

Molekuláris képalkotás korrelatív konfokális és STORM szuperfelbontású mikroszkópia segítségével

Doktori tézisek

Barna László

Semmelweis Egyetem
Szentágotthai János Idegtudományi Doktori Iskola



Konzulens:	Dr. Katona István, MTA doktora, tudományos tanácsadó
Hivatalos bírálók:	Dr. Ábrahám István, MTA doktora, egyetemi tanár Dr. Schay Gusztáv, PhD, tudományos munkatárs
Szigorlati bizottság elnöke:	Dr. Réthelyi Miklós, az orvostudomány doktora, ny. egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:	Dr. Kittel Ágnes, MTA doktora, tudományos tanácsadó Dr. Osváth Szabolcs, PhD, tudományos főmunkatárs

Budapest

2017

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. Az emberi agy körülbelül 86 milliárd neuronja, amelyek feltehetően több száz vagy akár ezernél is több eltérő típusba sorolhatóak körülbelül $1.5 \cdot 10^{14}$ 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.

A szinapszisban lejátszódó molekuláris szintű folyamatok megértése ezért nélkülözhetetlen a bonyolultabb idegrendszeri jelenségek magyarázatához. Ezen folyamatok vizsgálatát megnehezítik a szinapszisok nagy száma és mérettartománya. A szinaptikus rés, azaz a két idegsejt sejthártyája közötti távolság például átlagosan mindössze 20 nm; a klasszikus aminosav ingerület átvivőket tartalmazó szinaptikus hólyagocska átmérője mindössze 35 nm; a preszinaptikus aktív zóna hosszúsága pedig 300 nm.

A kémiai szinapszisok egészséges és kóros működésének tanulmányozásához tehát olyan módszerekre van szükség, amelyekkel lehetővé válik az egyedi szinapszisokban egy adott jelpályában kulcsszerepet játszó molekuláris alkotóelem térbeli eloszlásának és mennyiségének nanométeres tartományokban történő mérése agyszövetben.

Ezért doktori munkám során egy olyan módszertani eljárást dolgoztam ki kollégáimmal együttműködésben, amelyben az idegéletani mérések és az egyedi idegsejtek anatómiai vizsgálat célzatú szelektív jelölése 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 fénymikroszkópia felbontásának fényelhajlás miatti korlátozottságának teljes matematikai leírását Ernst Abbe adta meg 1873-ban. A felbontás:

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

ahol (n) a törésmutató, (α) a fókuszált fénykúp szöge, (NA) a numerikus apertúra ($NA = n * \sin \alpha$). 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. Ez azt jelenti, hogy két pontszerű forrás mikroszkópos képe nem különíthető el, ha 200nm-nél közelebb vannak egymástól. A PSF (Pontátviteli Függvény) egy háromdimenziós függvény, amelyre jellemző, hogy az axiális kiterjedése nagyobb a laterálisnál, így ebben az irányban a képalkotás alacsonyabb felbontású (~500nm). 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.

A kvantummechanika fejlődésével új lehetőség kínálkozott a hullámhossz csökkentésére, az anyag részecske-hullám kettőstermészetének felfedezése révén. Ernst Ruska, 1933-ban bemutatta az első működő elektronmikroszkópot, ahol a képalkotást a fény helyett megfelelő energiára gyorsított elektronok nyalábja biztosítja. Ezzel a módszerrel biológiai mintákon elérhető az 1nm körüli felbontás.

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

1.2. Szuperfelbontású fénymikroszkópia

A kétezres években megjelent három olyan teljesen más elven működő fénymikroszkópos megoldás, amely felbontása jelentősen meghaladta a fényelhajlás okozta korlátokat: 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 a PALM-ért rendre Stefan Hell és Eric Betzig kémiai Nobel-díjat kapott.

1.2.1. 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, más néven a pontátviteli függvényt (PSF, Point Spread Function). Ha a pontszerű forrás 2D képére Gauss-görbét illesztünk, akkor ennek centroidja megadja a forrás pozícióját a fényelhajlás-korlátozott képnél jóval nagyobb pontossággal. A digitális videomikroszkópia megjelenésével, ezzel az eljárással lehetett például a kinezin motorfehérje mozgását megfigyelni néhány nanométeres pontossággal.

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. A fluoreszcens jelölő különböző időben bekapcsolt állapotát kihasználó sűrű jelölésű egyedi molekula lokalizációs módszerből 2006-ban egyszerre három is megjelent, amelyek közül kettő, a PALM (Photoactivated Localization Microscopy) 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.

A fenti eljárások logikailag mind azon az alapon 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. Megfelelő számú ilyen kép felvételével a fluorofórok elhelyezkedése feltérképezhető. A felbontóképességet elsősorban az egyes fluorofórok bekapcsolása alatt érzékelt fotonok számától függ. A STORM mikroszkópia laterális felbontása ~20nm, amíg az axiális ~50nm.

1.3. STORM mikroszkópia az idegtudományokban

Habár doktori munkám nagy részét az Eredmények fejezetekben részletesen bemutatott módszertani, vizualizációs és adatelemzési fejlesztések képezik, az új eljárásokat először a szinaptikus endokannabinoid jelátvitel nanoskálájú szerveződésével kapcsolatos molekuláris neuroanatómiai kérdések megválaszolására alkalmaztuk, ezért a következőkben ezt a rendszert is bemutatom.

1.3.1. A retrográd szinaptikus jelátvitel

A preszinaptikus sejtől a posztzinaptikus sejt felé történő információáramlás, a szinaptikus vezikulákból felszabaduló ingerületátvivő anyag anterográd szinaptikus transzmisszióján alapszik.

A negatív visszacsatolás egyik legáltalánosabban előforduló formája a kémiai szinapszisokban a retrográd endokannabinoid jelátvitel. A posztzinaptikus sejtől felszabaduló endokannabinoid jelemolekulák a preszinaptikus vezikula ürülést rövid vagy hosszú távon csökkenteni tudják a preszinaptikus egyes típusú kannabinoid receptorokon (CB₁) keresztül, így visszafelé terjedve szabályozzák a szinaptikus kapcsolat erősségét. Az elmúlt évtizedben kiderült, hogy ez a visszacsatolási mechanizmus előfordul a legtöbb szinapszis típusban 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

Az egyes típusú kannabinoid receptor, egy G-fehérje kapcsolt transzmembrán fehérje, amelyen a vadvad THC komponense hat. A CB₁ receptor belső ligandjai az anandamid

és a 2-AG. 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 belső kannabinoid hatásért főképp a 2-AG felelős, amely a sejtmembrán alkotó foszfolipidekből keletkezik egy enzimatis kaskádon keresztül, amelynek utolsó lépésében az 1,2-diacil-glicerín (DAG) másodlagos hírvívöböl a glicerínváz sn-1 pozíciójában lévő zsírsavat az sn-1-specifikus diacil-glicerín lipáz (DGL) enzim lehasítja. A 2-AG lebontásáért pedig az MGL enzim (monoacil-glicerín lipáz) felelős. Még mindig nyitott kérdés, hogy az erősen lipofil endokannabinoidok hogyan jutnak el a posztzinaptikus oldalról a preszinaptikus oldalon található CB₁ receptorokig.

A CB₁ aktiválása elindítja a G_{i/o} jelátviteli útvonalat, amelynek gyors, $\beta\gamma$ alegység közvetített hatása a feszültségfüggő kalciumcsatornák blokkolása, így a vezikula felszabadulás 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 pozicionálása akadályozott, ezért a vezikuladokkolás tartósan gátlódik.

2.CÉLKITŰZÉSEK

I. A STORM mikroszkópos képalkotás optimalizálása sejt kultúrában és idegszövet preparátumon. A Nikon N-STORM mikroszkóp felbontásának mérése. A STORM mikroszkópia kvantitatív tulajdonságainak vizsgálata A CB₁ immunjelölés STORM képalkotásának felbontás vizsgálata idegszövetben.

II. Korrelatív konfokális és STORM szuperfelbontású mikroszkóp építése, képfelvétel optimalizálása

III. Konfokális és STORM szuperfelbontású mikroszkópos képek megjelenítése és nano-léptékű adatelemzési módszerek a VividSTORM szoftverben. Molekuláris távolságok és sűrűségek mérése lokalizációs mikroszkópos képeken. Konvex burkoló két pontja között legrövidebb felszín menti távolság számítása. Klaszterezettség vizsgálata lokalizációs mikroszkópiás képeken. Receptor internalizáció mérése hippocampális interneuron terminálisokban.

3. MÓDSZEREK

3.1. Sejtkultúra és kísérleti állatok

A HEK293 sejteket T25-ös tenyésztőflaskában növesztettük a rutinnak megfelelő körülmények között. A transzfecció előtt a sejteket poly-d-lizinnel borított, üvegaljú edényben szélesztettük. N-végződésén EGFP-vel jelölt CB₁ fehérjét kódoló cDNS-t használtunk a transzfeccióhoz, amelyhez a gyártói utasításnak megfelelően 1 µg Lipofektamin 2000-et (Invitrogen) adtunk edényenként. 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 4% PFA-ban 15 percig rögzítettük.

Egy alomból származó, felnőtt (50-60 napos), hím, CB₁^{+/+} és CB₁^{-/-} C57BL/6H egereket használtunk az immunfestési kísérletekhez. A perfúzió előtt az állatokat mélyaltattuk hasüregbe adott ketamin–xylazin injekcióval. Az érrendszert szíven keresztül, fiziológiás sóoldattal mostuk át, majd a szövetek rögzítése céljából 4%-os paraformaldehid-tartalmú 0,1 M-os foszfát-pufferrel perfundáltuk 20 percen keresztül. A perfúzió után az agyat eltávolítottuk a koponyából, utófixáltuk 4% PFA-ban 2 órán keresztül. A blokkokból 20 µm-es metszeteket készítettük vibratómmal, majd PB-ben mostuk.

3.2. Folt-zár (patch-clamp) elvezetés

Mélyaltatott 25–30 napos, hím, C57BL/6H CB₁^{+/+} vagy CB₁^{-/-} egerek lefejezése után az agyat gyorsan eltávolítottuk a koponyából és jéghideg agy-gerincvelői flyadékba tettük. A 300 µm-es, szeleteket 1 órán keresztül 34°C-os ACSF-ben tartottuk ezután a mikroszkóp mintatartó kamrájába helyeztük, ahol folyamatosan ACSF-et áramoltattunk. A teljes-sejt elvezetéshez patch-clamp pipettát (3–4 MΩ) használtunk, amelyet 0,2%-os biocitinnel töltöttünk fel. A hippocampusz CA1 területének piramissejtjeit és radiátum rétegbeli interneuronokat teljes-sejt folt-áramzár elrendezésben mértük. A mérés után a szeleteket 4% PFA tartalmú PB-be tettük 40 órára 4°C-ra, így rögzítettük a szövetet a későbbi mikroszkópos vizsgálatokhoz.

3.3. Immunfestés

A biocitinnel töltött sejt szövetet rögzítés után mostuk, majd Triton X-100-al kezeltük 30 percen keresztül. A biocitint AF488-sztreptavidinnel hívtuk elő, majd DAPI tartalmú Vectashield-el fedtük le.

Az aktivátor-riporter STORM kettősfestéshez amino-reaktív Alexa Fluor (AF) 405 vagy Cy3 vagy AF647 festékeket és jelöletlen antitestet reagáltattunk. A számár AF594 anti-egér vagy AF647 anti-egér jelölt antitesteket készen vásároltuk (Jackson).

A 20 µm-es szöveti mintákat szabadon lebegő módon festettük a következő primer antitestek felhasználásával: CB₁ (tengerimalac, 1:1000, M. Watanabe), CB₁ (nyúl, 1 µg/ml, ImmunoGenes), bassoon (egér, 1:2000, Ab82958, Abcam), CCK (egér, 1:3000 #9303, CURE).

3.4. Konfokális és korrelatív konfokális STORM képalkotás

Az töltött sejtek vizsgálatához Nikon A1R vagy C2 konfokális mikroszkóppal, 20x objektívvel Z-sorozatot vettünk fel a látótérbe optimálisan elhelyezett sejtről.

Minden STORM és korrelatív konfokális/STORM képalkotást Nikon Eclipse Ti-E mikroszkópvázra illesztett Nikon C2 konfokális fejjel vagy Andor iXon elektron-sokszorozó töltés-csatolt eszközzel (EMCCD) készítettünk. Az Andor EMCCD kamera előtt egy hengeres lencsét használtunk az asztigmatizmus alapú 3D képalkotáshoz. Minden minta vizsgálatához friss lefedőközeget készítettünk, mely 5% glükózt, 0.1 M 2-Merkaptoetilamint, 1 mg/ml glükóz-oxidázt (Sigma) és 1500U/ml katalázt (Sigma) tartalmazott DPBS-ben (Dulbecco's phosphate buffered saline).

A HEK sejtekről először konfokális Z-sorozatot készítettünk majd 3D-STORM felvételt (2000 ciklus). A töltött sejtet tartalmazó szövetmintákról szintén Z-sorozatot és egy vagy kétsatornás 3D-STORM képet készítettünk.

3.5. Konfokális és korrelatív konfokális STORM képelemzés

A nagy nagyítású konfokális Z-sorozatokat Huygens-el (SVI) dekonvolváltuk, a mikroszkóp és a médium paramétereinek alapján számolt PSF-el. A dekonvolvált konfokális képet a STORM képre a korrelatív analízishez az Imaj TurboReg beépülő alkalmazásával illesztettük. A Nikon N-STORM mikroszkóppal felvett képsorozatot a

Nikon NIS-Elements AR 4.3 program N-STORM 3.4 moduljával elemeztük. A konfokális pixeles vetületképen körülrajzoltuk a boutonokat, hogy megkapjuk azon STORM lokalizációk halmazát, amelyek az adott boutonhoz tartoznak. Ezeken a lokalizációkon az adatelemzéseket Matlab (Mathworks) és Python (Python Software Foundation) programokkal végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A Nikon N-STORM mikroszkóp felbontásának mérése

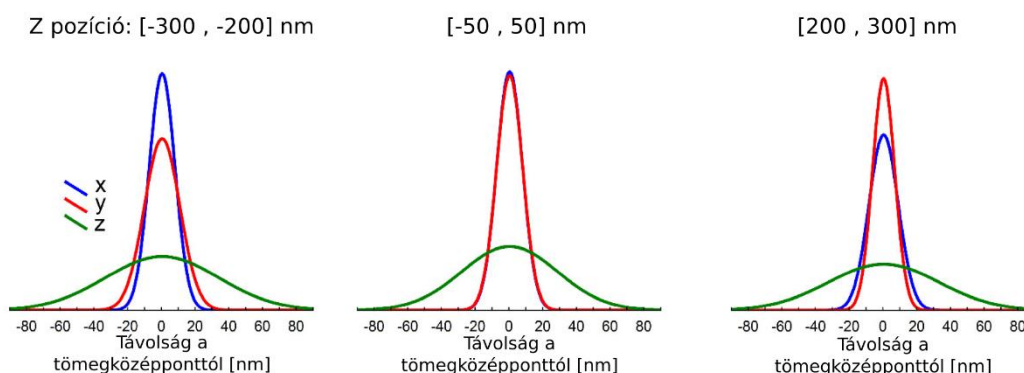
A mérőrendszerünk tesztelésére fedőlemezen egyenletesen elosztott 100 nm-es gyöngyöket használtunk. Egymás után több mérést végeztünk különböző gerjesztési megvilágítás intenzitás mellett, de azonos képfelvételi idővel hogy a felbontást a foton szám függvényében megmérjük. A gyöngyökről ötszáz képet 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. Hetezer foton esetében méréseink alapján a 100 nm-es gyöngyök helyzete meghatározható 6 nm körüli laterális felbontással.

4.2. A STORM mikroszkópia kvantitatív tulajdonságainak vizsgálata

Fontos kérdés, hogy a STORM képalkotás alkalmas-e relatív mennyiségi mérésekre. A STORM alapvetően egy sztochasztikus képalkotás, ami azt jelenti, hogy az egyes jelölések csak bizonyos valószínűséggel érzékelhetőek. Ráadásul egy jelölés akár többször is megjelenhet ezért a STORM relatív kvantifikációra alkalmasságát meg kellett vizsgálni. 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 termelték. A CB₁ immunfestését STORM képalkotással vizualizáltuk. A HEK sejtek teljes képeire vonatkozó EGFP konfokális fluoreszcens jel és az összes lokalizációs pont értéke erős pozitív lineáris összefüggést mutatott a fluoreszcens jel széles tartományán ($n = 46$ sejt, 5 fedőlemez, Spearman's rank order correlation, $R = 0.92$, $p < 0.001$).

4.3. A STORM képalkotás felbontását befolyásoló paraméterek vizsgálata CB₁ immunfestett idegszövet preparátumban

A szöveti STORM mikroszkópia felbontásának mérésére az egyedi fényforrás képének többszöri megjelenésének térbeli eloszlásra illesztett Gauss-görbe félérték-szélességét határoztuk meg. Az immunfestések mindig tartalmaznak aspecifikus jelöléseket. Mivel egy másodlagos antitest több AF647-et tartalmazhat és egy fluorofór többször is megjelenik, ezért ezek az aspecifikusan kötődött jelölések elszigetelt lokalizációs pontthalmazként jelennek meg a képalkotásban. Az ilyen pontthalmazokat a képeken azonosítani lehet, majd tömegközéppontjuk szerint egymásra lehet illeszteni. Kísérleteink alapján ez az adatkészlet alkalmas az X-Y és Z irányú felbontás mérésére agyszövetben is. A szöveti CB₁ immunfestések esetében a szigma értékek X-Y irányban 6 nm és Z irányban 41 nm-nek adódtak 5 μ m mélyen a hippocampusz metszetekben (1. ábra).



1. 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, azaz a felbontás 18nm-nek adódott az X,Y irányban és 65nm-nek Z-ben.

4.4. Korrelatív konfokális és egyedi molekula lokalizációs szuperfelbontású fénymikroszkópia

Munkám idején a szöveti membránjelölés STORM képalkotása még nem volt megoldható ezért az elektrofiziológiai mérések során specifikusan jelölt sejtek axonterminálisait csak hagyományos konfokális képalkotással tudtuk vizualizálni. Úgy

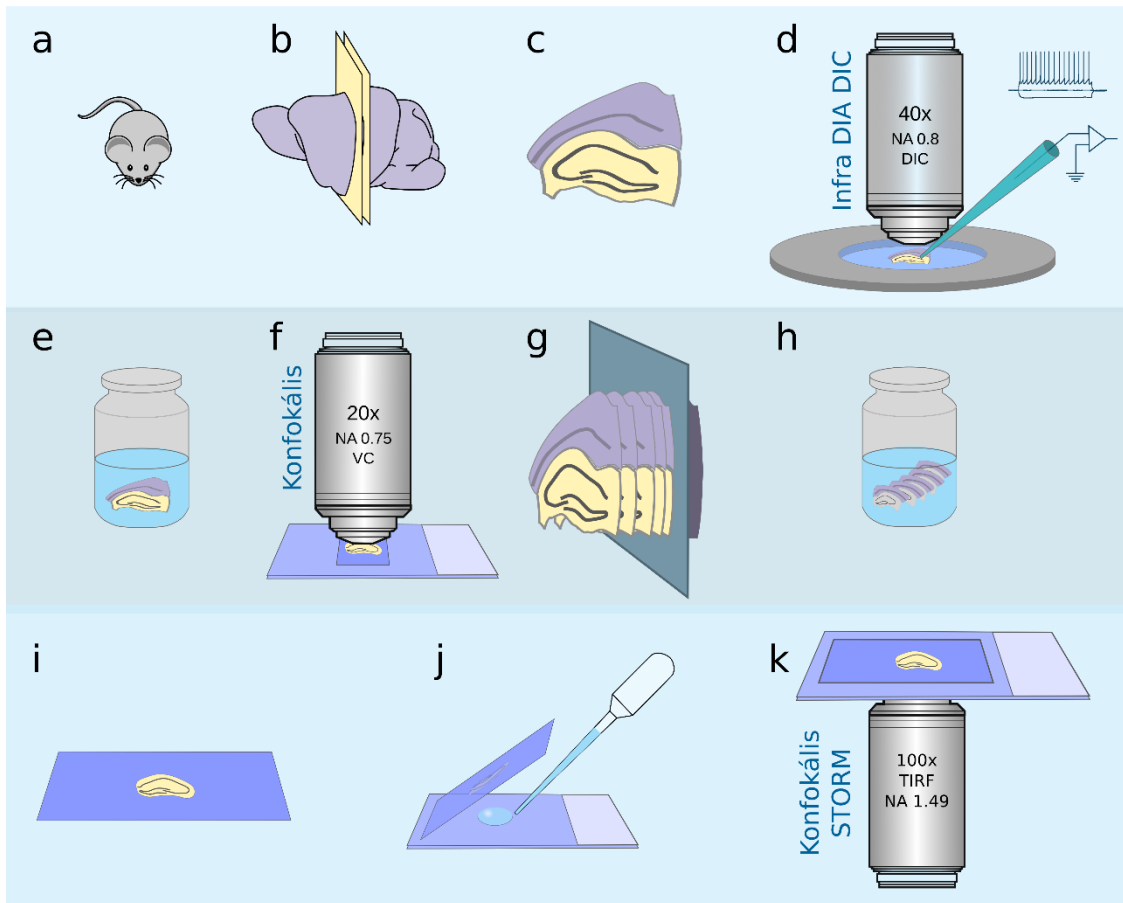
döntöttünk ezért, hogy a hagyományos konfokális szintű felbontású képet megpróbáljuk ötvözni a STORM képalkotással. Ennek elérésére az eredeti Nikon N-STORM mikroszkópot egy C2-es konfokális fejjel szereltük fel a korrelatív konfokális-STORM képalkotáshoz. A folt-pipettával egyedileg jelölt sejtek boutonjainak korrelatív konfokális és STORM képalkotásához a következő eljárást dolgoztuk ki (2. ábra):

- 1) *In vitro* teljes-sejt patch-clamp elektrofiziológiai mérések akut, túlélő, egér hippocampális szeleteken. Az élettani mérések 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. Fedőlemezre szárítás.
- 6) STORM és konfokális képalkotás.
- 7) A képek megjelenítése és az adatok elemzése.

4.5. VividSTORM korrelatív konfokális és STORM superfelbontású mikroszkópos analízis program

Mivel a biológiai szempontból fontos struktúra (esetünkben jelölt hippocampális 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 a 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 vagy konfokális mikroszkóp-SMLM, ennek ellenére

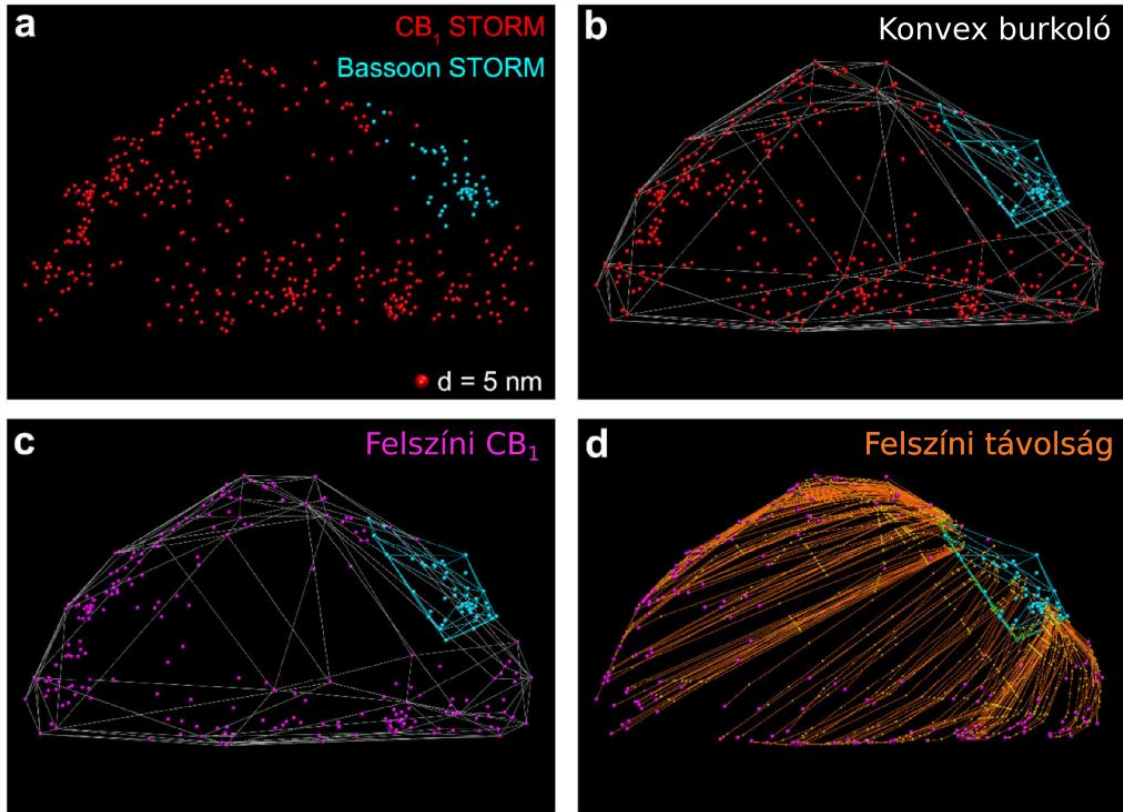
megfelelő, mindenki számára szabadon hozzáférhető szoftveres megoldást tudomásunk szerint nem volt, így egy korrelatív megjelenítésre és többféle analízisre alkalmas szoftver megírása mellett döntöttünk, melyet VividSTORM-nak nevezünk. Nagy örömünkre a VividSTORM szoftvert bemutató tanulmányunkat megjelenése óta több, mint 5 ezren töltötték le a Nature Protocols honlapjáról. Az elkészült szoftvert a SourceForge oldaláról pedig 35 országból több 700 felhasználó töltötte le.



2. ábra Mintakészítési és képalkotási folyamat a korrelatív elektrofiziológiai és konfokális-STORM képalkotás során. (a-c) Akut túlélő 300 μ m vastag hippokampális 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

4.6. Molekuláris távolságok és sűrűség mérése egyedi molekula lokalizációs mikroszkópos képeken

A lehető legegyszerűbb számítás a lokalizációs pontok közötti euklidészi távolság meghatározása. 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. A CB₁-pozitív hippokampális interneuronok axonvégződéseiben a CB₁ receptor 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. Miután a sejthártya modell és a vonatkozó CB₁ lokalizációk már rendelkezésre állnak, a következő fontos cél a szinaptikus aktív zóna kijelölése volt, melyet bassoon jelöléssel tettünk láthatóvá. A bassoon jelölés és a sejthártyában lévő CB₁ lokalizációk közötti legrövidebb felszíni út kiszámítására egy saját algoritmust dolgoztunk ki (3. ábra). 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. A konvex burkoló felületén egyenletes eloszlásban pontokat vettünk fel úgy, hogy az átlagos legközelebbi távolságok megegyezzenek a kívánt mintavételi gyakorisággal. A sűrűségméréshez a mintavételi gyakoriságot a STORM képek X-Y felbontásához igazítottuk. Minden mintavételi pont felszíni legrövidebb távolságát meghatároztuk az aktív zónától és a CB₁ lokalizációk számát megmértük 200 nm-es sugáron belül. 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 20%-os besűrűsödés már kimutatható szignifikáns különbségként a 0-250nm-es és az 1000-1250-nm-es aktív zónától mért tartományokra vonatkozólag ($p < 0.0001$ t-teszt), de a 10% még nem ($p = 0.84$).



3. ábra A sejhártya modellezése konvex burkolóval és a felszíni távolságszámítás. (a) Kettős CB₁ bassoon STORM képalkotás hippokampális axonterminálison. (b) Konvex burkoló a CB₁ és bassoon lokalizációkon. (c) Csak a felszíni CB₁ lokalizációk megjelenítése. (d) Az egyes felszíni CB₁ lokalizációkhoz vezető, bassoon jeltől mért legrövidebb felszíni útvonalak.

4.7. 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. A lokalizációs mikroszkópiában ezek a különálló részletek, mint lokalizációs pont csoportok vagy klaszterek jelennek meg. 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. Olyan algoritmusra van szükség, ahol nem kell előre meghatározni a klaszterek számát és értelmezve van egy külön halmaz a zaj elkülönítésére (a nem specifikus jelek szűrésére). Egy ilyen eljárás a sűrűség alapú klaszterezés zajjal (DBSCAN). Egy pont akkor fog egy klaszterhez

tartozni, ha epszilon sugarú környezetében van legalább N számú másik pont. Az epszilon és N paraméterek megadásához figyelembe kell venni a jelölési sűrűséget és a struktúrák jellemző méretét. A VividSTORMba épített DBSCAN funkcióval egér idegszövet preparátumban az egyedi mitokondriumok könnyen szétválaszthatónak bizonyultak kísérleteinkben.

4.8 Receptor internalizáció mérése CB_1 -pozitív interneuron terminálisokban

A ligand kötéssel aktivált GPCR jelátvitelt a receptor internalizációja követi. Ilyenkor a receptor klathrin-mediált endocitózis folyamattal eltűnik a plazmamembránból, majd újrahasznosul vagy lebontásra kerül. A VividSTORM-ba az internalizációs index (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 \mathbf{M} tömegközéppontját és, kiszámítjuk \mathbf{d} -t, ami az euklidészi távolság az \mathbf{M} és az LP (lokalizációs pont) között. A minden LP-re kiszámított \mathbf{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 burkolótól 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 internalizációs hatását is teszteltük ezzel az elemzéssel.

5. 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, 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 megjelenítésére és az adatok elemzésére. Munkánk során az alábbi következtetéseket tettük:

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 lokalizációs pontosság elérésére. Ez a lokalizációs pontosság megfelel a beágyazás előtti ezüst-intenzifikált immunarany elektronmikroszkópia segítségével elérhető molekuláris képalkotási pontosságnak.
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 idegszövevről más szövettípusokra is.
4. Az általunk fejlesztett VividSTORM korrelatív konfokális és egyedi molekula lokalizációs mikroszkópiái megjelenítő és analízis program alkalmas a különböző mikroszkóp modalitások manuális és megfelelő jelölés esetén automatikus összerendezésére, a pixelintenzitások és lokalizációs pontok együttes elemzésére. A VividSTORM szoftver ingyenesen letölthető, nyílt hozzáférésű, mások által továbbfejleszhető eszköz. 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.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témáját adó saját közlemények:

Barna, L., Dudok, B., Miczan, V., Horvath, A., Zs.I., Laszlo., 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., és mtsai. (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., Náráy-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 Závodszky, 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., Szilagy, 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.