsével a megvilágítást a látótér közepére fókuszáltuk a nagyobb lézerintenzitás érdekében. Az Andor EMCCD kamera előtt egy hengeres lencsét használtunk az asztigmatizmus alapú 3D képalkotáshoz (Huang 2008). Mind a nagy felbontású konfokális képeket, mind pedig a STORM és epifluoreszcens képeket 100x, NA=1,49, CFI Apochromat TIRF WD=1,2, hőmérséklet kalibrációs gyűrűs, Nikon objektívvel vettük fel. A képalkotáshoz használt szűrőket a **2. táblázat** foglalja össze. Közvetlenül a képalkotás előtt friss STORM képalkotási lefedő médiumot mértünk össze a következő összetételben: 5% glükóz, 0,1 M 2-Merkaptoetilamin (30070, Sigma, St. Louis, USA), 1 mg/ml glükóz-oxidáz (G2133, Sigma) és 1500 U/ml kataláz (C30, Sigma) Dulbecco-féle foszfát-pufferelt sóoldatban (DPBS). Az üvegaljú Petri-edényekben lévő HEK sejtek pufferét lecseréltük erre a képalkotási médiumra és légmentesen lezártuk, így helyeztük a mikroszkóp tárgyasztalára. A szöveti minták esetében, amelyek a fedőlemezre (24mm x 40mm) voltak szárítva, tárgylemezre csöppentettünk 25 µl STORM képalkotási médiumot és a mintát tartalmazó fedőlemezt rövid oldalával a tárgylemezre illesztettük, majd addig toltuk, amíg hozzáért a médium

csepphez, végül pedig a másik rövid oldalát alátámasztó csipesszel lassan leeresztettük. A hegyes csipesz mindvégig a lemez alatt volt, így ha buborék keletkezett, akkor vissza lehetett emelni és a buborékot eltávolítani. A buborékmentesség fontosnak bizonyult, mert a minta jelentős csúszását okozhatja, ami felbontásvesztéshez vezet. A lefedés után a fedőlemezt rögzítettük körömlakkal. A minta megfelelő területét zöld EPI megvilágításban kerestük ki a 100xTIRF objektívet használva (töltött sejt boutonjai). A kívánt fókuszsíkot a Ti-E mikroszkóp PFS (Perfekt Focus System) nevű hardveres fókusztartó rendszerével rögzítettük, majd a konfokális képalkotásra váltva a Z-sorozatot vettük fel (512x512x15 voxel, 78nm x 78nm x 150nm voxel mérettel). Ahhoz, hogy a két modalitás, a konfokális és a STORM kép a lehető legjobban illeszkedjen egymáshoz a C2 és az EMCCD kamerák forgási szögét, eltolását és nagyítását illesztettük egymáshoz. A konfokális Z-sorozat felvétele után a mikroszkóp optikai útját ismét az EPI megvilágításra és az EMCCD kamerára váltottuk és kikapcsoltuk a fókusz-zár rendszert.

2. táblázat A STORM képalkotáshoz használt szűrőkockák jellemzői

Szűrő	Megvilágítás	Gerjesztés (nm)	Emisszió (nm)
Zöld	EPI	488	515-555
STORM	EPI	405,488,561,647	670-760
Zöld	Konfokális	405,488,561,647	500-550
DAPI/Cy5	Konfokális	405,488,561,647	420-475,660-760

Az AF647-et kikapcsolt állapotba juttattuk a fókusz fel-le mozgásával 100%-os lézerintenzitású 647 nm-es megvilágítás mellett a STORM szűrőkockát használva. Az eredeti fókuszsíkhöz a PFS visszakapcsolásával térünk vissza, amely eltolási értékén keresztül megjegyzi az eredetileg beállított pozíciót. A STORM képalkotást végül szintén az EMCCD kamerával készítettük (256x256 pixel, 160 nm/pixel, 14 bit szürkeárnyalat), egyszeres festés esetén 1000 képalkotási ciklust végezve, minden ciklusban 1 darab alacsony intenzitású 405 nm vagy 561 nm aktivációs képpel és 3 darab 100%-os

intenzitású 647 nm-es megvilágítású riporter képpel, 30 ms-os záridőt használva (4*1000 kép, kb. 2 perc, EM erősítés: 300, konverziós erősítés: 2,5). A kettős jelölések esetében ismét 1000 ciklust vettünk fel, egy ciklus 8 képből állt: 1 alacsony intenzitású 405 nm-es aktivációs kép, 3 100%-os intenzitású 647nm-es megvilágítású riporter, 1 alacsony intenzitású 561nm-es aktivációs kép, 3 100%-os intenzitású 647 nm-es megvilágítású riporter kép, mindegyik 30 ms-os záridővel (8000 kép, kb. 4 perc, EM erősítés: 300, konverziós erősítés: 2,5). Az alacsony aktivátor lézerintenzitásokat úgy állítottuk be, hogy képenként a lehető legtöbb felvillanást lehessen azonosítani. A minta fókuszon kívüli területéről érkező 'hátteret' a kivilágítás szögének megdöntésével csökkentettük, melyet a TIRF kivilágítókar motoros szögállítójával értünk el. A képfelvételeket a Nikon NIS-Elements AR 4.3 programmal és az N-STORM 3.4 modullal vezéreltük.

A STORM képek felbontásának mérésére a szokásos eljárást használtuk (Deschout 2014). Mind a HEK sejtes, mind pedig a szöveti STORM képekben kerestünk 50-50 olyan lokalizációs ponthalmazt, amely feltehetően egy antitesten lévő fluorofórtól származik. Ezeknek a lokalizációs pontoknak a tömegközéppontjait meghatároztuk és ezek szerint a halmazokat egymásra illesztettük, amiből egy egyesített lokalizációs halmazt kaptunk. A halmazban az X,Y illetve Z koordináták eloszlására illesztett Gauss-görbe standard deviációját meghatároztuk és ez az érték adta meg a lokalizációs pontosságot.

3.3.3. A 3D kalibrációs görbe meghatározása

A 3D kalibrációs görbe meghatározásához 100 nm-es TetraSpeck fluoreszcens gyöngyöket használtunk (Thermo Fisher Scientific CN:T7279). Fedőlemez (18 mm x 18mm, #1,5) közepére 100 µl DPBS-t helyeztünk, majd ebbe 1 µl gyöngyöt pipettáztunk, 30 perc után a cseppet desztillált vízzel lemostuk és 10 percig száradni hagytuk. A tárgylemez közepére 10 µl DPBS-t cseppentettünk, majd erre rátettük a gyöngyöket tartalmazó fedőlemezt és körömlakkal rögzítettük. A mintát a mikroszkóp piezo mozgatójába (Nano-Drive, Mad City Labs) helyeztük és leszorítottuk. A gyöngyöket fókuszbba hoztuk a 100x TIRF objektívvel, az EMCCD kamerát, STORM kockát és 1%-os intenzitású, 647 nm-es megvilágítást használva. Olyan látóteret választottunk, ahol a gyöngyök nagy számban vannak jelen (kb. 40-60 db) de képük a fókuszsíktól távol sem fed át. Fél óra elteltével elindítottuk az N-STORM kalibrációs protokollját, mialatt a

mikroszkóp és a minta mechanikailag stabilizálódott. A hengeres lencsét a kamera elé csúsztattuk. Húsz alapvonalis kép felvétele után, a piezo asztalt mozgatva 10 nanométerenként a gyöngyök tökéletes fókuszához képest -800 nm-től +800 nm-ig minden pozícióban felvettünk egy képet (256 x 256, 160 nm/pixel, EX: 1% 647 nm, STORM kocka, EM erősítés: 300, konverziós erősítés: 2,5) végül az asztal visszatért a 0 pozícióba és újabb 20 alapvonalis kép felvételével zárult a protokoll (összesen 200 kép). A szoftver minden képen kikereste a gyöngyök helyét és a ROI-ba eső pixel intenzitásokra a következő elliptikus Gauss görbét illesztette:

, ahol h a csúcsmagasság, b a háttér (x_0, y_0) a csúcs középpontja w_x és a w_y pedig a

$$G(x, y) = he^{\left(-2\frac{(x-x_0)^2}{w_x^2} - 2\frac{(y-y_0)^2}{w_y^2}\right)} + b \quad (10)$$

PSF szélessége x illetve y irányban. A w_x illetve a w_y – Z pozíció (piezo mozgató adatából) függvényre pedig a következő defókuszáló függvényt illesztette:

$$w_{x,y}(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z-c}{d}\right)^2 + A \left(\frac{z-c}{d}\right)^3 + B \left(\frac{z-c}{d}\right)^4} \quad (11)$$

ahol w_0 a PSF szélessége, mikor a gyöngy pontosan fókuszban van, c a fókusz eltolás az átlagos fókuszsíkhöz képest, d az mikroszkóp mélységélessége, A és B magasabb rendű tagok együtthatói a nem ideális képalkotás kompenzációjára. Az utóbbi függvény alapján határozza meg a szoftver a lokalizáció Z pozícióját.

3.4. Konfokális és korrelatív konfokális/STORM képelemzés

3.4.1. Konfokális Z-sorozatok dekonvolúciója, transzformációja

A nagy nagyítású konfokális Z-sorozatokat a Huygens Professional (SVI, Hilversum, Netherlands) szoftverrel dekonvolváltuk, a mikroszkóp és a médium paramétereinek alapján számolt PSF-al, legnagyobb valószínűség módszerével, kilépési paraméternek maximum 100 lépést, illetve 0,01-es eredménybeli változást állapítottunk meg. A kapott eredményt 16 bites ics (Dean 1990) képformátumban mentettük. A dekonvolvált konfokális képet a STORM képre a korrelatív analízishez az ImagJ TurboReg (Thevenaz 1998) beépülő alkalmazásával illesztettük. Ez az algoritmus egy affin transzformációt végez. A transzformáció paramétereit egy konfokális mikroszkóppal és STORM EMCCD-vel felvett megfelelően sűrű, 100 nm-es gyöngyöket tartalmazó mintáról készült képpár alapján határoztuk meg (konfokális kép: 512x512, 80 nm/pixel és EMCCD: 256x256, 160 nm/pixel 512x512-re újra mintavételezve).

3.4.2. A STORM képek analízise

A mikroszkóppal felvett STORM képsorozatot vagy mozgóképet a Nikon NIS-Elements AR 4.3 program N-STORM 3.4 moduljával elemeztük. Minden képhez ugyanazokat az analízis paramétereket használtuk (csúcsmagasság: 2500 szürkeárnyalat, automatikus ROI illesztés, csúszás (drift) korrekció). Az aktivátor-riporter megközelítésű kettős STORM festésekben minden képnél ugyanazt az áthallás korrekciós faktort használtuk. A Z pozíció számításához kísérletileg meghatározott 3D kalibrációs görbét használtunk.

3. táblázat A NIS-Elements STORM analízis programjának kimeneti adatai

Csatornanév	A jelölési csatorna neve.
X	A lokalizáció X koordinátája nanométerben.
Y	A lokalizáció Y koordinátája nanométerben.
Xc	A lokalizáció X koordinátája nanométerben az elcsúszás korrekció után (drift correction).

Yc	A lokalizáció Y koordinátája nanométerben az elcsúszás korrekció után (drift correction).
Magasság	A lokális intenzitáscsúcs detektálása után a legfényesebb pixel intenzitásának és a háttér különbsége.
Terület	A csúcs alatti terület (intenzitás*pixel ²).
Szélesség	A W _x és W _y értékek átlaga.
Fi	A lokalizáció távolsága a W _x , W _y térbeli Z kalibrációs görbétől nanométerben. A Z hibás pontok ez alapján az érték alapján esnek ki.
Ax	A W _y /W _x arány.
BG	A lokalizáció háttére. A lokalizációt befoglaló ROI sarok pixeleinek az átlaga.
I	A lokalizációhoz tartozó pixelek összintenzitása. (A fókusz síkban 5x5 pixel a ROI, ettől távolabb a defókuszáltság miatt nagyobb.
Képsorszám	Annak a képnek a sorszáma, amelyben a lokalizáció megjelent.
Hossz	Egymást követő képek száma a bekapcsolt forrással.
Z	A lokalizáció Z koordinátája, a 0 pont a fedőlemez.
Zc	A lokalizáció Z koordinátája nanométerben az elcsúszás korrekció után (drift correction).
Fotonok száma	A forrás által kibocsátott összes fotonok száma. Ha több képen is megjelent egymás után, akkor a foton számok összeadódnak. A foton számot az összintenzitás és a foton/intenzitás (ADU) szorzata adja.
Laterális lokalizációs pontosság	Laterális (X-Y) lokalizációs pontosság a Thompson.formulával számolva a foton számból.

Xw	X koordináta az XY síkbeli kromatikus aberráció korrekciója után.
Xwc	X koordináta az XY síkbeli kromatikus aberráció és az elcsúszás korrekciója után.
Yw	Y koordináta az XY síkbeli kromatikus aberráció korrekciója után.
Ywc	Y koordináta az XY síkbeli kromatikus aberráció és az elcsúszás korrekciója után.

A lokalizációkat tartalmazó listákat txt formátumban mentettük el, amely a **3. táblázat** szerinti paramétereket tartalmazta minden felvillanásra. Az egyes felvillanásokhoz tartozó foton számokat a kamera gyári adatlapján közölt átváltási faktorról számítja ki a szoftver a 14 bites szürkeárnyalat értékekből (pixel intenzitás).

3.4.3. Biocitinnel jelölt sejtek axonterminálisainak korrelatív konfokális és STORM képeinek elemzése

Az egyes idegvégződésekről készült dekonvolvált konfokális Z-sorozatok beolvastuk ImageJ-be (Schindelin és mtsai., 2015), majd a 15 réteg közül kivettük azt a középső hármat, amelyek maximális intenzitás vetülete megfelel hozzávetőlegesen a STORM képek Z tartományának. Erre a vetületre alkalmaztuk azt az affin transzformációt (TurboReg), ami korrigálja a konfokális és a STORM képek közötti forgási, eltolási és nagyítási különbségeket. Ezután beolvastuk az adott boutonhoz tartozó STORM kép txt állományát és pontokkal jelenítettük meg az egyes lokalizációkat. A még fennmaradt esetleges eltéréseket a konfokális csatorna mozgásával korrigáltuk. A konfokális pixeles vetületképet 1 nm/pixel-re méreteztük át és ezen a képen körülrajzoltuk a bouton, hogy megkapjuk azon STORM lokalizációk halmazát, amelyek az adott boutonhoz tartoznak és végül elmentettük ezt a kiválasztott halmazt ismét txt formátumban. A későbbi elemzések részleteit az Eredmények fejezet tartalmazza.

3.4.4. A STORM mikroszkópiás képek megjelenítése

A txt formátumú STORM képek megjelenítésére háromféle módszert használtunk. A NIS-Elements a lokalizációkat egy kereszttel vagy az adott felvillanáshoz tartozó

számított lokalizációs pontossággal egyenlő félértékszélességű normalizált Gauss-intenzitáseloszlással jeleníti meg. A színkódolás csatornánkénti vagy Z mélység szerinti lehet. A konvex burkolók 3D megjelenítésére a VMD (Visual Molecular Dynamics, University of Illinois, USA (Humphrey és mtsai., 1996)) szoftvert használtuk. A txt formátumot PDB (Protein Data Bank) formátummá alakítottuk a beolvasáshoz. Ebben az esetben a lokalizációkat a számított lokalizációs pontosságnak megfelelő átmérőjű gömbbel helyettesítettük, a konvex burkolót pedig pálcikákkal jeleztük. A klaszterek színezéséhez a PDB formátum atomi béta faktorát használtuk. A VividSTORM szoftverben a lokalizációk megjelenítésére a gyorsabb működés érdekében pöttyöket használtunk.

3.5. Személyes hozzájárulás

A dolgozatban bemutatott fejlesztések és kísérleti eredmények természetesen több kollégám hozzájárulásával jöhettek létre. Személyes hozzájárulásom lényege röviden összefoglalva a korrelált konfokális és STORM mikroszkóprendszer megfelelő optimalizálása és kalibrálása, a konkrét mikroszkópos adatgyűjtés, valamint az adatelemzési algoritmusok és a VividSTORM szoftver fejlesztése volt. Részt vettem csoportunk STORM kutatási programjának tervezésében és az elkészült tanulmányok megírásában is. Legértékesebb konkrét fejlesztési hozzájárulásomnak a konfokális és STORM képalkotás és analízis részleteinek kidolgozását és az elemzésekhez szükséges saját fejlesztésű programok megalkotását érzem. Fontos kiegészítő hozzájárulás volt a STORM mikroszkóp szöveti és sejtmentes felbontásának mérése, Z kalibrációjának, megvilágításának és objektívének optimalizálása is. A konvex burkoló és a konvex burkolón mért felszíni távolságok mérési algoritmusát Dr. Matolcsi Máté segítségével dolgoztam ki. Az algoritmus leprogramozása, a felszíni sűrűségeloszlások mérési módszere és leprogramozása, a klaszteranalízis programozása, a 3D adatok vizualizációja pedig a saját munkám.

A kísérletekben használt HEK293 sejteket Dr. Christopher Henstridge növesztette és transzfektálta. Az immunfestések és az analízis egy részét Dr. Dudok Barna végezte. A STORM minták kirakását nagyrészt Pintér Balázs végezte, de Dr. Szabadits Eszter is hozzájárult munkájával. Az egyedi sejtek töltését és az elektrofiziológiai méréseket Dr. Katona István, Dr. Sang-Hun Lee, Dr. Marco Ledri és Dr. Szabó Szilárd végezték. A

VividSTORM grafikus felületét, az aktív kontúr, illetve a szabadkézi kijelölést, és a képek összerendezését Miczán Vivien és Dr. Horváth András programozták. A vese, szív és embrionális agymetszetek készítése László Zsófia munkája. A krónikus THC kezeléseket Dr. Claudia Sagheddu és Dr. Miriam Melis végezte a Cagliari Egyetemen Olaszországban.

4. EREDMÉNYEK

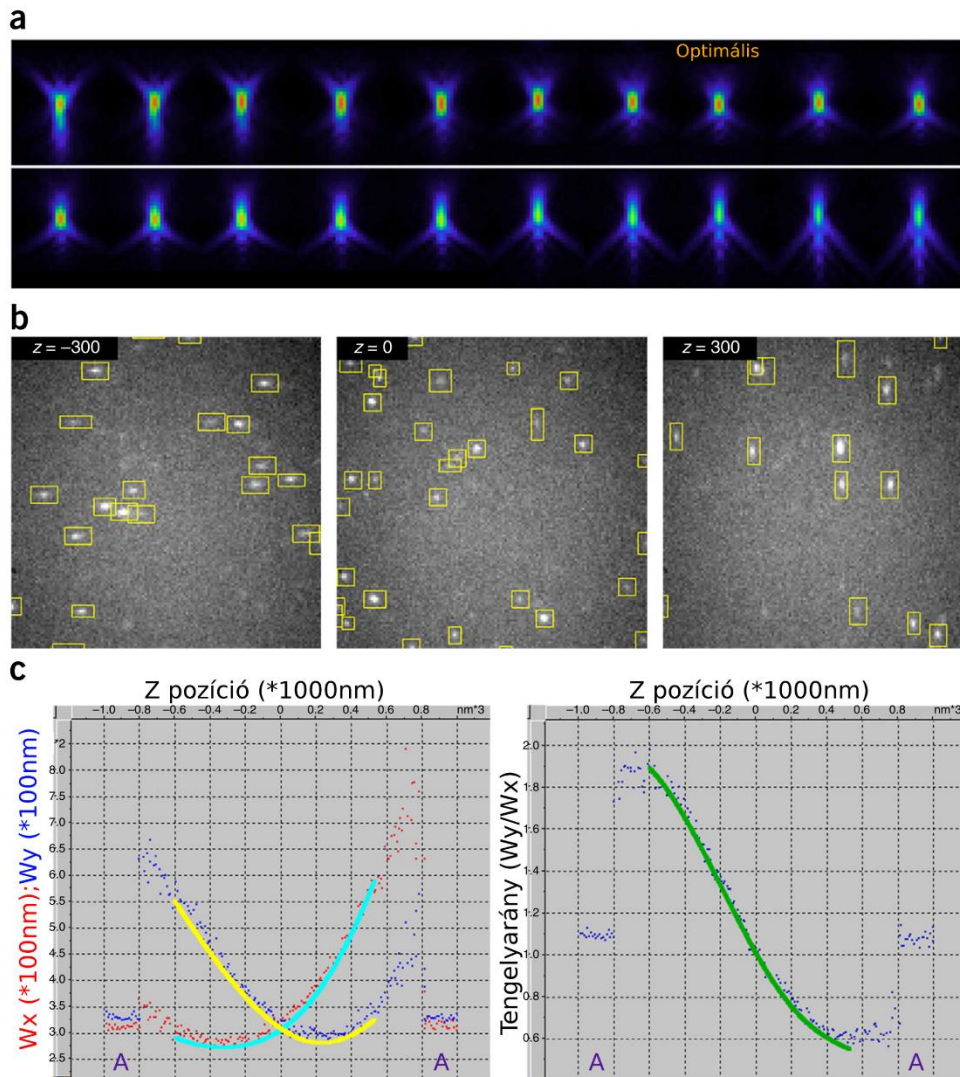
4.1. A STORM mikroszkópos képalkotás optimalizálása sejt kultúrában és idegszövet preparátumon

4.1.1. A képalkotás optimalizálása felbontás alatti méretű fényforrásokkal. A megvilágítás centrálása, az objektív korrekciós gyűrűjének beállítása, a megvilágítás szögének beállítása, 3D kalibráció, kromatikus aberráció korrekció.

Az egyedi molekula lokalizációs mikroszkóp hasonlóan a STED és SIM szuperrezolúciós megoldásokhoz rendszeres kalibrációt igényel. Ezért először szisztematikus méréseket végeztünk a kalibrációs lépések optimalizálásának érdekében (12. ábra). A legfontosabbnak a következő szempontok bizonyultak: *i.* a megvilágítás centrálása; *ii.* az objektív korrekciós gyűrűjének beállítása; *iii.* a Z vagyis 3D kalibráció; *iv.* kromatikus aberráció korrekció. Tapasztalatunk szerint ezeket a műveleteket az előző napon bekapcsolt mikroszkópon (Nikon N-STORM, MCL piezo Z asztallal) kell végrehajtani, stabil hőmérsékleti viszonyok között és alacsony légáramlás mellett.

A megvilágítás centrálásának célja, hogy az optikai szálon a TIRF kivilágító karba érkező lézerefényt a látótér közepére hozzuk és ezzel az optimális kivilágítást beállítsuk. Ez a lépés nagyon fontosnak bizonyult az egyes minták közötti összehasonlíthatóság érdekében.

Ezután a korrekciós gyűrűvel az objektív képalkotását az adott környezeti hőmérsékletre, immerziós olajhoz és fedőlemeztípushoz igazítottuk. Tapasztalataink szerint a korrekciós gyűrű beállításához 100 nm-es négyszínű gyöngy használata bizonyult a leghatékonyabbnak. Felállítottunk egy optimalizációs protokollt, amelyben azonos megvilágítási és képalkotási körülmények között az objektív korrekciós gyűrűjét egyenletes lépésközökben változtatjuk és minden lépésnél egy Z-sorozatot veszünk fel a látótérben egyenletesen elhelyezkedő és még a fókuszsíktól távol sem átfedő képű gyöngyökről. Az optimális pozícióban a PSF az X-Y síkra a lehető legszimmetrikusabb, az intenzitása a legerősebb és a Z irányú felbontás is a legnagyobb (12. ábra (a)).



12. ábra Nikon N-STORM mikroszkóp kalibrálása. (a) 100 nm-es gyöngyök Z-sorozatának X-Z maximális intenzitás vetülete. A 100x TIRF NA1.49 objektív hőmérséklet korrekciós gyűrűjének a végállapotok között egyenletes lépésekben állított helyzeteiben felvett Z-sorozatok. (b) Három különböző Z helyzetben (-300nm, 0nm, +300nm) felvett képen a szoftver által felismert felvillanások sárga keretben látszanak. Jól látszik a -300nm-nél az X irányú megnyúltság, +300nm-nél pedig az Y irányú. (c) Bal: 100nm-es gyöngyök PSF-nek az X (W_x) és Y (W_y) irányú szélessége a piezó asztal Z pozíciójának függvényében. Jobb: A W_y/W_x tengelyarányok a Z pozíció függvényében. Mind a két képen A jelöli az alapvonalat. A kalibráció elején és a végén is 20-20 kép készül a 0 Z pozícióban, amiből látszik a Z irányú mechanikai stabilitás.

Harmadik lépésben a 3D mérésekhez szükséges Z kalibrációs görbe elkészítésére kerül sor az optimalizációs protokollunkban. A z kalibrációs görbe segítségével az asztigmatikus lencsével torzított PSF képének X, illetve Y irányú (W_x és W_y) szélességének arányából nagy precizitással meghatározható a felvillanás Z pozíciója. Méréseink alapján a kalibrálás egyaránt sikerrel elvégezhető megfelelő sűrűségű, fedőlemezre rögzített fluoreszcens jelölőanyagokkal (pl. AF647), valamint 100 nm-es vagy annál kisebb átmérőjű fluoreszcens gyöngyökkel. A kalibráció során Z irányban egy nagy precizitású (10 nm) piezo asztalt mozgattunk és minden lépésnél egy képet készítettünk (Z-sorozat) (12. ábra (b)). Az ismert Z helyzet függvényében ábrázoltuk a W_x és W_y értékeket vagy a W_y/W_x értékeket (12. ábra (c)) majd a kalibrációs görbét erre az adatkészletre illesztettük. Előzetes méréseink során kiderült, hogy a kalibráció alatt a mikroszkóp Z irányú mozgásának minimálisnak kell lennie. Ezt jól nyomon lehetett követni a Z-sorozat előtt és után felvett alapvonal eltérésén (12. ábra (c)).

Az objektívek kromatikus aberrációja miatt a minta ugyanazon pontjából származó, különböző hullámhosszúságú fotonok a mikroszkópos képen különböző pontokba vetülnek (X, Y és Z irányban is). Az eltérés a különböző 'színek' között a látótér területén más és más. Ezért végül a negyedik lépésben ennek a hatásnak a korrigálására a warp korrekciót vezettük be, amely tapasztalataink szerint jól alkalmazható a STORM képalkotás során.

Először meghatározzuk azt a $\mathbf{p} = \mathcal{F}(\mathbf{r}, \lambda)$ vektor-vektor függvényt, amely megmutatja, hogy adott \mathbf{r} pontban található λ hullámhosszú forrásból származó lokalizációt, milyen \mathbf{p} vektorral kell elmozgatni, hogy az kompenzálja az aberrációt. Ehhez a függvényhez ismét felbontás alatti méretű, négy fluoreszcens emissziós tartományú, a látótér egyenletesen, de nem átfedve beborító gyöngyöket használva négy csatornában Z-sorozatot veszünk fel. Ekkor megmérhetjük a gyöngyök \mathbf{r} helyén a \mathbf{p} értékeket. Erre az adatkészletre, illetve kapjuk a $\mathbf{p} = \mathcal{F}_{fit}(\mathbf{r}, \lambda)$ függvényt, amivel korrigálhatjuk a több spektrális csatornában felvett STORM képek kromatikus aberrációját.

4.1.2. A Nikon N-STORM mikroszkóp felbontásának mérése

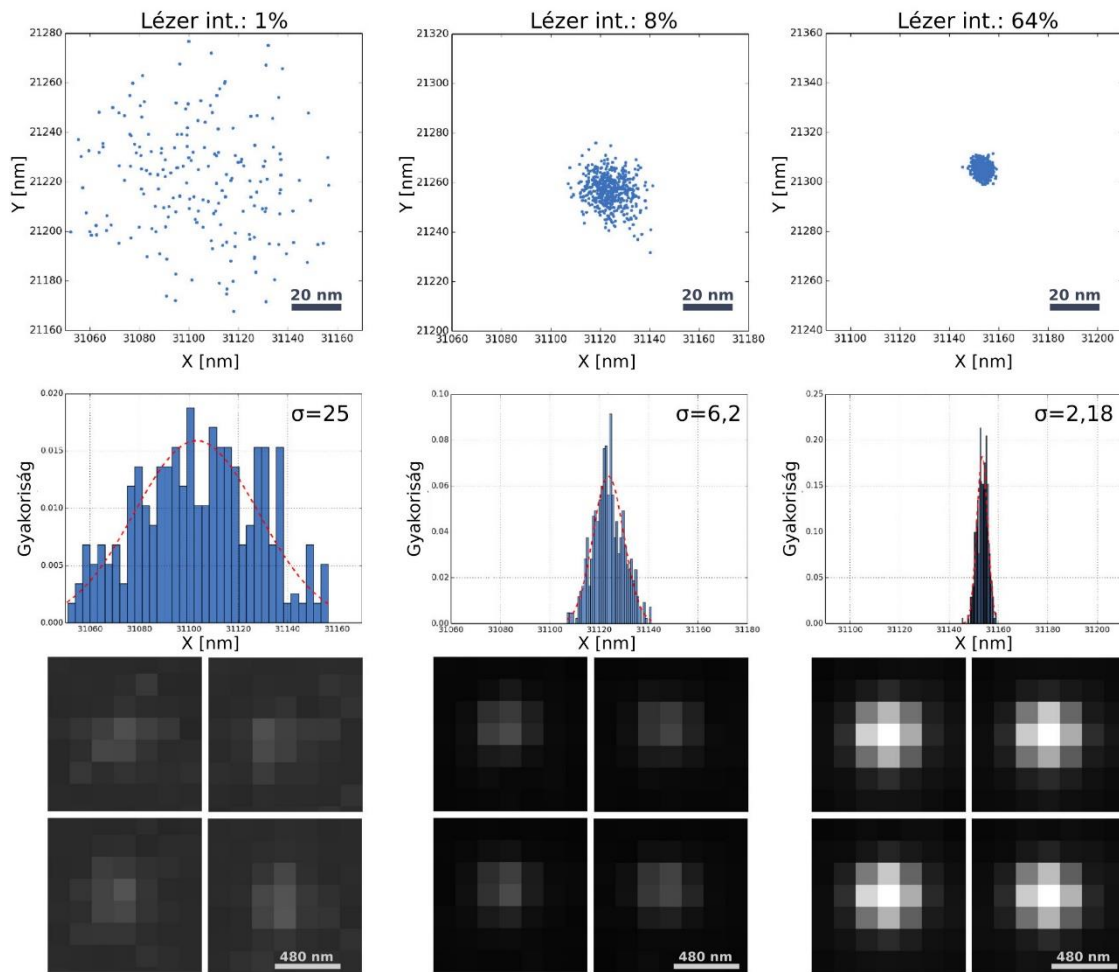
Az egyedi molekula lokalizációs mikroszkópiák feloldóképességét több különböző paraméter is befolyásolja.

1. Az egyik az egyes fényforrások (többnyire fluoreszcens kismolekulák vagy fehérjék) által kibocsátott fotonok száma (Ober és mtsai., 2004; Thompson és mtsai., 2002). Minél több fotont detektálunk egy forrásból, annál pontosabban ismerhetjük a pozícióját. A lokalizációs pontosság a foton szám gyökének reciprokával skálázódik (6. egyenlet).

2. Egy másik fontos paraméter a mikroszkóp mechanikai stabilitásával függ össze. A STORM képalkotás során sok ezer vagy tízezer kép felvételének ideje alatt, a minta X-Y és Z irányban is mozoghat, ami a hardveres (Z irány) és szoftveres (X-Y sík) kompenzációk ellenére a felbontás romlását okozza.

3. A lokalizációs pontok sűrűsége meghatározza, hogy milyen finomságú struktúrákat tudunk megfigyelni (Nyquist-mintavételezés). Például egy kerek struktúrán elegendő lokalizációnak kell lenni, hogy azt ne ötszögnek vagy valamilyen más geometriának lássunk.

Tapasztalatunk szerint a lokalizációs pontatlanságból és a mikroszkóp mozgásából származó együttes hatást a felbontóképességre egyszerűen tudjuk vizsgálni felbontás alatti méretű, fluoreszcens gyöngyök használatával. A mérőrendszerünk tesztelésére fedőlemezen egyenletesen elosztott, de át nem fedő képű, 100 nm-es gyöngyöket használtunk. Egymás után több mérést végeztünk különböző gerjesztési megvilágítás intenzitás mellett, de azonos képfelvételi idővel. Ezzel a megoldással a mechanikai stabilitás minden felvételre egyforma mértékben hatott, így a kapott képeken megbecsülhettük a foton szám hatását a lokalizációs pontosságra. A gyöngyökről ötszáz képet készítettünk és a kapott lokalizációs pontok X tengely mentén mért eloszlására Gauss-görbét illesztettünk, mivel ismert, hogy a Gauss-görbe félérték-szélessége a felbontással egyezik meg (Huang és mtsai., 2008). Az alacsony foton számoknál (kb. 50) jól megfigyelhető volt a pixelek Poisson-zaja, sokszor még a legnagyobb intenzitású pixel sem ugyanoda esett. Hetezer fotonnál a különböző képeken a PSF alakok szinte teljesen átfedőek. Méréseink alapján a 100 nm-es gyöngyök esetében hatezer foton mellett könnyen elérhető a 6 nm körüli felbontás (13. ábra).



13. ábra A lokalizációs pontosság függése a foton számtól. Fedőlemezen rögzített 100nm-es fluoreszcens gyöngyökről készült ötszáz kép lokalizációjának X-Y eloszlása különböző foton számok mellett és a PSF-ök négy-négy véletlenül kiválasztott képe. Az első oszlopban 1%-os lézer megvilágítás mellett felvett képek lokalizációjának eloszlása felül, középen az X tengely mentén a lokalizációk histogrammja és a rá illesztett Gauss görbe, alul a négy véletlen kép az ötszázból. Az oszlopok adatai balról jobbra: lézer intenzitás (LI), foton szám (FSZ), Rayleigh felbontás (d)

LI:1%, FSZ: 46 (std:7.8), Gauss σ : 25nm, d:75nm

LI:8%, FSZ:670 (std:35), Gauss σ : 6.2nm, d:18nm

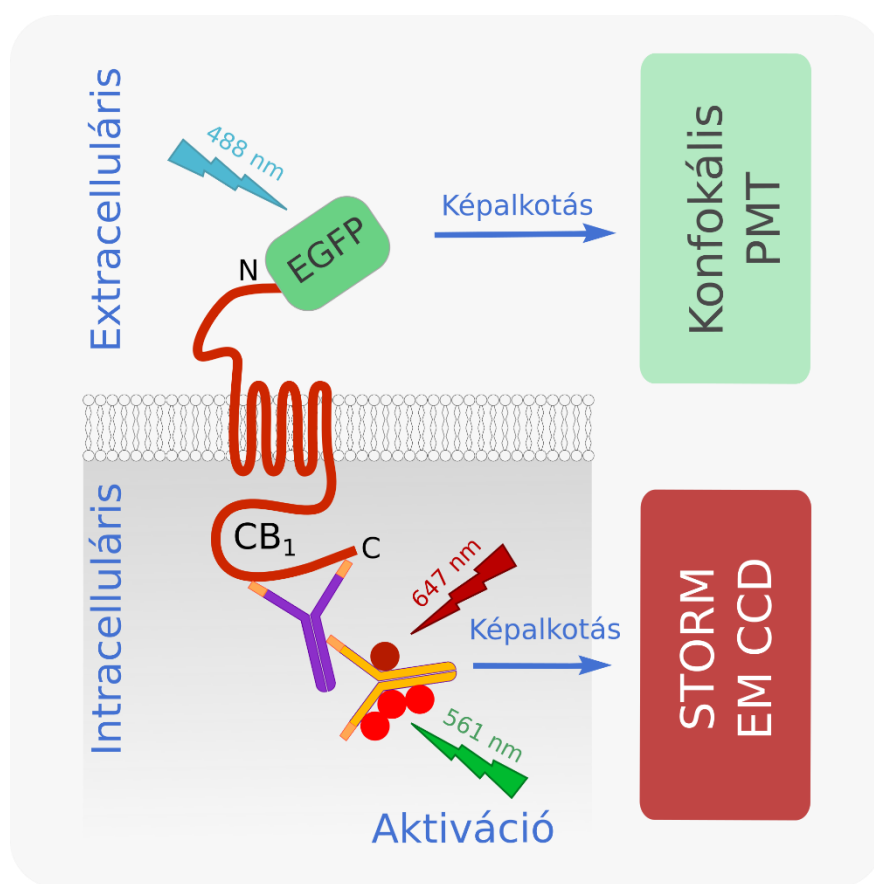
LI:64%, FSZ:6400 (std:111), Gauss σ : 2.18nm, d:6.6nm

4.1.3. A STORM mikroszkópia kvantitatív tulajdonságainak vizsgálata

Fontos kérdés, hogy a STORM képalkotás alkalmas-e abszolút vagy relatív mennyiségi mérésekre. Mivel az STORM alapvetően egy sztochasztikus képalkotás, ami azt jelenti, hogy az egyes jelölések csak egy bizonyos valószínűséggel érzékelhetőek. Ráadásul egy jelölés akár többször is megjelenhet (Dempsey és mtsai., 2011). Ezért úgy véltük, hogy precíz abszolút kvantifikáció megvalósítására kevés az esély, annak ellenére, hogy a szakirodalomban léteznek becslési eljárások a fluorofórok abszolút számára vonatkozólag (Levet és mtsai., 2015; Specht és mtsai., 2013; Veatch és mtsai., 2012). Mivel egy idegrendszeri betegségben egy molekula mennyiségének relatív megváltozása is nagyon hasznos információt jelent, ezért inkább arra a kérdésre összpontosítottunk, hogy milyen módon lehet igazolni, hogy a STORM képalkotással készült méréseink relatív kvantifikációra viszont alkalmasak.

A relatív kvantifikáció azt jelenti, hogy ha több a jelölőanyag által reprezentált célmolekula, akkor több lesz a kapott szuperfelbontású képen a lokalizációs pontok száma (NLP, Number of Localization Points). Ennek ellenőrzésére olyan HEK-293 sejt kultúrát használtunk, amelybe a humán *cnr1* (CB₁ receptor) gén EGFP-t kódoló szekvenciával fuzionált konstrukcióját tartalmazó plazmid DNS-t transzfektáltunk. A HEK-293 sejtek így az N-végződésű EGFP (sejten kívüli szakasz)-CB₁ (transzmembrán) fúziós fehérjét nagy mennyiségben fejezték ki a sejthártyájukban. A sejtek rögzítése és permeabilizálása után a CB₁ receptort immunfestéssel jelenítettük meg egy C-végződésű szakaszon található epitóp ellen készült elsődleges antitestet és további másodlagos antitesteket használva. Az EGFP mennyiségét saját fluoreszcenciájának intenzitásával mértük (14. ábra). Mivel a két jelölés (EGFP és CB₁ elleni antitest) ugyan azt a fehérjeláncot jeleníti meg, a hagyományos fluoreszcens (EPI vagy konfokális) képen az EGFP-nek és a STORM csatornában a CB₁ képnek hasonló térbeli eloszlást kell mutatnia. A 15. ábrán látható epifluoreszcens, konfokális és STORM képek alapján jól látszik, hogy jelölés eloszlások kvalitatív módon ugyanazt a biológiai struktúrát, jelen esetben a HEK sejt plazmamembránját jelenítik meg. A relatív kvantifikációhoz azonban az is szükséges, hogy ahol több a fluoreszcens jel, ott több STORM lokalizációs pontot (NLP) mérünk. Ennek kísérleti meghatározásához több egyedi HEK sejtet vettünk fel mind a konfokális EGFP csatornában, mind pedig a CB₁ immunjelölt STORM csatornában. A HEK sejteket

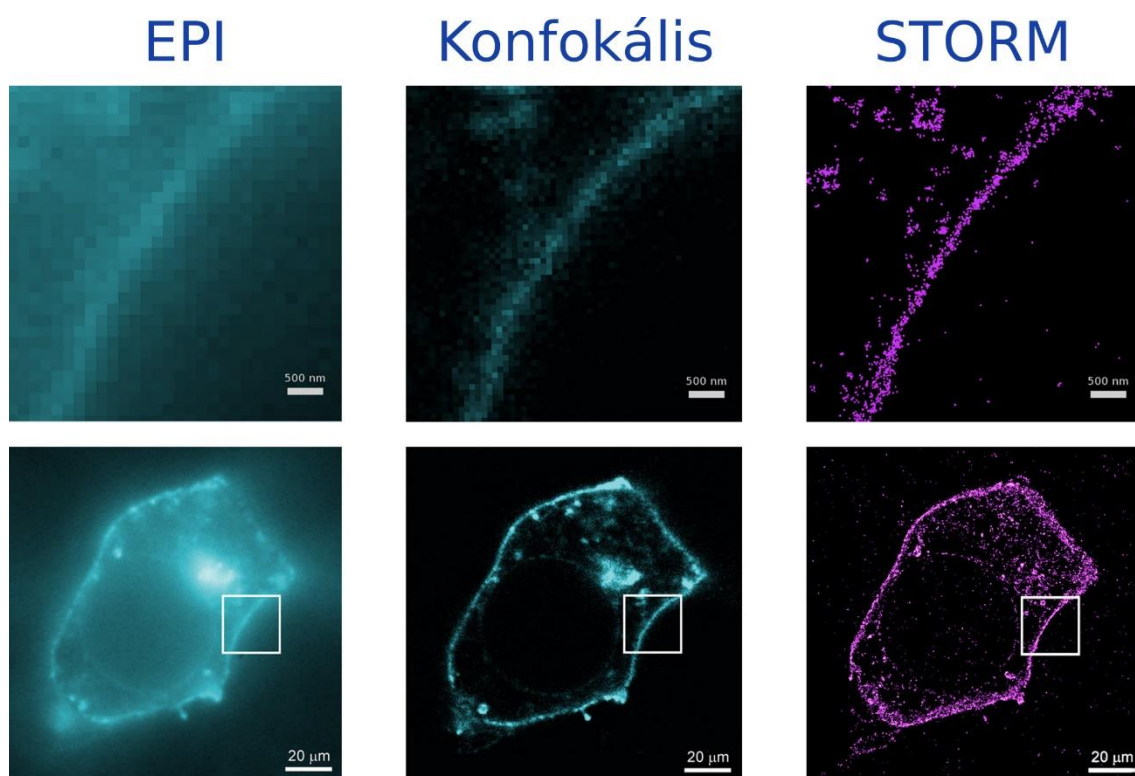
úgy válogattuk meg, hogy a CB₁ expressziós szintjük széles tartományban változzon, azaz fluoreszcens intenzitásuk a detektor dinamikus tartományát kitöltsék. A teljes képekre vonatkozó EGFP konfokális fluoreszcens jel és az összes lokalizációs pont értéke erős pozitív összefüggést mutatott (n = 46 sejt, 5 fedőlemez, Spearman's rank order correlation, R = 0.92, p < 0.001). A fluoreszcens dinamikus tartomány nagy részén a STORM NLP és az EGFP pixelintenzitás jel erősen lineáris összefüggést mutatott.



14. ábra CB₁R-EGFP konstrukció sematikus ábrája. A HEK sejtekben kifejezett CB₁R-EGFP fúziós fehérje saját fluoreszcenciáját konfokális kamerával a C végződést jelölő antitestet pedig STORM képalkotással vizualizáltuk

A felvett tartomány széleinél a linearitás sérült. Ennek oka a tartomány tetején egyrészt az lehet, hogy a nagyon erős jelöléseknél a nagy epitóp sűrűség miatt kötődő antitestek már térben gátolhatják egymást, ami az immunfestés jelölésének gyengülését okozza, de előfordulhat az is, hogy a STORM képalkotás közben túlzottan nagy jelölés

sűrűségeknél az egymással átfedő szomszédos PSF-k már nem detektálhatók egyedi lokalizációként, ami szintén a lokalizációs pontok sűrűségét csökkentheti fals módon. A tartomány alján a két technika, főleg az EMCCD (STORM, kvantumhatásfok: ~90%) és a PMT (konfokális, kvantumhatásfok: ~15%) detektorok közötti érzékenységbeli különbség okozhat gondot. A STORM nagyon érzékeny, hiszen egyetlen fluorofór is megjelenik a képen, amíg a konfokális képalkotás alacsony intenzitásoknál már csak a szöveti háttérrel vagy a mérőrendszer háttérét detektálja.

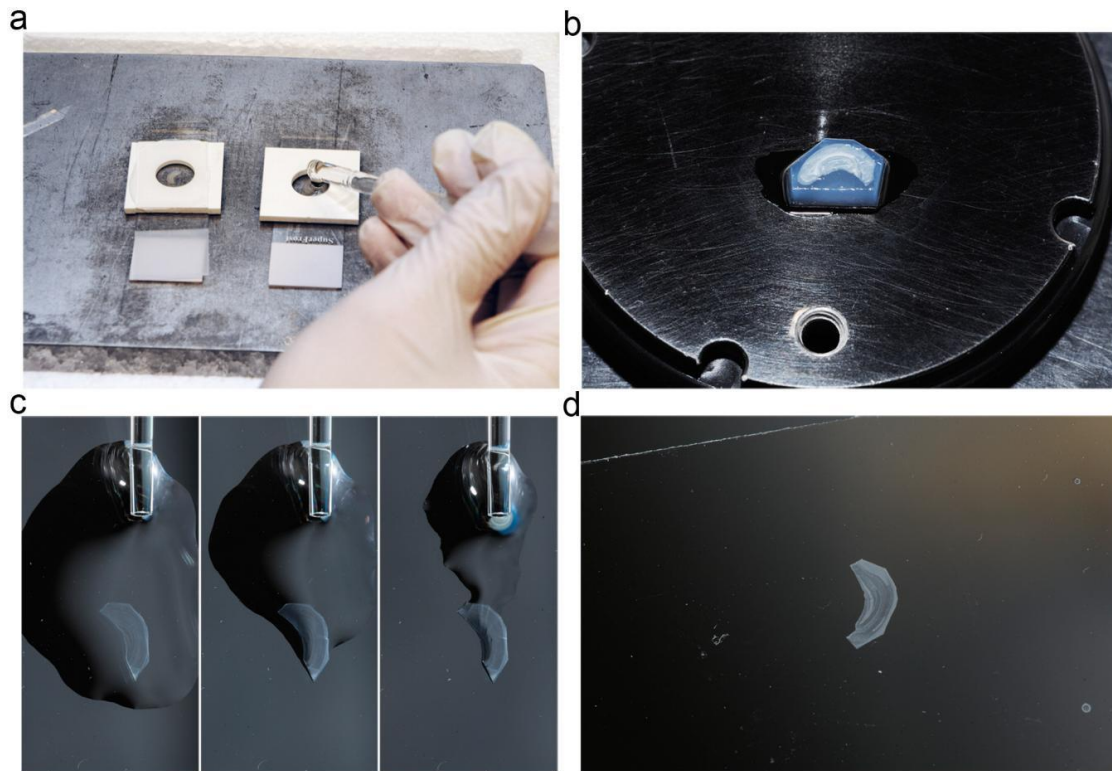


15. ábra CB₁ receptort kifejező HEK sejt. A CB₁-et immunfestéssel jelöltük és az AF647-es fluorofórt EPI, konfokális és STORM képalkotással vizualizáltuk. Az alsó sorban a teljes sejt látható a különböző modalitásokban, felette pedig a négyzettel jelölt rész kinagyított részlete (balra: EPI, középen: konfokális, jobbra: STORM).

4.1.4. Mintakezelési és festési módszer kidolgozása idegszövet esetében

Az első STORM képalkotási mérések és szisztematikus festéktesztelési kísérletek mesterségesen előállított, sejtmentes rendszereken (Dempsey és mtsai., 2011; Rust és mtsai., 2006) készültek. Ezek ideális körülményeknek tekinthetők mikroszkópos szempontból az alacsony háttér és a felszínhez közeli struktúrák miatt. Doktori munkám

kezdeté után jelent meg az első idegszövet preparátumban készült kísérleti eredmény STORM képalkotással (Dani és mtsai., 2010), azonban ebben a tanulmányban fagyasztva metszéssel készültek a szövetpreparátumok.



16. ábra Hippokampális agyszövetimetszet előkészítése STORM mikroszkópiához.

(a) A fixált szövet beágyazása 2%-os agarózba. (b) A beágyazott szövet körbevágása a vibratómos metszéshez. (c) Az immunfestés után a 20 μm -es metszetet tisztított fedőlemezre tesszük és sztereomikroszkópos megfigyelés mellett a puffert fokozatosan eltávolítjuk, ügyelve, hogy a metszet ne hajoljon be. (d) A fedőlemezre szárított hippokampális mintát 4°C-on tároljuk lefedés nélkül a képalkotás megkezdéséig

Ez a metszési technika több ponton nem ideális az immunfestés szempontjából. Ezért következő célunk a neuroanatómiában általános használt szövetkezelési és immunfestési protokollok STORM képalkotásra történő optimalizálása volt. Összehasonlító kísérleteinkben kiderült, hogy a vékony, felhúzott fagyasztva metszett mintákon a jelölés sokkal kevésbé érzékeny a vibratómmal metszett és szabadon lebegő metszethez képest.

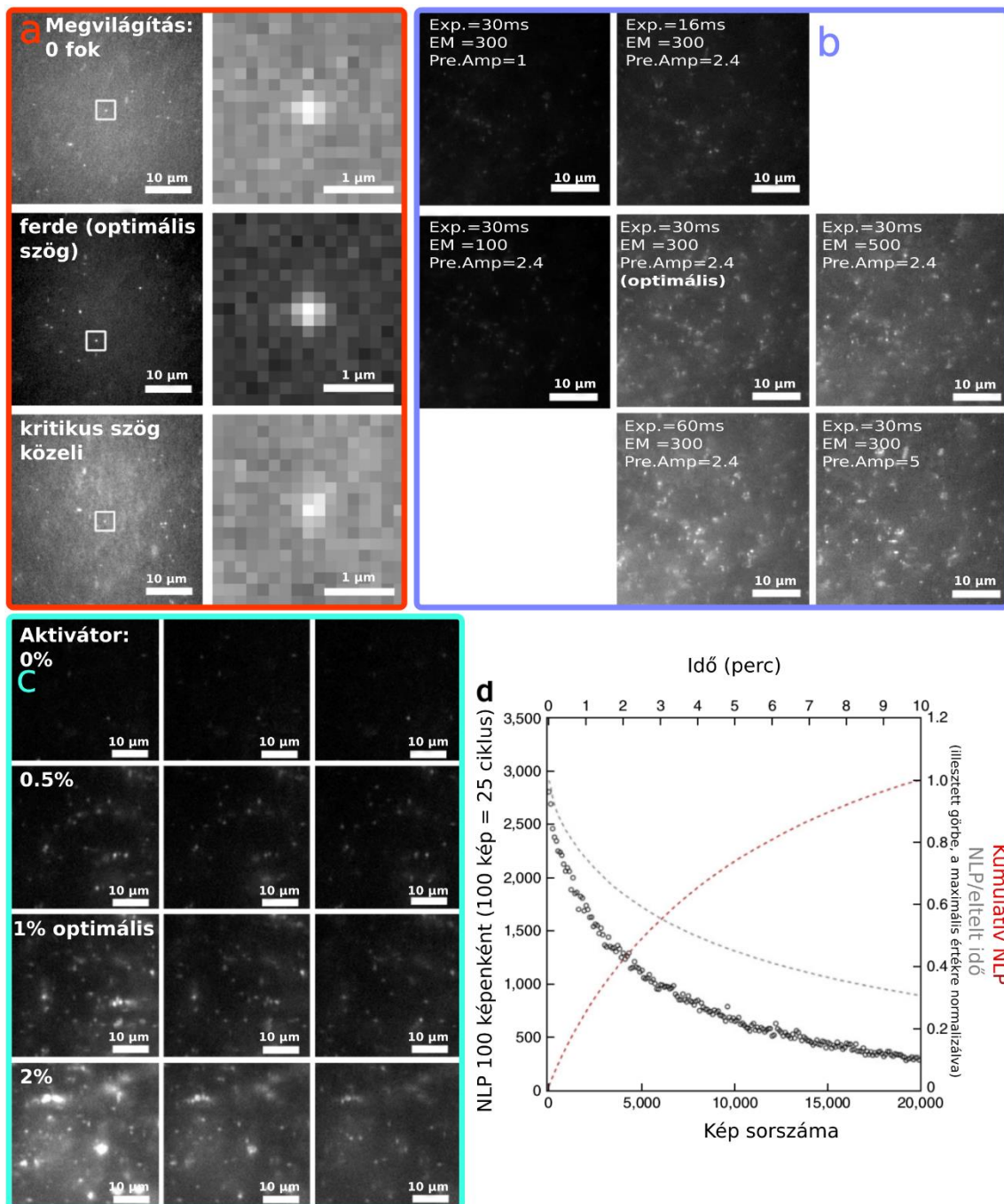
Ráadásul a szöveti szerkezet megőrzöttsége szintén jobbnak bizonyult a vibratomos metszés esetében. Ezért beállítottunk egy protokollt, amelyben 20 μm vastag vibratomos metszeteket készítettünk, amelyeket az oldatokban szabadon lebegő módon végzett immunjelölés után fedőlemezekre raktunk, majd rászárítottunk. A mindössze 20 μm vastag metszetek kezelése nagy ügyességet igényelt. Az üvegből ecsettel kivett metszeteket a fedőlemezen szintén ecsettel lehetett kisimítani, majd a felesleges folyadékot óvatosan Pasteur pipettával, illetve szűrőpapírral eltávolítani. A metszet ezután rászárad a fedőlemezekre, melyet 4 °C-on hetekig lehet tárolni (16. ábra). Tapasztaltunk szerint gyakran előfordul, hogy a metszet a tárolás során hullámosodik. A képképző médiummal történő lefedés előtt ezért ellenőrizni kell és ha hullámos a metszet, akkor a fedőlemezen kevés pufferben fel lehet úsztatni és újra kisimítani. A STORM mikroszkópos felvételek előtt a száraz metszetet frissen készült képképző lefedő médiummal kell lefedni, a széleken az esetleg túlcsoportolt folyadékot szűrőpapírral leitatni, majd a fedőlemezt körömlakkal rögzíteni.

4.1.5. A STORM képképzési paraméterek optimalizálása agyszövet esetében

Az egyedi molekula lokalizációs módszerek szinte mind egyszerű EPI fluoreszcens mikroszkópot használnak. A mintát lézerral világítjuk meg, a fluoreszcencia érzékelése pedig EMCCD vagy sCMOS kamerákkal történik. A teljes látótér kivilágítása leginkább a TIRF mikroszkópok esetében használt optikával valósul meg. Mint minden képképzési technikában, tapasztalatunk szerint a STORM esetében is jelentős hangsúlyt kell fektetni a megfelelő képképzési paraméterek megválasztására, amelyek között speciálisan az erre a módszerre jellemzők is megtalálhatóak. A megvilágítás intenzitásának optimalizálásához először is figyelembe kell venni a fluoreszcens jelölő anyag fotokémiai tulajdonságait. Az AF647 esetén a kivilágítás intenzitása kevésbé befolyásolja az egy bekapcsolásra eső foton számot. Viszont nagyobb teljesítménynél az aktív ciklusidő (duty cycle) hamarabb eléri a kívánatos alacsony értéket és a nagyobb végleges fakulási arány miatt egy AF647 festék kevesebbszer villan fel (Dempsey és mtsai., 2011). Az AF647 ilyen viselkedése miatt méréseink alapján a kivilágítást érdemes a lehető legnagyobb

teljesítményre állítani (2-10 kW/cm²). A detekciós oldalon szintén több paraméteres az optimalizációs tér. A Nikon N-STORM mikroszkópon mi Andor iXon Ultra 897 EMCCD kamerát használtunk. Az EMCCD kamerák előnye, hogy még a kiolvasás előtt lehet erősíteni a jelet (EM gain), így a kiolvasási zaj nem erősödik, jobb lesz a Jel/Zaj arány más rendszerű kamerákhoz képest. A legjobb Jel/Zaj arány érdekében tapasztalataink szerint az EM gain-t 300-ra, a PreAmp gain-t pedig 2,4x-re érdemes állítani. Ennek a kameratípusnak további előnye, hogy úgynevezett hátsó megvilágítású érzékelő lapocskát használ, ami a kamera kvantumhatásfokát növeli jelentősen (90%, 700 nm hullámhossznál). Az expozíciós idő alapvetően a festékek aktív ciklusidejétől függ. Ha nagyon hosszú az expozíciós idő (>300 ms), akkor nagy eséllyel kapunk egy-egy képen átfedő pontátviteli függvényeket ('végtelen' expozíciós idő esetén hagyományos EPI fluoreszcens képet kapunk vissza). Ha az expozíciós időt nagyon alacsonyra választjuk (<16 ms), akkor pedig egy felvillanás több képen is megjelenik. Ilyenkor meg kell vizsgálnunk, hogy vajon ugyan az a felvillanás tart-e több képsorozaton keresztül, vagy az már egy másik, független felvillanás. Ráadásul a külön pixelkiolvasások miatt a Jel/Zaj arány is csökken. Szisztematikus méréseink alapján az AF647 esetében 30 ms expozíciós idő az optimális.

A TIRF kivilágítási rendszernek köszönhetően a megvilágítás szöge változtatható. A döntött kivilágítás előnye, hogy egészen ferde szögeknél (a kivilágításnak az objektív optikai tengelyétől nagy szögeltérésnél) a minta egyre vékonyabb szeletét éri csak a gerjesztő fény, így a fókuszon kívüli mélységekből származó elmosódott kép kevésbé rontja a Jel/Zaj arányt. Számos felhasználói tapasztalat után kiderült, hogy az ideális kivilágítási szöget mintáról-mintára és mélységről-mélységre be kellett állítani. Egyes egyedi építésű rendszereknél megvalósított HILO kivilágítás még alkalmasabb a Z irányú megvilágítás vékonyítására (Tokunaga és mtsai., 2008). Az eddigi beállítások az egyedi PSF képek optimális felvételére vonatkoztak. A STORM képalkotás során természetesen egy látótérben nem egy PSF jelenik meg a legtöbb esetben, hanem mintától függően akár több száz is előfordulhat. Tapasztalataink szerint nagyon fontos, hogy mindig egyensúlyt kell tartani az egy képen megjelenő felvillanások száma és az ezek közül egymással átfedő PSF-űek száma között.



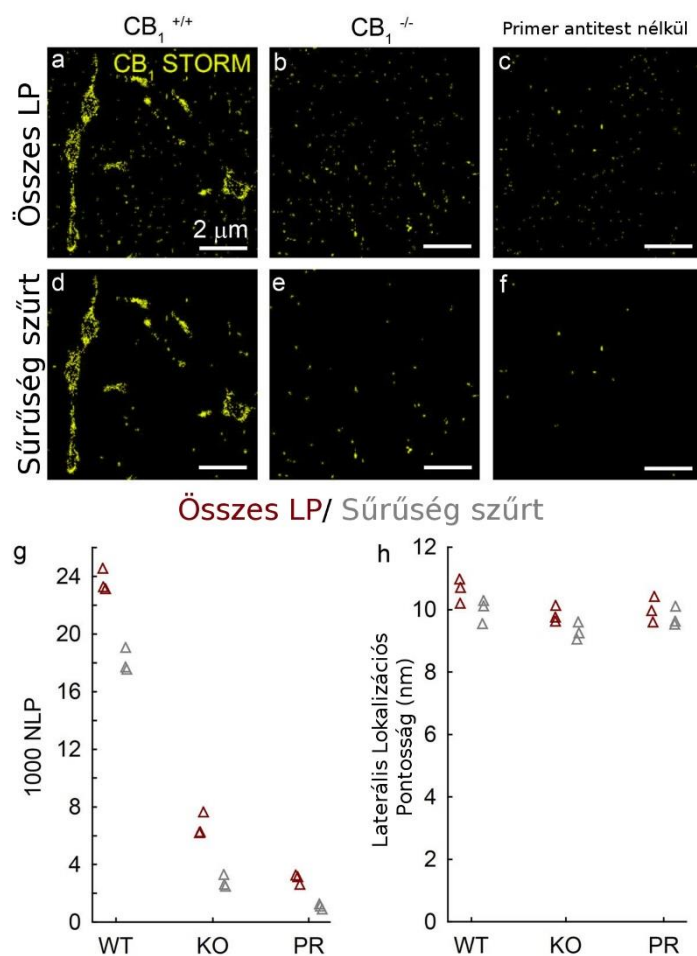
17. ábra A STORM képpalkotás paramétereinek optimalizálási lépései idegszövet preparátumban. (a) AF405 - AF647 aktivátor-riporterrel jelölt CB₁ immunfestés egér hippocampusz metszetben. A mintákat a legerősebb 647 nm-es lézerrel folyamatosan világítottuk meg. Minden képen 1,5-es gamma korrekció van. A képek (bal) és a belőlük nagyított egyetlen lokalizációk (jobb) különböző (TIRF optikával beállított) szögű gerjesztő megvilágítás mellett láthatóak (fentről lefele). A megfelelő szögbeállítás mellett alacsony háttér és a PSF nagy csúcsmagassága érhető el.

(b) A záridő, EM erősítés és az előerősítés (PreAmp gain) az (a) pontban beállított szögnél optimalizálva. (c) STORM képalkotás egy még meg nem világított területen a megfelelő lokalizációs pontsűrűség beállítására. Egy 405 nm-es aktivációs megvilágítási kép (nem látható) után három 647 nm-es gerjesztő kép látható (balról jobbra). Fentről lefelé látszik a különböző százalékban kifejezett aktivátor intenzitások hatása a lokalizációs pontok számára (sűrűségére). Az optimális 1%-nál a PSF-ok száma magas, de kevés az átlapoló közöttük. (d) Egy harmadik még meg nem világított terület 10 perces (20.000 képkocka) STORM képalkotásának egyes adatai az (a-c) -ben optimalizált paraméterek mellett. Az üres fekete karikák a 100 képenkénti lokalizációs pontok (NLP) számát mutatják az idő függvényében, az összesített NLP-t a piros szaggatott vonal jelzi, míg a eltelt időre eső összesített NLP-k szürke szaggatott vonallal látszanak. A képenkénti NLP 50%-ra csökken 3000 kép után (90 másodperc).

Ha nagyon kevés a felvillanás, akkor az átlapolás valószínűtlen, kevesebb lesz az analízis során elvesztett lokalizációk aránya, de lassabb lesz a képalkotás. Ha viszont túl sok felvillanás jelenik meg egy képen, akkor akár minden PFS átfedhet egy szomszédossal, így lehetetlenné válik a Gauss-illesztés. Mind az aktivátor-riporter, mind pedig a dSTORM megközelítésben bizonyos mértékig befolyásolni tudjuk a felvillanások sűrűségét a megfelelő aktivátor megvilágítással (Bates és mtsai., 2007). Az AF647 esetében a 405 nm-es megvilágítás elősegíti a fluorofór bekapcsolt állapotának létrejöttét a kikapcsolt állapotban bekövetkező UV abszorpciós hatáskeresztmetszet növekedéssel (Dempsey és mtsai., 2009b; van de Linde és mtsai., 2011; Vogelsang és mtsai., 2008). Az optimális aktivátor megvilágításnál tehát maximalizálnunk kellett a képenkénti, Gauss-illesztésre alkalmas PSF-ek számát. A mintában a fakulás miatt a fluorofórok száma egyre csökkent, így ha a képenkénti felvillanás számot (NLP) állandó értéken akartuk tartani, akkor az aktivátor lézer intenzitását folyamatosan növelnünk kellett. A STORM képalkotás megvilágítási és érzékelési oldalán is sokféle értékkel befolyásolható, az egyes paramétereknek nagy hatása van a Jel/Zaj arányra és a képfelvételi sebességre. A biológiailag érdekes vizsgálatok alapfeltételeként sikerült a STORM képalkotási paramétereket optimalizálnunk agyszövetben (17. ábra).

4.1.6. A CB₁ receptor jelölés specificitásának vizsgálata egér hippocampusban STORM képalkotásban

Az immunjelölések jellegzetes tulajdonsága, hogy minden egyes antitestnek egyedi jellemzői vannak (szelektivitás, szenzitivitás). Ráadásul a primer antitest fals pozitív jelölése mellett az immunfestés, mint módszer szintén okozhat háttérjelölést. Az elsődleges-másodlagos antitest jelölési módszerben ugyanis számolni kell mind az elsődleges, mind a másodlagos antitest specificitásának tökéletlenségével azaz a fals pozitív jelek előfordulásával. Végül egy új képalkotási eljárásban szintén rejtőzhet olyan, még nem ismert módszertani hiba, amely fals pozitív eredményekhez vezet. Ezért a STORM lokalizációs pontok ellenőrzésére mindenképpen szükséges egy negatív kontroll kísérlet elvégzésére. Ahhoz hogy eldönthessük, hogy a STORM lokalizációs pontjaink valóban a CB₁ receptort jelölik, összehasonlítottuk a vad típusú egerekből származó minták immunfestéseit CB₁ receptor génkiütött állatokból származó mintákkal. Egy második negatív kontroll kísérletben az elsődleges antitestet kihagytuk, így becsülhetővé válik a másodlagos antitest által okozott háttér mértéke. Szintén fontos szempont, hogy a jelölt célfehérje térbeli és sűrűségbeli eloszlása általában jelentősen eltér a háttérétől. Ezért az adott kísérletben fontos szubcelluláris kompartmentumban célszerű elvégezni a kontroll méréseket és jól alkalmazható a jelölés klaszterezettség szerinti szétválasztás is. A csoport vizsgálat (klaszter analízis) módszerében ugyanis választhatók olyan változóértékek, amelyek csak a háttérre jellemző lokalizációs pontokat választják ki, így az esetünkben amúgy is alacsony nem-specifikus jelölési háttér tovább csökkenthető. Mivel kutatócsoportunk évtizedes tapasztalatokkal rendelkezik a CB₁ kannabinoid receptorok eloszlásáról a hippocampális CB₁-pozitív interneuronok axonvégződéseiben, ezért a kontrollméréseinkben a fenti vizsgálatokat ezekben a szubcelluláris kompartmentumokban végeztük el, ahol a receptor amúgy is nagy sűrűségben van jelen. A kapott eredmények alátámasztották, hogy a STORM képalkotás kombinálása immunfestéssel idegszövet preparátumon nagy érzékenységgű és specificitású méréseket tesz lehetővé (18. ábra).



18. ábra A CB₁ receptor jelölés specificitásának vizsgálata. (a) CB₁ immunfestés egér hippocampális agymetszetein dSTORM eljárással megjelenítve. A specifikus jelölés az axonokban és axonterminálisokban jól látszódik. (b) Ugyanazon alomból származó, de CB₁ génkiütött egerek mintáinak festésén csak szórványosan megjelenő apró, nem specifikus jelöléscsoportok láthatók. (c) A másodlagos ellenanyag próbája vad típusú állatból származó metszeten. Minden mintakészítési lépés megegyezik az (a) ábrán láthatóval, de a CB₁ elsődleges ellenanyag hiányzik a kísérletből. (d-f) Az a-c képeken látható régiók sűrűség szűrés után (VividSTORM segítségével lásd később). A kis sűrűségű pontok nagy része eltűnt, míg a nagyméretű és sűrűségű specifikus jelek megmaradtak. (g) Az egyes mintacsoportokhoz tartozó lokalizációs pontszámok sűrűség szűréssel és anélkül (körülmenyként három kép alapján). (h) A laterális felbontás minden körülményben ugyanaz, így ez alapján a specifikus jel nem különíthető el az aspecifikus jeltől

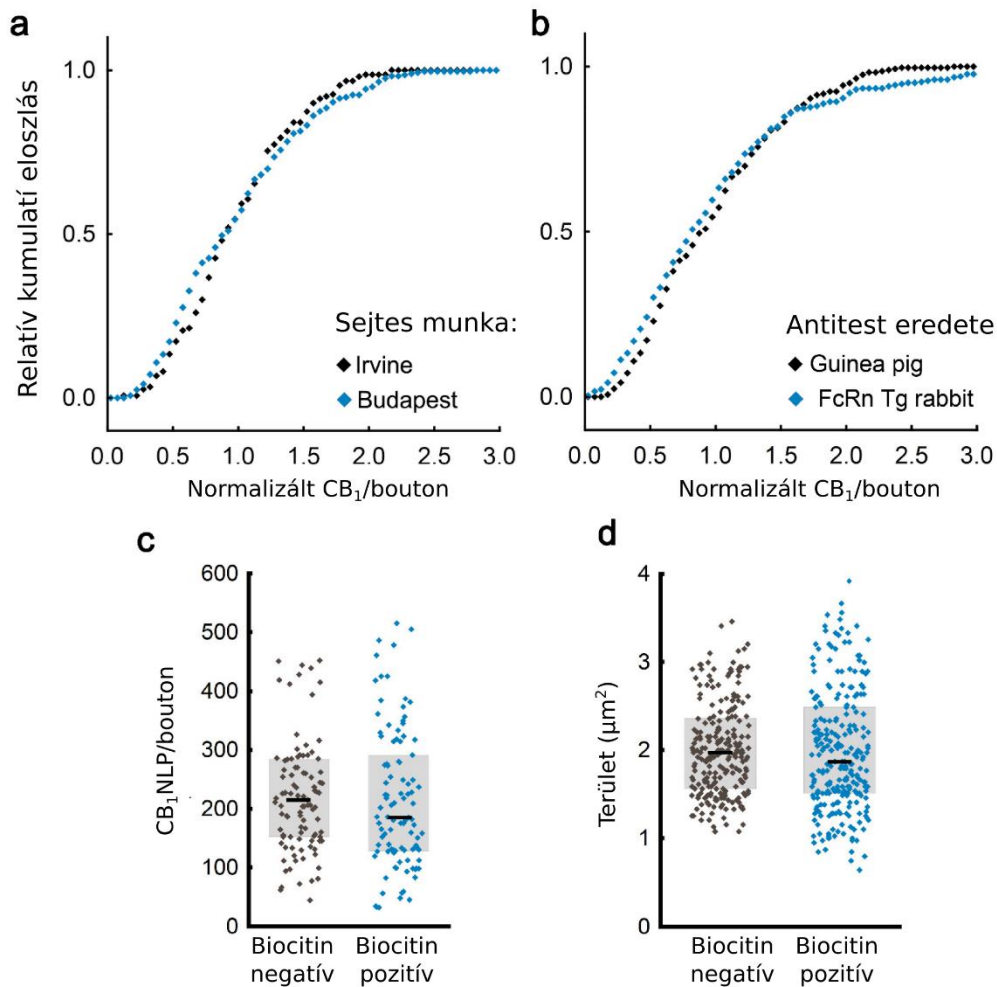
4.1.7. CB₁ festés mennyiségi vizsgálata agyszövetben különböző minta előkészítési körülmények között

A biológiai minták feldolgozása sokszor nagyon sok lépésben, sokféle anyag felhasználásával (pl. különböző antitestek) és változó környezeti körülmények között (hőmérséklet, páratartalom, megvilágítás) történik. Az ilyen változatosságok hatásának vizsgálatára további kontrollkísérleteket terveztünk. Az első összehasonlító kísérletben mind az elektrofiziológiai mérések akut túlélő agyszletekből, mind a szövet előkészítés és az immunfestés egymással párhuzamosan két laboratóriumban készültek (Irvine-ban, illetve Budapesten). A két helyszínen készült mintákat Budapesten mértük ugyanazon a STORM mikroszkópon. Az eltérő kísérleti helyszínek, tárolási és szállítási különbségek ellenére a két városban készített mintákban a boutononkénti CB₁ lokalizációk számában nem volt kimutatható különbség (Kolmogorov-Smirnov teszt, $p > 0.05$, $n = 150$ és $n = 279$ bouton, $n = 7$ és $n = 6$ kosársejtből Irvineben, illetve Budapesten töltve).

Második összehasonlító kísérletünkben megvizsgáltunk kétféle CB₁ elsődleges antitestet is, amelyeket tengerimalacban, illetve olyan transzgenikus nyúlban termeltek, amely túltermeli a újszülöttkori Fc receptort (FcRn). A hippocampális interneuronok idegvégződéseiben mért CB₁ lokalizációk számában itt sem mutatkozott különbség ($n = 279$ és $n = 302$ boutons $n = 6-6$ kosársejtből tengerimalacból illetve nyúlból származó anti-CB₁ antitesstel jelölve, Kolmogorov-Smirnov teszt, $p > 0.1$).

Végül a harmadik összehasonlító kísérletben azt vizsgáltuk, hogy az elektrofiziológiai mérések során a sejtek feltöltése biocitinnel okozhat-e torzulást a CB₁ receptorok kimutathatóságában. A patch-clamp elvezetés során a sejt feltöltése a festékanyaggal ugyanis járhat azzal a mellékhatással, hogy a sejtől egyes komponensek kimosódnak vagy eredeti lokalizációjuk megváltozik, illetve a szubcelluláris elemek mérete is megváltozhat. Ezeknek a potenciális technikai gondoknak az ellenőrzésére összehasonlítottunk olyan boutonokat, amelyeket az egyedi sejt azonosítása miatt biocitinnel töltöttünk és olyanokat, amelyek a szomszédos biocytin nélküli sejtekből származtak. A biocitin-tartalmú és a biocitint nem tartalmazó hippocampális gátlósejtek boutonjainak CB₁ lokalizációs pontjainak számában, nanoskálájú eloszlásában és a boutonok területének méretében sem tapasztaltunk kimutatható különbségeket.

Ezért összességében megállapítható, hogy a minta előkészítés során felmerülő, általunk vizsgált körülmények nincsenek hatással a STORM képalkotással szerzett mennyiségi adatokra (19. ábra).



19. ábra A minta előkészítés variabilitásának hatása a STORM mérésekre. **(a)** Boutononkénti CB_1 NLP-k relatív kumulatív eloszlása (a boutononkénti CB_1 NLP értéket a sejtátlagra normalizáltuk). A kék négyzettel az Irvine-ban végzett mintakészítés adatai látszanak, feketével pedig a budapestiek. **(b)** Ugyanaz az ábrázolás, mint az **(a)**, csak a két görbe a tengerimalac (kék) és a nyúl (fekete) antitestes jelölés adatait mutatja. **(c)** Boutononkénti CB_1 NLP-k biocitinnel töltött (kék) és nem töltött (fekete) kategóriákkal. **(d)** A boutonok területe biocitinnel töltött (kék) és nem töltött (fekete) kategóriákkal.

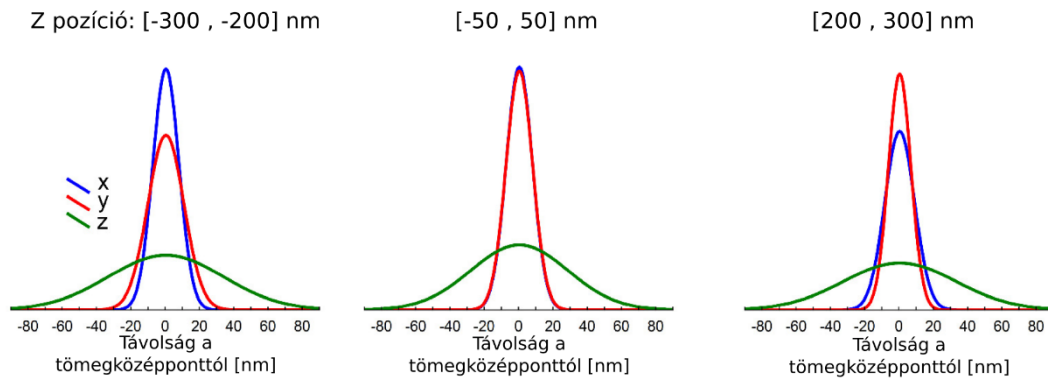
4.1.8. A STORM képalkotásának felbontását befolyásoló paraméterek vizsgálata CB₁ immunfestett idegszövet preparátumban

A fénymikroszkópok felbontásának mérésére gyakori módszer, hogy valamilyen felbontás alatti (<100 nm) fényforrás képének vonali profilját nézzük, azaz a kép pixelintenzitásait ábrázoljuk egy olyan egyenes mentén, amely keresztül megy a forrás képének maximális intenzitású részén. Erre az intenzitás eloszlásra Gauss-görbét lehet illeszteni, amelynek félérték-szélessége (definíciótól függően) adja az optikai felbontást. Felbontás alatti forrásnak használhatunk mesterséges objektumokat is pl. kvantumpöttyöt, fluoreszcens gyöngyöt, vagy biológiai struktúrákat, mint például fluoreszcensen jelölt szerkezeti fehérjéket (pl. aktin). Az egyedi molekula lokalizáción alapuló szuperfelbontású mikroszkópiában azonban a fluorofór képére illesztett Gauss-görbe centroidjának bizonytalanságát (a felbontást) ilyen módszerrel nem lehet mérni, hiszen az csak egy koordináta páros vagy 3D esetben koordináta számhármassal. A felbontás meghatározására ezért két lehetőség kínálkozott számunkra.

1. Az egyedi fényforrás képének többszöri felvételéből kapott eloszlásra illesztett Gauss-görbe félérték-szélességét határozzuk meg (Huang és mtsai., 2008).
2. A fényforrás képére illesztett Gauss-görbe centroidjának bizonytalansága több paraméterből adódik, amelyek közül a legfontosabb, hogy hány foton érkezett a forrásból a mérés alatt. További fontos paraméter, a PSF mérete, a detektor pixelmérete (esetünkben 160 nm) és a detektor zaja. Ezen paraméterek ismeretében az egyedi lokalizáció pontossága meghatározható elméleti úton a Thompson-formulával (Thompson és mtsai., 2002).

Az AF647 többszörös ki-be kapcsolása miatt az 1. lehetőség szerint a felbontás könnyen megmérhető a kísérleti felállásunkban. Az immunjelölésekben ugyanis mindig előfordulnak háttér jelölések, olyan elsődleges-másodlagos vagy csak másodlagos jelölések, amelyek nem specifikusan kötődnek. STORM képalkotásban ezek a valós biológiai struktúrától elkülönülten jelennek meg. Mivel egy másodlagos antitest több AF647-et tartalmazhat és egy fluorofór többször is megjelenik, ezért ezek az aspecifikusan kötődött jelölések elszigetelt lokalizációs pontokként jelennek meg a képalkotásban. Az ilyen pontokhoz azonosítani lehet, majd tömegközéppontjuk szerint egymásra lehet illeszteni. Kísérleteinkben ez az adatkészlet

alkalmas az X-Y és Z irányú felbontás mérésére agyszövetben is. A szöveti CB₁ immunfestések esetében az összebont klaszterekre illesztett Gauss görbe a szigma értéke X-Y irányban 6 nm és Z irányban 41 nm-nek adódtak 5 μ m mélyen a hippocampusz metszetekben, ami ~14nm X-Y és ~94nm Z irányú felbontásnak felel meg (20. ábra).



20. ábra Agyszövetbeli STORM képalkotás felbontása. A mintában jelenlevő elszigetelt lokalizációs csoportokat tömegközéppontjuk szerint egymásra illesztettük. A halmazokat háromféle Z tartományból vettük és meghatároztuk a lokalizációk X,Y és Z szerinti eloszlását. A felbontás csak kis mértékben függ a Z pozíciótól (1nm X,Y és 5nm Z). A fókuszpontban a félérték-szélesség 18nm-nek adódott az X,Y irányban és 65nm-nek Z-ben.

Az egyes felvillanásokból származó fotonok száma jelentősen befolyásolja a lokalizációs pontosságot. Egy fényforrás minél mélyebben van a szövetben, annál nagyobb a valószínűsége, hogy a kibocsátott fotonok valamilyen kölcsönhatásba lépnek az anyaggal (szóródás, elnyelődés). Ezért következő célul tűztük ki, hogy meghatározzuk vajon a fenti lokalizációs pontosság hogyan függ a mintáink felszínétől számított mélységtől. Méréseink és számításaink alapján azonos képalkotási paraméterekkel felvett 271 kép alapján a lokalizációs pontosság 0,18 nm/ μ m mértékben csökken, ami rendkívül kis változás. Számunkra is meglepő módon a STORM képalkotás még 10 μ m mélységben is különösebb felbontás veszteség nélkül alkalmazható volt.

A képalkotási lézerintenzitás hatását az NLP-re és a kép minőségére azonos mélységből, azonos beállításokkal, de különböző 647 nm-es lézerintenzitásoknál felvett képeken vizsgáltuk (minden körülményhez három képet vettünk fel). Az alacsony

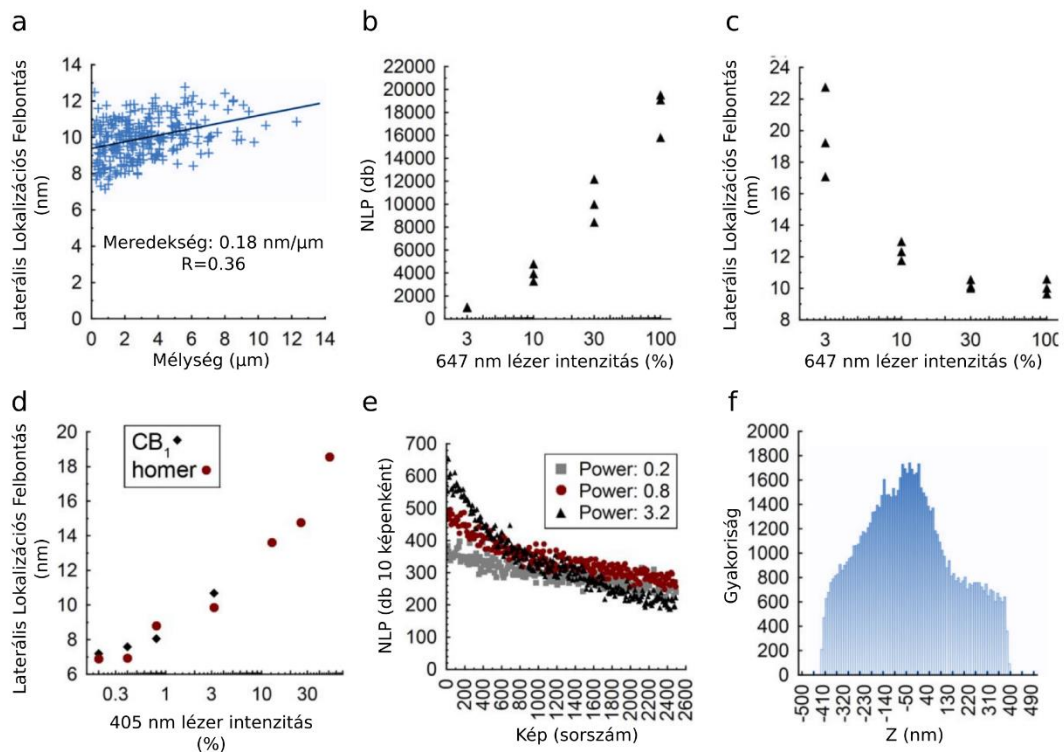
intenzitásoknál kevesebb NLP-t kaptunk és alacsonyabb lokalizációs pontosságot. Az aktivátor lézer (405 nm) intenzitásának hatását az NLP-re és a lokalizációs pontosságra szintén megvizsgáltuk. Az erősebb aktiváció csökkentette a lokalizációs pontosságot azzal, hogy magasabb háttérrel okoz, így csökkenti a Jel/Zaj arányt. A felvillanások száma képenként ugyan magasabb a felvétel elején, de számuk a fakulás miatt jobban is csökken, mint alacsonyabb aktivációnál, így összességében az összes NLP-t nem nagyon befolyásolja. Az a tény, hogy a lokalizációs pontosság nem változik a Z tengely mentén a szövetben viszont nem jelenti azt, hogy az NLP szám nem függ erősen ettől a paramétertől. A hippokampusz stratum pyramidale rétegében a CB₁-pozitív végződések egyenletesen helyezkednek el, így ideális esetben egy képalkotás során körülbelül ugyanakkora NLP számot kellene kapnunk az objektív fókusz síkjában, mint attól lefelé vagy felfelé. A méréseink azonban azt mutatják, hogy az NLP szám erősen függ a Z pozíciótól. Ennek az a fő magyarázata, hogy a PSF mérete a fókusz síktól távolodva nagyobb lesz és képe alacsonyabb intenzitású. Az alacsonyabb intenzitás közelíti a mintaháttérhez és egyre inkább csak az egy felvillanásban több fotont kibocsátó események detektálhatók. A nagyobb méret ugyanakkor az analízis szoftvert állítja kihívások elé, hiszen automatikusan fel kell ismerni, hogy az nem két fókusz sík közeli felvillanás, hanem egy távoli (21. ábra).

Összességében tehát kijelenthető, hogy a STORM képalkotás felbontása a mintafelszín közelében állandónak mondható, míg az NLP szám jelentősen függ a Z mélységtől. A képalkotó lézer intenzitását érdemes minél magasabbra állítani, míg az aktivátor lézert inkább az alacsonyabb tartományban célszerű működtetni.

4.2. Korrelatív konfokális és egyedi molekula lokalizációs szuperfelbontású fénymikroszkópia

4.2.1. A korrelatív konfokális és egyedi molekula lokalizációs mikroszkóp felépítése

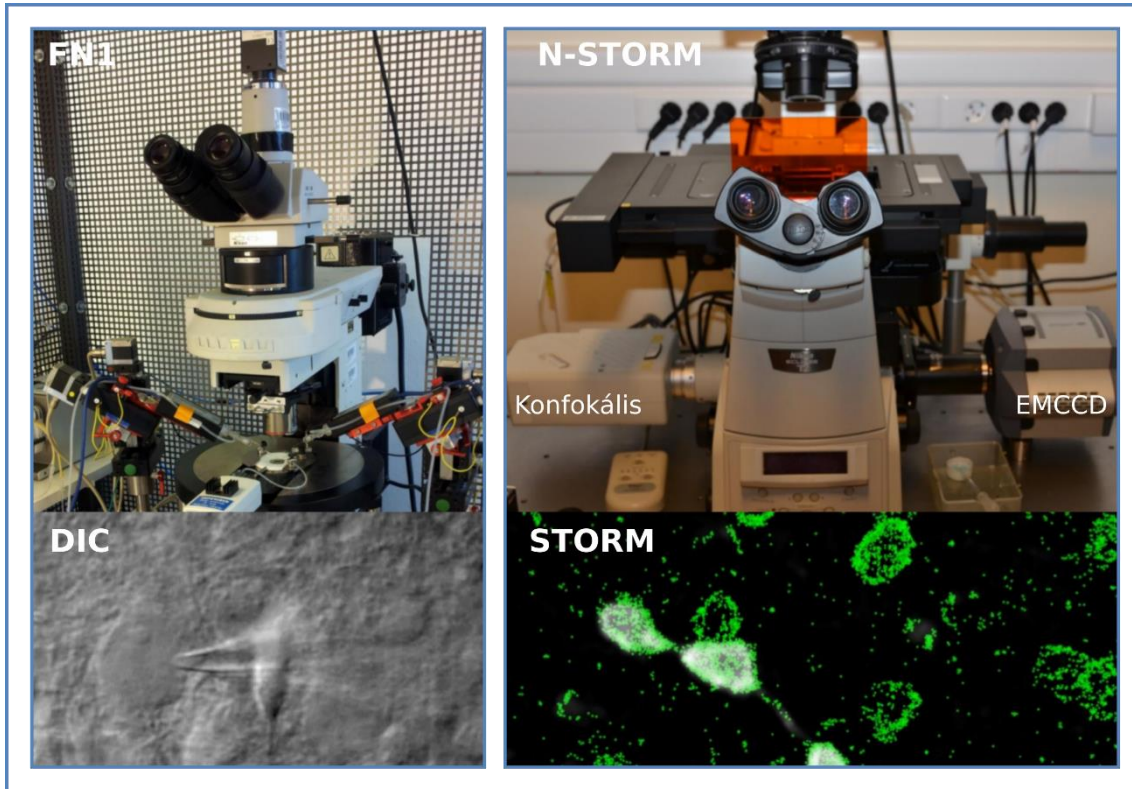
A mikroszkópos felvételek felbontásának meghatározására két szempontot érdemes figyelembe venni. Az egyik szempont az előző fejezetben tárgyalt lokalizációs pontosság, azaz az egyedi jelölőanyagok pozícióját milyen pontosan tudjuk meghatározni.



21. ábra Lokalizációs pontosság és NLP számok függése néhány fontos paramétertől. (a) A laterális lokalizációs pontosság kis mértékben függ csak a mintabeli mélységtől. (b-c) A képpalkotó lézer intenzitásának növelésével növekszik a lokalizációs pontok száma és lokalizációs pontosság (minden intenzitás esetében ugyanazon paraméterek mellett három képet vettünk fel). (d) Az aktivátor lézer hatásának vizsgálatához CB₁ és homer fehérjéket jelöltünk aktivátor-riporter (AF405-AF647) festékkel. A lokalizációs pontosság csökken az aktivátor intenzitásának emelésével a megemelkedett háttér és az egyre inkább átfedő csúcsok miatt. (e) Az összes lokalizáció száma nem változik az aktivátor teljesítményének változtatásával, mert a kezdeti nagyobb jelszám gyorsabban is csökken (aktivátor 405nm lézer intenzitás 0.3, 0.8 illetve 3.2%). (f) A Z koordináták gyakoriság eloszlása jól mutatja a csökkenő detektálási valószínűséget a fókuszsíktól távolodva. Az eloszlás aszimmetrikus a fókusz sík alatti és feletti szférikus aberráció eltérése miatt.

A másik szempont pedig az, hogy az adott jelölésünk milyen sűrűségben fordul elő a megfigyelni kívánt struktúrán. Egy-egy fehérje helyzetét például az egyedi molekula lokalizációs mikroszkópiák (STORM/PALM) akár néhány nanométeres pontossággal

megadhatják. Ha azonban például a sejt membránjait szeretnénk láthatóvá tenni, akkor olyan sűrűségű jelölést kell választani, amire igaz az, hogy a jelölőanyagok közötti legkisebb távolság a fele legyen a membránban előforduló legkisebb struktúráknak (pl. invaginációk, vezikulák).



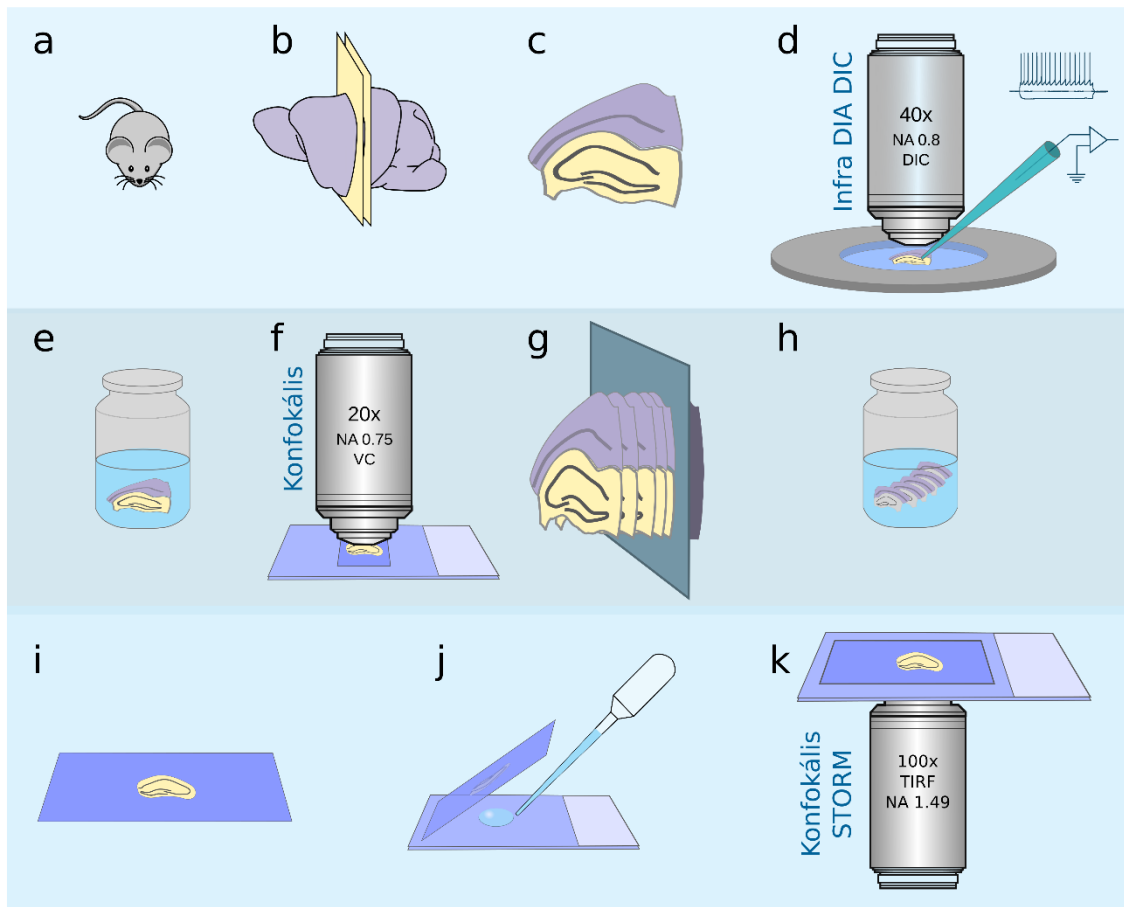
22. ábra Elektrofiziológiai folt-zár mérőrendszer és a konfokális-STORM mikroszkóp. A DIC képen éppen egy interneuront közelít meg a folt pipetta. A STORM képen egy töltött axonszakasz látszik boutonokkal. A CB₁ receptort AF 647-el vizualizáltuk és zöld színnel jelenítettük meg.

A korábbi nanoskálájú molekuláris képalkotásra használt immunarany jelölésen és elektronmikroszkópián alapuló eljárásokban például az ozmium-tetroxid kötődik a membránokhoz és szinte kitölti azokat ezzel szubcelluláris kontextusba helyezi a kolloidális arany szemcse által reprezentált molekuláris jelet. A fénymikroszkópos képalkotás esetében is léteznek specifikus lipofil membránfestékek (DiI, Dio, MitoTracker stb). Habár a STORM képalkotás esetében nagy segítség lenne egy jó villogási paraméterekkel rendelkező, az AF647-től spektrálisan különböző

membránspecifikus festék és egyes irodalmi adatok szerint a Di festékcsalád elemei akár alkalmasak is lehetnek (Shim és mtsai., 2012), de saját kísérleteink nem vezettek eredményre. Tapasztalataink szerint valószínűleg a szövetben a lipofil festék fixálásával kapcsolatos technikai nehézségek miatt idegszövetben ez a megközelítés még nem megoldható. Ezért úgy döntöttünk, hogy egy hagyományos konfokális szintű felbontású képet megpróbáljuk ötvözni a STORM képalkotással. Ennek elérésére az eredeti Nikon N-STORM mikroszkópunkat egy C2-es konfokális fejjel szereltük fel a korrelatív konfokális-STORM képalkotáshoz (22. ábra). Ez lehetővé teszi, hogy egy adott sejtípust és adott szubcelluláris kompartmentumait a megfelelő neurokémiai marker immunfestésével megjelenítsük, majd a konfokális mikroszkóppal azonosított célprofilokon belül STORM képalkotással a célmolekula térbeli eloszlását feltérképezzük. A fenti megközelítés alkalmas ugyan populációs szintű vizsgálatokra, azonban nem alkalmas az élettani, morfológiai és molekuláris adatok begyűjtésére ugyanabból a célsejtből vagy célprofilból. Az élettani, anatómiai és molekuláris mérések kombinálásának lehetősége miatt ezért mi a doktori munkám során egy másik, úgynevezett egyedi sejtjelölésen alapuló eljárás kidolgozására fektettünk nagyobb hangsúlyt. A mérésorozat felépítése a következő főbb módszertani lépésekből áll (23. ábra):

- 1) *In vitro* teljes-sejt patch-clamp elektrofiziológiai mérések akut, túlélő, egér hippocampális szeleteken. Az élettani karakterizáció közben az egyedi célsejt feltöltése biocitinnel.
- 2) A szelet fixálása és a biocitin jelölés előhívása AF488-sztreptavidinnel, a célsejt vizualizálására, DAPI festés a sejtmagok megjelenítésére és a réteghatárok kijelölésére.
- 3) A lefedett szeletben a töltött sejtről konfokális Z-sorozat felvétele morfológiai rekonstrukcióhoz és sejtípus azonosításhoz.
- 4) A 300 μm vastag akut élettani szelet továbbmetszése 20 μm vastag hippocampusz metszetekre.
- 5) A 20 μm vastag metszetek szabadon lebegő immunfestése. Fedőlemezszerű szárítás.
- 6) STORM és konfokális képalkotás.

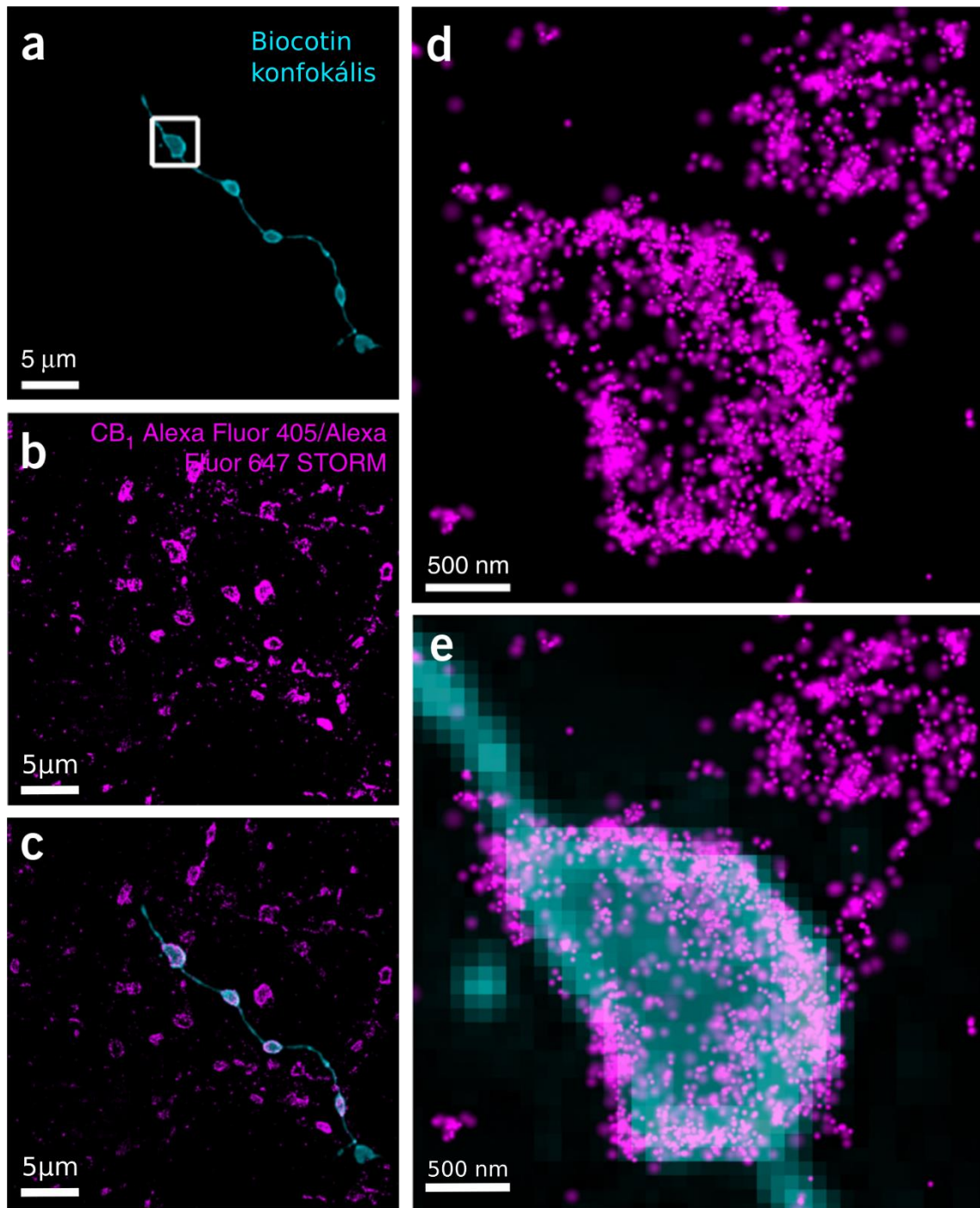
7) A képek megjelenítése és az adatok elemzése.



23. ábra Mintakészítési és képalkotási folyamat a korrelatív elektrofiziológiai és konfokális-STORM képalkotás során. (a-c) Akut túlélő 300 μ m vastag hippocampális szelet készítés. **(d)** Elektrofiziológiai mérések, sejtfeltöltés biocitinnel. **(e)** A szelet rögzítése, a biocitin jelölés előhívása. **(f)** A teljes sejt képének konfokális Z-sorozat felvétele. **(g)** A szelet beágyazása és 20 μ m-es metszetek készítése. **(h)** Immunfestés. **(i)** A metszetek fedőlemezre húzása és rászárítása. **(j)** Közvetlen a képalkotás előtt STORM lefedőközeg alkalmazása. **(k)** Korrelatív konfokális-STORM képalkotás.

4.2.2. A korrelatív konfokális és STORM képalkotás

A STORM mikroszkópos képalkotás előtt a fedőlemezre szárított 20 μ m vastag metszeteket képalkotási lefedő médiummal egy tárgylemezre raktuk, majd áttetsző körömlakkal rögzítettük. Nagyon fontosnak bizonyult, hogy a mérés előtt a körömlakk tökéletesen megszáradjon.



24. ábra Korrelatív konfokális és STORM képalkotás. (a) Biocitinnel töltött axonszakasz dekonvolvált konfokális képalkotással megjelenítve. (b) Ugyanazon látótérben a CB₁ receptor AF405/AF647 aktivátor-riporter immunfestéssel Gauss reprezentációban látszik. (c) Az (a) és (b) képek egymásra illesztve. (d) Az (a) képen fehér négyzettel jelölt terület CB₁ festésének nagy nagyítású STORM képe. (e) A (d) kép alatt látszik a biocitin konfokális jel is.

Száradás közben ugyanis kis mértékben mozgatja a fedőlemezt a tárgylemezhez képest, így csúszást visz a képbe, ami ebben a felbontásban már jól látható, felbontás veszteséget és műtermékeket okozhat. A metszetről első lépésben sűrű kivilágításban áteső mozaik felvételt készítettünk 10x-es objektívvel. Ez a kép szolgált az agyszövetben tájékozódásul a 100x-os objektív képkészítésénél. A 20x-os objektívvel már meghatározható az a terület, ahol a töltött sejt axonfája található. A 100xTIRF NA1,49 olajos objektívvel 488 nm-es epifluoreszcens kivilágításban a boutonokat megkerestük, majd konfokális képet készítettünk róla a C2 fejjel zöld (AF488) és távoli vörös (AF647) csatornában. A CB₁ STORM képkészítést 647 nm-es megvilágítással és 405 nm-es aktivátor lézer használatával végeztük. A dekonvolvált konfokális Z-sorozat felvételből a megfelelő síkot összeillesztettük a Nikon NIS-Elements programcsomag N-STORM modulja által létrehozott STORM képpel (24. ábra).

4.3. Korrelatív konfokális és STORM mikroszkópos képek megjelenítése adatelemzések a vividSTORM szoftverrel

Az egyedi molekula lokalizációs mikroszkópiák különlegessége a többi képkészítéshez képest, hogy a mérés eredménye nem egy intenzitás mátrix, azaz pixeles kép, hanem háromdimenziós koordináták, foton számok és egyéb paraméterek halmaza. A hagyományos pixeles képek feldolgozására számtalan program áll rendelkezésre, de az újabb fajta adatstruktúra új képmegjelenítési és elemzési módszerek megvalósítását tették szükségessé.

4.3.1. VividSTORM korrelatív konfokális és STORM szuperfelbontású mikroszkópos analízis program

Az egyedi molekula lokalizációs mikroszkópiák, köztük a STORM esetében is a mikroszkóppal felvett pixel alapú képsorozatban egy szoftver felismeri a fluoreszcens jelölő molekula felvillanásait, Gauss-görbét illeszt rájuk, majd meghatározza a görbe X és Y koordinátáját, 3D esetben pedig elliptikus Gauss-görbét illeszt és a kalibráció alapján a Z koordináta is kiszámításra kerül. A kapott eredmény, a molekuláris lokalizációk halmaza végül egy koordináta hármassá alakul. Az ilyen adatkészletek 2D vagy 3D megjelenítésére többféle megoldás létezik.

* A legegyszerűbb esetben az egyes koordinátákat jelölhetik például keresztek, melyeknek színe függ a Z koordinátától (Huang és mtsai., 2008; Rust és mtsai., 2006).

* Minden egyes lokalizációt egy normalizált Gauss-intenzitás eloszlással helyettesítünk, melyek szélessége egyenlő az adott felvillanásból származó foton számból elméletileg számítható lokalizációs pontossággal (Bates és mtsai., 2007).

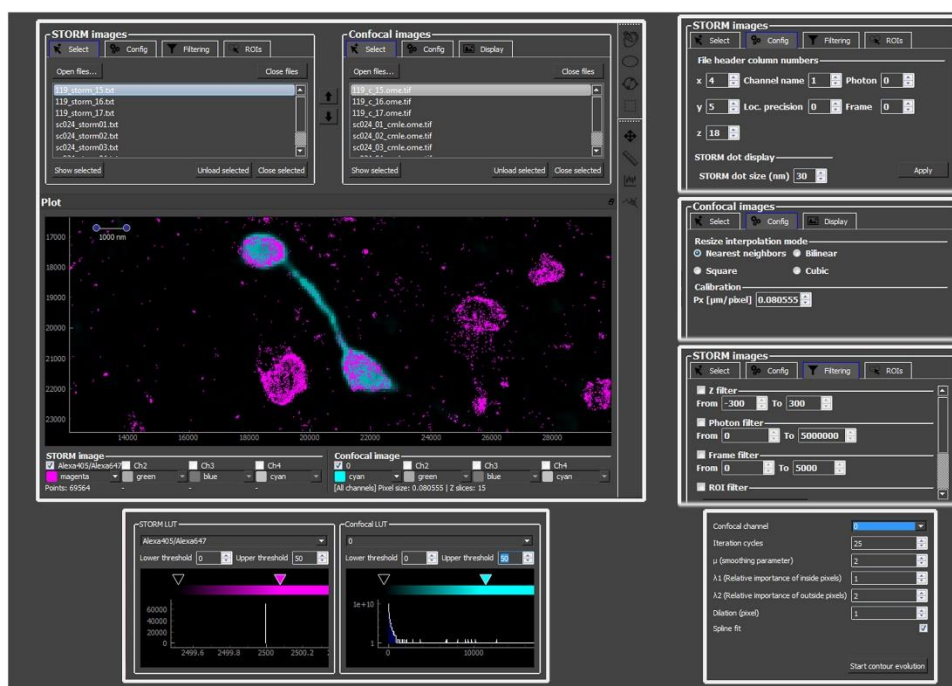
* Lokalizációs pont sűrűségeloszlás hőtérkép

* Delaunay-háromszögelés (Baddeley és mtsai., 2010)

Mivel a biológiai szempontból fontos struktúra (esetünkben jelölt hippokampális interneuron) dekonvolvált konfokális voxel alapú képként állt rendelkezésre, a CB₁ receptor pedig koordináta alapú STORM adatként, ezért szükségünk volt egy olyan szoftvereszközre, amely képes ezt a két nagyon különböző modalitást együttesen, azaz korrelatív módon kezelni. A lokalizációs adatkészletek továbbá teljesen újszerű adatelemzési lehetőségeket vetettek fel nanoskálájú molekuláris térbeli eloszlások vizsgálatára. Bár a doktori munkám kezdete és a témával kapcsolatos tanulmányaink megjelenése óta többféle korrelációs munka született a szakirodalomban, mint például elektronmikroszkóp-SMLM (Kim és mtsai., 2015; Löschberger és mtsai., 2014) vagy konfokális mikroszkóp-SMLM (Crossman és mtsai., 2015), ennek ellenére megfelelő, mindenki számára szabadon hozzáférhető szoftveres megoldást tudomásunk szerint csak mi készítettünk. Nagy örömünkre a VividSTORM szoftvert bemutató tanulmányunkat (Barna és mtsai., 2016b) megjelenése óta több, mint 5 ezren töltötték le a Nature Protocols honlapjáról. Az elkészült szoftvert a SourceForge oldaláról pedig 35 országból több mint 700 felhasználó töltötte le.

A VividSTORM egy könnyen kezelhető grafikus felületű, nyílt forráskódú, python alapú, önállóan működő program, korrelatív konfokális és STORM megjelenítővel, továbbá számos analízis lehetőséggel. Munkánk során az egymásra illesztett konfokális és STORM képeken a konfokális kép alapján kijelöltük a számunkra fontos szubcelluláris részeket, ami meghatározta az ide tartozó lokalizációs pontokat. Ebben az adatkészletben a VividSTORM-al mérni tudjuk a lokalizációs pontok számát (NLP) és sűrűségét, a LP-k közötti távolságeloszlást, az LP-k számát és sűrűségeloszlását 3D felszínen, klaszterezettséget és internalizációt.

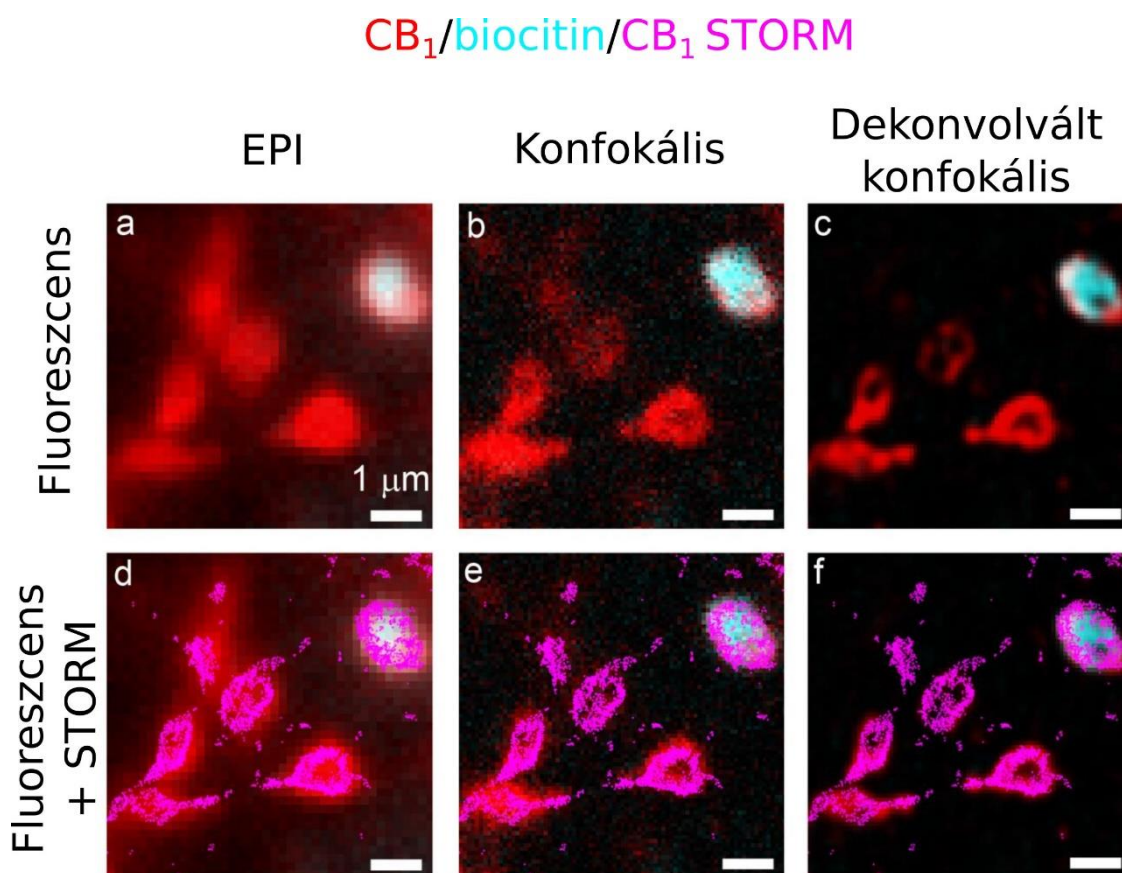
A szoftver lehetővé teszi SMLM adatok nano-léptékű mennyiségi vizsgálatát. Jelen dolgozatban az egyedi sejt-specifikus szubcelluláris jelölést a sejtek in-vitro patch-clamp elektródán keresztüli biocitin feltöltéssel valósítottuk meg, de a szoftver képes kezelni bármilyen egyéb módszerrel készült képet a specifikus célterületek láthatóvá tételére. Ilyen alternatív megoldás lehet a szuperfelbontású képeken a specifikus sejtes környezet kijelölése például csak az adott sejt típusra jellemző markerek immunjfestésével vagy genetikailag kódolt fluoreszcens jelölőanyagok sejt típus-specifikus kifejezésével. Egyes szöveti régiók jelölésére használható lehet egy virális vektor vagy nyomjelző befecskendezése, esetleg az in-utero elektroporáció. A kompartmentek megjelenítése szintén történhet immunfestéssel vagy az adott szubcelluláris doménekben, intracelluláris organelumokban specifikusan feldúsuló fluoreszcens jelölőanyagokkal történhet. A VividSTORM szoftver képes a fenti jelölésekről képet alkotni bármilyen más kellően nagy felbontású mikroszkópiával (STED, SIM) készült felvétel esetén is, amiket utána korrelatív módon analizálhatunk az SMLM módszerekből származó képekkel (25. ábra).



25. ábra A VividSTORM korrelatív konfokális és STORM szoftver grafikus felülete

4.3.2. Konfokális és STORM képek egymásra illesztése VividSTORM-ban

A korrelatív képalkotási eljárások egyik nagy kihívása a két vagy akár több modalitás (képalkotási módszer) két vagy három dimenziós illesztése (26. ábra). A fény és elektronmikroszkópos esetben egészen nyilvánvalóak a nehézségek, hiszen a minták teljesen más előkészítésen mennek keresztül és a mérés is teljesen más fizikai elveken működő műszerben valósul meg.



26. ábra Korrelatív EPI, konfokális és dekonvolvált konfokális - STORM megjelenítés a VividSTORM-mal. (a-c) EPI fluoreszcens, konfokális és dekonvolvált konfokális kép CB₁ (piros) és biocitin (kék) festéssel, ugyan azon látótérről. (d-e) Az (a-c) pixeles képekre vetített CB₁ STORM kép. Jól megfigyelhető a dekonvolúció zajcsökkentő és kontraszt növelő eredménye.

Az általunk használt konfokális-STORM mikroszkóppal ugyanazt a mintát vizsgáljuk a konfokális és a STORM modalitásban, időben pár perc eltéréssel, de a képek illesztése így is nehézséget okoz. Ennek az az oka, hogy a két kamera (C2 konfokális PMT detektora és az Andor EMCCD kamerája) egymáshoz képest kis mértékben mindig el van forogva, nagyítása különbözik és képközéppontjaik is eltérőek a mikroszkóp optikai tengelyéhez képest. Ezek a tényezők rendre elforgatási, nagyítási és eltolási különbségeket okoznak a képek között. Az illesztésre többféle módszert is kidolgoztunk:

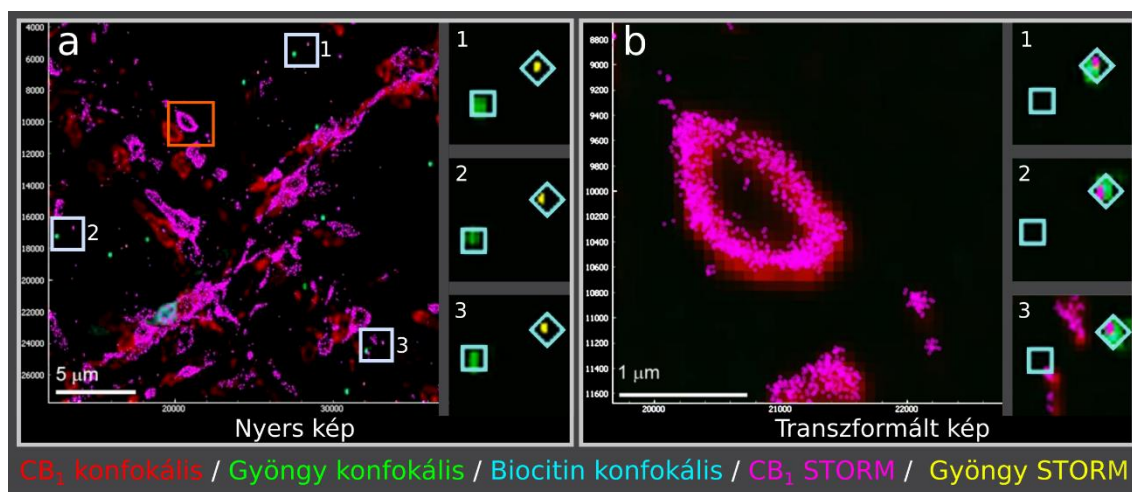
- * Manuális illesztés a modalitások képe alapján. Ennek előnye az egyszerű megvalósíthatóság, hátránya a szubjektivitás és nem alkalmazható akkor, ha a két modalitásban teljesen más struktúrák képeit rögzítjük.

- * Referencia képek felvétele mind a két modalitásban jól mérhető mintáról, majd a forgatási, nagyítási és eltolási átviteli függvény meghatározása (affin transzformáció) után, ezek az átvitelek használhatók a később felvett valós képeken is. A módszer előnye, hogy objektív, nagyon pontos, alkalmazható akkor is, ha a két modalitásban teljesen más struktúra képét rögzítettük. Hátránya, hogy az átviteli függvény időben és ráadásul mintáról-mintára is változhat.

- * A két modalitás autokorrelációs illesztése. Előnye, hogy objektív, nagyon pontos, de hátránya, hogy csak ugyanazon a jelölésen alkalmazható.

A referenciakép felvételén alapuló módszerhez megfelelő egy fedőlemezre rögzített felbontás alatti méretű (< 100 nm) megfelelő sűrűségben fluoreszcens gyöngyöket tartalmazó minta. Mind a C2 konfokális fejjel, mind pedig az EMCCD kamerával felvételt készítettünk a mintáról és egy megfelelő szoftverrel (esetünkben ImageJ TurboReg plugin, (Thevenaz és mtsai., 1998)) a transzformációt kiszámítottuk. Referencia alapú illesztéshez a legmegfelelőbbnek az bizonyult, ha maga a mérendő minta tartalmazza a gyöngyöket valamilyen spektrálisan elkülönült csatornában. Fontos az elkülönítés, hiszen a gyöngyök állandóan világítanak, így ha ugyanabban a hullámhossztartományban bocsátanak ki fényt, mint a hasznos jelölés, akkor csökken a látótér, a gyöngyök közelében pedig nem lehet PSF-t azonosítani. Azonban a gyöngyök rögzítése szövetben kihívásokkal teli és nem minden esetben megvalósítható. A

VividSTORM-ban rendelkezésre áll a referencia kép alapú, illetve a kézi illesztés is. A referencia kép alapú illesztésből két módszert építettünk be a programba. Az egyik fél automatikus, ilyenkor a felhasználónak kell választania a két képen három, egymásnak megfelelő, jellegzetes pontot (referenciapontok), majd a program elvégzi az ezeknek megfelelő affin illesztést. A másik megoldás a teljesen automatikus módszer, ilyenkor a két képen a szoftver keresi meg a referenciapontokat, majd elvégzi az affin illesztést (27. ábra)

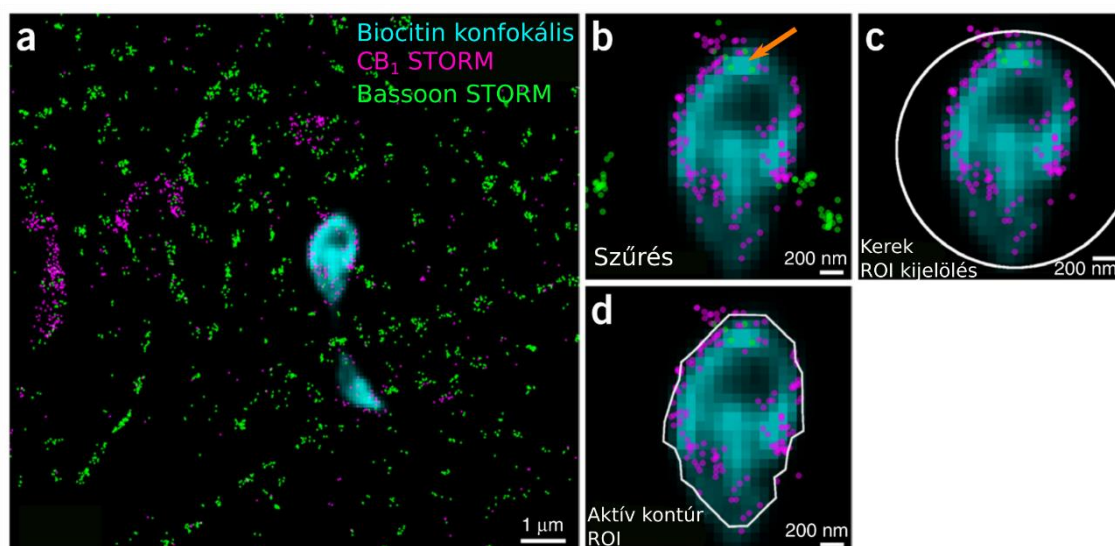


27. ábra Konfokális és STORM képek illesztése VividSTORM szoftverrel. (a) A konfokális és a STORM modalitás között jelentős elcsúszás fordulhat elő, amit korigálni kell a korrelatív elemzéshez. Jobbra látszik a szürke keretekbe eső gyöngyök nagyított képe, melyeket kontrolpontokként használ az illesztő algoritmus. (b) Az (a) panelen narancssárga négyzettel jelölt terület nagyítása a transzformáció után. A jobb oldalon az egymásra illeszkedő gyöngyképek láthatók (Barna és mtsai., 2016).

4.3.3. A releváns STORM lokalizációs pontok kiválasztása VividSTORM-ban

A képek illesztése után a következő fontos technikai lépés az volt, hogy a STORM képen lévő összes lokalizációs pont közül meghatározzuk azokat, amelyek a számunkra releváns szubcelluláris struktúrához tartoznak. A korrelatív konfokális és STORM képeken a konfokális csatorna tartalmazza azt az információt a sejtfeltöltés által, amely alapján ki tudjuk választani a jelölt axonterminálisokhoz tartozó CB₁ receptor

lokalizációkat. A legegyszerűbb módszer az, hogy a VividSTORM szabadkezes kijelölő eszközével körberajzoljuk a szubcelluláris profilt például esetünkben a bouton. A szabadkezes körberajzolásnak azonban vannak hátrányai, időigényes és erősen szubjektív lehet. Ezt a két faktort kiküszöbölendő automatikus kijelölő algoritmust építettünk a VividSTORM-ba.



28. ábra Aktív kontúr és felszíni távolságmérés VividSTORM-ban. (a) Biocitin konfokális, CB₁ és Bassoon STORM képek korrelatív megjelenítése. (b) A biocitinnel (türkizkék) töltött axonvégződésben a membránban látszódnak a CB₁ (bíborvörös) és belül a Bassoon (zöld, narancs nyíl) lokalizációk. (c) Az aktív kontúr kijelölés egy a struktúra köré rajzolt körből indul. (d) Az aktív kontúr az utolsó minimalizációs lépés után. A kijelölés a konfokális pixel mérethez igazodik.

A különböző határértékeken alapuló automatikus (threshold) módszerek nem hoztak megfelelő megoldást a biológiai struktúránk alakja és az intenzitások nagy szórása miatt. Az aktív kontúr algoritmus viszont megfelelőnek bizonyult a boutonok kijelölésére (Marquez-Neila és mtsai., 2014). Az aktív kontúr eljárás egy olyan szalagot (2D) vagy felszínt (3D) modellez, amelyre többféle erő hat. A belső erők nyújtó és hajlító erők, míg a külső erők a kép részleteivel vannak összefüggésben (intenzitás élek, egyenesek, stb.). Az algoritmus egy energia minimalizáció, amely a szalag vagy felszín energiafüggvényét minimalizálja ebben az erőterben. Nem teljesen automatikus módszer, mert a számítás

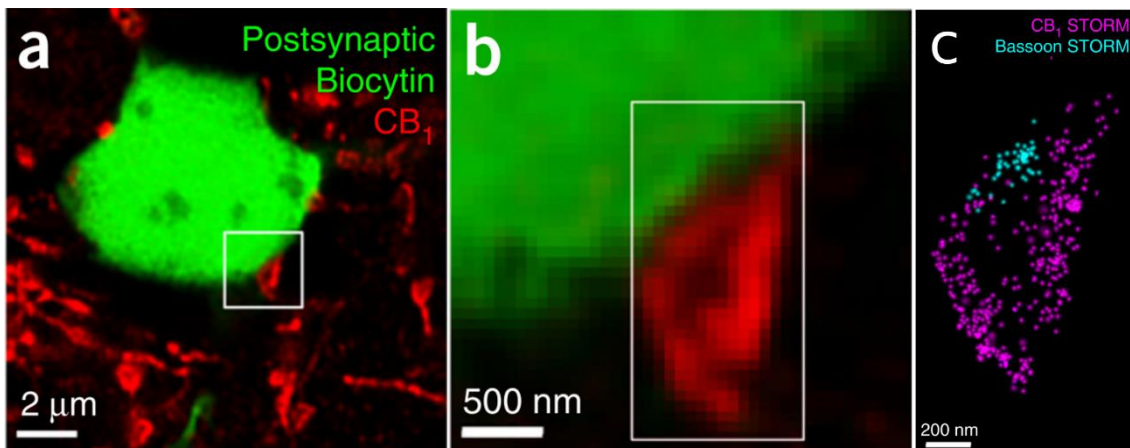
kezdetén meg kell adni a szalag kezdeti helyzetét. A VividSTORM-ban ez azt jelenti, hogy a struktúránk köré kört kell rajzolni, a minimalizáció ebből a helyzetből indul. A felhasználó megadhat paramétereket, mint például a nyújtási és hajlítási erők arányát. Ezzel finomhangolni lehet az erőteret, hogy az adott típusú struktúrákat jobban felismerje. Az akív kontúr módszer által a dekonvolvált konfokális csatornában kiválasztott területre eső lokalizációk alkotják azt a lokalizációs pont halmazt, ami később a molekuláris számítások során figyelembe vesszük (28. ábra).

4.3.4. Molekuláris távolságok mérése egyedi molekula lokalizációs mikroszkópos képeken

A képek illesztése és az adott szubcelluláris kompartmentumhoz tartozó lokalizációs pontok kijelölése után számtalan izgalmas kérdést lehet vizsgálni a molekulák/fehérjék térbeli szerveződéséről. A lehető legegyszerűbb számítás a lokalizációs pontok közötti euklidészi távolság meghatározása. Mivel a háromdimenziós koordináták rendelkezésre állnak, ugyanilyen egyszerű meghatározni például a Ripley's K függvényt vagy a hozzá hasonló párkorrelációs függvényt. Az utóbbi függvények nagyon hasznosak a lokalizációs pontok klaszterezettségének vagy kolokalizációjának vizsgálatára.

A sejtek membránjában lévő receptorok vagy ioncsatornák kölcsönhatásai szempontjából valószínűbb, hogy a közöttük mért membránfelszínen vett legrövidebb távolság lehet adat értékű az egyszerű euklidészi távolsággal szemben. Mivel a CB₁ kannabinoid receptor egy G-fehérje kapcsolt membránfehérje és downstream jelpályájának egyik jelentős célpontja a feszültségfüggő kalcium (VGCC) csatorna, ami szintén egy membránfehérje, kézenfekvő volt a membránfelszínen vett távolságmérés kidolgozása a lokalizációs képeken. Azonban a STORM mikroszkópiában a membránok jelölése és megjelenítése a fentebb már említett nehézségekbe ütközik. A CB₁-pozitív hippokampális interneuronok axonvégződéseiben a CB₁ receptor azonban nagyon nagy számban van jelen, ami jó lehetőséget adott a membrán modellezésére. A legegyszerűbb közelítés egy ponthalmaz burkolófelületére, ami a membránt modellezi, a konvex burkoló (29. ábra). A P ponthalmazon értelmezett konvex burkoló egy olyan test, amely tartalmazza P bármely két pontját összekötő szakaszt. Az ilyen konvex burkolók előállítását matematikailag egyértelmű és nagyon gyorsan kiszámítható.

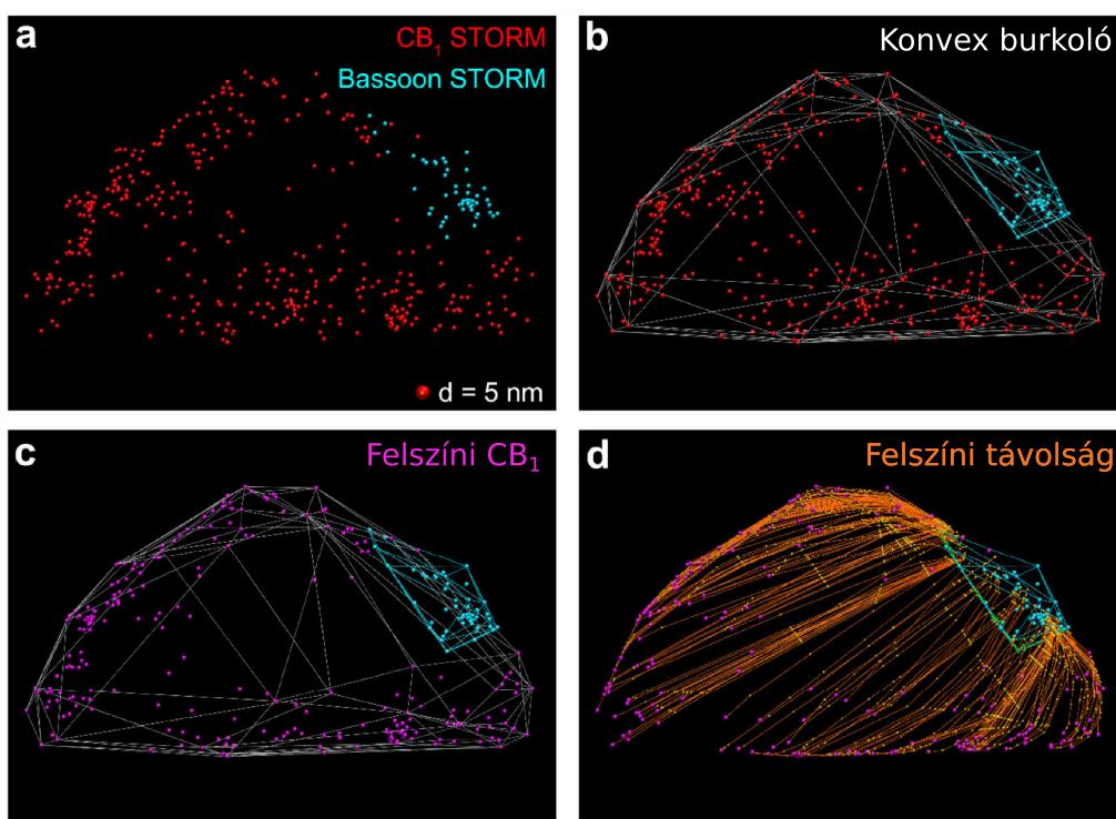
Miután a plazmamembrán modell és a vonatkozó CB₁ lokalizációk már rendelkezésre állnak, a következő fontos cél a szinaptikus aktív zóna kijelölése volt, mivel az elektronmikroszkópiával szemben a STORM nem tudja a szinapszist közvetlenül megjeleníteni. Kézenfekvő lenne magát a VGCC-t jelölni, de eddig nem állt rendelkezésre megfelelő érzékenységű és specifitású antitest az immunfestéshez. A bassoon fehérje fontos, nagy sűrűségű alkotóeleme annak az aktív zónában található molekuláris szerkezetnek, amely a VGCC-eket pozicionálja, a szinaptikus hólyagokat megköti és a szinaptikus rés közelébe irányítja (Frank és mtsai., 2010; Nishimune és mtsai., 2012; Richter és mtsai., 1999; Tom Dieck és mtsai., 1998). Ezért a következő lépésben a CB₁ bassoon kettős immunfestéseken mind a CB₁, mind pedig a bassoon lokalizációkra konvex burkot illesztettünk. A CB₁ konvex burka a plazmamembránt, amíg a bassooné az aktív zónát modellezte. A várakozásoknak megfelelően a bassoon konvex burok a CB₁ burkon belül helyezkedett el és mindig a megfelelő posztszinaptikus profil irányába mutatott (29. ábra).



29. ábra (a-b) Biocitinnel töltött piramisajt (zöld) és a felszínére simuló CB₁ (piros) pozitív idegvégződés dekonvolvált konfokális képalkotással. (c) A (b) panelen látható végződés kettős Bassoon és CB₁ STORM képalkotással. Az aktív zónát jelölő Bassoon festés a piramisajt sejtteste felé mutat

4.3.5. Konvex burkoló két pontja között mért legrövidebb felszín menti távolság számítása

A konvex burkoló egy háromszögekből álló felszín, melyre igaz, hogy bármely két szomszédos háromszög által kifeszített sík által bezárt szög konvex, a burkoló által meghatározott test tartalmazza bármely két olyan pont összekötő szakaszának minden pontját, amire a burkolót illesztettük. A CB₁-VGCC jelátviteli folyamat a G-fehérje $\beta\gamma$ alegységén keresztül plazmamembránhoz kötött módon történik (Herlitze és mtsai., 1996), így a receptor-effektor távolság szempontjából a felszíni távolság

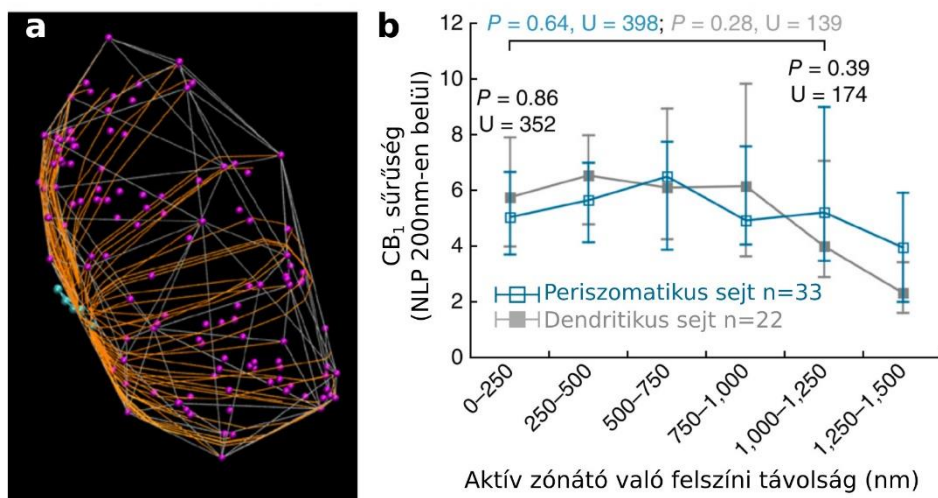


30. ábra A lokalizációs pontokra illesztett konvex burok és a legrövidebb felszíni útvonalak. (a) CB₁ és bassoon kettős festés STORM képe. (b) A kétféle festés lokalizációs pontjaira illesztett konvex burkolók. (c) A konvex burkoló a sejthártyát modellezi. Csak a felszíntől 100nm távolságra lévő CB₁ lokalizációkat tartottuk meg. (d) A burkoló felszínén számított legrövidebb utak membrán CB₁ és bassoon jelek között narancsszínnel látszanak ((a-d) VMD 3D megjelenítés)

(a plazmamembrán mentén) fontosabb lehet, mint az egyszerű euklideszi távolság. A konvex burok felszínén a legrövidebb útvonal számítására tudomásunk szerint eddig nem volt megfelelő algoritmus, ezért a következő közelítéssel éltünk. Konstruáltunk egy olyan S síkot, amely tartalmazza az A és B pontokat összekötő szakaszt. Vettük az S sík és a K konvex burok metszetét, amely két L1 és L2, szakaszból álló útvonalat jelöl ki A és B között. Az S síkot elforgattuk az AB szakasz által kijelölt tengely körül 5 fokkal, majd újraszámoltuk az L1 és L2 hosszakat. Összesen 180 fok elforgatás után az L1[1...36] és L2[1...36] útvonalakból meghatároztuk a legrövidebbet (30. ábra).

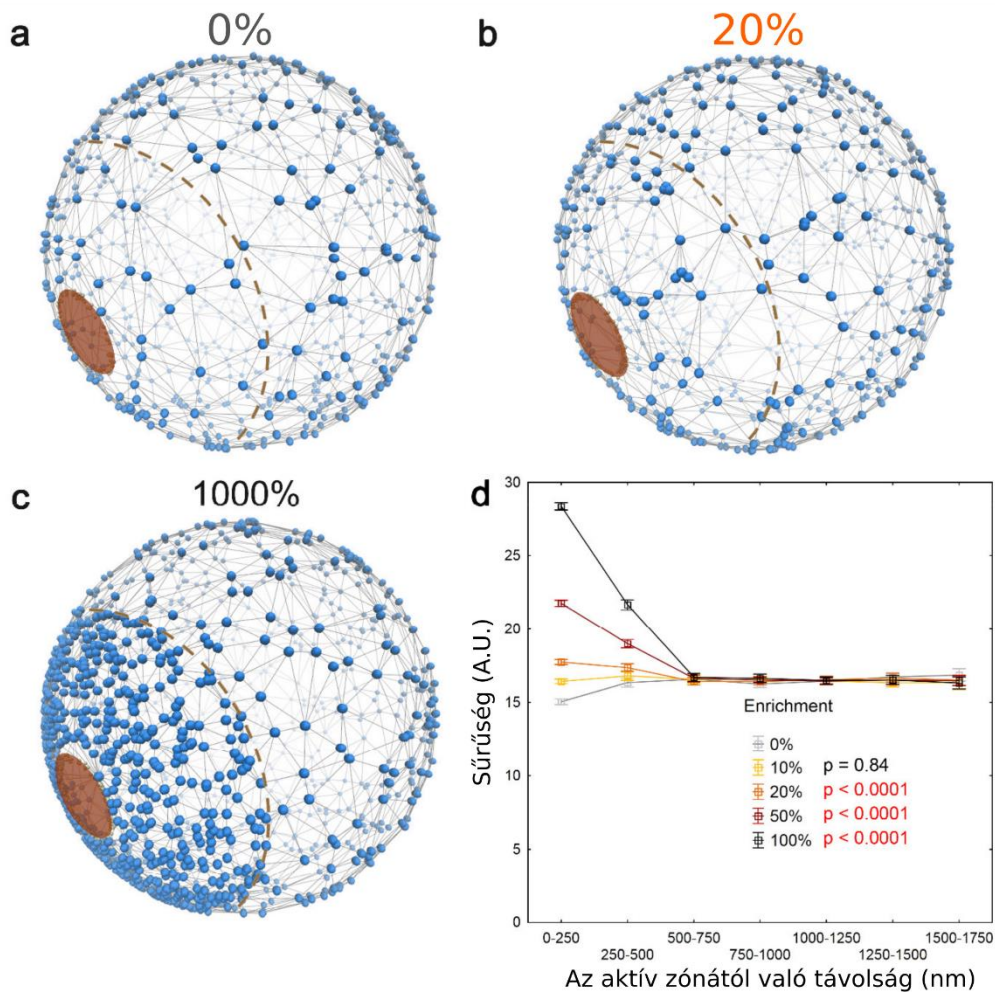
4.3.6. Molekuláris sűrűségek mérése lokalizációs mikroszkópos képeken.

Annak érdekében, hogy meg tudjuk mérni, hogy a CB₁ receptor bedúsul-e az aktív zóna körül, ezek után ki kellett dolgozni a molekuláris sűrűségek mérésének módszerét a konvex burkoló felszínén.



31. ábra (a) Kettős CB₁ (bíborvörös) és Bassoon (türkizkék) STORM képalkotás 3D megjelenítésben. A legrövidebb felszíni utak sárgával látszanak **(b)** A két sejtípus esetén a Bassoontól mért távolság függvényében a CB₁ lokalizációs pontok sűrűsége egyenletes és hasonló. Az ábrán a medián±IKT láthatók (Dudok 2015)

A konvex burkoló felületet háromszögek alkotják, amelyek felszínén véletlen, egyenletes eloszlásban pontokat vettünk fel úgy, hogy az átlagos legközelebbi távolságok megegyezzenek a kívánt mintavételi gyakorisággal. A sűrűségméréshez a mintavételi gyakoriságot a STORM képek XY felbontásához igazítottuk. Minden mintavételi pont távolságát meghatároztuk az aktív zónától és a CB₁ lokalizációk számát megmértük 200 nm-es sugáron belül. Az aktív zónától mért távolságot a következőképpen határoztuk meg. A bassoon az eddigi publikációk és a mi méréseink szerint is nem a bouton felszínén helyezkedik el, hanem kb. 70 nm-re a plazmamembrántól (Dani és mtsai., 2010). A számunkra érdekes effektorok (VGCC) pedig a plazmamembránban találhatóak, ezért a bassoon lokalizációkat a CB₁ által meghatározott membránt modellező konvex burkoló felszínére vetítettük. A kapott ponthalmazból meghatároztuk azt, amelyik az adott sűrűségmérési ponthoz a CB₁ konvex burkoló felszínén a legközelebb van és ezt vettük az aktív zónától való távolságnak (30. ábra (d)). Ahhoz, hogy meg tudjuk becsülni, hogy ezzel a módszerrel milyen sűrűségváltozást tudunk kimutatni, különböző aktív hely körüli bedúsulásokat modelleztünk figyelembe véve a boutonok jellemző geometriai viszonyait. A bouton egy 1 µm átmérőjű gömbfelszínen egyenletes eloszlásban, véletlenszerűen elhelyezett 'lokalizációkkal' reprezentáltuk. Az aktív hely pedig a gömb felszínén egy 230 nm sugarú gömbmetszet volt, ahova nem kerültek pontok. A bedúsulás modellezésére az aktív zónától 250 nm-es távolságon belül a gömbfelszínen további pontokat helyeztünk el, ami megfelelt 10,20,50,100 és 1000%-os besűrűsödésnek a gömb többi részén mérhetőhöz képest. A sűrűségméréshez felvett mintavételezési pontok az aktív zónát kihagyták, de ezen kívül egyenletesen, véletlenszerűen borították a modellbouton felszínét, átlagos legközelebbi távolságuk 40 nm volt. Minden bedúsulási körülményhez 50 modell készült és a mintavételezési távolságokat az aktív zóna peremétől számítottuk a sűrűség pedig a 200 nm-es sugáron belüli modell lokalizációk száma volt. Az egyes dúsítási körülményekben az aktív zónától mért távolságokat binneltük és az átlagát vettük. Végül ezt az ötven átlagot ábráztuk dúsulásonként. A 20%-os besűrűsödés már kimutatható szignifikáns különbségként a 0-250nm-es és az 1000-1250-nm-es aktív zónától mért tartományokra vonatkozólag ($p < 0.0001$ két mintás t-teszt), de a 10% még nem ($p = 0.84$) (32. ábra). A valódi biológiai mintákon mért CB₁ sűrűségeloszlások azt mutatták, hogy a módszerünk érzékenységi tartományában nem volt kimutatható bedúsulás az aktív zóna körül (31. ábra (b)).

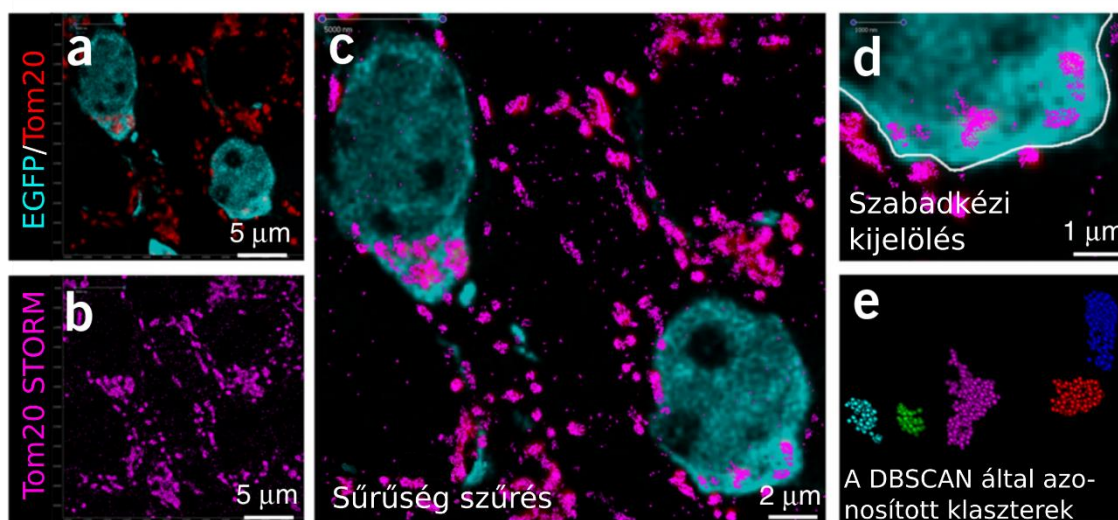


32. ábra A felszíni távolság számítás és sűrűség eloszlás mérés érzékenységének ellenőrzése egy modell boutonont használtunk. A bouton egy 1 μm átmérőjű gömb felszínére véletlenszerűen kiszórt pontokkal modelleztük (CB_1), kivéve az aktív helyet, ami egy 230nm átmérőjű kiürített terület. **(a-c)** Az aktív helytől 250nm távolságon belül többféle pont sűrűsödést hoztunk létre (10,20,50,100, és 1000 százalékosat az alapsűrűséghez képest) a receptor bedúsulását modellezendő. **(d)** A pontsűrűségek eloszlása az aktív zónától mért távolság függvényében a különböző besűrűsödések esetében. Minden besűrűsödési modellezést ötvenszer végeztünk el. Az egyes pontok diagramon a medián \pm IKT mutatják a különböző bedúsulások esetén. A kétmintás t-tesztet az aktív zóna 250nm-es tartománya és az 1000-1250nm-es tartomány adatai között végeztük. A 20%-os bedúsulást a módszer már ki tudja mutatni ($p < 0.001$) de 10%-nál még nem szignifikáns a különbség ($p = 0.84$)

4.3.7. Klaszterezettség vizsgálata lokalizációs mikroszkópiás képeken

Az egymástól térben jól elkülönülő biológiai struktúrák, funkcionális helyek jelölései egészen a felbontási határig elkülönült pixel vagy voxel halmazokként jelennek meg a hagyományos mikroszkópiában is. A lokalizációs mikroszkópiában ezek a különálló részletek, mint lokalizációs pont csoportok vagy klaszterek jelennek meg. A megnövekedett felbontás miatt természetesen kisebb elkülönülő egységek is szétválaszthatók. A diffrakció-limitált fénymikroszkópiában a sejtmagok, sejttestek kiválóan elkülöníthetők, de például sok szövettípusban a mitokondriális festés egy olyan határt jelet, ahol az egyes mitokondriumok már éppen nem választhatóak szét. Egy szinapszis aktív zónájának a belső struktúrája már semmiképpen nem oldható fel hagyományos fénymikroszkópiával. A pixel alapú mikroszkópiában az intenzitás szerinti szegmentálás használható az egyes struktúrák szétválasztásához. A egyedi molekula lokalizációs mikroszkópos adatokon ugyanezt a funkciót a lokalizációk klaszteranalízisével lehet megvalósítani. Egy pontthalmazon belüli csoportosulások, azaz a klaszterezettség meghatározása matematikailag nem egyértelmű feladat és többféle megközelítés elképzelhető. Az egyik legegyszerűbb módszer a K-klaszterezés, melynek során előre eldöntjük hány csoportot szeretnénk (K) és az algoritmus ennek megfelelően a pontokat szétosztja K számú klaszterbe. Ez nem célszerű akkor, ha nem tudjuk előre, hogy az adott látótérben hány mitokondrium van vagy egy boutonon hány aktív zóna helyezkedik el. Előnyös lehet ha például egy olyan struktúrát vizsgálunk, mint a magpórus komplex, ami mindig pontosan 8 alegységből áll (Loschberger és mtsai., 2012; Szymborska és mtsai., 2013). A K-klaszterezés további hátránya, hogy nem kezeli a 'zajt', ami azt jelenti, hogy minden pontnak muszáj egy klaszterhez tartoznia. A zaj jelentése a klaszterezésben egyszerűen megérthető például az immunfestés példáján, ahol mindig előfordulhatnak aspecifikus jelölések. Olyan algoritmusra van tehát szükség, ahol nem kell előre meghatározni a klaszterek számát és értelmezve van egy külön halmaz a zaj elkülönítésére. Egy ilyen eljárás a sűrűség alapú klaszterezés zajjal (DBSCAN) (Ester és mtsai., 1996). Egy pont akkor fog egy klaszterhez tartozni, ha epsilon sugarú környezetében van legalább N számú másik pont. Az epsilon és N paraméterek megadásához figyelembe kell venni a jelölési sűrűséget és a struktúrák jellemző méretét. A VividSTORM-ba épített DBSCAN funkcióval egér idegszövet preparátumban az egyedi mitokondriumok könnyen szétválaszthatóknak bizonyultak kísérleteinkben (33.

ábra). A CB₁-pozitív interneuronok boutonjain mindig több bassoon klasztert figyeltünk meg, amely egyezett a korábbi elektronmikroszkópos adatokkal amelyek, többszörös felszabaduló helyeket mutatnak (Biro és mtsai., 2006). A periszomatikus és dendritikus interneuronok boutonjain ugyanannyi bassoon lokalizációs pont található, viszont a DBSCAN klaszteranalízis kimutatta, hogy a periszomatikus boutonok esetében több klaszter található. Ugyanannyi lokalizációs pont, ha több klaszterben helyezkedik el, akkor a klaszterek kisebbek, ami arra utal, hogy az aktív zóna nanoskálájú felépítése töredezetebb. Ez a felépítése a periszomatikus axon terminálisok aktív zónáinak arra utal, hogy az endokannabinoid rendszer szempontjából nagyobb a receptor-effektor arány, a jelátvitel ezért nagyobb hatásfokkal működik.



33. ábra Klaszteranalízis tipikus munkafolyamata VividSTORM-ban. (a) Agyszövet konfokális képe EGFP (türkizkék) és mitokondriális (TOM20, piros) jelöléssel. (b) A TOM20 jelölés STORM képalkotása (bíborvörös). (c) A konfokális és STORM csatornák manuálisan összeillesztve és a sűrűségűző alkalmazásával a nem specifikus jelek eltüntetése. (d) A transzfektált neuroblaszt sejthez tartozó mitokondriumok számának és méretének elemzéséhez a sejtet szabadkézzel körberajzoljuk. (e) A DBSCAN által azonosított klaszterek

Feltevésünk szerint ez a nanoskálájú molekuláris szerveződés magyarázhatja a kétféle sejttípus szinapszisaiban az endokannabinoid jelpálya hatékonysága közötti ismert különbséget (Lee és mtsai., 2010). Hogy ezt az elképzelést alátámasszuk, megmértük,

hogy a kettős immunfestett CB₁ bassoon STORM képeken az aktív zónától (azaz a bassoon klaszterektől) számított releváns, 150-200 nm-es tartományban mennyi CB₁ lokalizációs pont található. A várakozásunknak megfelelően kb. 50%-kal nagyobb CB₁ NLP értéket mértünk a bassoon klaszterek közelében a periszomatikus boutonok esetében, mint a dendritikus idegvégződések esetében (Dudok és mtsai., 2015 5. ábra (k)). Ezek a mérések igazolják, hogy a klaszteranalízis egy fontos eszköze az egyedi molekula lokalizációs mikroszkópai adatok elemzésének.

4.3.8. Receptor internalizáció mérése CB₁-pozitív interneuron terminálisokban

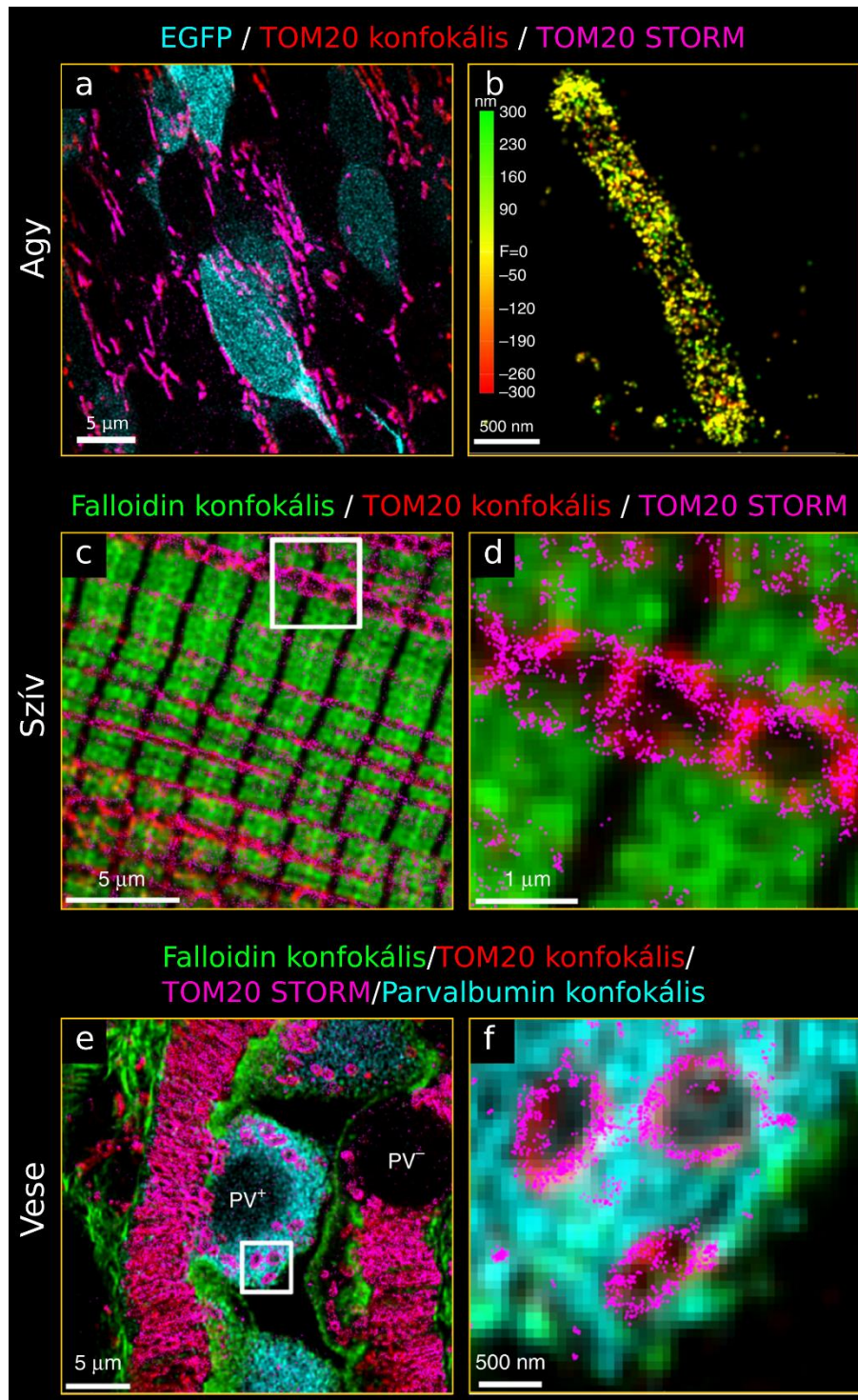
A ligandkötéssel aktivált GPCR jelátvitelt a receptor internalizációja követi (Moore és mtsai., 2007). Ilyenkor a receptor clathrin-mediálta endocitózis folyamattal eltűnik a plazmamembránból, majd újrahasznosul vagy lebontásra kerül. A CB₁ receptor, ami az agyban az egyik leggyakoribb GPCR (Herkenham és mtsai., 1990), ligandkötés hatására szintén internalizálódik (Coutts és mtsai., 2001; Hsieh és mtsai., 1999). Hogy mérni tudjuk az internalizáció mértékét egy újabb analízis funkciót építettünk a VividSTORM-ba, az internalizációs index (II) számítását. Az II számításnak kétféle módját valósítottuk meg. Az egyik esetben a lokalizációs ponthalmazra 2D konvex burkolót feszítünk (a Z koordinátákat figyelmen kívül hagyjuk), amelynek meghatározzuk a területét és kiszámítjuk azt az r sugarat, ami egy ilyen területű körhöz tartozik. Meghatározzuk a lokalizációs ponthalmaz 3D M tömegközéppontját és, kiszámítjuk d -t, ami az euklidészi távolság az M és az LP (lokalizációs pont) között. A minden LP-re kiszámított d/r értékeket átlagoljuk, így kapjuk az II-t, melynek értéke 1 körüli, ha minden LP a plazmamembránon van, és 0, ha a tömegközéppontban. A II számítás egy másik lehetősége, hogy konvex burkolót feszítünk a membránt jelölő LP halmazra, majd megmérjük a receptort jelölő LP-k euklidészi távolságát ettől a felszíntől. Minden LP-t internalizáltnak tekintünk, amely a konvex buroktól nagyobb távolságra van, mint egy megadható küszöbérték. Végül az II értékét a membránban lévő LP-k és az internalizált LP-k számának hányadosa adja meg.

Kísérleteink során az exogén és az endokannabinoidok internalizációt okozó hatását is teszteltük ezzel az elemzéssel. Először a két legfontosabbnak tartott

endokannabinoid, a 2-AG és az anandamid hatását vizsgáltuk. Egér hippokampális túlélő agyszeleteket JZL184-el (JZL) és PF3845-el (PF) kezeltünk, amelyek gátlói a 2-AG, illetve az anandamid lebontó enzimeinek. A gátlószer hatására mind a két endokannabinoid szintje több, mint kétszeresére emelkedik a szövetben. Érdekes módon sem a LP-k számában sem pedig az internalizációs indexben nem tapasztaltunk változást a megnövekedett 2-AG, illetve anandamid szint hatására. A külső kannabinoidok internalizációs hatásának tesztelésére egereket hat napon keresztül hasüregbe adott THC (Δ^9 -tetrahydrocannabinol)-tartalmú injekciókkal kezeltünk, olyan testtömeg arányos dózisban, amelynek eredményeképpen az egerek vérében a THC koncentráció megfelel egy rekreációs célból marihuánát szívó ember vérében mérhető THC szintjének. Ebben a krónikus kezelési modellben már drasztikusan kimutatható volt a CB₁ receptorok számának csökkenése. STORM méréseinkben 74%-kal kevesebb LP-t találtunk a periszomatikus boutonokon, mint a kontroll esetben és az internalizációs indexben is szignifikáns változást lehetett mérni (Dudok és mtsai., 2015, 6. ábra). Az STORM képalkotás és az internalizációs index analízis tehát nanoskálájú pontossággal mutatja meg a kannabinoidok hatását a CB₁ internalizációjára és ez a molekuláris tolerancia jelenség feltehetően háttérben állhat a hasonló dózisok esetében tapasztalható viselkedési toleranciának.

4.3.9. A STORM képalkotás kiterjesztése további szövettípusokra

Munkánk során a STORM képalkotást leginkább idegszöveten vagy sejt kultúrán végeztük. Célunk azonban egy általános, az élettudományok minden területén hasznos mikroszkópos képalkotási és adatelemzési megközelítés kifejlesztése volt. Ezért az utolsó lépésben megvizsgáltuk, hogy az alkalmazott minta előkészítési és képalkotási protokollunk más szövettípusokban is ugyanilyen jól alkalmazhatóak-e. Mivel a STORM képalkotás igényel néhány speciális feltételt, mint például nagy képalkotási lézerintenzitás, különleges képalkotási lefedő médium, fedőlemezre szárított metszetek, ezért előfordulhat, hogy más szövettípusok máshogyan viselkednek ilyen körülmények között. Olyan jelölést választottunk, amely minden szövettípusban jelen van, a sűrűsége megfelelően nagy ahhoz, hogy a struktúrát helyesen mintavételezze (Nyquist) és megfelelő minőségű antitest is rendelkezésre áll.



34. ábra Korrelatív konfokális és STORM képalkotás különböző szövetekben és jelölésekkel. (a-b) Embrionális radiál glia EGFP-vel transzfektálva és mitokondrium (TOM20) STORM. **(c-d)** Szívizom falloidin festés (konfokális) és TOM20 STORM. **(e-f)** Vese kéregállományban parvalbumin, falloidin, TOM20 konfokális és TOM20 STORM jelölés.

A választásunk így a TOM20-re esett, ami egy mitokondriális külső membránban elhelyezkedő fehérje. Az egyedi vagy sejttípus-specifikus jelölés egyik módja az általunk is követett patch-pipettával történő egyedi sejtfeltöltés. Ezenkívül mások mellett gyakori a vírusos jelölés vagy az *in utero* elektroporációs genetikai jelölés is. Az első mintánkban *in utero*, elektroporációval transzfektáltunk EGFP-t radiális gliasejt progenitorokba. A fixált embrionális szövetet a CB₁ esetében használt protokoll szerint jelöltük. A második mintánk egér szívizom volt, amelyben az AF647-el jelölt TOM20 STORM képalkotást falloidin konfokális jelöléssel kombináltuk a mitokondriumok megfigyelésére a szívizomsejtek (kardiomiociták) szarkomerjeiben. A harmadik szöveti tesztfestésnél veseállományban kombináltunk két konfokális és egy STORM modalitású immunfestést. A szöveti struktúrát falloidinnel jelöltük és parvalbumin-immunfestéssel láthatóvá tettük a nefronok disztális csatornáinak egyedi sejtjeit. A kísérletben a dekonvolvált konfokális modalitás alapján elkülöníthetőek voltak a PV+ epithél sejtekhez tartozó, de már a STORM szuperfelbontású csatornában láthatóvá tett mitokondriumok (34. ábra). A különböző szöveteken, különböző jelölési eljárásokkal (egyedi sejt feltöltése, plazmida transzfektálás, immunfestés neurokémiai markerrel), de ugyanazzal a minta előkészítési protokollal készült korrelatív konfokális és STORM szuperfelbontású képek alapján elmondható, hogy a dolgozatban bemutatott mintakészítési, képfelvételi és elemzési módszer általánosan használható megközelítések lehetnek az élettudományi kutatásokban.

5. MEGBESZÉLÉS

Dolgozatomban egy olyan új eljárást mutattam be, amellyel lehetséges az élettani és az anatómiai tulajdonságok kombinált mérése a jelenségek háttérében álló molekuláris alkotóelemek nanodomén-szintű vizsgálatával. Az idegrendszer neuronhálózatainak összetett felépítése miatt fontos célunk volt, hogy a kísérleteinket célsejt-specifikus módon végezhessük, és a molekuláris adatokat szubcelluláris kompartmentumokra korlátozva gyűjtsük az idegszövet preparátumokban. Kutatási programunk során az eljárást először egér hippocampusz mintákon alkalmaztuk, amelyekben az egyes típusú kannabinoid (CB₁) receptor eloszlását vizsgáltuk két GABAerg gátló interneuron típus idegvégződésein. Később méréseinket kiterjesztettük más biológiai preparátumokra például a vesekéreg nefronjaira, ezzel igazolva az eljárás széleskörű alkalmazhatóságát az élettudományokban.

Az eljárásunkban a STORM szuperfelbontású mikroszkópiát alkalmaztuk kombinálva patch-clamp elektrofiziológiával és hagyományos konfokális mikroszkópiával. Fontos megemlíteni, hogy a szuperfelbontású fénymikroszkópiás eljárásokat (a STED, a SIM és a STORM mikroszkópiát) néhányan már sikeresen használták az élettudományok több területén, köztük például a szinapszis kutatásban is (Dani és mtsai., 2010; Maglione és Sigrist, 2013; Specht és mtsai., 2013; Tang és mtsai., 2016). Azonban a korábbi tanulmányokban a képalkotást többnyire sejt kultúrában végezték vagy nem egyedileg azonosított sejt típusokban, hanem véletlenszerű populációs szintű vizsgálatokban. Ugyanakkor ismert, hogy a különböző sejt típusok minőségi és mennyiségi különbségeket mutatnak az egyes molekuláris alkotóelemek expressziós szintjét illetően, amely feltételezhetően hozzájárulhat az egyes jelpályák eltérő élettani működéséhez is. Például a periszomatikus és dendritikus GABAerg interneuronok idegvégződéseik egyaránt tartalmazzák a CB₁ receptort a hippocampusz CA1 régiójában, ugyanakkor a kannabinoid jelátvitel hatékonysága efferens szinapszisaikban jelentősen különbözik (Lee és mtsai., 2010). Kiindulási hipotézisünk ezért azon a feltételezésen alapult, hogy a CB₁ receptorok mennyiségi és/vagy térbeli szerveződésének különbségéből adódik az élettani különbség a periszomatikus és dendritikus gátlósejtek között.

A térbeli szerveződés vizsgálatához olyan módszert kellett találnunk, amellyel a receptorok eloszlását nano-léptékű feloldással lehetett megfigyelni az idegszövetben, ráadásul egyedileg jelölt interneuronok idegvégződésein. A lokalizációs pontosságon túl a képalkotás érzékenységének is nagyon magasnak kellett lennie, mert ugyan a dendritikus és periszomatikus sejtek idegvégződéseinek sejtthártyájában nagy mennyiségű CB₁ receptor található, de ma már ismert, hogy kisebb kópiaszámban a CB₁ receptorok (és általában a GPCR-ek) előfordulnak intracellulárisan is, azaz a boutonon belül is képesek lehetnek különböző jelátviteli folyamatokban résztvenni (Bénard és mtsai., 2012; MacGillavry és mtsai., 2013; Rozenfeld és Devi, 2008). Eredményeink alapján a STORM képalkotás, amely egyesíti a szuperfelbontást az egyedi molekula érzékenységgel jó választásnak bizonyult a fenti célok eléréséhez a sejteket jelölő konfokális képalkotással kombinálva.

Az első tanulmányunk (Dudok és mtsai., 2015) megjelenése után kilenc hónappal egy hasonló módszertani logikán alapuló, de a konfokális mikroszkópiát a szuperfelbontású PALM eljárással kombináló tanulmányban belga kutatók az AMPA típusú glutamát receptorok (GLR-1) eloszlását vizsgálták sikerrel a *C. elegans* szinapszisaiban (Vangindertael és mtsai., 2015), ezzel tovább igazolva a korrelált módszertani megközelítés erejét. Ugyanakkor mivel a PALM egy fluoreszcens fehérjével felcímkézett célfehérje expresszióján alapszik és általában mesterségesen túltermeltetett expressziós rendszerekben használják, ezért mi úgy gondoljuk, hogy az endogén fehérjék vizsgálatára továbbra is az antitest alapú STORM megközelítés lesz alkalmasabb.

5.1. A STORM egyedi molekula lokalizációs mikroszkópia optimalizálása idegszöveti képalkotásra

5.1.1. STORM mikroszkóp beállítása az optimális képalkotáshoz

Annak érdekében, hogy elérjük a STORM képalkotás által biztosított egy nagyságrend felbontás növekedést a fényelhajlás korlátozottához képest, a mikroszkópon több beállítást is optimalizáltunk a fejlesztési munkánk első szakaszában. Tapasztalataink szerint a következő paraméterek a legfontosabbak:

1. A fényforrás centrálása.
2. Az objektív hőmérséklet korrekciós gyűrűjének beállítása.
3. Az asztigmatizmus alapú, Z irányú feloldás növekedést biztosító kalibrációs görbe felvétele.
4. Az objektív kromatikus aberrációjának korrigálása.

Habár a fenti beállítások fontossága általános érvényű az egyedi molekula lokalizációs mikroszkópia terén, ennek ellenére a szakirodalomban ritkán részletezik és hívják fel rá a figyelmet (Xu és mtsai., 2017). Pontos kivitelezése valószínűleg függ az aktuális mikroszkóptípus egyedi mechanikai, elektronikai és szoftveres kialakításától. Ezért fontos volt, hogy kidolgoztuk a megfelelő protokollt az általunk használt rendszerre vonatkozólag és részletesen bemutattuk ezzel reményeink szerint elősegítve más rendszerek optimalizálását is (Barna és mtsai., 2016).

5.1.2. A STORM mikroszkóp felbontásának mérése

A hagyományos fluoreszcens mikroszkópiákban a jelölésre felhasznált fluorofórok mind bekapcsolt állapotban vannak, így a képalkotás felbontása csak a pontátviteli függvény félérték-szélességétől függ. A sűrű jelöléses egyedi lokalizációs mikroszkópiákban viszont a fluorofórok egy része kikapcsolt állapotban van és bekapcsolásuk egy véletlenszerű folyamat. Ezért a felbontás szempontjából a lokalizációs pontosság mellett, egy másik tényező is megjelenik: az összes jelölő és az ezek közül detektálásra kerülő fluorofórok aránya (Nyquist-mintavételezés).

A lokalizációs pontosság is két tényezőtől függ. Az egyik a fluorofórok által kibocsátott fotonok számával és a mikroszkópos képfelvétel paramétereivel összefüggő komponens, a másik pedig a mikroszkóp mechanikai stabilitásával összefüggő elcsúszási összetevő. Fluoreszcens gyöngyökkel megállapítottuk, hogy 160 nm/pixel felbontású EMCCD képen a Rayleigh-felbontás 46 foton esetében 75 nm, 700-nál 18 nm és 6400-nál 6,6 nm. Az általunk használt STORM mikroszkóp lokalizációs felbontása tehát bőven fényelhajlás korlátozott alatt van és megegyezett az irodalomban sejtkultúra preparátumokban tapasztaltakkal (lásd például Dempsey és mtsai., 2011). A lokalizációs pontosság ilyen mérése természetesen csak egy irányadó érték, azt mutatja meg, hogy a

képalkotás és a szoftveres analízis mire képes olyan ideális körülmények között, ahol nagy a foton szám és nagyon alacsony a háttér. Agyszövet minták immunfestése esetén a lokalizációs pontosság méréséhez az egyedi fluorofórok többszörös felvillanását kihasználva X-Y irányban ~20 nm; Z irányban ~60 nm-t mértünk. Ezek az értékek megegyeznek vagy meghaladják más idegszövet preparátumokban kapott STORM és PALM rendszerekben mért értékeinek pontosságát (Dani és mtsai., 2010; MacGillavry és mtsai., 2013; Nair és mtsai., 2013; Pennacchiotti és mtsai., 2017; Specht és mtsai., 2013).

Nem szabad elfelejteni, hogy ezek az értékek a célfehérjék pozícióját jelző fluoroforokra vonatkoztatott lokalizációs pontosságot jelölik. A célfehérjéket azonban elsődleges antitestekkel, majd a fluorofórral felcímkézett másodlagos antitestekkel jelöljük meg, amely a tér minden irányában még újabb ~ 20-20 nm-es pontatlanságot jelent a célfehérje lokalizációját illetően. Fontos tehát kiemelni, hogy minden egyedi molekula lokalizációs mikroszkópiában különbséget kell tenni a célfehérje (localization accuracy) és a jelölő anyag (localization precision) lokalizációs pontossága között (összefoglalásként lásd Deschout és mtsai., 2014). Az antitestek méretéből és ismeretlen térbeli elfordulásából fakadó pontatlanság azonban minden immunfestésen alapuló molekuláris anatómiai eljárás jellemzője. Előrelépést jelenthet ebből a szempontból a hagyományos 150-160 kDa nagyságú antitestek alkalmazása helyett a jóval kisebb (~50 kDa) Fab fragmentumok közvetlen jelölése Alexa 647-el. Egy még érdekesebb jövőbeli fejlesztés lehet azonban a cápákból és tevéfélékből származó nanotestek (nanobody-k) használata, amelyek tízszer kisebb méretűek (12-15 kDa) és hatékonyabb szövetbeli penetrációjuk várhatóan tovább javítja a képalkotás hatékonyságát a lokalizációs hűség mellett. Ebből a szempontból az első STORM szuperfelbontású képalkotás sejt kultúra preparátumban EGFP és tubulin ellen készült nanotestekkel már sikeresnek bizonyultak (Mikhaylova és mtsai., 2015; Ries és mtsai., 2012).

Az egyszer felvillanó festékek esetében (pl. PA-GFP) a képalkotás során egy idő után már nincs több fluorofór, mert már mind végleges fakulás állapotába került. A többszörösen felvillanók esetében viszont még akkor is nagy felvillanás szám tapasztalható, ha már az összes fluorofór legalább egyszer felvillant és így a további felvillanások már nem járulnak hozzá a jelölés Nyquist-féle mintavételezéséhez. A STORM esetén így az optimális képfelvételi idő meghatározásához figyelni kell az

egyedi fluorofórok felvillanási számát. A ciklusszám növelésével megjelenő sokszoros felvillanások jelensége ugyanakkor nehezíti az abszolút molekuláris kvantifikáció megvalósítását (lásd alább), habár korrekciós becslési eljárások már léteznek (Veatch és mtsai., 2012).

5.2. A STORM képalkotás kvantitatív tulajdonságainak vizsgálata

A szuperfelbontású mikroszkópia és azon belül is a STORM képalkotás első sikerei az egyes szubcelluláris struktúrák molekuláris szerkezetének, fehérje komplexek összetételének feltárásához fűződnek (összefoglalásként lásd Sydor és mtsai., 2015). Fontos kérdés volt munkánk kezdetekor, hogy mennyire alkalmas a STORM mennyiségi molekuláris vizsgálatokra? Mivel a képalkotás sztochasztikus folyamat, ezért az egyes képeken az összes fluorofór egy véletlen alhalmaza jelenik meg. Fontos tisztában lenni azzal, hogy egy fluorofór több képen is megjelenhet a többszörös ki-be kapcsolási tulajdonság miatt. Ilyen körülmények között a módszer kvantitatív jellege egyáltalán nem egyértelmű. Az abszolút kvantifikáció nehezen megvalósítható, mert egy fluorofór ki-be kapcsolásának száma egy véletlen érték, ezért csak várható értékével jellemezhető. Ugyanakkor a fluorofórok pontos számára akkor adható egy becslés, ha az adott képalkotási körülmények között pontosan ismerjük a jelölő anyag fotokémiai tulajdonságait. A fluoreszcens jelölések pontos számának meghatározására az egyik szakirodalomban leírt eljárás a fakítás alatt mért fluoreszcencia csökkenési lépések számának mérése. Ez a módszer viszont ismét fényelhajlás korlátozott, így nem ad felvilágosítást a jelölések szuperfelbontású eloszlására (Specht és mtsai., 2013; Ulbrich és Isacoff, 2007).

Mi úgy gondoltuk, hogy biológiai szempontból releváns és fontos kérdésekre úgyszólván választ lehet kapni, ha két tökéletesen egyformán kezelt preparátumot hasonlítunk össze és a mennyiségi különbségekből vonunk le konklúziót. Ez a megközelítés feltételezi, hogy a potenciális hibaforrások (például az antitestek szöveti penetrációjának variabilitása vagy a véletlenszerű sokszoros fluorofór felvillanások) egyforma valószínűséggel jelentkeznek az azonosan kezelt mintákban. Azonban fontos volt közvetlen kísérlettel is megmutatni, hogy a STORM szuperfelbontású képalkotás valóban alkalmas a relatív mennyiségi összehasonlításra, azaz ha több fluorofórunk van, akkor

több lokalizációs pontot kapunk. A CB₁-EGFP konstrukció (Tappe-Theodor és mtsai., 2007) használata lehetővé tette, hogy az EGFP mennyiségét hagyományos konfokális mikroszkópiával vizsgálva összehasonlítsuk a CB₁-STORM jel mennyiségével. Eredményeink bizonyították, hogy van egy széles jelölési koncentráció tartomány, ahol lineáris arányosság van az EGFP intenzitás és a STORM lokalizációs pontok száma között. Fontos kiemelni, hogy az idegszövetben végzett kísérleteink során az interneuronokon mért CB₁-STORM jel sűrűsége ugyanebbe a dinamikus tartományba esett. Tudomásunk szerint hasonló antitest alapú összehasonlító vizsgálat még nem elérhető a szakirodalomban.

A lineáris dinamikus tartomány legszélén, azaz a nagyon alacsony EGFP intenzitásoknál a linearitás a vártnak megfelelően eltűnt. A konfokális fluoreszcens érzékenység (például a PMT detektorok jóval kisebb kvantum hatásfoka miatt lásd 29. oldal) ugyanis jóval elmarad az egyedi molekula érzékenységtől. A nagy koncentrációk esetében pedig az általunk használt fluorofórok megjelenésének időbeli szétválasztása már nem lehetséges még az erre a célra kifejlesztett DAO-STORM eljárással sem (Babcock és mtsai., 2012), így a szoftveres analízis során lokalizációs pontvesztés lép fel és a linearitás ismét sérül (Dudok és mtsai., 2015). Ezek a mérési eredményeink összességében tehát arra utalnak, hogy lehetséges a relatív mennyiségi összehasonlítás STORM képalkotással, de nagyon fontos a szükséges kontroll mérések elvégzése az adott vizsgálati rendszer paramétereinek megfelelően (Barna és mtsai., 2016b).

5.3. Hippokampális agymetszetek STORM képalkotása

Az Eredmények részben bemutattam az általunk kidolgozott munkafolyamatot, amely alkalmas a perfundált, illetve akut túlélő agymintából származó metszetek festésére, tárolására és képalkotására. Fontos fejlesztési célunk volt, hogy a legtöbb munkacsoport által használt általános immunfestési eljárásokhoz lehető leginkább hasonlító protokollt dolgozzunk ki. Kulcskérdés volt ugyanakkor az antitestek használatából fakadó lehetséges műtermék kiküszöbölésének megoldása és a STORM jel valóságának ellenőrzése. Kísérleteinkben a CB₁ jelölésre érzékeny és szelektív elsődleges antitestek álltak rendelkezésre (Fukudome és mtsai., 2004). Ugyanakkor a szelektivitás csak a hagyományos mikroszkópos képalkotások lehetőségein belül volt érvényes korábbi

irodalmi adatok alapján (Katona, 2006). Viszont nem biztos, hogy a szelektivitás igaz akkor is, amikor olyan érzékeny módszert használunk, mint a STORM, ahol minden egyedi fluorofór megjelenik. Minden antitest ugyan kis valószínűséggel, de hozzákötődik aspecifikus módon más fehérjékhez is, különösen fixált szöveti preparátumokban (Saper és Sawchenko, 2003). Ezért előfordulhat, hogy a STORM jobban képes olyan önmagukban álló, hamis célpontokat felismerni, amelyek pixelintenzitása jóval a konfokális mikroszkóp érzékenységi határa alatt van. Vad típusú és CB₁ génkiütött állatból származó minták összehasonlításából azonban kiderült, hogy mind az elsődleges antitest, mind pedig a másodlagos antitest nem okoz olyan aspecifikus hátteret, ami konfokális szinten nem volt észlelhető. Természesen ezt a jövőben minden kísérletezőnek a saját antitestjei esetén szintén ellenőriznie kell. Ennek a munkának a segítésére is alkalmas a VividSTORM szoftverünkbe beépített klaszterelemzési funkció. A feltételezett aspecifikus lokalizációk jellemző klaszterméretét megvizsgálva ugyanis megállapítható egy olyan sűrűség alapú szűrési paraméter, amellyel a képek háttere jelentősen csökkenthető.

Egy másik módszertani szempontból fontos kérdés a STORM mikroszkópiában, hogy a fókuszon kívüli térfogatokból érkező fotonok erősen rontják az adott fluorofórhoz tartozó Jel/Zaj arányt. Ez sejt kultúra preparátumokban nem jelent problémát, de a szöveti preparátumokon a vastag, sűrű jelölésű minták esetében, mint például a hippokampális CA1 területén a piramissejt rétegi CB₁ receptorok vagy a preszinaptikus aktív zónák bassoon immunjelölése gondot jelentett. Ezért dolgoztuk ki az akut élettani szeletek újrametszésének lehetőségét 20 µm vékonyságú anatómiai metszetekre, majd ezeknek a metszeteknek szabadon úszó inkubálását és fedőlemezre felhúzását oldottuk meg. Ezek a lépések türelmet és némi kezűgyességet kívánnak. Ezért hosszú távon más megoldásoknak is komoly létjogosultságuk lehet, ilyen például a nemrég megjelent array technika alkalmazása, amelyben 70 nm ultravékony sorozatmetszeteket használtak térbeli sejtrekonstrukcióra STORM szuperfelbontás segítségével (Sigal és mtsai., 2015).

Szintén fontos cél, hogy a mintának minél vékonyabb rétege legyen csak kivilágítva a gerjesztő fénnel. Az általunk használt mikroszkópon ezt a megvilágítás optikai tengelyhez képesti szögének változtatásával lehetett megvalósítani. A szög megválasztása függött a képalkotás mélységétől, így minden területen be kellett állítani

az optimális kivilágítást. A még vékonyabb réteg kivilágítására még alkalmasabb a HILO megoldás lehet (Tokunaga és mtsai., 2008), ami a mi rendszerünkön nem elérhető, de saját építésű rendszereken érdemes megfontolni az alkalmazását. Szintén izgalmas fejlesztési lehetőség lehet a light-sheet mikroszkópia megvilágításának kombinálása az egyedi molekula lokalizációs mikroszkópiával (Cella Znacchi és mtsai., 2011), és várhatóan széles körben el fog terjedni a lattice light sheet mikroszkópia megoldása is (Chen és mtsai., 2014).

Végül szintén fontos szempont, hogy az aktivátor megvilágítás elősegíti a fluorofórok bekapcsolt állapotba lépését. Ez akkor kívánatos, ha a STORM képalkotás egyes képein a PSF-ek már ritkán, egymástól messze mutatkoznak, tehát növelni lehetne az egyszerre világító jelölők számát addig a szintig, amíg már meg nem jelennek az első összeérő és így analízisre alkalmatlan pontátviteli függvényképek. A megfelelő aktivátor lézerintenzitás beállítását a dolgozatban bemutatott kísérletekben empirikus módon végeztük. A jövőben fontos lenne egy szoftveres megoldás kidolgozása, ami valós időben mutatná az egyedi és az átlapoló PSF-ek arányát. Ez az igény az analízis szoftverek gyorsaságával szemben támaszt kihívást. Ígéretesnek tűnnek ilyen szempontból is a GPU (Graphic Process Unit) alapú, masszívan párhuzamosított lokalizáció analízis algoritmusok (Brede és Lakadamyali, 2012; Tang és mtsai., 2015).

5.4. Korrelatív konfokális és egyedi molekula lokalizációs mikroszkópia

Az eredményekben bemutatott korrelatív módszer bevezetésének fő célja az volt, hogy képesek legyünk a jelölt célsejt morfológiai részleteit minél pontosabban megjeleníteni. Ezzel lehetővé vált, hogy elkülönítsük azokat a molekuláris lokalizációs adatokat például a CB₁ receptorok vagy a bassoon fehérje STORM jelét, amelyek specifikusan a fiziológiailag karakterizált célsejthez tartoznak. Kézenfekvő lenne a célsejt strukturális jelölését is STORM-al leképezni, ez azonban, habár nem lehetetlen, egyelőre még gyakran nehézségbe ütközik. A membrán d nm-es felbontású vizualizálásához olyan jelölést kell választani, amelynél a jelölők átlagos legközelebbi távolsága $d/2$ nm (Nyquist-mintavételezés). Ez azt jelenti, hogy STORM szempontjából megfelelő fotokémiai tulajdonságú, membrán-specifikus festéket kell a célsejtbe juttatni úgy, hogy a festés ne terjedjen át más sejtek membránjaiba, de az adott sejtben elérje a legtávolabbi

részeket is, és megfelelő sűrűségben legyen mindenhol. Lipofil cianin festékek például DiI segítségével a sejtthártyáról és szubcelluláris organellekről sikerült másoknak STORM képet készíteniük ezzel a módszerrel, de kizárólag sejt kultúra preparátumokban (Shim és mtsai., 2012). Saját próbálkozásaink szöveti preparátumokban génpuska és patch elektródával töltés segítségével azonban nem vezettek eredményre, a minta fixálása során a lipofil festék túl nagy területen terjedt szét.

Egy másik lehetőség lehet, ha a vizsgálni kívánt egyedi sejtbe juttatunk egy olyan gént, amely valamilyen membránba irányító címkét tartalmazó jelölést kódol (pl. fluoreszcens fehérje-membránfehérje konstrukció). Primer neuronális tenyészeteken ez technikailag megoldható volt (Lakadamyali és mtsai., 2012), és ígéretes nem publikált elő eredményeink alapján in utero elektroporációval neuronokba bevitt plazmidok elegendően sűrű jelölést eredményeznek teljes sejt rekonstrukcióhoz. Ez a megközelítés alkalmas ritkás, egyedi sejtek vizualizálására, esetleg célzott sejt típusok megjelenítésére megfelelő promoterral ellátott plazmid esetén. De ahhoz, hogy kizárólag egyetlen sejtet szeretnénk megjelölni a mintában, amelyhez az élettani adatok tartoznak más utat kellett választanunk. Ezért a hippokampális interneuronok jelölésére a neuroanatómiában régóta használt biocitinnel töltés módszerét választottuk, amellyel egyetlen célsejt jelölhető és a jelölés eljut a legtávolabbi sejt szakaszokra is. Ez a jelölés tökéletesen alkalmas volt a konfokális mikroszkóppal történő morfológiai vizsgálatokhoz, és a STORM mikroszkóppal is megoldható volt a képalkotás. Azonban ebben az esetben minden subcelluláris struktúra rengeteg jelölést tartalmaz, nem csak a sejtthártyában, de a teljes sejttérfogatban. Ezért a STORM képalkotás még megfelelő fotokémiai tulajdonságú fluorofórral is jóval hosszabb ideig tart, továbbá a sűrű térfogati jelölésnél csökken a Jel/Zaj viszony a megemelkedett háttér miatt.

A szoftveres és hardveres lehetőségeket figyelembe véve mi a STORM-ot a dekonvolvált konfokális képalkotással kombináltuk a biocitin jelölés megjelenítésére, tudomásunk szerint a világon elsőként. A többféle képalkotási modalitás korrelatív alkalmazására azonban már régóta van számszempes példa, ilyen a korrelatív fény és elektronmikroszkópia (CLEM, Correlative Light and Electron Microscopy), amit például jelölt idegsejtek közötti szinaptikus kapcsolatokat igazolására lehet használni (Begemann és Galic, 2016; Gulyás és mtsai., 1993; Veres és mtsai., 2014). A CLEM technika

segítségével ma már lehetséges akár túlélő agyszövetben idegsejtek boutonjaiból kalcium áramokat mérni 2-foton mikroszkópiával, majd ugyanezen boutonok morfológiája jellemezhető a térfogati elektronmikroszkópos rekonstrukció módszerével (Holderith és mtsai., 2012). Ezekben a módszerekben azonban nem nyílik lehetőség a szinapszisok molekuláris jellemzőinek kvantitatív vizsgálatára, vagy az időigényesség miatt nem alkalmazhatóak széles körben. A membránfehérjék eloszlásának legpontosabb mérésére alkalmas fagyasztva töréses replika jelölés elektronmikroszkópia pedig csak véletlen membránrészletek vizsgálatát teszi lehetővé, így ezen módszer korrelatív alkalmazása még várat magára (Kerti-Szigeti és Nusser, 2016; Lenkey és mtsai., 2015).

A különböző fénymikroszkópos modalitások előnye az CLEM-el szemben, hogy a minta strukturális változásával nem kell számolni (Kim és mtsai., 2015; Kopek és mtsai., 2013; Sochacki és mtsai., 2014). Az általunk kidolgozott szövetkezelési és képalkotási eljárás további nagy előnyei az elektronmikroszkópiához képest, hogy: *i*, az elektronmikroszkópiás beágyazási folyamatok műtermékeitől mentes; *ii*, egyszerűbb és gyorsabb a minta előkészítés; *iii*, több csatornás, azaz egyszerre számos molekuláris marker vizsgálható; *iv*, nagyobb érzékenységgű jelölést tesz lehetővé, *v*. sejttípus-specifikus és kompartment-fókuszált módon lehet méréseket végezni vele.

Végül szintén ki kell emelni, hogy tanulmányaink megjelenésével közel egy időben más munkacsoportok igazolták az egyedi molekula lokalizációs mikroszkópia erejét más superfelbontású mikroszkópiával kombinálva. Véleményem szerint ezek az eljárások szintén hasznos eszközök lehetnek a jövőben az élettudományok számára (Hamel és mtsai., 2014; Wegel és mtsai., 2016).

5.5. Korrelatív konfokális és egyedi molekula lokalizációs mikroszkópos képek analízise

A lokalizációs mikroszkópia abban is különbözik a többi hagyományos vagy superfelbontású képalkotástól, hogy az eredménye nem egy pixel vagy voxel alapú kép, hanem a lokalizációs koordináták listája néhány egyéb adattal kiegészítve. A lokalizációk 2D vagy 3D koordinátáinak kiszámításához a pixel alapú képekből százas nagyságrendű kereskedelmi, illetve szabad felhasználású szoftver áll rendelkezésre, amelyek nagy része

vizualizálásra is alkalmas (Sage és mtsai., 2015). Munkánk kezdetekor azonban nem állt rendelkezésre olyan program, amely együtt kezelné a pixeles modalitást a lokalizációs adatokkal, így a VividSTORM korrelatív pixel alapú (EPI, konfokális, stb.) és SMLM analízis szoftver megírása mellett döntöttünk, amelyben a következő funkciókat valósítottuk meg:

- Konfokális és SMLM adatok beolvasása és megjelenítése
- A két modalitás regisztrációja (összerendezése)
- Automatikus területkijelölés (ROI szerkesztő)
- Lokalizációs és pixelintenzitás alapú analízis eszközök
- Jól használható grafikus felület
- Nyílt, könnyen értelmezhető, fejlesztésre alkalmas forráskód
- Önmagában is futó és lehetőleg platform független alkalmazás

A megjelenítés módja és összetettsége az SMLM-ban nagy változatosságot mutat (Baddeley és mtsai., 2010). Munkánk során nagyrészt elegendő volt az egyszerű pontokkal vagy lokalizációs felbontásnak megfelelő méretű korongokkal való megjelenítés, de a későbbiekben tervezzük többféle megjelenítési mód megvalósítását.

A lokalizációs adatkészletek elemzésénél kétféle utat lehet követni. Az egyik mentén a lokalizációs adatokat valamilyen módszerrel pixeles képekké alakítjuk és a már régen jelen lévő és megfelelően kifinomult képelemzési módszereket alkalmazzuk ugyan úgy, mintha csak egy konfokális kép lenne. A pixeles képpé alakítás nem triviális folyamat és egyre újabb megoldások jelennek meg ezen a területen is (Andronov és mtsai., 2016; Levet és mtsai., 2015). A másik lehetőség, hogy megmaradva a lokalizációs pontok 3D koordinátáinál, új analízis algoritmusokat használjunk. A sejthártya modellezéséhez koordináta alapon a konvex burkoló számítását építettük a VividSTORM programba. Ez a módszer megfelelő olyan struktúrák esetében, ahol nincs, vagy kismértékű a homorú felszín aránya. Összetettebb felszínéknél érdemes lesz a makromolekulák oldószer hozzáférési felszínének számításához hasonló módszert alkalmazni (Shrake és Rupley, 1973). A biológia jelpályák sok esetben membránhoz kötöttek, így távolságok számításakor sokszor a membrán mentén számított adat fontosabb az euklideszi távolsággal szemben. A konvex burkoló felszínén lévő két lokalizáció közötti legrövidebb felszínen futó út számítására egy saját algoritmust

fejlesztettünk ki és építettünk a VividSTORM-ba. A nem konvex felszínek esetében új eljárást tervezünk implementálni, amely például alapulhat a diffúzió alapú legrövidebb felszíni út számításán. A lokalizációk csoportosulásának mérésére olyan klaszterezési algoritmus választottunk, amely értelmezi a zajt is, azaz vannak lokalizációk, melyek nem tartoznak egy klaszterbe sem. Ez fontos szempont olyan típusú jelöléseknél, mint az immunfestés, ahol szinte mindig jelen van a nem specifikus kötődésekből származó zaj. A VividSTORM-ba először a DBSCAN eljárást építettük, ami megfelel az előbbi követelményeknek (Ester és mtsai., 1996), de legújabb fejlesztéseink már egy Bayes-féle klaszteranalízist is lehetővé tesznek (Rubin-Delanchy és mtsai., 2015), amelyben nem szükséges előzetes paraméterek megadása. Véleményem szerint a lokalizációs mikroszkópiai adatok elemzése során mind a pixeles, mind pedig a lokalizáció alapú megközelítésnek helye van, és mérés típusától függ melyik módszer lesz a megfelelőbb és a jövőbeli terveim között szerepel ennek szisztematikus vizsgálata is.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Doktori munkám során a fő célom egy olyan eljárás kidolgozása volt, amely a konfokális és a STORM szuperfelbontású mikroszkópia kombinálásával lehetővé teszi a molekuláris képalkotást nanométeres tartományban sejtípus- és szubcelluláris domén-specifikus módon az idegszövetben. A klasszikus neuroanatómiai minta előkészítési és immunfestési eljárásokat optimalizáltuk szuperfelbontású mikroszkópiára, összeépítettünk egy konfokális mikroszkópot és egy STORM rendszert, valamint létrehoztunk egy új szoftvert, amely alkalmas a két mikroszkóp modalitásból származó képek együttes kezelésére. Munkánk során az alábbi következtetésekre jutottunk:

1. Sejtmentes, sejt kultúra és idegszövet preparátumokon végzett kísérleteink bizonyították, hogy a STORM szuperfelbontású mikroszkóp alkalmas a 20 nm alatti X-Y síkú és ~50 nm körüli Z irányú felbontás elérésére.
2. Kísérleteink alapján a STORM mikroszkópia alkalmas a célmolekulák mennyiségi változásainak relatív mérésére többek között térbeli változások, például receptor internalizáció nyomon követésére.
3. A korrelatív konfokális és STORM szuperfelbontású mikroszkópia lehetővé teszi a molekuláris képalkotást azonosított idegsejtekben és specifikus szubcelluláris kompartmentjeikben. Az eljárás kiterjeszhető az idegszövetről más szövettípusokra is.
4. Az általunk fejlesztett VividSTORM korrelatív konfokális és egyedi molekula lokalizációs mikroszkópiai megjelenítő és analízis program alkalmas a különböző mikroszkóp modalitások manuális és megfelelő jelölés esetén automatikus összerendezésére. Egy adott célterületen belül képes a molekuláris mennyiségek mérésére, a molekuláris távolságok meghatározására, például a sejt kompartment felszínét modellező konvex burok felszínén, molekuláris sűrűségek és klaszterezettség megállapítására, valamint internalizációs index kiszámolására.

Összességében megállapítható, hogy a STORM szuperfelbontású mikroszkópia hasznos eszköz az idegtudományok, illetve szélesebb körben az élettudományok számára, és még sok fejlesztési potenciált rejt magában.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A szinapszisok működésének molekuláris szintű feltárása nemcsak az idegrendszer kódolási folyamatainak megértéséhez járul hozzá, hanem számos neurológiai és pszichiátriai betegségben segíthet kijelölni azokat a molekuláris alkotóelemeket, amelyek terápiás célpontként szolgálhatnak a „szinaptopátiával” összefüggő idegrendszeri megbetegedésekben. Ez a feladat azonban különlegesen nehéz az idegszövet kiemelkedően összetett molekuláris és celluláris szerveződése miatt. Ráadásul a kémiai szinapszisok jelátviteli hatékonysága térben és időben dinamikusan változhat, amelynek hátterében gyakran a nanotartományban végbemenő molekuláris folyamatok állnak. Ezért elengedhetetlen olyan módszerek alkalmazása, amelyekben azonosított idegsejttípusok afferens és efferens szinapszisai célzott módon vizsgálhatóak és a szinapszisok élettani, valamint anatómiai tulajdonságai mögött álló molekuláris jelenségek feltárhatóak. Doktori munkában kidolgoztunk egy új eljárást, amely lehetővé teszi az egyedi idegsejtek élettani mérésének kombinálását olyan szövetkezelési és immunfestési módszerekkel, amelyek kompatibilisek nanoskálájú molekuláris képalkotással. Kísérleteinkben korrelatív konfokális és STORM szuperfelbontású fénymikroszkópiát alkalmaztunk, és igazoltuk, hogy a rendszer alkalmas sejttípus-specifikus molekuláris képalkotásra a nanométeres mérettartományban sejt-kultúra, idegszövet, harántcsíkolt izomszövet mintákon és vesekéreg preparátumokon. További kísérletekben igazoltuk, hogy az eljárás alkalmazható sejttípusok és szubcelluláris domének közötti relatív mennyiségi mérésekre, valamint példákat mutattunk be, hogy milyen módon lehet *in vivo* farmakológiai kezelésekkel összefüggő molekuláris mennyiségi és térbeli változásokat nyomon követni. A STORM szuperfelbontású mikroszkópia adatkészlete a molekulalokalizációk háromdimenziós koordinátája, így jelentősen különbözik a konfokális mikroszkópia pixelalapú képeitől. Ezért létrehoztuk a VividSTORM Python alapú, grafikus felületű, nyílt forráskódú programot. Ez az első szoftver, amelyben a két mikroszkópos modalitás korrelatív módon vizsgálható. Segítségével lehetővé vált a konfokális és STORM képek megjelenítése, pontos összeillesztése, biológiai profilok automatikus kijelölése, a molekuláris szintű 3D euklidészi és felszíni távolságmérés, a lokalizációs pontok klaszteranalízise, internalizáció és eloszlási sűrűség mérése.

8. SUMMARY

Molecular-level exploration of synaptic processes not only contributes to understanding coding processes of the nervous system but it can also help identify in several neurological and psychiatric diseases the molecular players, that can serve as therapeutic targets in neurological conditions related to 'synaptopathy'. However, the task is especially difficult due to the highly complex molecular and cellular nature of the nerve tissue. Moreover, the efficacy of signal transmission of chemical synapse may vary dynamically in space and time often as a result of nanoscale molecular processes. Therefore, it is imperative to apply methods in which a targeted study of afferent and efferent synapses of identified neuron types can be conducted, and the molecular processes underlying the anatomical and physiological properties of synapses can be explored. In my thesis, we have developed a new method which allows combining electrophysiological characterisation of identified nerve cells with tissue preparation and immunostaining methods which are compatible with nanoscale molecular imaging. During the experiments, we applied correlative confocal and superresolution STORM light microscopy and demonstrated that the system is suitable for cell type-specific molecular imaging in nanoscale level in cell culture, brain, heart and kidney tissue samples. Our further experiments corroborated that the method can be applied to relative quantifications between cell types and sub-cellular domains and we included examples on how to follow molecular-level spatial and quantitative changes related to in-vivo pharmacology treatments. The dataset of STORM superresolution microscopy is the 3D coordinates of localisations of molecules, making it fundamentally different from pixel-based images of confocal microscopy. Therefore, we have created the VividSTORM Python-based, open-source programme with a graphical user interface. This is the first freely available software that is able to handle the two microscopy modalities in a correlative way. It enabled the simultaneous display of confocal and STORM images, their precise registration, automatic segmentation of biological profiles (active contour), molecular-level 3D Euclidean and surface measurement of distance, clustering localization points as well as internalization and the measurement of density distribution.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Abbe, E. (1873). Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. für Mikroskopische Anat.* 9, 440–456.

Airy, G.B. (1835). On the Diffraction of an Object-glass with a Circular Aperture. *Trans. Cambridge Philos. Soc.* 5, 283–291.

Andronov, L., Orlov, I., Lutz, Y., Vonesch, J.-L., és Klaholz, B.P. (2016). ClusterViSu, a method for clustering of protein complexes by Voronoi tessellation in super-resolution microscopy. *Sci. Rep.* 6, 24084.

Astrom, K.J., és Murray, R.M. (2012). *Feedback Systems: An Introduction for Scientists and Engineers* (Princeton, New Jersey 08540: Princeton University Press).

Axelrod, D. (1981). Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J. Cell Biol.* 89, 141–145.

Azevedo, F.A.C., Carvalho, L.R.B., Grinberg, L.T., Farfel, J.M., Ferretti, R.E.L., Leite, R.E.P., Filho, W.J., Lent, R., és Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* 513, 532–541.

Babcock, H., Sigal, Y.M., és Zhuang, X. (2012). A high-density 3D localization algorithm for stochastic optical reconstruction microscopy. *Opt. Nanoscopy* 1, 6.

Baddeley, D., Cannell, M.B., és Soeller, C. (2010). Visualization of localization microscopy data. *Microsc. Microanal.* 16, 64–72.

Bálint, Š., Verdeny Vilanova, I., Sandoval Álvarez, Á., és Lakadamyali, M. (2013). Correlative live-cell and superresolution microscopy reveals cargo transport dynamics at microtubule intersections. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 3375–3380.

Barna, L., Dudok, B., Miczan, V., Horvath, A., Laszlo I. Zs., és Katoan, I. (2016). Correlated confocal and super-resolution imaging by VividSTORM. *Nat. Protoc.* 11, 163–183.

Bates, M., Huang, B., Dempsey, G.T., és Zhuang, X. (2007). Multicolor Super-Resolution

- Imaging with Photo-Switchable Fluorescent Probes. *Science* (80-.). *317*, 1749–1753.
- Bates, M., Dempsey, G.T., Chen, K.H., és Zhuang, X. (2012). Multicolor super-resolution fluorescence imaging via multi-parameter fluorophore detection. *ChemPhysChem* *13*, 99–107.
- Begemann, I., és Galic, M. (2016). Correlative light electron microscopy: Connecting synaptic structure and function. *Front. Synaptic Neurosci.* *8*, 1–12.
- Bénard, G., Massa, F., Puente, N., Lourenço, J., Bellocchio, L., Soria-Gómez, E., Matias, I., Delamarre, A., Metna-Laurent, M., Cannich, A., és mtsai. (2012). Mitochondrial CB₁ receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat. Neurosci.* *15*, 558–564.
- Betzig, E. (1995). Proposed method for molecular optical imaging. *Opt. Lett.* *20*, 237–239.
- Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J., és Hess, H.F. (2006). Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science* (80-.). *313*, 1642–1645.
- Biggs, D.S.C. (2010). 3D deconvolution microscopy. *Curr. Protoc. Cytom.* 1–20.
- Biro, A.A., Holderith, N.B., és Nusser, Z. (2006). Release Probability-Dependent Scaling of the Postsynaptic Responses at Single Hippocampal GABAergic Synapses. *J. Neurosci.* *26*, 12487–12496.
- Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M.G., Ligresti, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E.J., és mtsai. (2003). Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J. Cell Biol.* *163*, 463–468.
- Blankman, J.L., Simon, G.M., és Cravatt, B.F. (2007). A Comprehensive Profile of Brain Enzymes that Hydrolyze the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol. *Chem. Biol.* *14*, 1347–1356.
- Boult, T.E., és Wolberg, G. (1992). Correcting chromatic aberrations using image warping. *IEEE Comput. Soc. Conf. Comput. Vis. Pattern Recognit.* 684–687.

- Brede, N., és Lakadamyali, M. (2012). GraspJ: an open source, real-time analysis package for super-resolution imaging. *Opt. Nanoscopy* 1, 11.
- Campagnola, P.J., Millard, A.C., Terasaki, M., Hoppe, P.E., Malone, C.J., és Mohler, W.A. (2002). Three-Dimensional High-Resolution Second-Harmonic Generation Imaging of Endogenous Structural Proteins in Biological Tissues. *Biophys. J.* 82, 493–508.
- Cella Zancchi, F., Lavagnino, Z., Perrone Donnorso, M., Del Bue, A., Furia, L., Faretta, M., és Diaspro, A. (2011). Live-cell 3D super-resolution imaging in thick biological samples. *Nat Methods* 8, 1047–1049.
- Chen, B.-C., Legant, W.R., Wang, K., Shao, L., Milkie, D.E., Davidson, M.W., Janetopoulos, C., Wu, X.S., Hammer, J.A., Liu, Z., és mtsai. (2014). Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution. *Science* 346, 1257998.
- Chevalyere, V., Heifets, B.D., Kaeser, P.S., Südhof, T.C., Purpura, D.P., és Castillo, P.E. (2007). Endocannabinoid-Mediated Long-Term Plasticity Requires cAMP/PKA Signaling and RIM1alpha. *Neuron* 54, 801–812.
- Choquet, D., és Triller, A. (2013). The dynamic synapse. *Neuron* 80, 691–703.
- Chozinski, T.J., Gagnon, L.A., és Vaughan, J.C. (2014). Twinkle, twinkle little star: Photoswitchable fluorophores for super-resolution imaging. *FEBS Lett.* 588, 3603–3612.
- Coutts, A.A., Anavi-Goffer, S., Ross, R.A., MacEwan, D.J., Mackie, K., Pertwee, R.G., és Irving, A.J. (2001). Agonist-induced internalization and trafficking of cannabinoid CB₁ receptors in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 21, 2425–2433.
- Cox, S., Rosten, E., Monypenny, J., Jovanovic-Talisman, T., Burnette, D.T., Lippincott-Schwartz, J., Jones, G.E., és Heintzmann, R. (2011). Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics. *Nat. Methods* 9, 195–200.
- Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., és Gilula, N.B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384, 83–87.

Crocker, J.C., és Grier, D.G. (1996). Methods of Digital Video Microscopy for Colloidal Studies. *J. Colloid Interface Sci.* *179*, 298–310.

Crossman, D.J., Hou, Y., Jayasinghe, I., Baddeley, D., és Soeller, C. (2015). Combining confocal and single molecule localisation microscopy: A correlative approach to multi-scale tissue imaging. *Methods* *88*, 98–108.

Dani, A., Huang, B., Bergan, J., Dulac, C., és Zhuang, X. (2010). Superresolution Imaging of Chemical Synapses in the Brain. *Neuron* *68*, 843–856.

Dempsey, G.T., Wang, W., és Zhuang, X. (2009a). Fluorescence Imaging at Sub-Diffraction-Limit Resolution with Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. In *Handbook of Single-Molecule Biophysics*, P. Hinterdorfer, és A.M. van Oijen, szerk. (New York: Springer Science and Business Media), o. 95–127.

Dempsey, G.T., Bates, M., Kowtoniuk, W.E., Liu, D.R., Tsien, R.Y., és Zhuang, X. (2009b). Photoswitching mechanism of cyanine dyes. *J. Am. Chem. Soc.* *131*, 18192–18193.

Dempsey, G.T., Vaughan, J.C., Chen, K.H., Bates, M., és Zhuang, X. (2011). Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nat. Methods* *8*, 1027–1036.

Denek, W., Strivkler, J.H., és Webb, W.W. (1990). Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science* *248*, 73–76.

Deschout, H., Zancchi, F.C., Mlodzianoski, M., Diaspro, A., Bewersdorf, J., Hess, S.T., és Braeckmans, K. (2014). Precisely and accurately localizing single emitters in fluorescence microscopy. *Nat. Methods* *11*, 253–266.

Devane, W., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R., Stevenson, L., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A., és Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* *258*, 1946–1949.

Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., és Piomelli, D. (2002). Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 10819–10824.

Dudok, B., Barna, L., Ledri, M., Szabó, S.I., Szabadits, E., Pintér, B., Woodhams, S.G., Henstridge, C.M., Balla, G.Y., Nyilas, R., és mtsai. (2014). Cell-specific STORM super-resolution imaging reveals nanoscale organization of cannabinoid signaling. *Nat. Neurosci.* 18, 75–86.

Dudok, B., Barna, L., Ledri, M., SI, S., Szabadits, E., Pinter, B., SG, W., CM, H., GY, B., Nyilas, R., és mtsai. (2015). Cell-specific STORM super-resolution imaging reveals nanoscale organization of cannabinoid signaling. *Nat. Neurosci.* 18, 75–86.

Le Duigou, C., Simonnet, J., Teleńczuk, M.T., Fricker, D., és Miles, R. (2014). Recurrent synapses and circuits in the CA3 region of the hippocampus: an associative network. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 1–13.

Erdélyi, M., Sinkó, J., Kákonyi, R., Kelemen, A., Rees, E., Varga, D., és Szabó, G. (2015). Origin and compensation of imaging artefacts in localization-based super-resolution microscopy. *Methods* 88, 122–132.

Ester, M., Kriegel, H.-P., Sander, J., és Xu, X. (1996). Density-Based Clustering Methods. *AAAI Press* 2, 226–231.

Fatt, P., és Katz, B. (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol.* 117, 109–128.

Fölling, J., Bossi, M., Bock, H., Medda, R., Wurm, C.A., Hein, B., Jakobs, S., Eggeling, C., és Hell, S.W. (2008). Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nat. Methods* 5, 943–945.

Frank, T., Rutherford, M.A., Strenzke, N., Neef, A., Pangr??i??, T., Khimich, D., Fetjova, A., Gundelfinger, E.D., Liberman, M.C., Harke, B., és mtsai. (2010). Bassoon and the synaptic ribbon organize Ca²⁺ channels and vesicles to add release sites and promote refilling. *Neuron* 68, 724–738.

Fukaya, M., Uchigashima, M., Nomura, S., Hasegawa, Y., Kikuchi, H., és Watanabe, M. (2008). Predominant expression of phospholipase C??1 in telencephalic principal neurons and cerebellar interneurons, and its close association with related signaling molecules in somatodendritic neuronal elements. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1744–1759.

Fukudome, Y., Ohno-Shosaku, T., Matsui, M., Omori, Y., Fukaya, M., Tsubokawa, H., Taketo, M.M., Watanabe, M., Manabe, T., Kano, M., és mtsai. (2004). Two distinct classes of muscarinic action on hippocampal inhibitory synapses : M₂-mediated direct suppression and M₁ / M₃-mediated indirect suppression through endocannabinoid signalling. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 2682–2692.

Gaoni, Y., és Mechoulam, R. (1964). Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* *86*, 1646–1647.

Gelles, J., Schnapp, B.J., és Sheetz, M.P. (1988). Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision. *Nature* *331*, 450–453.

Glebov, O.O., Jackson, R.E., Winterflood, C.M., Owen, D.M., Barker, E.A., Doherty, P., Ewers, H., és Burrone, J. (2017). Nanoscale Structural Plasticity of the Active Zone Matrix Modulates Presynaptic Function. *Cell Rep.* *18*, 2715–2728.

Gulyás, A. I., Miles, R., Sík, A., Tóth, K., Tamamaki, N., és Freund, T.F. (1993). Hippocampal pyramidal cells excite inhibitory neurons through a single release site. *Nature* *366*, 683–687.

Gustafsson, M.G.L. (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* *198*, 82–87.

Gustafsson, M.G.L. (2005). Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 13081–13086.

Gustafsson, M.G.L., Agard, D. a, és Sedat, J.W. (1995). Sevenfold improvement of axial resolution in 3D wide-field microscopy using two objective lenses. *Proc. SPIE* *2412*, 147–156.

Hamel, V., Guichard, P., Fournier, M., Guiet, R., Flückiger, I., Seitz, A., és Gönczy, P. (2014). Correlative multicolor 3D SIM and STORM microscopy. *Biomed. Opt. Express* *5*, 3326.

Hashimotodani, Y., Ohno-Shosaku, T., Tsubokawa, H., Ogata, H., Emoto, K., Maejima, T., Araishi, K., Shin, H.S., és Kano, M. (2005). Phospholipase C β serves as a

coincidence detector through its Ca²⁺ dependency for triggering retrograde endocannabinoid signal. *Neuron* 45, 257–268.

Hedde, P.N., Fuchs, J., Oswald, F., Wiedenmann, J., és Nienhaus, G.U. (2009). Online image analysis software for photoactivation localization microscopy. *Nat. Methods* 6, 689–690.

Heilemann, M., Van De Linde, S., Schüttpelz, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P., és Sauer, M. (2008). Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 47, 6172–6176.

Hein, B., Willig, K.I., és Hell, S.W. (2008). Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 14271–14276.

Heintzmann, R., Jovin, T.M., és Cremer, C. (2002). Saturated patterned excitation microscopy—a concept for optical resolution improvement. *J. Opt. Soc. Am. A* 19, 1599.

Hell, S., és Stelzer, E.H.K. (1992). Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope. *J. Opt. Soc. Am. A* 9, 2159.

Hell, S.W., és Wichmann, J. (1994). Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy. *Opt. Lett.* 19, 780–782.

Henriques, R., Lelek, M., Fornasiero, E.F., Valtorta, F., Zimmer, C., és Mhlanga, M.M. (2010). QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ. *Nat. Methods* 7, 339–340.

Herkenham, M., Lynn, A.B., Litrle, M.D., Johnstont, M.R., Melvin, L.S., De Costa, B.R., és Riceo, K.C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Neurobiology* 87, 1932–1936.

Herlitze, S., Garcia, D.E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T., és Catterall, W.A. (1996). Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380, 258–262.

Hess, S.T., Girirajan, T.P.K., és Mason, M.D. (2006). Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophys. J.* 91, 4258–4272.

- Holden, S.J., Uphoff, S., és Kapanidis, A.N. (2011). DAOSTORM: an algorithm for high-density super-resolution microscopy. *Nat. Methods* 8, 279–280.
- Holderith, N., Lorincz, A., Katona, G., Rózsa, B., Kulik, A., Watanabe, M., és Nusser, Z. (2012). Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nat. Neurosci.* 15, 988–997.
- Hooke, R. (1664). *Micrographia: or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies, Made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries Thereupon*. R. Soc. London (John Martyn, James Allestry) 1–178.
- Hsieh, C., Brown, S., Derleth, C., és Mackie, K. (1999). Internalization and recycling of the CB₁ cannabinoid receptor. *J. Neurochem.* 73, 493–501.
- Huang, B., Wang, W., Bates, M., és Zhuang, X. (2008). Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. *Science*. 319, 810–813.
- Huang, F., Hartwich, T.M.P., Rivera-Molina, F.E., Lin, Y., Duim, W.C., Long, J.J., Uchil, P.D., Myers, J.R., Baird, M.A., Mothes, W., és mtsai. (2013). Video-rate nanoscopy using sCMOS camera–specific single-molecule localization algorithms. *Nat. Methods* 10, 653–658.
- Humphrey, W., Dalke, A., és Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33–38.
- Jones, S.A., Shim, S.-H., He, J., és Zhuang, X. (2011). Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. *Nat. Methods* 8, 499–505.
- Juette, M.F., Gould, T.J., Lessard, M.D., Mlodzianoski, M.J., Nagpure, B.S., Bennett, B.T., Hess, S.T., és Bewersdorf, J. (2008). Three-dimensional sub–100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples. *Nat. Methods* 5, 527–529.
- Jung, K.-M., Sepers, M., Henstridge, C.M., Lassalle, O., Neuhofer, D., Martin, H., Ginger, M., Frick, A., DiPatrizio, N. V, Mackie, K., és mtsai. (2012). Uncoupling of the endocannabinoid signalling complex in a mouse model of fragile X syndrome. *Nat. Commun.* 3, 1080.

- Kao, H.P., és Verkman, A.S. (1994). Tracking of Single Fluorescent Particles. *67*.
- Katona, I. (2006). Molecular Composition of the Endocannabinoid System at Glutamatergic Synapses. *J. Neurosci.* *26*, 5628–5637.
- Katona, I., és Freund, T.F. (2008). Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat. Med.* *14*, 923–930.
- Katona, I., és Freund, T.F. (2012). Multiple Functions of Endocannabinoid Signaling in the Brain. *Annu. Rev. Neurosci.* *35*, 529–558.
- Katona, I., Sperlág, B., Sík, A., Käfalvi, A., Vizi, E.S., Mackie, K., és Freund, T.F. (1999). Presynaptically located CB₁ cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* *19*, 4544–4558.
- Kellermayer, M.S.Z. (2005). Visualizing and manipulating individual protein molecules. *Physiol. Meas.* *26*, R119–R153.
- Kerti-Szigeti, K., és Nusser, Z. (2016). Similar GABA_A receptor subunit composition in somatic and axon initial segment synapses of hippocampal pyramidal cells. *Elife* *5*, 1–23.
- Kim, D., Jun, K.S., Lee, S.B., Kang, N.G., Min, D.S., Kim, Y.H., Ryu, S.H., Suh, P.G., és Shin, H.S. (1997). Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature* *389*, 290–293.
- Kim, D., Deerinck, T.J., Sigal, Y.M., Babcock, H.P., Ellisman, M.H., és Zhuang, X. (2015). Correlative stochastic optical reconstruction microscopy and electron microscopy. *PLoS One* *10*, 1–20.
- Klar, T.A., és Hell, S.W. (1999). Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* *24*, 954.
- Kner, P., Chhun, B.B., Griffis, E.R., Winoto, L., és Gustafsson, M.G.L. (2009). Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination. *Nat. Methods* *6*, 339–342.
- Kopek, B.G., Shtengel, G., Grimm, J.B., Clayton, D.A., és Hess, H.F. (2013). Correlative

Photoactivated Localization and Scanning Electron Microscopy. *PLoS One* 8.

Kreitzer, A.C., és Regehr, W.G. (2001). Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron* 29, 717–727.

Lakadamyali, M., Babcock, H., Bates, M., Zhuang, X., és Lichtman, J. (2012). 3D multicolor super-resolution imaging offers improved accuracy in neuron tracing. *PLoS One* 7.

Lambert, T.J., és Waters, J.C. (2017). Navigating challenges in the application of superresolution microscopy. *J. Cell Biol.* 216, 53–63.

Lampe, A., Haucke, V., Sigrist, S.J., Heilemann, M., és Schmoranzler, J. (2012). Multi-colour direct STORM with red emitting carbocyanines. *Biol. Cell* 104, 229–237.

Lee, S.-H., Foldy, C., és Soltesz, I. (2010). Distinct Endocannabinoid Control of GABA Release at Perisomatic and Dendritic Synapses in the Hippocampus. *J. Neurosci.* 30, 7993–8000.

Lenkey, N., Kirizs, T., Holderith, N., Máté, Z., Szabó, G., Vizi, E.S., Hájos, N., és Nusser, Z. (2015). Tonic endocannabinoid-mediated modulation of GABA release is independent of the CB₁ content of axon terminals. *Nat. Commun.* 6, 6557.

Levet, F., Hosy, E., Kechkar, A., Butler, C., Beghin, A., Choquet, D., és Sibarita, J.-B. (2015). SR-Tesseler: a method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data. *Nat. Methods* 12, 1065–1071.

van de Linde, S., Krstić, I., Prisner, T., Doose, S., Heilemann, M., és Sauer, M. (2011). Photoinduced formation of reversible dye radicals and their impact on super-resolution imaging. *Photochem. Photobiol. Sci.* 10, 499–506.

Loschberger, A., van de Linde, S., Dabauvalle, M.-C., Rieger, B., Heilemann, M., Krohne, G., és Sauer, M. (2012). Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution. *J. Cell Sci.* 125, 570–575.

- Löschberger, A., Franke, C., Krohne, G., van de Linde, S., és Sauer, M. (2014). Correlative super-resolution fluorescence and electron microscopy of the nuclear pore complex with molecular resolution. *J. Cell Sci.* *127*, 4351–4355.
- Ludanyi, A., Eross, L., Czirjak, S., Vajda, J., Halasz, P., Watanabe, M., Palkovits, M., Magloczky, Z., Freund, T.F., és Katona, I. (2008). Downregulation of the CB₁ Cannabinoid Receptor and Related Molecular Elements of the Endocannabinoid System in Epileptic Human Hippocampus. *J. Neurosci.* *28*, 2976–2990.
- Luján, R., Nusser, Z., Roberts, J.D.B., Shigemoto, R., és Somogyi, P. (1996). Perisynaptic Location of Metabotropic Glutamate Receptors mGluR1 and mGluR5 on Dendrites and Dendritic Spines in the Rat Hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* *8*, 1488–1500.
- Maccarrone, M. (2017). Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years. *Front. Mol. Neurosci.* *10*, 166.
- MacGillavry, H.D., Song, Y., Raghavachari, S., és Blanpied, T.A. (2013). Nanoscale scaffolding domains within the postsynaptic density concentrate synaptic ampa receptors. *Neuron* *78*, 615–622.
- Maglione, M., és Sigrist, S.J. (2013). Seeing the forest tree by tree: super-resolution light microscopy meets the neurosciences. *Nat. Neurosci.* *16*, 790–797.
- Marquez-Neila, P., Baumela, L., és Alvarez, L. (2014). A morphological approach to curvature-based evolution of curves and surfaces. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* *36*, 2–17.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., és Bonner, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* *346*, 561–564.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., és mtsai. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* *50*, 83–90.
- Micheva, K.D., és Smith, S.J. (2007). Array Tomography: A New Tool for Imaging the

- Molecular Architecture and Ultrastructure of Neural Circuits. *Neuron* 55, 25–36.
- Mikhaylova, M., Cloin, B.M.C., Finan, K., van den Berg, R., Teeuw, J., Kijanka, M.M., Sokolowski, M., Katrukha, E. a, Maidorn, M., Opazo, F., és mtsai. (2015). Resolving bundled microtubules using anti-tubulin nanobodies. *Nat. Commun.* 6, 7933.
- Mitrophanov, A.Y., és Groisman, E.A. (2008). Positive feedback in cellular control systems. *BioEssays* 30, 542–555.
- Monory, K., Massa, F., Egertová, M., Eder, M., Blaudzun, H., Westenbroek, R., Kelsch, W., Jacob, W., Marsch, R., Ekker, M., és mtsai. (2006). The Endocannabinoid System Controls Key Epileptogenic Circuits in the Hippocampus. *Neuron* 51, 455–466.
- Moore, C.A.C., Milano, S.K., és Benovic, J.L. (2007). Regulation of Receptor Trafficking by GRKs and Arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 451–482.
- Muller, C., és Remy, S. (2014). Dendritic inhibition mediated by O-LM and bistratified interneurons in the hippocampus. *Front. Synaptic Neurosci.* 6, 1–15.
- Murataeva, N., Straiker, A., és MacKie, K. (2014). Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *Br. J. Pharmacol.* 171, 1379–1391.
- Nair, D., Hossy, E., Petersen, J.D., Constals, A., Giannone, G., Choquet, D., és Sibarita, J.-B. (2013). Super-Resolution Imaging Reveals That AMPA Receptors Inside Synapses Are Dynamically Organized in Nanodomains Regulated by PSD95. *J. Neurosci.* 33, 13204–13224.
- Nishimune, H., Numata, T., Chen, J., Aoki, Y., Wang, Y., Starr, M.P., Mori, Y., és Stanford, J.A. (2012). Active zone protein Bassoon co-localizes with presynaptic calcium channel, modifies channel function, and recovers from aging related loss by exercise. *PLoS One* 7, 1–10.
- Ober, R.J., Ram, S., és Ward, E.S. (2004). Localization Accuracy in Single-Molecule Microscopy. *Biophys. J.* 86, 1185–1200.
- Ohno-Shosaku, T., és Kano, M. (2014). Endocannabinoid-mediated retrograde

modulation of synaptic transmission. *Curr. Opin. Neurobiol.* *29*, 1–898.

Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., és Kano, M. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron* *29*, 729–738.

Palay, S.L. (1956). SYNAPSES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *J. Cell Biol.* *2*, 193–202.

Pan, B., Wang, W., Zhong, P., Blankman, J.L., Cravatt, B.F., és Liu, Q. -s. (2011). Alterations of Endocannabinoid Signaling, Synaptic Plasticity, Learning, and Memory in Monoacylglycerol Lipase Knock-out Mice. *J. Neurosci.* *31*, 13420–13430.

Parthasarathy, R. (2012). Rapid, accurate particle tracking by calculation of radial symmetry centers. *Nat. Methods* *9*, 724–726.

Pavani, S.R.P., és Piestun, R. (2008). Three dimensional tracking of fluorescent microparticles using a photon-limited double-helix response system. *Opt. Express* *16*, 22048–22057.

Pennacchietti, F., Vascon, S., Nieuw, T., Rosillo, C., Das, S., Tyagarajan, S.K., Diaspro, A., Del Bue, A., Petrini, E.M., Barberis, A., és mtsai. (2017). Nanoscale Molecular Reorganization of the Inhibitory Postsynaptic Density Is a Determinant of GABAergic Synaptic Potentiation. *J. Neurosci.* *37*, 1747–1756.

Poulin, J.-F., Tasic, B., Hjerling-Leffler, J., Trimarchi, J.M., és Awatramani, R. (2016). Disentangling neural cell diversity using single-cell transcriptomics. *Nat. Neurosci.* *19*, 1131–1141.

Quan, T., Zhu, H., Liu, X., Liu, Y., Ding, J., Zeng, S., és Huang, Z.-L. (2011). High-density localization of active molecules using Structured Sparse Model and Bayesian Information Criterion. *Opt. Express* *19*, 16963.

Regehr, W.G., Carey, M.R., és Best, A.R. (2009). Activity-Dependent Regulation of Synapses by Retrograde Messengers. *Neuron* *63*, 154–170.

Ribrault, C., Sekimoto, K., és Triller, A. (2011). From the stochasticity of molecular

processes to the variability of synaptic transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 375–387.

Richter, K., Langnaese, K., Kreutz, M.R., Olias, G., Zhai, R., Scheich, H., Garner, C.C., és Gundelfinger, E.D. (1999). Presynaptic cytomatrix protein bassoon is localized at both excitatory and inhibitory synapses of rat brain. *J. Comp. Neurol.* *408*, 437–448.

Ries, J., Kaplan, C., Platonova, E., Eghlidi, H., és Ewers, H. (2012). A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nat. Methods* *9*, 582–584.

De Robertis, E.D.P., és Bennett, H.S. (1955). Some Features of the Submicroscopic Morphology of Synapses in Frog and Earthworm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *1*, 47–58.

Rozenfeld, R., és Devi, L.A. (2008). Regulation of CB₁ cannabinoid receptor trafficking by the adaptor protein AP-3. *Faseb J* *22*, 2311–2322.

Rubin-Delanchy, P., Burn, G.L., Griffié, J., Williamson, D.J., Heard, N.A., Cope, A.P., és Owen, D.M. (2015). Bayesian cluster identification in single-molecule localization microscopy data. *Nat. Methods* *12*, 1072–1076.

Ruska, E. (1987). Nobel lecture. The development of the electron microscope and of electron microscopy. *Rev. Mod. Phys.* *59*, 627–638.

Rust, M.J., Bates, M., és Zhuang, X. (2006). Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* *3*, 793–796.

Sage, D., Kirshner, H., Pengo, T., Stuurman, N., Min, J., Manley, S., és Unser, M. (2015). Quantitative evaluation of software packages for single-molecule localization microscopy. *Nat. Methods* *12*, 717–724.

Saper, C.B., és Sawchenko, P.E. (2003). Magic peptides, magic antibodies: Guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.* *465*, 161–163.

Schaefer, L.H., Schuster, D., és Herz, H. (2001). Accelerated maximum likelihood based image restoration applied to three-dimensional fluorescence microscopy: a generalized approach. *Focus Microsc.* *204*, 99–107.

Schindelin, J., Rueden, C.T., Hiner, M.C., és Eliceiri, K.W. (2015). The ImageJ

ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol. Reprod. Dev.* *82*, 518–529.

Schröter, M., Paulsen, O., és Bullmore, E.T. (2017). Micro-connectomics: probing the organization of neuronal networks at the cellular scale. *Nat. Rev. Neurosci.* *18*, 131–146.

Shannon, C.E. (1949). Communication in the presence of noise (Revised). *Proc. IEEE* *86*, 447–457.

Shim, S.-H., Xia, C., Zhong, G., Babcock, H.P., Vaughan, J.C., Huang, B., Wang, X., Xu, C., Bi, G.-Q., és Zhuang, X. (2012). Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 13978–13983.

Shrake, A., és Rupley, J.A. (1973). Environment and exposure to solvent of protein atoms. Lysozyme and insulin. *J. Mol. Biol.* *79*, 361–371.

Shtengel, G., Galbraith, J.A., Galbraith, C.G., Lippincott-Schwartz, J., Gillette, J.M., Manley, S., Sougrat, R., Waterman, C.M., Kanchanawong, P., Davidson, M.W., és mtsai. (2009). Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 3125–3130.

Sigal, Y.M., Speer, C.M., Babcock, H.P., és Zhuang, X. (2015). Mapping Synaptic Input Fields of Neurons with Super-Resolution Imaging. *Cell* *163*, 493–505.

Sochacki, K.A., Shtengel, G., van Engelenburg, S.B., Hess, H.F., és Taraska, J.W. (2014). Correlative super-resolution fluorescence and metal-replica transmission electron microscopy. *Nat. Methods* *11*, 305–308.

Specht, C., Izeddin, I., Rodriguez, P., ElBeheiry, M., Rostaing, P., Darzacq, X., Dahan, M., és Triller, A. (2013). Quantitative nanoscopy of inhibitory synapses: Counting gephyrin molecules and receptor binding sites. *Neuron* *79*, 308–321.

Stallinga, S., és Rieger, B. (2010). Accuracy of the Gaussian Point Spread Function model in 2D localization microscopy. *Opt. Express* *18*, 24461.

Stella, N., Schweitzer, P., és Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that

modulates long-term potentiation. *Nature* 388, 773–778.

Sugaya, Y., Yamazaki, M., Uchigashima, M., Kobayashi, K., Watanabe, M., Sakimura, K., és Kano, M. (2016). Crucial Roles of the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol in the Suppression of Epileptic Seizures. *Cell Rep.* 16, 1405–1415.

Sydor, A.M., Czymmek, K.J., Puchner, E.M., és Mennella, V. (2015). Super-Resolution Microscopy: From Single Molecules to Supramolecular Assemblies. *Trends Cell Biol.* 25, 730–748.

Szymborska, A., de Marco, A., Daigle, N., Cordes, V.C., Briggs, J.A.G., és Ellenberg, J. (2013). Nuclear Pore Scaffold Structure Analyzed by Super-Resolution Microscopy and Particle Averaging. *Science* (80-.). 341, 655–658.

Tam, J., Cordier, G.A., Borbely, J.S., Álvarez, Á.S., és Lakadamyali, M. (2014). Cross-talk-free multi-color storm imaging using a single fluorophore. *PLoS One* 9.

Tanaka, J., Nakagawa, S., Kushiya, E., Yamasaki, M., Fukaya, M., Iwanaga, T., Simon, M.I., Sakimura, K., Kano, M., és Watanabe, M. (2000). Gq protein alpha subunits Galphaq and Galpha11 are localized at postsynaptic extra-junctional membrane of cerebellar Purkinje cells and hippocampal pyramidal cells. *Eur. J. Neurosci.* 12, 781–792.

Tang, A.-H., Chen, H., Li, T.P., Metzbower, S.R., MacGillavry, H.D., és Blanpied, T.A. (2016). A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors. *Nature* 536, 210–214.

Tang, Y., Dai, L., Zhang, X., Li, J., Hendriks, J., Fan, X., Gruteser, N., Meisenberg, A., Baumann, A., Katranidis, A., és mtsai. (2015). SNSMIL, a real-time single molecule identification and localization algorithm for super-resolution fluorescence microscopy. *Sci. Rep.* 5, 11073.

Tanimura, A., Yamazaki, M., Hashimoto, Y., Uchigashima, M., Kawata, S., Abe, M., Kita, Y., Hashimoto, K., Shimizu, T., Watanabe, M., és mtsai. (2010). The Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol Produced by Diacylglycerol Lipase α Mediates Retrograde Suppression of Synaptic Transmission. *Neuron* 65, 320–327.

Tappe-Theodor, A., Agarwal, N., Katona, I., Rubino, T., Martini, L., Swiercz, J., Mackie,

- K., Monyer, H., Parolaro, D., Whistler, J., és mtsai. (2007). A Molecular Basis of Analgesic Tolerance to Cannabinoids. *J. Neurosci.* 27, 4165–4177.
- Thevenaz, P., Ruttimann, U.E., és Unser, M. (1998). A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans. Image Process.* 7, 27–41.
- Thompson, R.E., Larson, D.R., és Webb, W.W. (2002). Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes. *Biophys. J.* 82, 2775–2783.
- Tokunaga, M., Imamoto, N., és Sakata-Sogawa, K. (2008). Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *5*, 159–161.
- Tom Dieck, S., Sanmartí-Vila, L., Langnaese, K., Richter, K., Kindler, S., Soyke, A., Wex, H., Smalla, K.H., Kämpf, U., Fränzer, J.T., és mtsai. (1998). Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *J. Cell Biol.* 142, 499–509.
- Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B., és Nägerl, U.V. (2014). Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nat. Neurosci.* 17, 678–685.
- Ulbrich, M.H., és Isacoff, E.Y. (2007). Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat. Methods* 4, 319–321.
- Vangindertael, J., Beets, I., Rocha, S., Dedecker, P., Schoofs, L., Vanhoorelbeke, K., Vanhoorelbeeke, K., Hofkens, J., és Mizuno, H. (2015). Super-resolution mapping of glutamate receptors in *C. elegans* by confocal correlated PALM. *Sci. Rep.* 5, 13532.
- Veatch, S.L., Machta, B.B., Shelby, S.A., Chiang, E.N., Holowka, D.A., és Baird, B.A. (2012). Correlation functions quantify super-resolution images and estimate apparent clustering due to over-counting. *PLoS One* 7.
- Veres, J.M., Nagy, G.A., Vereczki, V.K., András, T., és Hájos, N. (2014). Strategically Positioned Inhibitory Synapses of Axo-axonic Cells Potently Control Principal Neuron Spiking in the Basolateral Amygdala. *J. Neurosci.* 34, 16194–16206.
- Vicidomini, G., Moneron, G., Han, K.Y., Westphal, V., Ta, H., Reuss, M., Engelhardt, J., Eggeling, C., és Hell, S.W. (2011). Sharper low-power STED nanoscopy by time

gating. *Nat. Methods* 8, 571–573.

Vogelsang, J., Kasper, R., Steinhauer, C., Person, B., Heilemann, M., Sauer, M., és Tinnefeld, P. (2008). A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 47, 5465–5469.

Wegel, E., Göhler, A., Lagerholm, B.C., Wainman, A., Uphoff, S., Kaufmann, R., és Dobbie, I.M. (2016). Imaging cellular structures in super-resolution with SIM, STED and Localisation Microscopy: A practical comparison. *Sci. Rep.* 6, 27290.

Westphal, V., és Hell, S.W. (2005). Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope. *Phys. Rev. Lett.* 94, 1–4.

Wettschureck, N., van der Stelt, M., Tsubokawa, H., Krestel, H., Moers, A., Petrosino, S., Schutz, G., Di Marzo, V., és Offermanns, S. (2006). Forebrain-Specific Inactivation of Gq/G11 Family G Proteins Results in Age-Dependent Epilepsy and Impaired Endocannabinoid Formation. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5888–5894.

White, J.G., Southgate, J.N., és Thomson, J.N. (1986). The structure of the nervous system of the nemathode *Caenorabditis elegans*. *Phil. Trans. R. Soc.* 314, 1–340.

Wilson, T. (2011). Resolution and optical sectioning in the confocal microscope. *J. Microsc.* 244, 113–121.

Wilson, R.I., és Nicoll, R.A. (2001). Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410, 588–592.

Xu, J., Chang, J., Yan, Q., Dertinger, T., Bruchez, M.P., és Weiss, S. (2013a). Labeling cytosolic targets in live cells with blinking probes. *J. Phys. Chem. Lett.* 4, 2138–2146.

Xu, J., H, M., és Liu, Y. (2017). Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). *Curr Protoc Cytom* 81, 1–27.

Xu, K., Zhong, G., és Zhuang, X. (2013b). Actin, Spectrin, and Associated Proteins Form a Periodic Cytoskeletal Structure in Axons. *Science* (80-.). 339, 452–456.

Zhang, Z., Kenny, S.J., Hauser, M., Li, W., és Xu, K. (2015). Ultrahigh-throughput single-molecule spectroscopy and spectrally resolved super-resolution microscopy. *Nat.*

Methods 12, 935–938.

Zimmer, a M., Hohmann, a G., Herkenham, M., és Bonner, T.I. (1999). Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB₁ receptor knockout mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 5780–5785.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témáját adó saját közlemények:

Barna, L., Dudok, B., Miczan, V., Horvath, A., Laszlo, I. Zs., és Katona, I. (2016). Correlated confocal and super-resolution imaging by VividSTORM. *Nat. Protoc.* *11*, 163–183.

Dudok, B., Barna, L., Ledri, M., Szabó, S.I., Szabadits, E., Pintér, B., Woodhams, S.G., Henstridge, C.M., Balla, G.Y., Nyilas, R., Varga C, Lee SH, Matolcsi M, Cervenak J, Kacs Kovics I, Watanabe M, Sagheddu C, Melis M, Pistis M, Soltesz I, Katona I. (2014). Cell-specific STORM super-resolution imaging reveals nanoscale organization of cannabinoid signaling. *Nat. Neurosci.* *18*, 75–86.

Az értekezés témájától független közlemények:

Dormán, G., Cseh, S., Hajdú, I., Barna, L., Kónya, D., Kupai, K., Kovács, L., és Ferdinandy, P. (2010). Matrix metalloproteinase inhibitors. *Drugs* *70*, 949–964.

Flachner, B., Varga, A., Szabó, J., Barna, L., Hajdú, I., Gyimesi, G., Závodszy, P., és Vas, M. (2005). Substrate-assisted movement of the catalytic Lys 215 during domain closure: Site-directed mutagenesis studies of human 3-phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* *44*, 16853–16865.

Fülöp, K., Barna, L., Symmons, O., Závodszy, P., és Váradi, A. (2009). Clustering of disease-causing mutations on the domain-domain interfaces of ABCC6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *379*, 706–709.

Gál, P., Harmat, V., Kocsis, A., Tunde, B., Barna, L., Ambrus, G., Végh, B., Balczer, J., Sim, R.B., Náray-Szabó, G., és mtsai. (2005). A true autoactivating enzyme - Structural insight into mannose-binding lectin-associated serine protease-2 activations. *J. Biol. Chem.* *280*, 33435–33444.

Gál, P., Barna, L., Kocsis, A., és Závodszy, P. (2007). Serine proteases of the classical and lectin pathways: Similarities and differences. *Immunobiology* *212*, 267–277.

Kallo, I., Mohacsik, P., Vida, B., Zeold, A., Bardoczi, Z., AM, Z., Farkas, E., Kadar, A., Hrabovszky, E., R, A. e D., és mtsai. (2012). A Novel Pathway Regulates Thyroid Hormone Availability in Rat and Human Hypothalamic Neurosecretory Neurons. *PLoS One* 7.

Kamondi, S., Szilágyi, A., Barna, L., és Závodszy, P. (2008). Engineering the thermostability of a TIM-barrel enzyme by rational family shuffling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 725–730.

NG, T., Romero, R., Meiri, H., Erez, O., Xu, Y., Tarquini, F., Barna, L., Szilágyi, A., Ackerman, R., Sammar, M., és mtsai. (2011). PP13, maternal ABO blood groups and the risk assessment of pregnancy complications. *PLoS One* 6.

Papp, A., Szommer, T., Barna, L., Gyimesi, G., Ferdinandy, P., Spadoni, C., Darvas, F., Fujita, T., Űrge, L., és Dorman, G. (2007). Enhanced hit-to-lead process using bioanalogous lead evolution and chemogenomics: application in designing selective matrix metalloprotease inhibitors. *Expert Opin. Drug Discov.* 2, 707–723.

SH, L., Ledri, M., Toth, B., Marchionni, I., CM, H., Dudok, B., Kenesei, K., Barna, L., SI, S., Renkecz, T., és mtsai. (2015). Multiple Forms of Endocannabinoid and Endovanilloid Signaling Regulate the Tonic Control of GABA Release. *J. Neurosci.* 35, 10039–10057.

Tomori, T., Hajdu, I., Barna, L., Lorincz, Z., Cseh, S., és Dorman, G. (2012). Combining 2D and 3D in silico methods for rapid selection of potential PDE5 inhibitors from multimillion compounds' repositories: biological evaluation. *Mol. Divers.* 16, 59–72

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A legnagyobb köszönettel tartozom témavezetőmnek és barátomnak, Katona Istvánnak, akinek hatására fordult szakmai életem a mikroszkópia irányába. Töretlenül lelkes megismerés vágya az idegtudományok terén csodálatra méltó, tanítómesteri képességeit pedig sok tudományosan sikeres 'padavanja' ismeri el. Motivációja és támogatása nélkül munkám biztosan nem készülhetett volna el. Lelkiismeretessége mind a tudomány, mind pedig az élet többi területén is mértékadó és követendő. Közös útjaink során nem csak a legkiválóbb előadókat hallgathattuk vagy a legújabb eredményeket bemutató posztereket láthattuk, de a még oly ritka és kicsiny tengermelléki verebet is megfigyelhettük.

Hasonlóan nagy köszönettel tartozom Dudok Barnának, akitől a mikroszkópia biológiai alkalmazásainak alapjait tanulhattam meg. Az idegtudományok területén szerzett tudásom jelentős részét is Neki köszönhetem. Utazásaink során mindig nagy segítség volt széles gasztronómiai ismerete és tőle ismerhettem meg a LIIT indukálta pezsgő jókedv biológiai jelenségét is. Mint kollegámnak és igaz barátomnak sok sikert kívánok a tengerentúli megmérettetéshez is.

A KOKI közösségének és benne kiemelten a Molekuláris Neurobiológiai Kutatócsoport tagjainak szintén köszönettel tartozom a mindig magas színvonalú szakmai támogatásért és a kiváló, baráti hangulatban töltött munkahelyi éveikért. Matolcsi Máténak köszönöm a matematikai konzultációkat, Miczán Viviennek, Horváth Andrásnak és Tímár Bandesznek pedig a programozásban nyújtott értékes segítséget. Szabadics Jánosnak és Brunner Jánosnak itt szeretnem megköszönni, hogy nagy türelemmel tágitották ismereteimet az elektrofiziológia és a képalkotás terén. Kun Andrástól és Stamm Attilától szintén sokat tanultam a mikroszkópiáról, köszönöm nekik az állandó rendelkezésre állást és professzionális szervizmunkát.

Nagy öröm számomra, hogy ezen a helyen írásban is megköszönhetem az egész családomnak a támogatást, Szüleimnek különösen azt, hogy biztos családi háttér mellett lehetővé tették tanulmányaimat, így ezt a munkát Nekik ajánlom. Benedek fiamnak köszönöm a türelmét és biztatását továbbá munkám tevőleges segítségét a sok pipettahegy töltéssel.