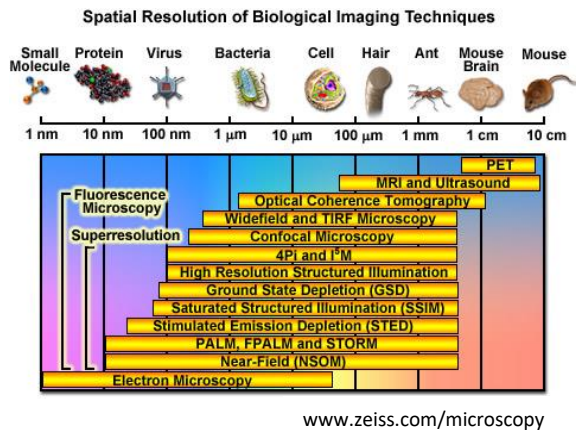


Modern mikroszkópai technikák

NAGYFELBONTÁSÚ MIKROSKÓPIA

Szabó-Meleg Edina

Hiszem, ha látom, tartja a mondás. Mindig többet és többet szeretnék látni...minél részletgazdagabban.



1. ábra

Napjainkban fontos követelmény a molekuláris szintű folyamatok követése biológiai rendszerekben, lehetőleg valós időben => feloldóképesség javítása szükségyszerű; mivel az Abbe-elv /diffrakciós limit/ behatárolja a felbontóképességet:

200 nm laterális (x,y)

500 nm axiális (z)

Ez azt jeleneti, hogy az ennél kisebb tárgy a hagyományos fénymikroszkópiában nem felbontható (=homályos folt látható az okulárban)

PSF: point spread function: egy képalkotó rendszer válasza egy pontszerű objektumra; az a kiterjedt folt a képen, ami a nem felbontott objektumot reprezentálja

De: a legtöbb szubcelluláris struktúra (pl. aktin filamentum, intermedier filamentumok, mikrotubulus, riboszóma, transzport vezikulumok) ettől jóval kisebbek-hogyan lehet láthatóvá tenni mikroszkópiában?

A felbontóképesség növelésével:

Hogyan lehet növelni a felbontóképességet?

1. Rövidebb hullámhossz alkalmazásával.
2. Magasabb indexű immerziós folyadék alkalmazásával (levegő; $n \approx 1,0$ < víz; $n \approx 1,3$ < glicerín; $n \approx 1,4$ < olaj; $n \approx 1,5$).
3. Egyedi molekulák/részecskék tanulmányozásával.
4. Szuperrezolúcióval (optikai nanoszkópia alkalmazásával)

Mivel az axiális felbontóképesség sokkal rosszabb, mint a laterális (2 nagyságrenddel), ezért elsősorban az axiális irányú felbontását célozták meg a fejlesztések.

A szuperrezolúciós technikák előnyei:

+optikai tartományban működnek

+nem igényelnek speciális mintaelőkészítést (<-> elektronmikroszkóp)
+így minimalizálni lehet a mintaroncsolást

A nagyfelbontású technikákat két csoportra oszthatjuk:

1. Fluorofórok együttesének detektálása, térben modulált, fókuszált fény használatával = PSF modifikáció (PSF engineering) (STED, GSD, SSIM) (RESOLFT technikák)
2. Egyedi molekula lokalizációs technikák, fotoaktiválható fluorofórok alkalmazásával (PALM, STORM, FPALM)

I. RESOLFT TECHNIKÁK

REversible Saturable (or Switchable) Optical Fluorescence Transitions

Stefan Hell: 200 nm-nél kisebb molekulák nem észrevehetőek → megoldás: tartunk néhány molekulát sötétben

Fluoreszcens próbák, reverzibilisen világos „on”, és sötét (off) állapotba kapcsolhatók (illetve A és B állapot között változtathatók, pl. cisz-transz izomerizáció); pl. STED, GSD, SSIM, SPEM. Fotokémiai folyamatok révén lehetővé válik, hogy csak bizonyos molekulák világítsanak, legyenek aktív állapotban egyszerre. A molekulák kapcsolhatóvá válnak. Amikor egy molekula fotokapcsol A-ról, B-re (pl. világosról-sötétre) a gerjesztő fény intenzitásával exponenciálisan csökken annak valószínűsége, hogy az első állapotban marad.

Ezen technikák jellemzője, hogy depléciós (gyengítő) lézerrel végigpásztázza a mintát (ezért kell reverzibilis állapot), a depléciós lézer közepén nulla csomópont (pásztázás során képes legyen a molekula egyik állapotból a másikba visszatérni), PSF-et (felbontást) nem a hullámhossz szabja meg, hanem a depléciós lézer intenzitása

Fontos: megfelelő fluorofór (bistabil), magas lézer intenzitás → foto-bleachelés (kifakítás) → kritikus: mekkora lézrerősséget képes a fluorofór tolerálni

Nagyfelbontás, de nem feltétlenül extrém nagy fényintenzitással

Felbontóképesség:

$$d \cong \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I/I_s}}$$

ahol:

λ : gerjesztő fény hullámhossza

$n \sin \alpha$: objektív NA

a : térben modulált depléciós lézernyaláb alakja (nincs feltüntetve az egyenletben) (egyenes/fánk, nulla középpel)

I : depléciós lézer intenzitása

I_s : a vizsgált fluorofór saturációs intenzitása, az a fény intenzitás, ahol a kapcsolási átmenet megtörténik, ~ fordítottan arányos a két állapot életidejével. PI: a molekulák 50%-a átment sötétből világosba. Ha a gerjesztő fény intenzitása > saturációs intenzitás: megnő a valószínűsége, hogy valamelyik bejövő foton elindítja az átkapcsolást.

Ha $I=0$: felbontóképesség=Abbe diffrakciós limit

Ha $I \gg I_s$: = gyök alatti érték nő: PSF nagyon szűk, megvalósul a nagyfelbontás

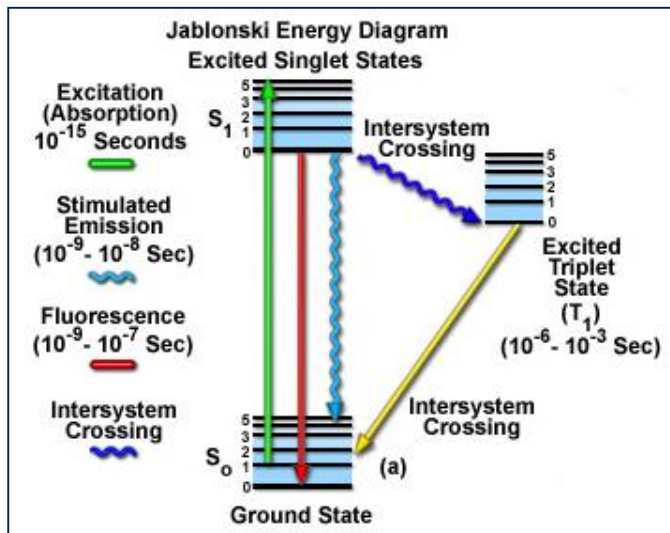
ha $I/I_s=100 \rightarrow 10x$ -es felbontás növekedés

STimulated Emission Depletion (STED) mikroszkópia

Korlátozott számú molekula kapcsol be, a többi kikapcsolt marad.

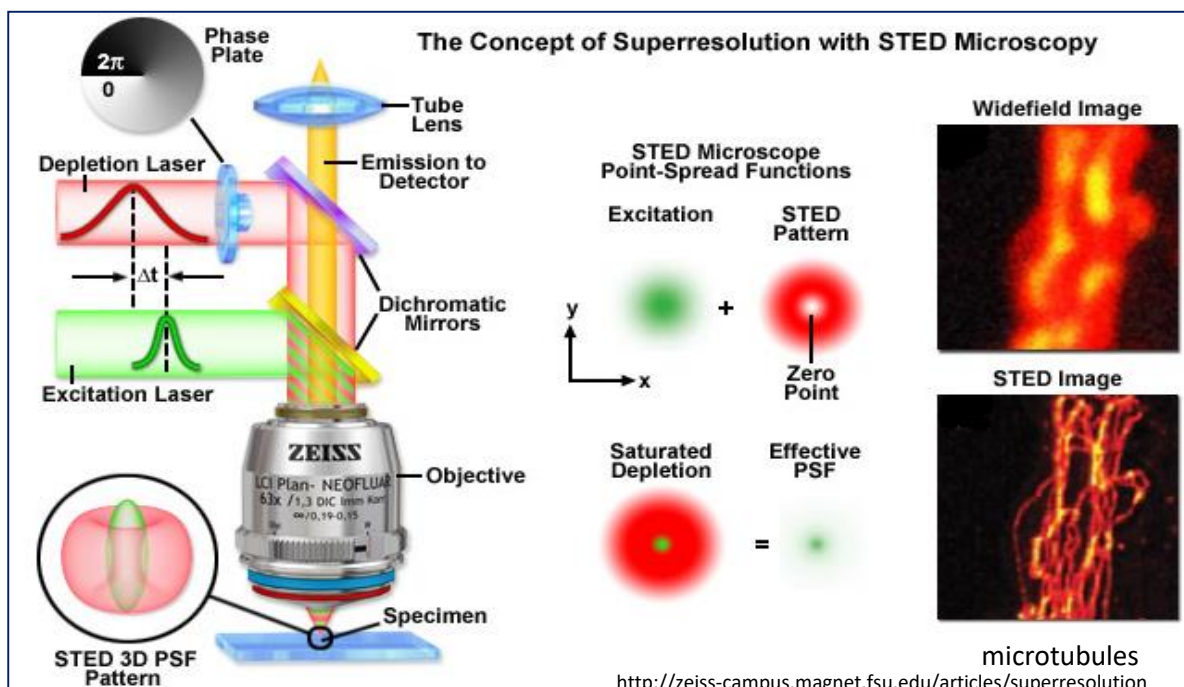
A depléciós (=gyengítő) lézertény intenzitásának eloszlása térben kontrollált.

Térben modulált, szaturálható átmenetek két állapot között.



2. ábra <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/superresolution>

Az atomokban a mag körül elektronok keringenek meghatározott pályákon, melyek különböző energiaszintet reprezentálnak. Alapesetben az elektronok a legkisebb energiaszinteket foglalják el, de energia elnyelésével magasabb szintre, energia leadásával pedig alacsonyabb szintre kerülhetnek. Az elektron különböző, külső forrásból vehet fel energiát, amit abszorpciónak nevezünk. A magasabb energiaszintre való ugráshoz pontosan meghatározott energiamennyiség kell. A magasabb energiaszintre ugrott elektront, és az őt tartalmazó atomot gerjesztettnek nevezzük. Mivel az atomi szerkezet mindig a legkisebb energiájú állapotra törekszik, a gerjesztett elektron előbb-utóbb visszaugrik az alacsonyabb energiaszintre, miközben a két szint közötti energiát például foton kibocsátással leadja = spontán emisszió. Ha egy gerjesztett atomból felszabaduló foton kölcsönhatásba lép egy másik, ugyanolyan, gerjesztett atommal, akkor azt legerjeszti egy újabb foton felszabadulása mellett = stimulált emisszió. A stimulált emisszió útján felszabaduló foton energiája, frekvenciája, fázishelyzete és haladási iránya azonos a stimulálást kiváltó fotonéval, az így „megszaporodott” fotonok további kölcsönhatások révén még újabb fotonokat szabadíthatnak fel. (wikipedia) (2. ábra).



3. ábra

STED működése (3. ábra) (forrás: www.zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution):

- A mintát két forrásból világítjuk meg: gerjesztő lézer+ vörös eltolódott depléciós lézer (=STED nyaláb)

- Gerjesztés + deplécio: szinkronizált lézer impulzusokkal, amiket az objektív a minta síkjára fókuszál
- Fluorofórok: a STED nyaláb nulla pontjában pozicionálva-fluoreszcens marad, többi: alapállapotba (nem fluoreszcens) kerül a stimulált emisszió miatt.
- PSF alakjának módosítása: gerjesztő és depléciós lézer: impulzusának, impulzus szélességének, és intenzitásának változtatásával
- Depléciós lézer:
 - o nulla pont a közepén (intenzitás=0) (fázis modulátorral érhető el), intenzitás a periféria felé exponenciálisan nő
 - o fánk alak, amely körbeveszi a gerjesztő lézer fókuszpontjának közepét (PSF-et)
 - o a piros depléciós lézer rá van téve a zöld gerjesztési helyre => effektív PSF méretének csökkentése
 - o hullámhosszát és impulzusának idejét a fluorofórnak megfelelően választjuk meg
 - o ereje: $>250\text{MWatt/cm}^2$ – brutális: => fluorofórok azonnal alapállapotba kerülnek
- Fluorofórok deaktivációja (hatástalanítása) a fókusz síkban: a centrum kivételével (← stimulált emisszió)
- Fluoreszcencia emisszió detektálása: PMT detektorral
- Komplet kép eléréséhez: a STED lézerrel előállított középső nulla ponttal végigpásztázni a mintát (konfokálishoz hasonlóan) = STED nyaláb végigléptetése a mintán
- A STED nyaláb koordinátái előre beállítottak: tudjuk, h. melyik régiót világítjuk meg, mert úgy pozicionáljuk a sugarat
- Tehát az alapelv: meghatározni, hol vannak a molekulák „on” és hol „off” állapotban
- Ha nő a depléciós lézer intenzitása: csökken az a régió, ahol a fluorofór „A” állapotban található => laterális felbontás nő

STED-nél alkalmazott fluorofórok:

Fluorophore	Ex λ (nm)	Pulse Width (picoseconds)	STED λ (nm)	Pulse Width (picoseconds)	Resolution (lateral; nm)
Synthetic Dyes					
ATTO 425	440	130	532	1000	70-80
ATTO 565	532	90	640	90	30-40
ATTO 663	635	100	750	200	40
Alexa Fluor 594	570	90	700	90	60
DyLight 594	570	90	700	90	60
RH 414	554	0.25	745	13	30
Fluorescent Proteins					
EGFP	490	100	575	200	70
Citrine	490	100	598	300	50
EYFP	490	100	598	300	70

4. ábra

<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution>

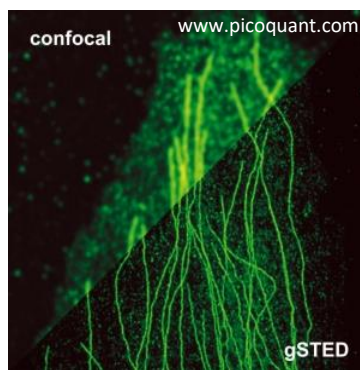
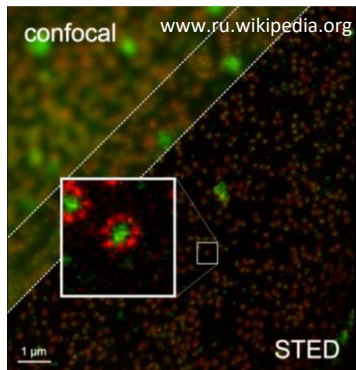
A STED előnyei/hátrányai:

- +felbontóképességet a kísérleti konfiguráció és az alkalmazott lézer ereje szabja meg
- +a kép nem igényel további feldolgozást
- +pásztázás sebessége kb. megegyezik LSCM-al

+effektív felbontás egyenesen arányos a depléciós lézer erejével

+felbontás: 40 nm

-extrém erős lézer a próba gyors kifakításához (bleaching) és roncsolásához vezet



5. ábra konfokális vs. STED

II. EGYEDI MOLEKULA LOKALIZÁCIÓS MIKROSKÓPIAI TECHNIKÁK

PALM (PhotoActivated Localization Microscopy)

FPALM (Fluorescent PhotoActivated Localization Microscopy)

STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)

} 2006.

Három kutatócsoport egymástól függetlenül, közel egyidőben publikálta a három módszert, a módszerek alapvetően ugyanazok, csak más típusú próbákat használnak a minta jelölésére.

Eredetileg: PALM, FPALM: fotoaktiválható molekulákat használt

STORM: szintetikus fotokapcsolható karbocianin (Cy) festékeket használt

Alapelv: véletlenszerűen aktivált festékmolekulák lokalizálása; egy egyedi molekula pozíciója nm-es (vagy jobb) pontossággal lokalizálható, ha megfelelő mennyiségű fotont emittál, és a molekula 200 nm-es körzetében nincs hasonlóan emittáló molekula. A koncepció a következő: kis erejű aktivációs lézerrel való gerjesztés → a molekulák kis hányada véletlenszerűen bekapcsol, ezeket ábrázoljuk, lokalizáljuk, bleacheljük (kifakítjuk) (6. ábra).

Eddig tárgyalt módszerek: molekulák csoportját vizsgálta, egyszerre több fluorofórt gerjesztettek.

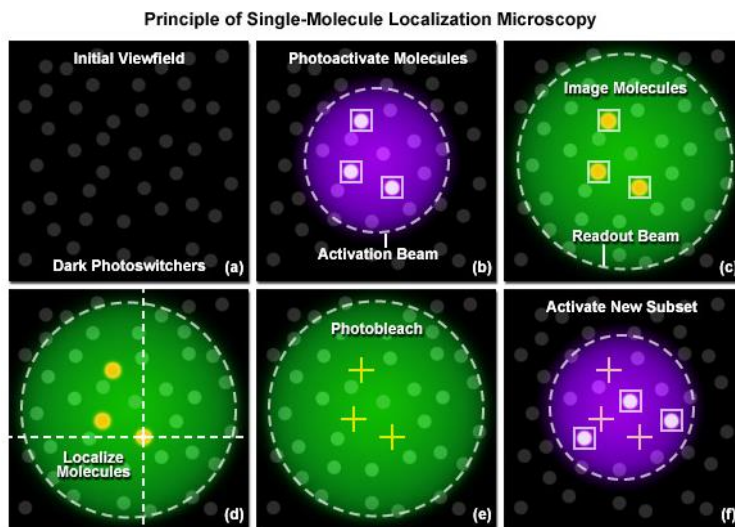
Ezek a technikák: egyedi molekulákat vizsgálnak, amelyek között nagyobb a távolság, mint az Abbé limit.

Eddig: sok foton ment be, itt: sok foton jön ki.

Fontos jellemzők:

- megfelelő fotoaktiválható próba
- detektor karakterisztikája
- minta autofluoreszcenciájának minimalizálása

Felbontás: 10-20 nm, csak a lokalizáció pontosságától függ



<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu>

6. ábra

- a. Eredetileg minden molekula inaktív (natív állapot; sötét karikák).
- b. UV lézerrel (405 nm) aktiváljuk a molekulák egy kis részét (aktiválás=kémiai modifikáció) (az, hogy kevés molekula legyen aktiválva, gyenge lézerrel érhető el és tartható fenn) kevés molekula=molekulák 1%-a (az ábrán kerettel jelölt fehér karikák). A fotoaktiváció véletlenszerű. Az aktiváció valószínűsége egyenesen arányos az aktiváló lézer intenzitásával.
- c. A kiolvasó lézer (zöld, 561 nm) detektálja és rögzíti (=feljegyzi) a fluoreszcens molekulák pozícióját a megvilágított területen belül.
- d. A fotoaktivált molekulák digitális képét elemzik, hogy azonosítsák és lokalizálják a molekulákat. A kép olyan, mintha néhány világító szentjánosbogarat fényképeztünk volna le. Függvényillesztéssel képük alapján meghatározhatók az egyes festékmolekulák pozíciói (a fényes pontok centrumát határozzák meg).
- e. A kiolvasás addig történik, amíg a molekulák fluoreszcens állapotban vannak, a kiolvasás alatt a fotoaktivált molekulák spontán bleach-elődnek, ezzel csökkentve az aktív molekulák számát a mintában.
- f. Újabb adag molekulát aktiválnak, megismétlik az előbbi procedúrát. Egészen addig ismétlik, amíg az összes molekula kimerül a mintában. Ezt a metódust akár több 1000-szer ismétlik meg, mindig különálló molekulákat kapcsolnak be és lokalizálnak → így a minta képe rekonstruálható az egyes festékmolekulák pozíciói alapján.

A lokalizáció pontossága függ:

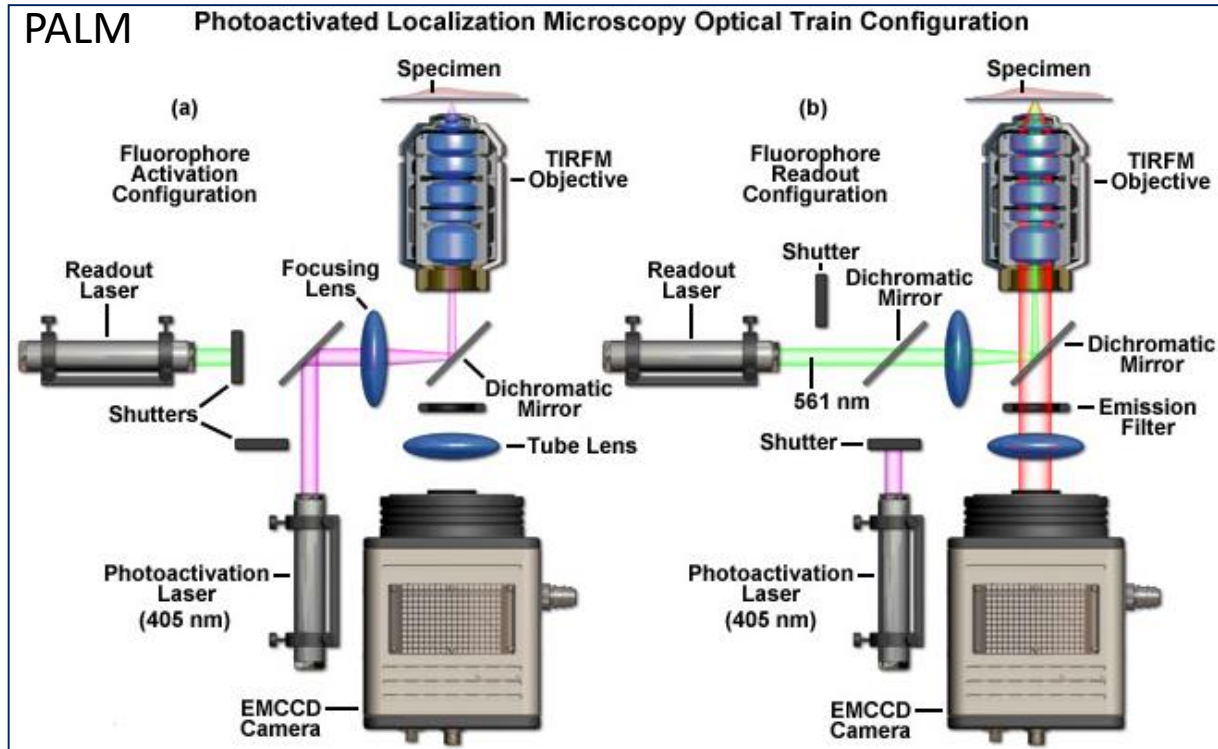
- jel/zaj viszonytól: a gyűjtött fotonok számának maximalizálása az egyes fotoaktiválható próbákból a háttér minimalizálása mellett. Háttér lehet: i. természetes/reagens-indukált autofluoreszcencia (pl. fixáló ágensektől, transzfektáló vegyszerektől), ii. környező - sötét állapotba lépett - próbák visszamaradt fluoreszcenciája.
- a molekulák által emittált fotonok totális számától – fontos a megfelelő fluorofór zavaró tényezők:
 - antitestek (10 nm)
 - fluoreszcens fehérjék (3 nm)

Tehát a próba limitálja a felbontást. Ott fityegnek a molekulán, bezavarnak a lokalizációba pl. mikrotubulus elsődleges+másodlagos antitesttel jelölve: ~ 30 nm-el szélesebbnek tűnik az antitestek miatt

Fluoreszcens fehérjék kevesebb fotont bocsátanak ki, mint a szintetikus festékek (Cy3, Cy5-karbocianinek)

Pl.: 10 000 gyűjtött foton (ha háttér zaj=0) → a molekula közepe 1-2 nm-es pontossággal megadható

400 foton → 20 nm, vagy rosszabb pontosság

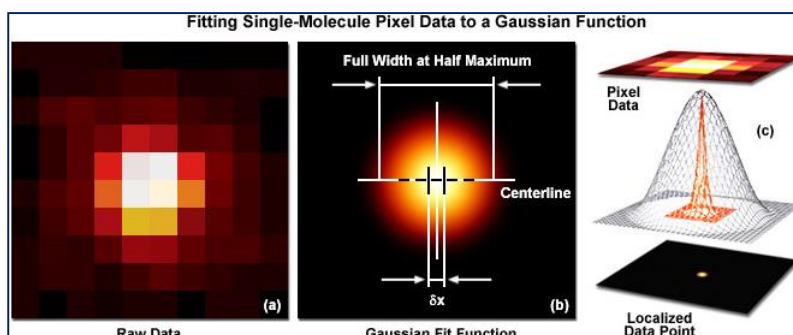


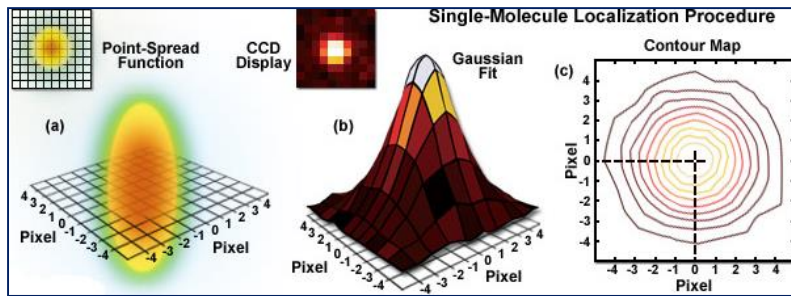
7. ábra

7. ábra: a PALM mikroszkóp optikai útvonala: az aktivációs lézert egy dikroikus tükör elvezeti a mikroszkóphoz – egy vonalba esik a kiolvasó lézerrel. Mindkét nyaláb ugyanazon a fókuszáló lencsén halad keresztül, és egy másik dikroikus tükör veri vissza → fókuszpont formálás az objektíven → minta megvilágítása. Az emittált fluoreszcenciát az egyszerű objektív begyűjti, amely a dikroikus tükörre, majd az emissziós szűrőre jut. Az emissziót egy másik lencse fókuszálja (tubus lencse) → kamerára jut az egyedi molekula képe. Az aktivációs és kiolvasó lézerek shutterrel kontrolláltak (külön-külön/szimultán is használhatók). Különböző tükrök irányítják a fény nyalábokat.

Lokalizációs eljárás:

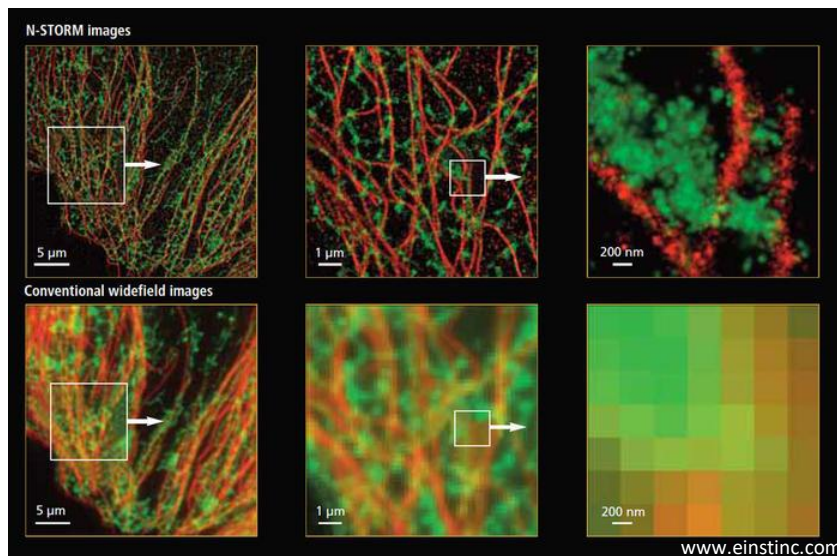
Az egyedi molekula „nyers” adatait matematikai műveletekkel 2D Gauss-függvénnyel ábrázolják, nm pontossággal lokalizálják. A diffrakció-limitált hely közepe megfelel a molekula feltételezhető pozíciójának, elegendő mennyiségű foton esetén a molekula lokalizációja az említett pontossággal meghatározható (8. ábra).





<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu>

8. ábra

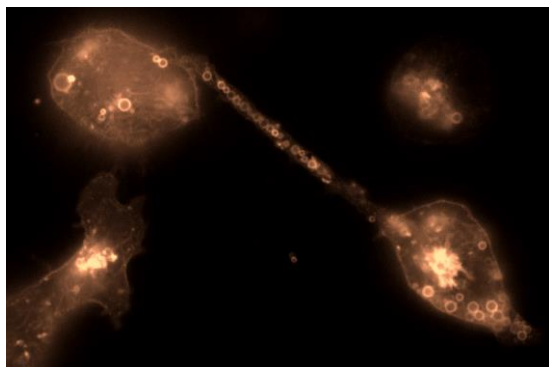
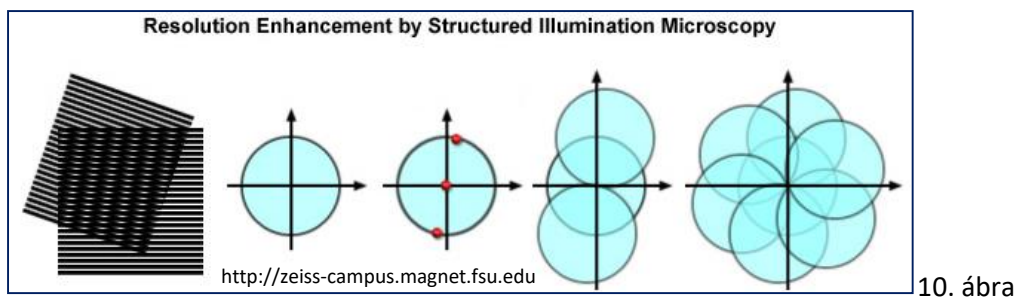


9. ábra. Konvencionális vs. STORM kép

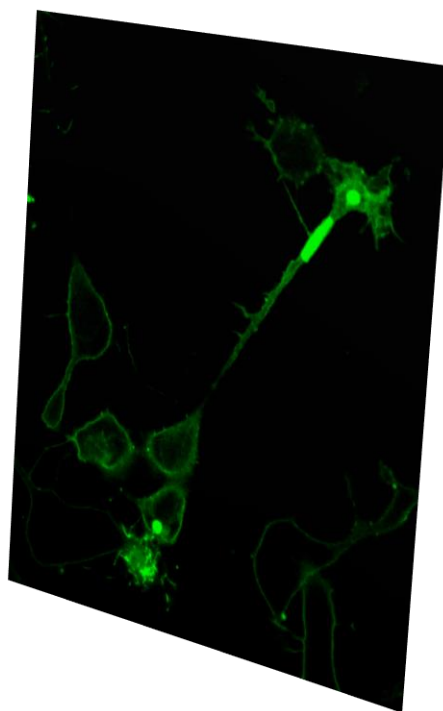
STRUKTURÁLT MEGVILÁGÍTÁSÚ MIKROSKÓPIA (SIM)

Felbontóképeség: 80-90 nm (x, y) (mind az axiális mind a laterális felbontást megduplázza)

(Struktúrált megvilágítás: megvilágítás útjába rácsot teszünk. Nem egy pontot vetítünk a vizsgálandó tárgyra, hanem 1 v. 2 dimenziós alakzatot /pl. egy rácsot/. A rács képe megjelenik a mintán /ahol a rács van, ott nem világít a fluorofór, mert nem éri el a fény a mintát/. Miore effektus: 2 csíkos mintázat egymásra rakásakor alakul ki. Ha a fluorofórok eloszlását a mintában ilyen csíkos formában képzelnénk el, és erre vetítünk rácsot (amelynek ismerjük a paramétereit, pl. rácsállandó): közel vertikális csíkozatot látnánk. A rács elforgatható a mikroszkópban: $3x \rightarrow 120^\circ$ v. $5x \rightarrow 72^\circ$. Az így keletkező Moire-effektusban a csíkok közötti távolság > a felbontási határnál. Ha ezt a struktúrát reciprok térben nézzük (Fourier transzformált) - egy kört kapunk: a kör közepén: alacsony felbontású információ, a kör széle felé: nő a felbontás (magas frekvenciájú részek). A kör eltolása a nagyfelbontású részek felé, információ újra lokalizálása. Utólagos feldolgozásra, számolásra van szükség.



Vezikuláris transzport B sejteket összekötő membrán nanocsöveken keresztül (SIM, saját felvétel)



CD86 transzport membrán nanocső belsejében (SIM, saját felvétel)