

Válaszok Dr. Dér András opponens kérdéseire

Mindenekelőtt szeretném megköszönni az opponens munkáját, a dolgozat alapos átnézését és a részletes bírálatot. A feltett kérdésekre azok eredeti sorrendjében az alábbiakban igyekszem válaszolni.

1. A dSTORM technikai alkalmazások 2-D felbontási határára több helyen is a < 20 nm-es értéket tünteti fel, illetve saját kísérleti eredményei szerint a szarkomer struktúrák esetén 5-10 nm-es pontosságot is sikerült elérni. Mit lehet mondani a praktikus megvalósítható felbontási határról a harmadik („z”) dimenzióban a 3D asztigmias, illetve a 3D biplane módszerek esetén?

Válasz: A lokalizációs szuperrezolúciós mikroszkópiában 3D leképezés alatt a mélységélességen belüli axiális feloldást értjük, azaz (nagy numerikus apertúrájú objektívet a látható tartományban használva) tipikusan 1 mikron axiális tartományt tudunk leképezni. A feloldás függ a fotonszámtól, a zajtól és a választott módszertől. Általánosságban elmondható, hogy az axiális felbontás 2-3-szor rosszabb, mint a laterális. Pl. Huang és munkatársai az asztigmias módszernél 20–30 nm laterális felbontás mellett 50–60 nm axiális felbontást értek el [1]. A biplane módszernél [2] hasonló eredményről, 30 nm laterális feloldás mellett 75 nm axiális feloldásról számoltak be. Meg kell azonban említeni, hogy ezen 3D módszerek hatással vannak a laterális felbontásra, hiszen az asztigmias esetben anizotróppá válik a PSF, azaz x és y irányban eltérő lokalizációs pontosságot kapunk. A biplane módszernél 50–50%-os bontásban hozzuk létre a két képet, ezért a fotonszám csökkenése rontja a laterális feloldást. Kísérleteink során mi is hasonló axiális feloldást értünk el. Érdekes azonban megemlíteni, hogy az axiális feloldás és a tartomány, amelyen belül a fluoreszcens molekula pozíciója meghatározható, függ a rendszer paramétereitől. Asztigmias módszernél pl. a hengerlencse fókusz távolságától és a pontos helyzetétől. Erősebb asztigmia bevezetésével növelhető az axiális feloldás, hiszen kisebb defókuszálás esetén már mérhető az aszimmetria, ugyanakkor az axiális dinamikus tartomány lecsökken.

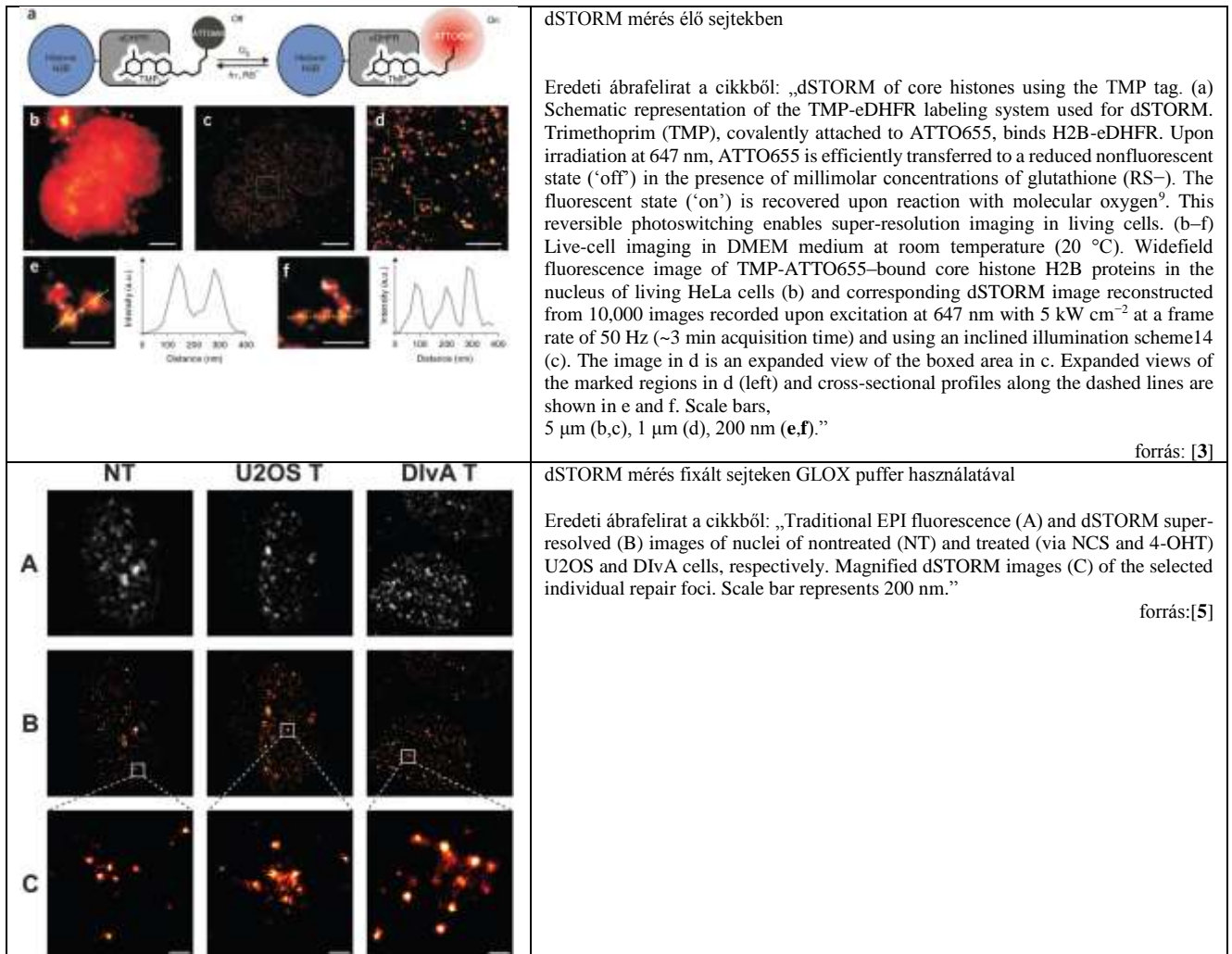
A szegedi rendszerben a detektor elé épített 4f rendszernél az asztigmia nagysága könnyen állítható volt. Ha a lencsét a detektorhoz azon szakaszába helyezzük, ahol a nyáláb mérete változik az optikai tengelyen (első lencse és a mikroszkóp, illetve a második lencse és a detektor közötti tartomány), akkor a lencse axiális mozgásával a bevezetett asztigmatiát könnyen és nagy tartományban változtathattuk. A hengerlencsét a két lencse közé helyezve az asztigmia mértéke kevésbé függött a pozíciótól, ekkor a hengerlencse fókusz távolságával lehetett az asztigmia mértékét állítani. Gyakorlati szempontból ezt a második beállítást preferáltam, mert a 2D és 3D mérések közötti váltáskor a rendszer kalibrálása így volt egyszerűbb.

2. Említi a dolgozatban, hogy a dSTORM módszer biológiai alkalmazásai általában fixált mintákra vonatkoznak. Milyen feltételek teljesülése esetén lehetséges a módszer élő sejteken történő alkalmazása?

Kutatásaim során az összes dSTORM mérést fixált sejteken végeztem, élősejtes kísérletek nem történtek. Azonban ismert, hogy dSTORM mérések speciális esetekben élősejtes környezetben is végezhetők. Az élősejtes dSTORM mérések nehézségét illetve azok kiküszöbölésére javasolt eljárásokat öt pontban foglalom össze:

- ***Jelzőmolekula bevitele a sejtbe, szelektív jelölés és a fluoreszcens háttér csökkentése***

A jelölő festékmolekulák illetve az immunhisztokémiai jelölésnél használt antitestek permeabilitása tipikusan alacsony. Élősejtes kísérleteknél a membrán permeabilizálása nem lehetséges, ezért speciális jelölésre és vivőmolekulákra van szükség. Jó példa erre a „TMP tag” módszer, amikor a célfehérjét standard genetikai kódolással eDHFR-rel (Escherichia coli dihydrofolate reductase) jelölik, amit fluoreszcens molekulával konjugáltak, a sejtmembránon nagy permeabilitással rendelkező trimethoprimmal (TMP) festenek. Hasonlóan működik a „SNAP-tag” módszer. Sauer és munkatársai TMP [3] illetve SNAP tag [4] segítségével jelöltek hiszton H2B fehérjéket és készítettek nagy feloldású képeket (1. ábra, felső tábla). A DNS kettőtörések során kialakuló fókuszok dSTORM mérését a dolgozatban én is tárgyalom, és a vizuális összehasonlításhoz betettem a fixált sejteken, GLOX puffer segítségével felvett képeket (1. ábra, alsó tábla). Ezek alapján megállapítható, hogy az élő sejteken készült képek minősége közel azonos a fixált sejtek esetén készült képekkel.



1. ábra: DNS törési fókuszok dSTORM leképezése élő (felső tábla) és fixált (alsó tábla) sejteken.

A fedőlapra kitapadt fluoreszcens jelölés magas háttérrel ad, ami pl. úgy csökkenthető, ha a jelölés után a sejteket egy tiszta fedőlemezre helyezik át [3]. A fluoreszcens háttér a gerjesztés geometriájának alkalmas megválasztásával (TIRF, HILO) is csökkenthető.

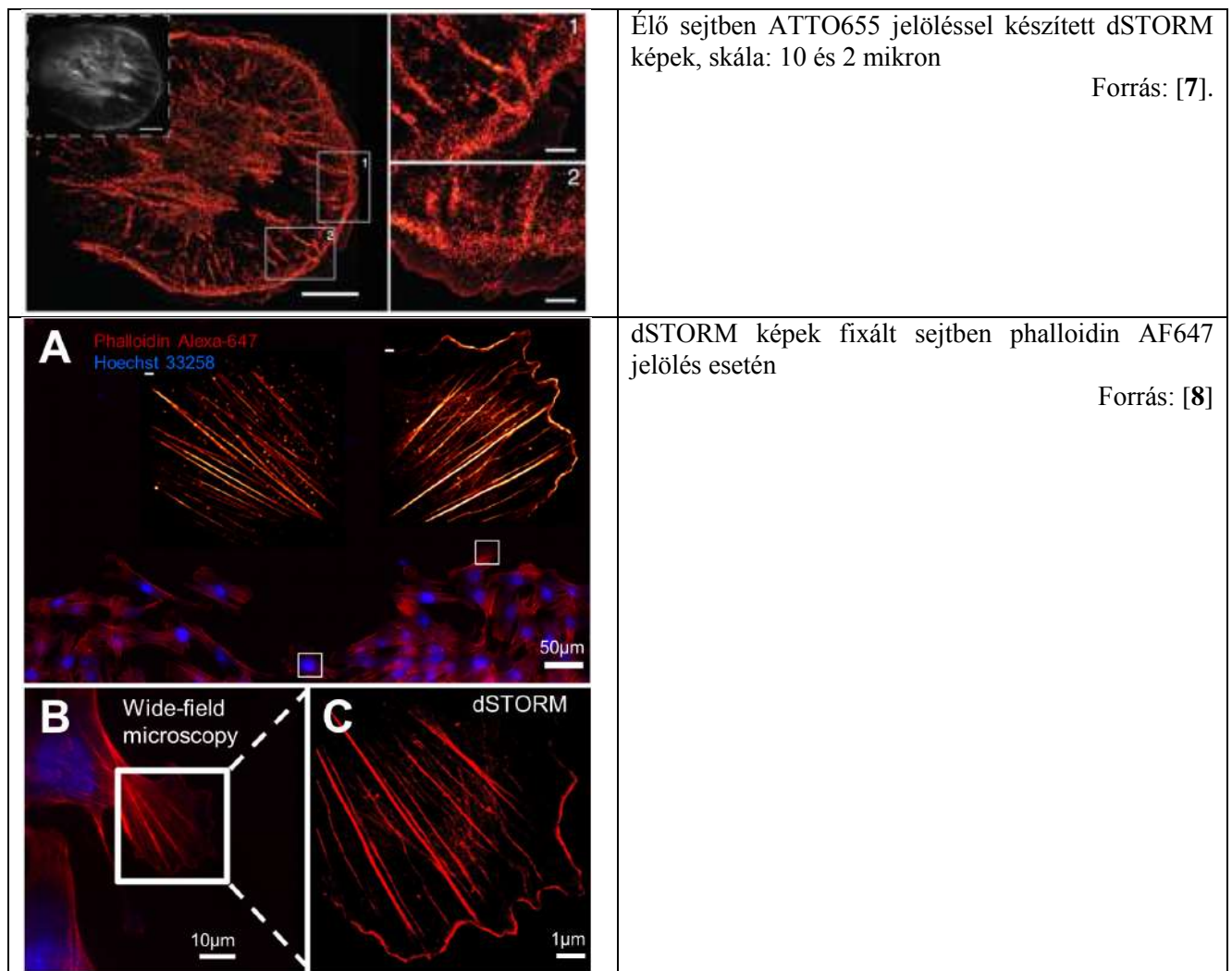
- **A jelölés befolyásolhatja a sejt működését**

Ez egy általános probléma a jelöléseket alkalmazó módszereknél. Referenciamérésekkel kell igazolni, hogy a megjelölt sejtalkotóhoz kapcsolódó molekula nem befolyásolja a vizsgálni kívánt mechanizmust.

- **Megfelelő fotokémiai környezet biztosítása (pH, redox folyamatok)**

A dSTORM módszerben biztosítani kell az alkalmazott festék ON és OFF állapotainak optimális fotofizikai feltételeit. Fixált sejtek esetén ezt általában MEA (merkaptotilamin) ≈10 mM koncentrációjú pufferoldatával érik el. Élő sejtek esetén a festékek szabályozott villogásához szükséges oxidációs-redukációs kémiai környezetet a sejtben eleve meglévő redox folyamatokra és a bennük részt vevő molekulákra kell építeni. Eukarióta sejtekben a Glutathion (GSH) fordul elő a legnagyobb koncentrációban (1–11 mM) az antioxidáns vegyületek (pl. aszkorbinsav) közül [6]. Sajnos a sejtben belüli koncentrációja nem homogén: legnagyobb a mitokondriumban, de a koncentráció függ a sejt típusától is. Ezért a tervezett fotofizikai hatás sejt- és sejtalkotó függő. 2018-ban Virant [7] és munkatársai HeLa sejtekben nanobody jelöléssel és ATTO655 festéket használva készítettek élő sejteken dSTORM felvételeket (2. ábra, felső tábla). Referenciaként „hagyományos” fixált sejtekkel készült phalloidin

AF647-es saját mérési eredményeket is bemutatok (2. ábra, alsó tábla). Ebben az esetben az élősejtes mérések minősége nem érte el a fixált sejtes mérésekét.



2. ábra: Aktin sejtvez dSTORM leképezése élő (felső tábla) és fixált (alsó tábla) sejtekben.

- *Alacsony gerjesztési intenzitás a fototoxicitás elkerülésére*

Az alacsony fototoxicitás miatt célszerű a gerjesztési intenzitást csökkenteni, és szelektíven csak a leképezett területet gerjeszteni pl. HILO vagy TIRF kivilágítási módszerrel.

- *Minta mozgásából eredő hibák*

Élő sejtben a mozgás okozta műtermékek jelentősebb problémát okoznak, mint fixált mintában. Markerek (fluoreszcens gyöngyök, nanorészecskék stb.) használata az élő sejtben nem praktikus, ezért korrelációs módszerek vagy fehérfényű képek szekvenciális rögzítésével lehet például a mozgásból adódó műtermékeket kiküszöbölni.

További megjegyzés: Élősejtes lokalizációs mikroszkópiára a fotoaktiválható fluoreszcens molekulák használatán alapuló PALM módszer ad lehetőséget, hiszen ott pufferfolyadék használata nem szükséges, fiziológias környezetben lehet a mintát vizsgálni. Megjegyzem, hogy a kutatócsoport mEOS fotokapcsolható fehérjékkel már megkezdte ezirányú kutatásait. Továbbá érdemes megemlíteni, hogy napjainkban egyre

szélesebb körben alkalmazzák a PAINT módszert is, ahol a fluoreszcens molekulák rövid idejű (pár száz ms) bekötődése értelmezhető felvillanásként.

3. A fluoreszcenciaanizotrópia eloszlását feltérképező kísérletei esetén mi volt a térbeli felbontási határ? Lehet-e kombinálni a technikát szuperrezolúciós módszerekkel?

A dolgozatban ismertetett anizotrópiás mérések EPI/TIRF kivilágítással történtek. Jó közelítéssel, a leképezési hibák elhanyagolásával a diffrakciós limittel jellemezhetjük a térbeli feloldást (tipikusan <500 nm). Az axiális feloldást EPI kivilágítás esetén az objektív mélységélessége (≈ 600 nm), TIRF kivilágítás esetén az evanescens tér behatolási mélysége (≈ 100 nm) határozza meg.

Anizotrópia mérés egyedi molekula szinten lehetséges, erre a dolgozatban két megoldást is javasoltam. Az egyik a bipolSTORM-nak nevezett módszer, amelyben egy kettősen törő lemezzel bontjuk ketté az emittált fotonokat és mérjük a gerjesztő fény polarizációs síkjával párhuzamos és a rá merőleges komponenszt (4.5.1 fejezet). A másik lehetőség az mmSTORM módszernél a másodlagos karba helyezett polarizátor segítségével lehetséges, ahol az elsődleges kép a teljes intenzitást, a másodlagos pedig a polarizátorral kiválasztott polarizációs komponenszt adja meg (4.5.2 fejezet).

4. A monomer illetve dimer állapotok anizotrópiájának különbségéből lehet következtetni a fehérje aggregációs fokának steady-state állapotára. Mi okozhatja a monomer forma anizotrópiájának (0,24 körüli érték) eltérését a teoretikus maximumtól (0,4)? (Ha a mikroszkópjektív depolarizációs hatása ezt egyedül nem magyarázza, akkor a minta geometriai paraméterei, vagy a benne lejátszódó folyamatok állhatnak a háttérben. Ha az emissziós tranziens dipól gyors rotációs diffúziója idézi elő az anizotrópia fokának csökkenését, akkor ennek kinetikáját ki lehetne-e mérni időfelbontásos méréssel? Ha pedig nem a rotációs diffúzió az ok, akkor az abszorpciós és emissziós tranziens dipólmomentum-vektorok szögére lehetne-e következtetni?)

Válasz: A mTFP1 monomer állapotban mért 0,24-es érték valóban eltér az elméleti 0,4-es maximális értéktől. Az eltérés pontos okát egyértelműen nem sikerült beazonosítani, annak (ahogy a bíráló is felsorolja) több forrása lehet: a fluoreszcencia élettartam (mTFP esetén $\approx 3,2$ ns) alatt bekövetkező forgás, az emissziós és abszorpciós dipólusok irányának eltérése, és a minta (vagy a mikroszkóp) által bevezetett depolarizáció. Specifikusan e kérdés megválaszolásához méréseket nem végeztünk, és az irodalomban sem találtam az mTFP1-re vonatkozó anizotrópiás eredményeket. Megjegyzem, hogy más fluoreszcens fehérjék esetén sem renthagyó az ideális értéktől való eltérés: EYFP-re megmutatták, hogy élő sejtben az anizotrópia jelentősen kisebb (0,22) mint fixált mintában (0,36). Az eltérés lehetséges okait (fixálás következtében a forgás csökkenése és a keresztkötések miatt lecsökkent HOMO-FRET hatások [9]) felsorolták, de mérésekkel nem támasztották alá. Élősejtes kísérleteknél figyelembe kell venni, hogy a minta 37 fokban inkubátorból került a mikroszkópba, a magasabb hőmérséklet szintén az anizotrópia csökkenéséhez vezet [10]. Mivel a kísérleteknél az anizotrópia értékét több tényező is befolyásolja, ezért a két szélső esetben (100% monomer és 100% dimer) mért anizotrópia értékekhez viszonyítottunk és egy egyszerű modellt használtunk a monomer/dimer arány meghatározására.

Természetesen megpróbáltuk megfejtetni az elméleti 0,4-es értéktől való eltérést, erre vonatkozó megfontolásaimat röviden összefoglalom:

Ha a 0,24-es értéket csak az abszorpciós és emissziós dipólok eltérő iránya okozná, akkor ez 31° -os eltérést jelentene a dipólmomentum-vektorok között. Ugyan létezik olyan festék (NBD-PE), ahol ez a szög 25° [11], de fluoreszcens fehérjék esetén tipikusan párhuzamos dipólusokat feltételeznek (pl. GFP [12]).

Ha az anizotrópia értékének csökkenését csak az izotróp forgásnak tulajdonítjuk, akkor 3,2 ns fluoreszcencia élettartammal számolva (<https://www.fpbases.org/protein/mtfp1/>) a Perin egyenlet alapján a forgási korrelációs időre 4,8 ns adódik, ami a 26,9 kDa molekulatömegű mTFP esetén viszonylag gyors forgásnak felel meg [13].

Már a kísérletek során végeztünk molekuladinamikai vizsgálatokat az mTFP1 monomerből és két mTFP-ből alkotott dimer formációkra. A számolásokat Paragi Gábor kollégám végezte. Az eredményeket nem publikáltuk, de a szimulációk azt mutatták, hogy a fluoreszcenciáért felelős, a hordós szerkezet belsejében ülő kromofor (PIA) rögzített, a molekula többi részéhez képest jelentős elmozdulást nem szenved.

A fentiek alapján a mTFP monomer 0,24-es anizotrópia értékét több forrás együttes eredményeként tudom elképzelni. Az egyes okok súlyának meghatározásához az időbontott anizotrópia mérést egy lehetséges kísérleti módszernek tartom.

5. A polarizációfok változása alapján időben nyomon követhetőek voltak - pl. fehérje-ligand reakcióval együtt járó - lassú depolarizációs változások. Mi ennek a technikának az elvi és gyakorlati időfelbontása?

Megítélésem szerint az anizotrópia mérésére kialakított mikrofluidikai rendszer (4.7.4 fejezet) nem alkalmas a tényleges fehérje-ligand kölcsönhatás időbeli felbontására, mert az egy jelentősen gyorsabb, a kamera expozíciós idejéhez vagy a mikrocsatornában a mérési ponthoz jutás időtartamához képest pillanatszerű folyamat. A kísérletek során a koncentrációarányt változtattuk (az említett esetben a festett BRC4 koncentrációját növeltük), és mértük az anizotrópia jelben bekövetkező változást. Ilyen értelemben a rendszer nem alkalmas időbontott mérésekre. A változás mértéke a kötési affinitásra utal, és nem magának a kötésnek a kinetikájára. A dolgozatban az erre vonatkozó kijelentés „időben lassan változó fluoreszcencia anizotrópiamérés” ilyen értelemben félrevezető lehet. A mérésben az „időfelbontást” a mikrocsatornában haladó egyes droplettek között eltelt idő határozza meg. A kísérletek során az egyedi droplettek alacsony fluoreszcenciajele korlátozta a mérést. Megítélésem szerint a módszer sebessége a csatornák számával lineárisan növekszik. Az alkalmazható csatornák számát a mikroszkóp látótere korlátozza. Természetesen a látótér a nagyítás csökkentésével növelhető, de kisebb nagyítás tipikusan kisebb numerikus apertúrát is jelent, azaz kevesebb az összegyűjtött foton.

6. A rainSTORM és testSTORM programok alkalmazásával lehetővé válik egyedi fluoreszcens molekulák mozgásának követése is. Tervez-e kísérleteket a biológiai határfelületek (pl. érfalak) közelében létrejövő áramlás vizsgálatára?

Igen, tervezünk egymolekula követésén alapuló vizsgálatokat végezni határfelületek közelében. E vizsgálatainkat azért kezdtük a határfelületek közelében történő mérésekkel, mert a jelölő részecske nem mozog ki a mélységélességből, azaz időben folytonos jelet detektálunk a kamerán, ami könnyebben követhető. Jelenleg egy olyan mikroszkóprendszeren dolgozunk, amely a sejtfalet illetve strukturált felületek közelében képes az áramlás feltérképezésére.

Referenciák:

1. Huang, B., Wang, W., Bates, M. and Zhuang, X., 2008. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 319(5864), pp.810-813.
2. Juette, M.F., Gould, T.J., Lessard, M.D., Mlodzianowski, M.J., Nagpure, B.S., Bennett, B.T., Hess, S.T. and Bewersdorf, J., 2008. Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples. *Nature methods*, 5(6), pp.527-529.
3. Wombacher, R., Heidbreder, M., Van De Linde, S., Sheetz, M.P., Heilemann, M., Cornish, V.W. and Sauer, M., 2010. Live-cell super-resolution imaging with trimethoprim conjugates. *Nature methods*, 7(9), pp.717-719.
4. Klein, T., Löschberger, A., Proppert, S., Wolter, S., van de Linde, S. and Sauer, M., 2011. Live-cell dSTORM with SNAP-tag fusion proteins. *Nature methods*, 8(1), pp.7-9.
5. Varga, D., Majoros, H., Ujfaludi, Z., Erdélyi, M. and Pankotai, T., 2019. Quantification of DNA damage induced repair focus formation via super-resolution dSTORM localization microscopy. *Nanoscale*, 11(30), pp.14226-14236.
6. van de Linde, S., Heilemann, M. and Sauer, M., 2012. Live-cell super-resolution imaging with synthetic fluorophores. *Annual review of physical chemistry*, 63, pp.519-540

7. Virant, D., Traenkle, B., Maier, J., Kaiser, P.D., Bodenhöfer, M., Schmees, C., Vojnovic, I., Pisak-Lukáts, B., Endesfelder, U. and Rothbauer, U., 2018. A peptide tag-specific nanobody enables high-quality labeling for dSTORM imaging. *Nature communications*, 9(1), pp.1-14.
8. Becsky, D., Szabo, K., Gyulai-Nagy, S., Gajdos, T., Bartos, Z., Balind, A., Dux, L., Horvath, P., Erdelyi, M., Homolya, L. and Keller-Pinter, A., 2020. Syndecan-4 Modulates Cell Polarity and Migration by Influencing Centrosome Positioning and Intracellular Calcium Distribution. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8.
9. Ganguly, S., Clayton, A.H. and Chattopadhyay, A., 2011. Fixation alters fluorescence lifetime and anisotropy of cells expressing EYFP-tagged serotonin1A receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 405(2), pp.234-237.
10. Jain, P.; Motosuke, M.; Aida, T. Fluorescence Anisotropy Studies of Fluorescein. Preprints 2021, 2021050189 (doi: 10.20944/preprints202105.0189.v1).
11. Thompson, N.L., McConnell, H.M. and Burhardt, T.P., 1984. Order in supported phospholipid monolayers detected by the dichroism of fluorescence excited with polarized evanescent illumination. *Biophysical journal*, 46(6), pp.739-747.
12. Gautier, I., Tramier, M., Durieux, C., Coppey, J., Pansu, R.B., Nicolas, J.C., Kemnitz, K. and Coppey-Moisan, M., 2001. Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of GFP-tagged proteins. *Biophysical journal*, 80(6), pp.3000-3008.
13. Lakowicz, J.R. ed., 2006. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Boston, MA: springer US.

Szeged, 2022. március 9.

Erdélyi Miklós