

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Pixelenkénti autofluoreszcencia korigált FRET mérés és
implementálása Panoramic Confocal konfokális
patológiai szkenerre**

Rebenku István

Témavezető: Dr. Vereb György



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

TÁRGYSZAVAK

digitális patológia, 3 dimenziós virtuális tárgylemez, apertúra korrelációs konfokális képalkotás, dekonvolúció, Förster rezonancia energia transzfer (FRET), autofluoreszcencia korrekció, α kalibrációs faktor, kvantitatív intenzitás alapú FRET, sejtmentes kalibrációs standard, ImageJ / Fiji plugin, EGFR, HER2, Integrin, glioblasztóma

KEYWORDS

digital pathology, 3-dimensional virtual slide, aperture correlated confocal imaging, deconvolution, Förster resonance energy transfer (FRET), autofluorescence correction, α calibration factor, quantitative intensity-based FRET, cell-free calibration standard, ImageJ / Fiji plugin, EGFR, HER2, Integrin, glioblastoma

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
BEVEZETÉS	6
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
A DIGITÁLIS PATOLÓGIA	7
A PANNORAMIC CONFOCAL KÉPALKOTÁSA	7
Pontkiterjedési függvény és dekonvolúció	9
A GLIOBLASZTÓMA MULTIFORME	10
Patomechanizmus	10
A GBM molekuláris profilja	11
AZ EMLŐTUMOROK	11
AZ EPIDERMÁLIS NÖVEKEDÉSI FAKTOR RECEPTOR CSALÁD	12
A EGFR jelentősége glia tumorokban	12
A HER2 jelentősége emlőtumorokban	13
AZ INTEGRINEK	14
AZ EPIDERMÁLIS NÖVEKEDÉSI FAKTOR RECEPTOR ÉS INTEGRINEK KÖLCSÖNHATÁSAI	14
FÖRSTER REZONANCIA ENERGIATRANSZFER	15
A FRET fizikája	15
Mikroszkópos FRET mérési módszerek	17
A FRET mérési módszerek korlátai	18
FRET mérés és az autofluoreszcencia	18
CÉLKITŰZÉSEK	20
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	21
ANTITESTEK KONJUGÁLÁSA FLUORESZCENS FESTÉKKEL	21
FLUORESZCENS GYÖNGYÖK PSF MEGHATÁROZÁSÁHOZ	21
SEJTKULTÚRA ÉS FLUORESZCENCIÁS JELÖLÉS	22
Minták dekonvolúció teszteléséhez	22
Kontaktlencsén növesztett többsejtrétegű 3D modell	22
Immunfluoreszcenciás jelölés szuszpenzióban FRET méréshez	23
Adherens sejtek fluoreszcenciás jelölése FRET méréshez	24
LÉZERPÁSZTÁZÓ KONFOKÁLIS MIKROSKÓPIA	25
Fényhatékonyság és nagyméretű 3D minták összehasonlító mérései	25
Autofluoreszcencia karakterizálása	25
FRET mérések	25
ÁRAMLÁSI CITOMETRIA	26
A PANNORAMIC CONFOCAL VIZSGÁLATA	26
A pontkiterjedési függvény meghatározása és dekonvolúció	26
A tárgyasztal stabilitásának és relokalizációs pontosságának mérése	26
A megvilágítás homogenitásának mérése	27
A mérési linearitás meghatározása	27
A szenzitivitás meghatározása	27
A fényhatékonyság meghatározása	28
STANDARD TÁRGYLEMEZEK KÉSZÍTÉSE FRET MÉRÉSHEZ	28
KÉPELEMZÉS	28
PIXELNKÉNTI AUTOFLUORESZCENCIA KORREKCIÓS ALGORITMUS	29

EREDMÉNYEK	33
I. A PANNORAMIC CONFOCAL AUTOMATA PATOLÓGIAI SZKENNER TESZTELÉSE.....	33
I.1. A Panoramic Confocal excitációs teljesítményének és fényhatékonyságának vizsgálata	33
I.2. Konfokális teljesítmény és dekonvolúció.....	35
I.3. A tárgyasztal stabilitása és relokalizációs pontossága	37
I.4. A megvilágítás homogenitása	39
I.5. Linearitás és szenzitivitás.....	41
I.6. Mérések nagy területű és vastagságú mintákon	42
II. PIRELENKÉNTI AUTOFLUORESCENCIA KORRIGÁLT FRET	45
II.1. A celluláris autofluoreszcencia vizsgálata.....	45
II.2. Autofluoreszcencia korrekció jelöletlen mintákon	46
II.3. Korrekciós faktorok meghatározása antitest alapú standard lemezekon	48
II.3. Modellrendszer FRET mérések teszteléséhez	50
II.4. FRET mérések gyöngyökön és sejteken változó donor/akceptor/autofluoreszcencia arányok mellett	53
II.5. FRET mérések biológiailag releváns molekulapárok között és indirekt jelölés alapú pozitív kontrollokon	54
III. FRET MÉRÉS A PANNORAMIC CONFOCAL AUTOMATA PATOLÓGIAI SZKENNERREL	59
III.1. Modellrendszer a FRET mérések teszteléséhez a Panoramic Confocalon.....	59
III.2. FRET mérések Panoramic Confocallal és LSM 880 mikroszkóppal	60
MEGBESZÉLÉS	63
ÖSSZEFOGLALÁS.....	69
SUMMARY.....	70
IRODALOMJEGYZÉK.....	71
HIVATKOZOTT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	71
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ ÉS EGYÉB SAJÁT KÖZLEMÉNYEK.....	77
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	79
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK KÜLÖNLENYOMATAI	80

Rövidítések jegyzéke

Akt/PKB	Akt/protein kináz B
BSA	Szarvasmarha szérum albumin
CLSM	konfokális lézerpásztázó mikroszkóp
DAPI	diamino-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	extracelluláris mátrix
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor (HER1, EGFR)
FBS	fötális borjú szérum
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FRET	Förster Rezonancia Energiatranszfer
FWHM	Full width at half maximum
GBM	Glioblasztóma multiforme
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetánszulfonsav oldat
IgG	Immunglobulin G antitest
ITGA5	$\alpha 5$ integrin
ITGB1	$\beta 1$ integrin
PDGFR	vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor
PI3K	foszfatidilozitol-3-kináz
PSF	Pontkiterjedési függvény
SNR	jel-zaj arány

Bevezetés

A különböző tumoros megbetegedésekre általánosan jellemző a nagy térbeli heterogenitás. Ez a tulajdonságuk különösen nehezíti a megfelelő diagnózis és terápia eljárás meghatározását, hiszen akár egyetlen, a tumor többi részétől eltérő sejt is befolyásolhatja a tumor reakcióját az alkalmazott kezelésre. A tumor heterogenitás vizsgálatára napjainkban számos módszert fejlesztenek. Ezek közé tartozik például a térbeli transzkriptomika és térbeli proteomika, melyekkel az adott metszet különböző területeinek mRNS, ill. fehérjeszintű expressziós profilja vizsgálható, azonban ezeket összetettségük és költséges voltuk miatt diagnosztikára nem, csak felfedező klinikopatológiai kutatásokra használják. Ugyanakkor a digitális patológia napjainkra bekövetkezett gyors fejlődése nem csak szöveti szintű morfológiai felvételek készítését, digitális tárolását és elemzését teszi lehetővé, hanem immunhisztokémiai jelölések alkalmazásával ezek a morfológiai jegyek egy vagy két molekula expressziós szintjével is korreláltathatók. Napjainkban a fluoreszcenciás patológiai szkennerek megjelenése és elterjedése zajlik. Ezek lehetővé teszik egy mintában több molekula multiplex jelölésen alapuló vizsgálatát is. Ez a technológiai háttér a rutin diagnosztikából fejlődött ki, így kézenfekvő, hogy fontosnak tartott markerek nagy kiterjedésű mintákban - akár ritka eseményként - való megjelenésének vizsgálatára alkalmazzuk. A Panoramic Confocal (amelyet a magyarországi 3DHitech Kft. fejleszt) az első olyan digitális patológiai szkennerek, amely a hagyományos transzmissziós képalkotáson túlmenően nemcsak multiplex fluoreszcenciás detektálást, hanem konfokalitást is biztosít, így vastagabb metszetek térbeli vizsgálatára is használható. Ezt a szkennert a konfokalitás, a stabilitás, a pontosság, a fényhatékonyság, a linearitás és az érzékenység szempontjából vizsgáltuk. Mivel bizonyos molekulák közötti kölcsönhatás gyakran érzékenyebb mutatója lehet egy adott sejt állapotának, mint ezen molekulák kifejeződési szintje, azt is meg kívántuk vizsgálni, hogy a Panoramic Confocal alkalmassá tehető-e szövettani metszeteken molekuláris interakciók mérésére Förster rezonancia energiáttranszfer (FRET) mérésén keresztül. A FRET népszerű eszköz a molekuláris kölcsönhatások tanulmányozására, mivel az 1-10 nm-es tartományban igen érzékeny a távolságra. Az intenzitás alapú, spektrálisan korrigált FRET mérés hatékony és sokoldalú módszer, amelynek fő gyakorlati limitációja az elérhető jel-zaj (SNR) arány, és a sejtek autofluoreszcenciájának torzító hatása. Annak érdekében, hogy a módszer jól használható legyen magas autofluoreszcenciájú metszeteken is, az áramlási citometriában leírt sejtenkénti autofluoreszcencia korrekciós algoritmust pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióként adaptáltuk a mikroszkópos mérésekhez, és az eljáráshoz kalibrációs standardot fejlesztettünk.

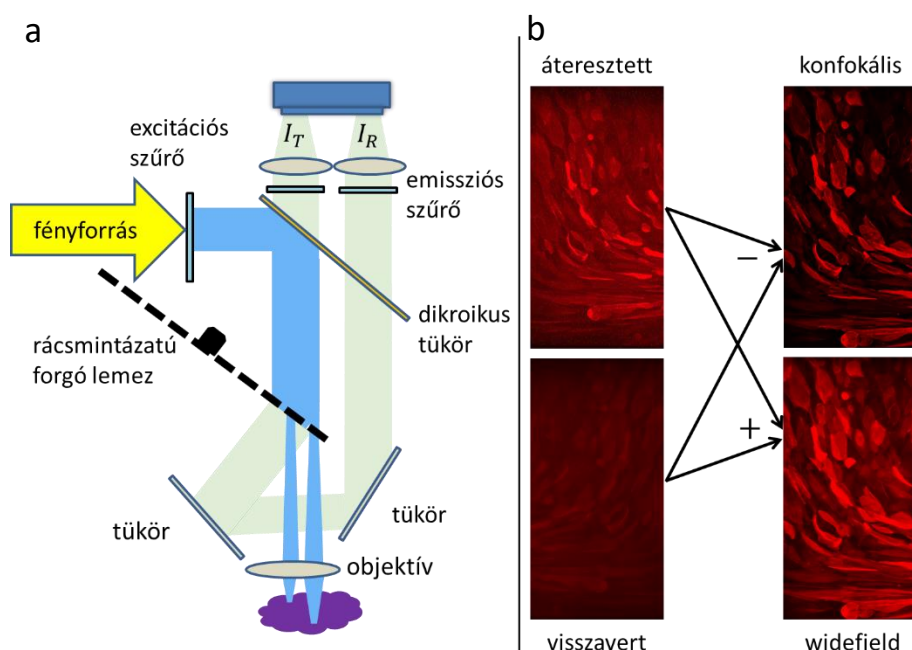
Irodalmi áttekintés

A digitális patológia

A digitális patológia a szöveti biomarkerek kutatásán túl [1] a rutin diagnosztikában is egyre inkább előtérbe kerül [2]. Ezt a fejlődést a gyorsabbá váló teljes tárgylemez szkennerek, valamint a tárhely és a számítási teljesítmény csökkenő ára teszi lehetővé [3]. A legtöbb rutin diagnosztikai területen jelenleg hagyományos transzmissziós módszereket alkalmaznak. A fluoreszcencia képalkotás, különösen a konfokális képalkotás, az automatizált teljes tárgylemez szkennelés feltörekvő területe. Még a European Society of Digital and Integrative Pathology 2021-es kiadásában, a digitális patológiára vonatkozó legjobb gyakorlatra vonatkozó ajánlásban is csak a fluoreszcenciás módszerek neve kerül említésre, de nem tárgyalják azokat [4]. Eközben számos fluoreszcens technika van fejlesztés alatt, vagy vár arra, hogy bekerüljön a digitális patológia vagy a tudományos kutatás mindennapi eszköztárába [5]. A konfokális módszerek bevezetése az automatikus tárgylemez szkennerekbe javíthatja azok képminőségét és jelentősen megnövelheti a z irányú feloldást, ami lehetővé teszi olyan technikák alkalmazását, amelyek korábban teljes tárgylemez-szkennerekkel nem voltak megvalósíthatóak, mint például a 3D FISH (fluoreszcens *in situ* hibridizáció) [6]. A digitális patológia és a teljes tárgylemez szkennelés egy folyamatosan fejlődő terület, ahol az új műszerek és azok folyamatos minőségellenőrzése elengedhetetlen a magas színvonal biztosításához.

A Panoramic Confocal képalkotása

A Panoramic Confocal egy konfokális képalkotásra képes fluoreszcenciás tárgylemez szkennerek. A készülék konfokális képalkotását az Aurox cc88 apertúra korrelációs konfokális rendszer biztosítja (1./a ábra).



1. ábra. Panoramic Confocal képalkotása

a, A LED fényforrásból érkező fény áthalad a gerjesztési szűrőn és a dikroikus tükrön, majd a konfokális egységbe jut. A konfokális egység egy forgó lemez segítségével az objektíven keresztül rácsmintázató gerjesztő fényt vetít a mintára. A mintáról érkező emissziós fény az objektíven keresztül a forgó lemezre jut, amin a fény egy része továbbhalad és az emissziós szűrőn keresztül az sCMOS detektor egyik oldalára vetül. A fény fennmaradó része a forgó lemezről visszaverődik, és egy alternatív optikai útvonalon keresztül az sCMOS detektor másik felére vetül.

b, Kép rekonstrukció során a konfokális kép az áteresztett és a visszavert kép különbsége, a hagyományos „widefield” kép azok összegeként állítható elő.

A cc88 képalkotásának központi eleme egy forgó optikai lemez, amely rácsmintázatban áteresztő és visszaverő területeket hordoz. Erre vetül a multispektrális Lumencor LED fényforrás fénye egy motorizált váltóban elhelyezkedő optikai szűrőrendszeren keresztül. A LED spektrális tulajdonságai az 1. táblázatban láthatóak, a váltóban elhelyezkedő gerjesztési és emissziós szűrők, valamint a dikroikus tükör ezekhez a gerjesztő spektrumtartományokhoz kerülnek kiválasztásra.

csatorna neve	excitációs fény (nm)
DAPI	386/23
CFP	438/24
FITC	475/28
YFP	512/25
TRITC	550/88
Cy5	650/13

1. táblázat A Panoramic Confocal fényforrásai.

A gerjesztő fény a cc88 rácsmintázatának transzparens elemein áthaladva az objektíven keresztül eljut a mintára. Ezt követően az emittált fény az objektíven keresztül ismét a cc88 forgó lemezére jut, ahol a fény egy része tovább halad, egy másik része pedig visszaverődik. Az optikai rendszer úgy van kialakítva, hogy mindkét frakció ugyanannak az sCMOS (pco.edge 5.5 2560 × 2160 felbontás; 6,5×6,5 μm fizikai pixel méret; > 60 % kvantumhatásfok) kamera szenzornak a két felén képződjön le. A rácsmintázaton átjutó, mintára fókuszált fény által a rácshoz konjugált fókusz síkban gerjesztett fluoreszcencia a transzparens rácsponatokon át a szenzor egyik felére jut. Mivel az áteresztő rész a lemez felét teszi ki, a fókusz síkon kívülről származó fotonok véletlenszerű fele a rácson át ugyanerre a fél szenzorra jut, míg a másik fele a lemez tükröző részéről visszaverődve másik optikai úton a szenzor másik felére képződik le. Emiatt, ahogy az 1./b ábrán látható, az áteresztett (I_T) és a visszavert (I_R) képből számolható a teljes látómezős („widefield”) (I_W) és a konfokális (I_C) kép az alábbi egyenletek segítségével (1. és 2. egyenlet):

$$I_W = I_T + kI_R \quad (1)$$

$$I_C = I_T - kI_R \quad (2)$$

Ahol a k egy kísérletesen meghatározott korrekciós faktor (~ 0.9), amelyre a két fényútban található reflektív és transzmisszív optikai komponensek eltérő fényhatékonysága miatt van szükség. A forgólemez eltávolítható a fényútból, ebben az esetben a készülék konvencionális epifluoreszcenciás mikroszkópként üzemel [7]. A tárgylemezek kezelése automatikusan történik egy 12 helyvel rendelkező tárgylemez tartó tálcáról. A képalkotáshoz egy 20× Plan-Apochromat (NA=0,8; kat. sz.: 420650-9901 Carl Zeiss Jena) vagy egy 40× C-Apochromat víz immerziós (NA=1,2; kat. sz.: 421767-9971) objektív áll rendelkezésre. Az immerziós víz adagolása szintén automatikusan történik. A kijelölt területről a mikroszkóp szekvenciálisan, néhány pixel átfedéssel felvételeket készít. A felvételekből egy képösszefűző algoritmus létrehozza a digitális tárgylemezt [8], tehát a digitális tárgylemez egy tárgylemez teljes területének digitalizálásával jön létre [9, 10], számítógépes háttértárból bármikor előhívható, és megfelelő program segítségével (pl. a 3D Histech Kft. SlideViewer, vagy a szabad hozzáférésű Qpath [11]) úgy vizsgálható, mintha a mikroszkóppal navigálnánk a metszetben.

Pontkiterjedési függvény és dekonvolúció

Amikor egy mintát optikai mikroszkóppal vizsgálunk, a kép, ami kialakul, nem a minta tökéletes leképeződése; a mikroszkóp optikai jellemzői és korlátai befolyásolják a képalkotást

[12]. A pontszerű fényforrásról alkotott kép térbeli szétterülését a pontkiterjedési függvény (PSF) írja le [13]. Mivel minden tárgypont egyidőben vetül – a PSF-nek megfelelően – a képsíkba, a kép a tárgy és a PSF konvolúciója. Emiatt a PSF torzító hatását egyszerű lineáris képfeldolgozási módszerekkel nem küszöbölhetjük ki, csak dekonvolúcióval, melyre számos matematikai módszer áll rendelkezésre [12].

A glioblasztóma multiforme

A glioblasztóma multiforme (GBM) a leggyakoribb primer agydaganat felnőtteknél, és összességében az egyik legnagyobb mortalitású daganatos megbetegedés. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) a GBM-et IV. grádusú asztrocitóma tumorként határozza meg, amelyet rosszindulatú, mitotikusan aktív és nekrozisra hajlamos daganatként jellemez. A nekrozis a GBM egyik legfontosabb jellemzője, a IV grádusba sorolás feltétele [14]. A GBM esetében a terápiás cél a lehető legteljesebb sebészi eltávolítás, de központi idegrendszeri elhelyezkedése és infiltratív jellege miatt teljes eltávolítása gyakorlatilag lehetetlen. Emiatt a műtét után kemoterápiát és/vagy sugárterápiát is végeznek. Azonban a GBM rendkívül ellenálló a kemo- és sugárterápiákkal szemben, így a molekulárisan célzott kezelések kidolgozása ezen a területen is kiemelt figyelmet kap [15].

Patomechanizmus

Az alacsony grádusú asztrocitómákra jellemző a szomszédos agyi struktúrák diffúz inváziója, ebből származik az a tulajdonságuk, hogy szinte mindig kiújulnak. Erre a kiújulásra jellemző, hogy gyakran a tumor egy magasabb grádusára való áttéréssel együtt történik, míg végül kialakulnak a GBM-re jellemző biológiai és szövettani jellemzők. Más glioblasztómák nagyon gyorsan fejlődnek ki (azaz egy kevésbé rosszindulatú prekursor elváltozás klinikai, radiológiai vagy morfológiai bizonyítékai nélkül), ezeket elsődleges vagy de novo glioblasztómáknak nevezik. Az elsődleges és másodlagos asztrocitómák megkülönböztetését klinikailag nem használják rutinszerűen. Ennek oka, hogy a két típus megkülönböztetése szövettanilag nem triviális. Széles körben elfogadott azonban, hogy a primer glioblasztómák sokkal gyakoribbak [16]. A legtöbb rákos megbetegedéshez hasonlóan a GBM karcinogenezise is többlépcsős folyamat, melyben több gént is azonosítottak, ezek vagy protoonkogének vagy tumor szuppresszor gének. A protoonkogének funkcionyerése szabályozatlan jelátvitelt és ezáltal túlzott sejtnövekedést okozhat. GBM esetén tipikus példák a vérlemezke eredetű növekedési

faktor receptor (PDGFR) valamint az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) [16]. A funkciójukat vesztett tumor szuppresszor gének jellegzetes példája a TP53 [16].

A GBM molekuláris profilja

Az asztrocitiómák különböző fokozataihoz különböző molekuláris változások társulnak. Ezen belül a IV. grádusú (GBM) tumorok a hasonló szövettan ellenére is különböző genetikai elváltozásokat és ennek következtében változatos molekuláris profilokat mutatnak, ami prognosztikai jelentőséggel bír [16]. A leggyakoribb (60-80%) genetikai eltérés mind primer mind szekunder GBM esetében a 10-es kromoszóma hosszú karjának heterozigótaság vesztese (LOH 10q25-qter) [17]. Az EGFR amplifikációja és a foszfátáz és tenzin homológ gén (PTEN) mutációi az elsődleges glioblasztómákra jellemző genetikai elváltozások, míg a TP53 mutációk korai és gyakori genetikai elváltozások a másodlagos glioblasztómákhoz vezető tumorevolúcióban. Ezek az elváltozások néha prognosztikai markerként használhatók. A GBM-ben számos egyéb prognosztikai markert azonosítottak, mint például az O6-metilguanin-DNS-metiltransferáz (MGMT) promóterének metilációs státusza, az izocitrát-dehidrogenáz enzim 1/2 (IDH1/2) mutációi, a glioma-CpG-sziget-metilátor fenotípus (G-CIMP) és egyéb gének funkciónyeréses/vesztéses mutációi [16, 18], beleértve az EGFR-gént hordozó 7p kromoszómaállomány megtöbbszöröződését [19, 20].

Az emlőtumrok

Az emlőtumor nőkben a leggyakoribb tumoros elváltozás, amely a teljes populációt vizsgálva a 3 leggyakoribb tumortípus egyike [21] Tudományos szempontból az emlőtumrok legalább 10 csoportra oszthatóak [22]. Az osztályozásban klinikai szempontból legfontosabb markerek az ösztrogén receptor, a progeszteron receptor és a humán epidermális növekedési faktor 2 (HER2) receptor kifejeződése. E tényezők mindegyike befolyásolja az invazív emlőrákban szenvedő betegek prognózisát, és a kezelési lehetőségek egyénre szabására szolgál [23]. Az emlőtumrok molekuláris profil szerinti osztályozása és az erre alapozott új kezelési irányok az elmúlt évtizedekben nagyban hozzájárultak a betegség mortalitásának csökkenéséhez [24]. Ennek ellenére gyakran előforduló jelenség, hogy a kezdeti pozitív terápiás reakciót követően a tumor kiújul és rezisztensé válik a terápiára. A jelenség mögött a megváltozott szignál utak és molekuláris kölcsönhatások mellett gyakran a tumor össejtek állnak[25].

Az epidermális növekedési faktor receptor család

Az EGFR az eritroblasztos leukémia B receptor tirozinkináz család (ErbB) tagja, ErbB1 néven is ismert. A család további tagjai az ErbB2 (más néven humán epidermális növekedési faktor 2: HER2), ErbB3 és ErbB4 [26, 27].

A EGFR jelentősége glia tumorokban

Az EGFR-amplifikáció különleges jelentősége abban keresendő, hogy ez a második leggyakoribb genetikai elváltozás, amely az összes GBM 34%-ában fordul elő [28], továbbá ígéretes terápiás célpont [29, 30]. Az EGFR egy receptor tirozinkináz, amelynek jelátviteli útvonalai a sejtek számos funkcióját befolyásolják, beleértve a növekedést, a migrációt és a túlélést. Az EGFR specifikus ligandok, például az epidermális növekedési faktor (EGF) és a transzformáló növekedési faktor alfa ($TGF\alpha$) kötődése révén aktiválódik. Aktiválódást követően az EGFR dimerizálódik vagy egy másik EGFR-rel homodimert alkotva, vagy az ErbB család egy másik tagjával heterodimert alkotva [31]. A dimerizációt követően az EGFR molekulák transzfoszforilálják egymást azok intracelluláris tirozin aminosavmaradékaikon. Ez aktivációt és jelátvitelt vált ki számos más fehérje által, amelyek a foszforilált tirozin aminosavmaradványokhoz saját foszfortirozin kötő (PTB vagy SH2) doménjeiken keresztül kapcsolódnak. Ezek a fehérjék számos jelátviteli kaszkádot indítanak el, amelyek fehérjeszintézist, sejtmigrációt, adhéziót, sejtproliferációt és antiapoptózist eredményeznek. Ezeknek a sejtválaszoknak a kialakításában, különböző enzimek játszanak központi szerepet, egy példa erre a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) családja, amely leginkább a sejtosztódás elősegítésében játszik szerepet. Az EGFR által aktivált másik fontos jelátviteli útvonal szintén nagy jelentőséggel bír a daganatellenes terápiák szempontjából, ez a PI3K-Akt/PKB (foszfatidilozitol-3-kináz - Akt/protein kináz B) túlélési útvonal. Az Akt/PKB egy növekedési faktorok által szabályozott szerin/treonin kináz. A PI3K által létrehozott foszfatidilinozitol-3,4,5-trifoszfát az Akt-ot a plazmamembránhoz rekrutálja, ahol az további kinázok, köztük a foszfoinozid-függő kináz 1 (PDK1) általi foszforiláció révén aktiválódik. Az aktivált Akt a Bad és a kaszpáz-9, valamint a FOXO3A transzkripció faktor inaktiválásán keresztül gátolja a különböző stresszhatások, köztük a kemoterápiás szerek által kiváltott apoptózist, és elősegíti a sejtek túlélését [32, 33]. Az EGFR kináz doménje más szomszédos receptorok tirozin-oldalláncait is képes foszforilálni, és maga is hasonló módon aktiválódhat más tirozinkinázok által. Kimutatták például, hogy az EGFR képes foszforilálni a PDGFR β -t, amely egy másik receptor-tirozinkináz alcsalád tagja, és ilyen módon aktiválni azt [34]. Továbbá

kimutatták, hogy az EGFR nemcsak más receptor-tirozinkinázokkal, hanem teljesen más családba tartozó receptorokkal, például a G-fehérje kapcsolt receptorokkal is képes kölcsönhatásba lépni [35]. A sejtciklusban betöltött ilyen befolyásos szerepe miatt nem meglepő, hogy az EGFR génamplifikációja igen széles körben jelen van számos ráktípusban, például tüdő- és emlőrákban [36, 37]. Ami a GBM-et illeti, jól dokumentálták, hogy az EGFR funkciónyerése a tumor kialakulásának gyakori oka. De az EGFR nem csak a karcinogenezisért lehet felelős, azt is kimutatták, hogy overexpressziója korrelál a gliomák sugárterápiával szembeni rezisztenciájával [38].

A HER2 jelentősége emlőtumorokban

A HER2 jelátvittele hasonló az EGFR-hez az aktivált jelutak szempontjából, azonban nem igényel ligandumot az aktív konformáció és következményes dimerizáció eléréséhez. Mind homo-, mind heterodimerjei hatékonyan aktiválják a sejtek osztódását és migrációját, így tumorok patogenezisében betöltött szerepe kiemelkedő [39]. Az emlőtumorok nagyjából 20%-a HER2 pozitív [40]. Mivel egyéb szövetekben kifejeződése elhanyagolható, kiváló molekuláris terápiás célpont, ennél fogva felfedezése óta ez az egyik legátfogóbban tanulmányozott tumorantigén [41].

A HER2 volt az első olyan molekuláris célpont, ami ellen a szolid szervi daganatok terápiájában humanizált antitest, a trastuzumab (Herceptin) használatát engedélyezték. A kemoterápiás szereket trastuzumabbal együtt alkalmazva sokkal jobb hatást lehetett elérni, mint a kemoterápia egyedüli alkalmazása esetén; a túlélési idő megnőtt, a halálozás kockázata mintegy 20%-al csökkent [42]. Ezen javulás ellenére a HER2 pozitív emlőtumorok közel 30%-ában előforduló jelenség, hogy a kezdeti terápiás sikert követően a tumor rezisztenssé válik a kezelésre. Ilyen esetekben a HER2 státusz vizsgálata és a HER2 jelátvitelének, internalizációjának analízise befolyásolhatja a további terápiát. Az egyik, még kevésbé kiaknázott lehetőség a poliklonális antitestterápia, mely a monoklonálisnál hatékonyabb leszabályozást tesz lehetővé hiperkeresztikötés útján [43]. A másik, egyre népszerűbb megközelítés az antitest-gyógyszer konjugátumok (ADC) alkalmazása, melyek egy monoklonális antitestből és a hozzájuk kötött erős citotoxikus hatású gyógyszerből állnak [44, 45]. A második generációs ADC-k, például a trastuzumab deruxtecan bevezetésével lehetségessé vált az alacsony HER2 expressziójú tumorok sikeres kezelése is [46]. Azokban az esetekben, ahol a szabadon diffundáló antitest tumorsejtekhez való kötődését az extracelluláris mátrix gátolja, biztató eredményeket értek el a trastuzumab egyláncú variábilis fragmentumát kiméra antigén receptorokban (CAR) hordozó génmódosított T sejtekkel [47].

Az integrinek

Az extracelluláris mátrix (ECM) fontos tényező a tumorbiológiában, amely befolyásolhatja a tumorsejtek sorsát. Az ECM topográfiája és mechanikai tulajdonságai támpontokat nyújtanak a beágyazott sejtek számára [48]. Lényeges, hogy a sejtek megtalálják a külvilággal való kommunikáció módját, és képesek legyenek a környezetükben bekövetkező változásokat érzékelni és reagálni rájuk. Ennek egyik kiemelkedően fontos szereplője az integrin család [48, 49]. Az integrinek heterodimer fehérjék, amelyek egy alfa és egy béta alegységből állnak. Az integrin α és β alegységeknek számos különböző izoformája ismert. A különböző α alegységek különböző β alegységekkel képesek dimert alkotni, így nagyszámú lehetséges integrin dimer létezik. Az integrinek két funkcióval rendelkeznek, abban az értelemben, hogy a sejteket az ECM-hez rögzítik, valamint jeleket továbbítanak az ECM-ből a sejtek felé. Az integrinek többek között a fibronectin, a kollagén és a laminin ECM komponensekhez kötődhetnek. Az integrinek (pl. az $\alpha 5 \beta 1$ heterodimer) különböző fehérjékkel multimer klasztereket alkotnak fokális adhéziós komplexekben. Az ilyen klaszterek fontos alkotó eleme a fokális adhéziós kináz (FAK), amely antiapoptotikus jelátvitelt indít el [50]. Az integrin mediált adhézió a fibronectinhez egyszerre eredményezi az src-kináz aktiválódását és a PI3K-termékek felhalmozódását, valamint az ebből következő downstream szignalizációt a Raf-1, Mek-1, Erk-2 és Akt/PKB kinázok által [50]. Mivel az integrinek ennyire fontos szerepet töltenek be az antiapoptotikus jelátviteli folyamatokban, nem meglepő, hogy az integrinek túlzott expressziója hozzájárulhat a tumor növekedéséhez és a terápiás rezisztenciához. Ami a GBM-et illeti, az $\alpha 5 \beta 1$ integrin esetében már kimutatták, hogy hozzájárul a GBM temozolomid kezeléssel szembeni rezisztenciájához [51].

Az epidermális növekedési faktor receptor és integrinek kölcsönhatásai

Mivel a GBM mind a kemo-, mind a sugárterápiával szemben rendkívül ellenálló, több kísérletet is tettek a rezisztencia mechanizmusainak feltárására. Többek között megállapították, hogy bizonyos sejtadhéziós molekulák és receptor-tirozinkinázok közötti kölcsönhatás hozzájárulhat a kemo- és sugárrezisztencia kialakulásához [52, 53]. Az egyik ilyen specifikus kölcsönhatás az EGFR és az integrinek között van. Amint azt korábban említettük, az integrinek (pl. az $\alpha 5 \beta 1$ heterodimer) különböző fehérjékből álló multimer klasztereket alkotnak a fokális adhéziós komplexekben, amelyek az apoptózist megakadályozó jelátvitelt képesek létrehozni

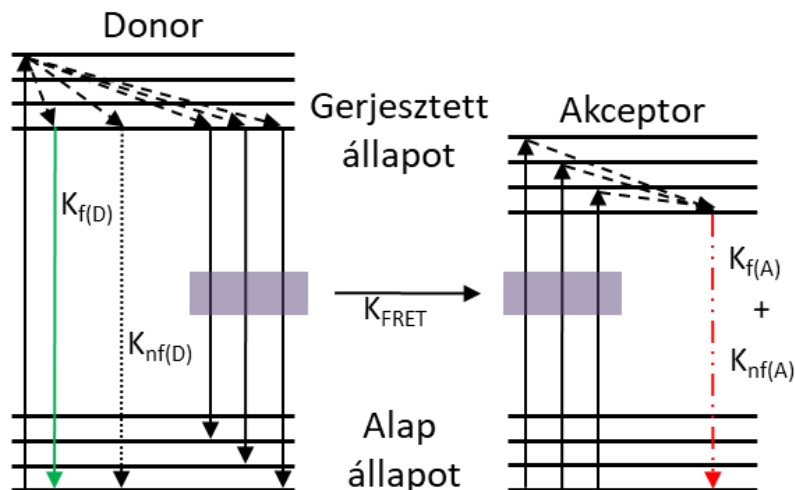
[50, 54]. Az EGFR is előfordul ezekben a struktúrákban, és potenciálisan ugyanazt a túlélési jelátvitelt képes elindítani. Ezen felül az EGFR és a $\beta 1$ integrin- közötti kölcsönhatás fokozza a tumorsejtek leválását a tumorról, azok motilitását és áttétképző képességét. Ezt úgy éri el, hogy az EGFR leszorítja a tenzin-3-at a $\beta 1$ integrin citoplazmatikus régiójáról, ami az aktin citoszkeleton depolimerizációjához vezet [55, 56]. Munkacsoportunk egy korábbi közleményében kimutatta, hogy az EGFR fokozza a $\beta 1$ integrin expresszióját. Megállapították, hogy a $\beta 1$ integrin és az EGFR magasabb expressziójának hatására csökken az EGFR homoasszociáció és növekszik az EGFR- $\beta 1$ integrin heteroasszociáció, továbbá ez a jelenség hozzájárul a GBM sugárrezisztenciájához az AKT antiapoptotikus jelátviteli útvonal aktivációján keresztül. A $\beta 1$ integrin és EGFR heteroasszociációja a magasabb grádusú asztrocitómákban fokozódik, ezért prognosztikai paraméterként használható, mely megbízhatóbb, mint az interakcióban résztvevő molekulák expressziós szintje [57]. Az $\alpha 5$ integrin a $\beta 1$ integrin gyakori dimerizációs partnere, az általuk alkotott dimer az egyik fibronectin receptor, mely hasonló szerepet játszik a GBM kemoterápia rezisztenciájában [51].

Förster rezonancia energiatranszfer

Az 1960-as évek végétől kezdve a Förster rezonancia energiatranszfer (FRET) fokozatosan népszerű eszközzé vált a makromolekulák közötti interakciók meghatározására és összehasonlítására. Erre az 1-10 nm-es távolság tartományban erős távolság függése teszi alkalmassá még olyan optikai eszközökben is, amelyek egyébként a diffrakció miatt kisebb felbontóképességre korlátozódnak [58]. Még a felbontási határt egyre lejjebb és lejjebb szorító, rohamosan fejlődő szuperrezolúciós technikák mellett is rengeteg hely maradt a FRET számára [59].

A FRET fizikája

A FRET egy ütközésmentes, erősen távolságfüggő fotofizikai folyamat. FRET során egy gerjesztett fluoreszcens molekula (donor) energiát ad át egy megfelelő akceptornak, amely a gyakorlati megfontolások miatt általában szintén fluoreszcens tulajdonságú. Az energiaátadás nagy távolságú dipól-dipól csatolási mechanizmuson keresztül nem radiatív módon (foton keletkezése nélkül) történik (2. ábra) [60].

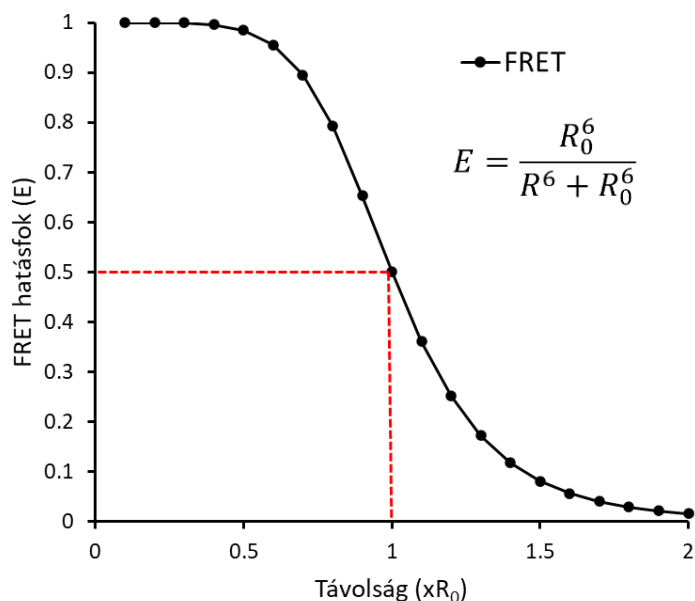


2. ábra. A FRET Jablonski diagramja

A gerjesztési energiát a donor és akceptor elektronjai nyelik el, ennek során alapállapotból gerjesztett állapotba kerülnek. A gerjesztett állapotból alap állapotba fluoreszcencián keresztül a donor $K_{f(D)}$, az akceptor $K_{f(A)}$ sebességi állandóval jut. A nem fluoreszcens relaxációs módok összességét a $K_{nf(D)}$ és a $K_{nf(A)}$ sebességi állandók jellemzik. FRET esetén a donor K_{FRET} valószínűséggel az akceptornak adja át a gerjesztési energiát.

A FRET létrejöttéhez a donor és az akceptor molekuláknak térben megfelelő orientációjúnak kell lennie, valamint a donor emissziós spektrumának átfedésben kell lennie az akceptor abszorpciós spektrumával [61]. Minél nagyobb a spektrális átfedés a két molekula között, annál kisebb a Förster-távolság (R_0), amelyet a donor és az akceptor azon távolságaként határoznak meg, amelynél a FRET hatékonysága 50% (3. ábra) [60].

A FRET hatékonyság (E) távolságfüggése nagyon erős, mivel E a donor és akceptor közötti R távolság negatív 6. hatványától függ (3. ábra).



3. ábra. A FRET távolságfüggése

Az E FRET hatásfok a donor és az akceptor R távolságának függvényében. Az R_0 az az adott festékpárra jellemző távolság, ahol a FRET hatásfok 0,5.

A spektrális átfedésen és a donor-akceptor távolságon kívül azok relatív térbeli orientációja is befolyásolja a FRET hatékonyságot. A legtöbb biológiai mintában azonban, ahol a fluoreszcens molekulák szabad mozgása nem akadályozott, a donor gerjesztett állapotának élettartama alatt a két molekula minden megfelelő orientációt felvehet, ami a relatív orientációs tényező dinamikus átlagolásához vezet, és egy állandót eredményez. A FRET csak a közeli mezőben fordul elő, amely az 1-10 nm-es tartományba esik [62]. Ha a donor és az akceptor közötti távolság kisebb, mint 1 nm, akkor közöttük az energiaátadás nagy valószínűséggel ütközésen keresztül történik, míg ha a távolság eléri az R_0 kétszeresét (szokványos donor-akceptor párok esetén ez ~10 nm), akkor E 2% alá csökken és a donor által kibocsátott fotonemisszió dominál [60].

Mikroszkópos FRET mérési módszerek

A FRET mikroszkópiában történő mérésére számos megközelítés létezik [63], az egyedi molekula mérésektől [64, 65] a több molekula átlagos távolságát leíró megközelítésekig, melyek közül sok nem igényel drága műszereket, és/vagy nem roncsolja a mintát [60, 66, 67]. Ezek közé tartoznak az intenzitás arányokon alapuló módszerek, amelyeket a fluoreszcens fehérje alapú, ismert donor/akceptor sztöchiometriával rendelkező bioszenzorok egyre bővülő területén lehet a legjobban alkalmazni [68], valamint az olyan kvantitatív mérési módok, amelyek a donor/akceptor sztöchiometriától független, kalibrált FRET hatékonyságot

eredményeznek [69]. Ezek közül a fluoreszcencia élettartam-képalkotás (FLIM) természetéből adódóan kvantitatív módszert jelent, de fejlett műszerezettséget igényel [70, 71]. A spektrális átvilágításra korrigált (3 szűrős) FRET módszer egy költséghatékony és sokoldalú megközelítés, amely az áramlási citometriában és a hagyományos fluoreszcenciás mikroszkópiában is alkalmazható. A szintén népszerű akceptor fotoelhalványításos technikával [72, 73] ellentétben ez az eljárás time-lapse és 3D képelemzéssel együtt is alkalmazható [69, 74].

A FRET mérési módszerek korlátai

A FRET mérés minden módszerének fő korlátja a jel-zaj arányban (SNR) keresendő. Az SNR a jel várható értéke osztva annak szórásával. Az összes mért fluoreszcencia-intenzitás zaja tovább terjed az abból számított FRET hatékonyság zajába. Feltételezve a detektált fotonok képpontonkénti Poisson-eloszlását λ várható értékkel, továbbá, hogy a szisztematikus zaj elhanyagolható, akkor az SNR értéke $\sqrt{\lambda}$, így az alacsonyabb intenzitások várhatóan nagyobb mértékben növelik a meghatározott FRET hatásfok bizonytalanságát. Az alacsony SNR-rel rendelkező mintákat a fluoreszcens festékek kvantumhatékonyságának és fotostabilitásának javításával, hatékonyabb detektálással [75], a FRET festékpárok optimalizálásával [76, 77], valamint továbbfejlesztett matematikai és statisztikai megközelítésekkel [78-81] lehet FRET analízisre alkalmassá tenni. A spektrális átvilágításra korrigált FRET módszer alkalmazásával általában akkor lehet következtetni a meglévő molekuláris kölcsönhatásokra, ha ~5%-os vagy annál nagyobb FRET hatékonyságot látunk, ami $\sim R/R_0 < 1,6$ esetén következik be.

FRET mérés és az autofluoreszcencia

Az elérhető SNR-t a sejtek autofluoreszcenciája is korlátozza. Mivel a sejtek autofluoreszcenciája jellemzően kevésbé erős a látható fény vörös tartományában, ezért lehetőleg ebbe a tartományba eső donor-akceptor festékpárokat érdemes használnunk, mint például az Alexa Fluor 546 - Alexa Fluor 647 [82]. Az autofluoreszcencia torzító hatásának csökkentésére felhasználható az is, hogy annak spektruma viszonylag stabil, így bevilágítása a FRET mérés optikai csatornáiba egy független referencia csatorna értéke alapján becsülhető. Ezt a módszert munkacsoportunk korábban sikerrel vezette be áramlási citometriás FRET mérésekre [83]. Leavesley és munkacsoportja továbbfejlesztette a megközelítést a spektrális unmixing bevezetésével [84], és kimutatta, hogy a módszer alkalmazható a kompartmentális jelátviteli mechanizmusok vizsgálatára 3D spektrális képalkotás segítségével [75]. Egy másik,

innovatív megközelítésben Cardoso Dos Santos és munkatársai kvantumdot-okat kombináltak fluoreszcens fehérjékkel a FRET méréshez, miközben a natív fluoreszcenciát fluoreszcens élettartam mikroszkópiában időkapuzást alkalmazva kizárták [85]. Ez utóbbi két megközelítés alkalmazása azonban komoly technikai háttérrel, speciális mikroszkópokat igényel.

Célkitűzések

Irodalmi adatok azt mutatják, hogy számos patológiás folyamatban, beleértve a tumoros elváltozásokat, nem csak a jelátviteli folyamatokban résztvevő molekulák mennyisége, de az azok között mérhető molekuláris interakciók mértéke is fontos diagnosztikai, ill. prognosztikus marker lehet.

A szignalizációs partnerek közötti interakció vizsgálatára kézenfekvő módszer a FRET mérés, aminek pontossága javítható a jelölési és mérési protokollok optimalizálásával, valamint a megfelelő autofluoreszcencia korrekció elvégzésével.

A FRET mérés diagnosztikai elterjedésének komoly gátját képezi, hogy bizonyos mérési eljárások speciális műszereket igényelnek, és jellemzően lassú a képalkotásuk. Ennek megoldása lehet, ha a napjainkban robbanásszerűen fejlődő digitális patológia eszköztárát felhasználva egy automata, konfokális teljes tárgylemez szkennerre implementáljuk a megfelelő FRET mérési eljárást.

Ezek alapján az alábbi célokat tűztük ki:

1. A Panoramic Confocal patológiai szkennerek képalkotásának, kvantitatív mérésekre való alkalmasságának vizsgálata.
2. A megfelelő autofluoreszcencia korrekciós eljárás kidolgozása az intenzitás alapú spektrálisan korrigált FRET mérésekhez.
3. A digitális patológiában megvalósított FRET mérés hagyományos konfokális mikroszkópos méréssel történő összehasonlítása.

Anyagok és módszerek

A külön nem jelölt vegyszerek a Sigma Aldrich termékei. Amennyiben másképp nincs jelölve, az anyagok tárolása 4 °C-on történt.

Antitestek konjugálása fluoreszcens festékekkel

A Trastuzumab (Herceptin®) és Pertuzumab (Perjeta®) HER2 ellenes antitestek a Roche termékei. A TS2/16.2.1 anti- β 1 integrin (hibridóma: ATCC cat# HB-243); BIIG2 anti- α 5 integrin (hibridóma: DSHB AB_528155); és ab528 anti- EGFR (hibridóma: ATCC cat# HB-8509) antitesteket laborunkban állítottuk elő hibridóma felülűszóból. Ezeket egyes esetekben direkt immunofluoreszcens jelöléshez Alexa Fluor 546 (ThermoFisher cat# A-20002) és Alexa Fluor 647 (ThermoFisher cat# A-20006) monofunkcionális aminreaktív festékekkel konjugáltuk, a festék gyártói protokollja szerint. A jelölt antitesteket Sephadex G50 (cat# 9048-71-9) oszlopon tisztítottuk. A jelölt antitest oldatok fehérje és festék koncentrációját NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel határoztuk meg.

Fluoreszcens gyöngyök PSF meghatározásához

A PS-Speck gyöngyöket (Thermo Fisher/Invitrogen cat# P7220) poli-L-lizin bevonatú fedőlemezre tapasztottuk. A négyszögletes fedőlemezeket (24 x 40 mm, Thermo Fisher) acetonnal zsírtalanítottuk, poli-L-lizin (cat# P1666) oldatba helyeztük 2 órára, majd megszáritottuk. A PS-Speck törzsoldatból 2 μ l-t mértünk 500 μ l BSA VWR (9048-46-8) 1%-os desztillált vizes oldatába, ezt az oldatot automata pipettával felvittük a fedőlemezre, majd egy pipettaheggyel egyenletesen eloszlattuk. Ezt követően hagytuk a fedőlemezt újra megszáradni, majd Mowiol antifade (0,1 M TrisHCl, pH 8,5, 25% (w/v) glicerin és 10% Mowiol 4-88 Polysciences (cas# 9002-89-5)) segítségével tárgylemezhez rögzítettük. A Tetraspeck 0,5 μ m-es gyöngyök (Thermo Fisher/Invitrogen cat# T7281) esetében ugyanígy jártunk el, azzal az eltéréssel, hogy itt nem volt szükség poli-L-lizin bevonatra.

Sejtkultúra és fluoreszcenciás jelölés

Minták dekonvolúció teszteléséhez

Az A172 glioblasztóma sejteket (ATCC cat# CRL-1620) 10 % FBS-sel (fötális borjú szérum; VWR: FB-1090/500) kiegészített DMEM tápoldatban (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; 4,5 g/l glükóz, 3,7 g/l NaHCO₃ tartalommal, pH 7,35) ThermoFisher (cat# 12800082), 37 °C-on, 5 % CO₂ mellett, párasított inkubátorban 2 napon át sterilizált 25 mm átmérőjű kerek üveg fedőlemezeken (0,17 mm vastagság) tenyésztettük. A sejtkultúra immunfluoreszcenciás jelölése előtt 20 perccel 100 nM Mito Tracker Red-et (Thermo Fisher cat# M7512) adtunk 10 % FBS-sel kiegészített DMEM-ben a sejtekhez. A sejteket jégen 3-szor mostuk 4 mM glükózzal kiegészített HEPES (20 mM HEPES (N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etánszulfonsav); pH 7,2; 120 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM CaCl₂; 1,5 mM MgSO₄; 5 mM Na-piruvát desztillált vízben oldva.) pufferrel. Ezután jégen 10 µg/ml HEPES pufferben hígított TS2/16.2.1 (β1 integrin ellenes) antitesttel 25 percig inkubáltuk a sejteket. Az elsődleges antitestet 3-szor 5 percig glükózos HEPES pufferrel mostuk, a mintákat 3 percig acetonnal jégen fixáltuk, majd az acetont szobahőn 3-szor HEPES-sel mostuk. Ezt követően 25 percen keresztül a mintákat szobahőn 5 µg/ml Alexa Fluor 647 konjugált kecske anti-egér IgG-t (H+L), ThermoFisher (cat# A-21235), 0,5 µg/ml DAPI-t Merck (D9564) és 0,5 µg/ml FITC-falloidint tartalmazó HEPES pufferben jelöltük. 3-szor 5 perces HEPES pufferes mosás után a fedőlemezeket Mowiol antifade segítségével tárgylemezhez rögzítettük.

Kontaktlencsén növesztett többsejtrétegű 3D modell

A konjunktíva eredetű többrétegű sejtkultúrákat a [86, 87] hivatkozásokban részletesen leírtak szerint hoztuk létre (etikai engedély száma: IX-R-052/00016-28/2012). A sejteket hordozó kontaktlencsét felszálló aceton sorban (10, 20, 40, 70 és 100%) fixáltuk, majd PBS-sel mostuk. A mintát 2% BSA-t és 0,1% Triton X-100-at (cas# 9036-19-5) tartalmazó PBS-sel 1 órán keresztül permeabilizáltuk és blokkoltuk, majd 90 percen keresztül inkubáltuk a következő primer antitestekkel: 20 µg/ml Alexa Fluor 647 anti-citokeratin 19 IgG Abcam (cat# ab205446), EPR1579Y klón; 5 µg/ml tengerimalac anti-citokeratin 3 IgG Fitzgerald, (cat# 20R-2642) és 5 µg/ml Cy3 konjugált egér anti-vimentin Sigma Aldrich, (cat# C9080), V9 klón. Háromszori PBS/0,05%-os Triton X-100-zal történő mosás után a mintákat 1 µg/ml Alexa Fluor 488 konjugált anti- tengerimalac IgG (H+L), ThermoFisher (cat# A-11073) antitesttel jelöltük 1 órán keresztül, majd újra háromszor mostuk PBS/0,05%-os Triton X-100-zal. A

sejtmagokat 0,01 mg/ml DAPI-val a második mosási lépés során jelöltük. Végül a mintákat 1%-os formaldehiddel Molar Chemicals (cas# 50-00-0) PBS-ben 10 percig fixáltuk, leöblítettük és Mowiol antifade segítségével a kontaktlencsét fedő- és tárgylemez közé rögzítettük. (A minta készítése társszerzők munkája.)

Immunfluoreszcenciás jelölés szuszpenzióban FRET méréshez

Az A172 glioblasztóma (ATCC cat# CRL-1620) és SK-BR-3 emlőrák (ATCC cat# HTB-30) sejteket 10 % FBS-sel kiegészített DMEM-ben, 37 °C-on, 5 % CO₂ mellett, párasított inkubátorban 2 napon át T75-ös sejtenyésző flakában növesztettük. A flakát 4 mM glükózzal kiegészített HEPES pufferrel öblítettük, majd 1 ml sterilizált PBS-ben 0,5 g/dm³ tripszinnel (cat# 27250018) és 0,2 g/dm³ EDTA-val (cat# 15576028) kezeltük 5 percig 37 °C-on. A felvált sejteket összegyűjtöttük és 5 percig 4 °C-on centrifugában, 4 mM glükózzal kiegészített HEPES pufferben 200 g-n mostuk standard 15 ml-es centrifugacsőben. A felülúszót eltávolítottuk, az üledéket újra szuszpendáltuk és 1 ml 1%-os formaldehid és HEPES-puffer keverékében 15 percig szobahőmérsékleten fixáltuk. A sejteket ismét 5 percig mostuk HEPES pufferben szobahőmérsékleten. Az A172 sejteket 30 percig szobahőmérsékleten 20 µg/ml koncentrációjú ab528 antitesttel jelöltük, az SK-BR-3 sejteket pedig ugyanilyen körülmények között jelöltük trastuzumabbal, majd HEPES pufferrel centrifugában 200 g-n mostuk. A másodlagos fluoreszcenciás jelöléshez az A172 sejteket különböző arányban Alexa Fluor 546 konjugált kecske anti-egér IgG (H+L), ThermoFisher (cat# A-11030) vagy Alexa Fluor 647 konjugált kecske anti-egér IgG (H+L), ThermoFisher (cat# A-21235) antitestekkel jelöltük, összesen 10 µg/ml koncentrációban. Az SK-BR-3 sejteket ugyanígy jelöltük, kivéve, hogy kecske anti-humán antitesteket használtunk: Alexa Fluor 546 konjugált kecske anti-humán IgG (H+L), ThermoFisher (cat# A-21089; Alexa Fluor 647 konjugált kecske anti-humán IgG (H+L), ThermoFisher (cat# A-21445). A 30 perces szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a sejteket a korábban leírt módon mostuk, majd az üledéket 150 µl 1% formaldehidet tartalmazó HEPES pufferben újra szuszpendáltuk. A nem jelölt kontrollokat ugyanezzel a protokollal, de az antitestek elhagyásával készítettük. A Protein G-vel bevont gyöngyök (Bangslabs Protein G Antibody Binding Beads cat# 554) jelölése hasonló protokollt követett, de az első fixálási lépés alkalmazása nélkül. A primer antitestek koncentrációja ebben az esetben 100 µg/ml volt. Minden mintából (sejtek és gyöngyök) 20 µl-t összekevertünk 20 µl Mowiol antifade-del. Ebből a keverékből 30 µl-t egy Superfrost üveg tárgylemezre pipettáztunk, és acetonnal tisztított 12 mm átmérőjű, kerek üveg fedőlemezzel (0,17 mm vastagság) fedtük le. A tárgylemezeket egy éjszakán át szobahőmérsékleten szárítottuk, majd 4 °C-on tároltuk. A

tárgylemezokről Zeiss LSM 880 lézerpásztázó mikroszkóppal készítettünk felvételeket. A maradék mintaszuszpenziókat ACEA NovoCyte RYB áramlási citométerrel mértük.

Adherens sejtek fluoreszcenciás jelölése FRET méréshez

Az A172 glioblasztóma (ATCC cat# CRL-1620) és SK-BR-3 emlőrák (ATCC cat# HTB-30) sejteket 10 % FBS-sel kiegészített DMEM-ben, 37 °C-on, 5 % CO₂ mellett, párasított inkubátorban 2 napon át 12 mm átmérőjű kerek üveg fedőlemezeken tenyésztettük. A fedőlemezeket a sejtenyészítő médiumból paraffinnal bevont jéghideg fémfelületre helyeztük, és 4 mM glükózzal kiegészített HEPES pufferrel mostuk 5 percig. A sejteket 4°C-on 15 percig fixáltuk 1 %-os formaldehiddel HEPES-pufferben, majd szobahőmérsékleten háromszor mostuk HEPES-pufferrel (2, 3 és 7 percig). Minden ezt követő lépést szobahőmérsékleten végeztünk. A direkt jelöléshez a sejteket donor és akceptor festékekkel konjugált antitestekkel jelöltük, mindkettőt 20 µg/ml végkoncentrációban alkalmaztuk, 2% BSA-t tartalmazó HEPES pufferben 30 percig, a következő kombinációkkal: ab528-Alexa Fluor 546 + BIIG2-Alexa Fluor 647; ab528-Alexa Fluor 647 + BIIG2-Alexa Fluor 546; ab528-Alexa Fluor 546 + TS2-Alexa Fluor 647; ab528-Alexa Fluor 647 + TS2-Alexa Fluor 546. Az Intermolekuláris FRET mérések pozitív kontrolljaként az ab528-Alexa Fluor 546, BIIG2-Alexa Fluor 546 és TS2-Alexa Fluor 546 primer antitesteket ugyanígy használtuk, 20 µg/ml végső koncentrációban. Ezután a jelölési lépés után a sejteket ismét háromszor (2, 3 és 7 percig) mostuk HEPES pufferrel. Ezt egy hasonló jelölési ciklus követte a primer ellenanyaghoz megfelelő 10 µg/ml Alexa Fluor 647 konjugált kecske anti-egér (ThermoFisher cat# A-21235), vagy anti-patkány (ThermoFisher cat# A-21247) IgG (H+L), másodlagos ellenanyaggal, amelyet 2% BSA-t tartalmazó HEPES-ben hígítottunk és 30 percig hagytunk a mintán. Az utolsó mosást 1 %-os HEPES pufferben lévő formaldehidben történő 15 perces fixálás követte, majd Mowiolal Superfrost tárgylemezre történő rögzítés. Egyszeresen jelölt és nem jelölt kontrollokat is készítettünk a korrekciós faktorok és az emissziós spektrumok meghatározásához.

A trastuzumab-pertuzumab jelölésre alapuló intramolekuláris FRET mintákat a fenti direkt jelölési protokollban leírtak szerint készítettük a következő antitest kombinációkkal: trastuzumab-Alexa Fluor 546 + pertuzumab-Alexa Fluor 647; pertuzumab-Alexa Fluor 546 + trastuzumab-Alexa Fluor 647.

A fagyasztva metszett N87 sejtvonal eredetű minták egy kezdeti PBS + 0,05% Triton X-100-at tartalmazó rehidrációs lépést leszámítva szintén ugyanezzel a protokollal készültek.

Lézerpásztázó konfokális mikroszkópia

Minden konfokális mikroszkópos mérésünket egy LSM 880 lézerpásztázó konfokális mikroszkóppal (Carl Zeiss GmbH, Jena, Németország) végeztük, egy 40× C-Apochromat vízimmerziós objektív (NA=1,2, cikkszám: 421767-9971) segítségével.

Fényhatékonyság és nagyméretű 3D minták összehasonlító mérései

A fényhatékonyság összehasonlító méréseit, valamint a nagyméretű 3D minták összehasonlító mérését konfokális lézerpásztázó mikroszkóppal végeztük. A DAPI gerjesztése 405 nm-en, az Alexa Fluor 488-é 488 nm-en, a Cy3-é 543 nm-en és az Alexa Fluor 647-é 633 nm-en történt. A fluoreszcencia emissziót egy 32 elemű GaAsP detektor segítségével spektrálisan felbontottuk és optimalizáltuk a detektálás hullámhossz tartományait úgy, hogy szekvenciális gerjesztés mellett minimális legyen a csatornák közötti átvilágítás. Minden felvétel esetében Nyquist szerinti optimális mintavételezést alkalmaztunk, a konfokális apertúra pedig teljesen nyitott, vagy 1 Airy egység volt.

Autofluoreszcencia karakterizálása

A mérések során a konfokális apertúra 1 Airy egység volt, a pixelméretet pedig 100 nm-re állítottuk be (Nyquist-alapú optimális mintavételezés). Az autofluoreszcencia spektrális felbontásához a festetlen sejtek emisszióját a mikroszkóp 32 elemű GaAsP spektrális detektorán oldottuk fel 8,92 nm-es lépésmérettel. Szekvenciálisan 488, 543 és 633 nm-es lézer gerjesztés mellett is felvettük a spektrumokat.

FRET mérések

A FRET mérésekhez a mikroszkópot sorpásztázó üzemmódban használtuk, és az összes fluoreszcens emissziós csatornát a műszer 32 csatornás GaAsP detektorával egyidejűleg detektáltuk. A konfokális apertúra 1 Airy egység volt, a pixelméretet pedig 100 nm-re állítottuk. Az autofluoreszcencia csatornában a gerjesztés 488 nm, a detektálási tartomány pedig 499-535 nm volt. A donor és a transzfer csatornát egyidejűleg 543 nm-es lézerfényvel gerjesztettük és 553-615 nm, illetve 651-695 nm között detektáltuk. Az akceptor csatornát 633 nm-en gerjesztettük és a 651-695 nm-es tartományban detektáltuk.

Áramlási citometria

Az áramlási citometriás fluoreszcencia- és FRET méréseket NovoCyte RYB (Acea Biosciences / Agilent, Santa Clara, CA) citométerrel végeztük. Az autofluoreszcencia méréséhez a műszer előre meghatározott FITC-H csatornáját használtuk (488 nm gerjesztés és 515-545 nm detektálás); a donor csatorna a PE-H volt (561 nm gerjesztés és 576-596 nm detektálás); a transzfer csatorna a PE-Cy5 mPlum-H (561 nm gerjesztés és 650-670 nm detektálás); az akceptor csatorna az APC-H (640 nm gerjesztés és 650-670 nm detektálás). A kiértékelés, kapuzás és a korrekciós faktorok meghatározása az FCS Express (De Novo Software) v7 programmal történt. A kapuzott FRET mintákat CSV formátumba exportáltuk, a FRET-számítási képleteket (lásd alább) MS Excelben alkalmaztuk, majd az újonnan létrehozott FRET adatokat vizualizálás céljából visszaimportáltuk az FCS Express-be.

A Panoramic Confocal vizsgálata

A pontkiterjedési függvény meghatározása és dekonvolúció

A Panoramic Confocal konfokális pontkiterjedési függvényét PS Speck gyökkel határoztuk meg. A mikroszkóp minden csatornájában 20× és 40× objektívvel is 100 szeletet készítettünk 200 nm-es Z-lépésközzel. A PSF szimmetriaeloszlási térképét és az elméleti PSF méreteit a PSFj Fiji plugin [13] segítségével állítottuk elő. A PSF szimmetriáját a legkisebb és a legnagyobb laterális, félmagasságnál mért átmérők (FWHM, full width at half maximum) arányaként határoztuk meg. A mért képekből a PSF létrehozásához a Huygens szoftvert (SVI, NL) használtuk. Minden csatornában 25 gyöngyöt vágunk ki és átlagoltunk, majd az átlagolt gyöngyökből létrehoztuk a PSF-et. A biológiai mintákat 100%-os gerjesztési intenzitással és 20 ms expozíciós idővel vettük fel a DAPI-csatornában, és 200 ms expozíciós idővel minden más csatornában. A dekonvolúciót a Huygens Classic Maximum Likelihood Estimation (CMLE) algoritmussal végeztük, maximum 50 iterációra korlátozva azt.

A tárgyasztal stabilitásának és relokalizációs pontosságának mérése

Az 500 nm átmérőjű TetraSpeck gyöngyöket a Panoramic Confocal widefield képalkotási módjában vettük fel. A stabilitás vizsgálatához 120 percen keresztül percenként képeket vettünk fel ugyanarról a látótérrel. A relokalizációs pontosság méréséhez 10-10 képet készítettünk úgy, hogy minden kép rögzítése után elmozdítottuk a tárgyasztalt egy látótérnyit,

majd visszaléptettük a helyére. Ezt a műveletsort mindkét transzlációs tengely mentén mindkét irányban elvégeztük. Minden esetben 15 gyöngy mozgását követtük a TrackMate Fiji plugin [88] segítségével.

A megvilágítás homogenitásának mérése

A megvilágítás homogenitását kék fluoreszcens referencia tárgylemezeken mértük (Ted Pella, Redding, CA, USA, Fluor-Ref, Prod#: 2273). A 20× objektív esetében a DAPI, FITC, TRITC és Cy5 csatornákat a következő expozíciós időkkel és gerjesztési intenzitásokkal képeztük le: 20 ms / 4%; 20 ms / 70%; 100 ms / 100%; 20 ms / 50%. A 40× objektív esetében a vonatkozó adatok a következők voltak: 20 ms / 8%; 40 ms / 100%; 300 ms / 100%; és 60 ms / 100%. Minden csatornához 20 képet rögzítettünk és a zaj csökkentése érdekében átlagoltuk azokat.

A mérési linearitás meghatározása

A műszer intenzitás válaszában linearitását InSpeck green linearitás kalibrációs gyöngyökkel (ThermoFisher, cat# I14785) mértük. Az InSpeck green hat különböző intenzitású gyöngypopulációt tartalmaz, melyek intenzitás arányait ismerjük. A gyöngyöket 15 fókusz síkban, egymástól 1,2 µm nagyságú lépésközzel mértük. Az expozíciós idő és a gerjesztési teljesítmény 160 ms, ill. 100% volt a TRITC csatornában widefield üzemmódban, és 20 ms ill. 4% a FITC csatornában konfokális üzemmódban. A csatornák váltása a két üzemmód között azért volt szükséges, hogy a teljes intenzitástartományt azonos expozíciós idővel és megvilágítással lehessen leképezni. Az elkészült felvételeken átlagolt intenzitású Z projekciót végeztünk, majd az átlagos háttérrel kivontuk. Az egyes gyöngyök intenzitását Fiji programban megmértük, majd a mért értékeket átlagoltuk mind widefield, mind konfokális képalkotási módban.

A szenzitivitás meghatározása

A műszer érzékenységét QIFIKIT kalibrációs gyöngyökkel határoztuk meg. A készlet 5 gyöngypopulációt tartalmazott, amelyek felületére különböző számú (2200; 14000; 48000; 169000; 724000) egér IgG antitestet konjugáltak. 30 µl QIFIKIT gyöngyöt szortericsőben, 20 percig szobahőmérsékleten, 10 µg/ml koncentrációjú Alexa Fluor 488 konjugált kecske anti-egér IgG-vel (H+L), ThermoFisher (cat# A-32723) HEPES pufferben jelöltünk. Ezt követően centrifugában 300 g -n HEPES-sel mostuk a mintát. A felülúszót eltávolítottuk, majd a gyöngyöket 100 µl HEPES pufferben újra szuszpendáltuk, ezt a szuszpenziót egy éjszakán

keresztül tárgylemez felületére szárítottuk, majd Mowiolal fedőlemezt rögzítettünk a tárgylemezhez. A mintáról 100%-os gerjesztési intenzitással és 20 ms expozíciós idővel widefield módban, illetve 600 ms expozíciós idővel konfokális módban felvételeket készítettünk. A háttér kivonása után widefield módban 1190 gyöngy, konfokális módban 3196 gyöngy intenzitását határoztuk meg Fiji programban, majd a mért értékeket átlagoltuk.

A fényhatékonyság meghatározása

A gerjesztési intenzitásokat az optikai út több pontján is meghatároztuk egy Thor Labs s170C mikroszkópos tárgylemez formátumú fényteljesítmény-mérővel, 365, 488, 543 és 633 nm-t beállítva a DAPI, FITC, TRITC és Cy5 csatornák esetében. Az objektíveken és az Aurox cc88 forgó lemezén bekövetkező fényvesztéséget MS Excelben számítottuk ki. Az emittált fény detektálási hatékonyságának meghatározásához FocalCheck fluoreszcencia mikroszkóp teszt lemezek (Thermo Fisher/Molecular Probes cat# F36909) 1 μm átmérőjű gyöngyeit használtuk. A gyöngyökről a Panoramic Confocallal és referenciaként a Zeiss LSM 880 mikroszkóppal 200 nm-es lépésközzel harminc fókuszsíkot vettünk fel. A felvételeken Z projekciót végeztünk, majd levontuk a háttérét és meghatároztuk a gyöngyök átlagos intenzitását. Ezeket az átlagos intenzitásokat összehasonlítottuk a különböző mikroszkópok és képalkotási módok között.

Standard tárgylemezek készítése FRET méréshez

A standard tárgylemezek létrehozásához 5 μl fluoreszcens festékkel konjugált antitest oldatot 45 μl oldószerben hígítottunk, amely 30% ban tartalmazott 1 m/m% BSA-t PBS-ben és 70% Mowiol-t. Ebből a hígított ellenanyagból 30 μl -t pipettáztunk egy tárgylemezre, és acetonnal tisztított 12 mm átmérőjű, kerek üveg fedőlemezzel (0,17 mm vastagság) fedtük le. A mintákat egy éjszakán át szobahőmérsékleten szárítottuk, majd ezt követően 4 °C-on tároltuk. A műszerháttér meghatározásához nem fluoreszkáló tárgylemezt készítettünk úgy, hogy az 5 μl antitest-konjugátumot ugyanolyan mennyiségű 1 m/m%-os BSA-val helyettesítettük PBS-ben.

Képelemzés

Minden képelemzés a Fiji [89] program segítségével történt. A korábban a laboratóriumunkban a hagyományos intenzitás alapú, spektrálisan korrigált FRET mérés kiszámítására létrehozott plugin-t átírtuk úgy, hogy pixelenkénti autofluoreszcencia-korrekcióra is alkalmas legyen, valamint, hogy nagyobb képhalmazok teljesen automatikus feldolgozását tegye lehetővé és

kompatibilis legyen az ImageJ 2.0-val. Az új plugin a Fiji-n belül a FRET Imaging frissítési oldalán keresztül érhető el.

Pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciós algoritmus

A pixelenként korrigált FRET hatások kiszámításához négy fluoreszcenciás csatornára van szükségünk: Az I_0 egy segédcsatorna, amiben az autofluoreszcencia intenzitását mérjük. Az általunk végzett kísérletekben erre a donor csatornához viszonyítva alacsonyabb hullámhosszú gerjesztést alkalmaztunk. Az I_1 a donor csatorna, ami spektrálisan megfelelő a donor festék detektálására. Az I_2 a transzfer csatorna, amelyben a donor festéknek megfelelő gerjesztés mellett detektáljuk az akceptor emisszióját. Az I_3 az akceptor csatorna, ahol az akceptornak megfelelő hullámhosszú fényrel gerjesztünk, és az akceptor emisszióját detektáljuk. Ez a spektrális elrendezés alkalmassá teszi a módszert Alexa Fluor 488 / 546 és Alexa Fluor 546 / 647 vagy hasonló tulajdonságú festékpárok közötti FRET mérésre.

A kiértékelés során az első lépés minden esetben a műszer háttér levonása. Ennek méréséhez egy olyan tárgylemezt használtunk, aminek mind a 4 csatornában elhanyagolható a fluoreszcenciája.

Az 3-6. egyenletek leírják, hogy milyen komponensekből tevődnek össze a mérések során használt fluoreszcencia csatornában detektált intenzitások. Az AF az autofluoreszcencia az I_0 csatornában. Az I_D és az I_A a FRET nélküli donor, valamint az akceptor intenzitása a saját csatornájukban mérve. Az egyenletek további komponensei kalibrációs faktorok, amelyeket később fejtünk ki részletesen.

$$I_0 = AF + I_D(1 - E) \cdot S_5 + I_A \cdot S_6 + I_D \cdot E \cdot \alpha \cdot \frac{S_6}{S_2} \quad (3)$$

$$I_1 = AF \cdot B_1 + I_D(1 - E) + I_A \cdot S_4 + I_D \cdot E \cdot \alpha \cdot \frac{S_4}{S_2} \quad (4)$$

$$I_2 = AF \cdot B_2 + I_D(1 - E) \cdot S_1 + I_A \cdot S_2 + I_D \cdot E \cdot \alpha \quad (5)$$

$$I_3 = AF \cdot B_3 + I_D(1 - E) \cdot S_3 + I_A + I_D \cdot E \cdot \alpha \cdot \frac{1}{S_2} \cdot epsR \quad (6)$$

Az $epsR$ (7. egyenlet) a donor és akceptor festékek egymás gerjesztési hullámhosszán mért moláris abszorpciós együtthatóinak szorzata, osztva a saját gerjesztési hullámhosszukon mért moláris abszorpciós együtthatókkal. Ez a legtöbb jól használható festékpár esetében elhanyagolható.

$$epsR = \frac{\varepsilon_{A.exc}^D \cdot \varepsilon_{D.exc}^A}{\varepsilon_{D.exc}^D \cdot \varepsilon_{A.exc}^A} \quad (7)$$

Az S_1 , S_3 és S_5 donor festékre jellemző átvilágítási faktorokat a csak donor festéket tartalmazó minta felhasználásával határozzuk meg a 8-10. egyenletekben leírtak szerint.

$$S_1 = \frac{I_2^D}{I_1^D} \quad (8) \quad S_3 = \frac{I_3^D}{I_1^D} \quad (9)$$

$$S_5 = \frac{I_0^D}{I_1^D} \quad (10)$$

Az S_2 , S_4 és S_6 akceptorra jellemző átvilágítási faktorokat a csak akceptor festéket tartalmazó mintán határozzuk meg (11-13. egyenlet).

$$S_2 = \frac{I_2^A}{I_3^A} \quad (11) \quad S_4 = \frac{I_1^D}{I_3^A} \quad (12)$$

$$S_6 = \frac{I_0^A}{I_3^A} \quad (13)$$

A B_1 , B_2 és B_3 értékek az autofluoreszcencia átvilágítását mérik, ezeket jelöletlen sejtes mintákon (Nl) határozzuk meg (14-16. egyenlet).

$$B_1 = \frac{I_1^{Nl}}{I_0^{Nl}} \quad (14) \quad B_2 = \frac{I_2^{Nl}}{I_0^{Nl}} \quad (15)$$

$$B_3 = \frac{I_3^{Nl}}{I_0^{Nl}} \quad (16)$$

Az α paraméter korrigálja az akceptor és donor Q_A és Q_D kvantumhatékonyságának, illetve η_A és η_D detektálási hatékonyságának eltérését. Meghatározásához egy csak donor és egy csak akceptor festéket tartalmazó minta szükséges (17. egyenlet).

$$\alpha = \frac{Q_A}{Q_D} \cdot \frac{\eta_A}{\eta_D} = \frac{I_3^A}{I_2^D} \cdot \frac{B_D}{B_A} \cdot \frac{L_D}{L_A} \cdot \frac{\varepsilon_D}{\varepsilon_A} \quad (17)$$

Ha sejtes mintákat használunk erre a célra, a donor és akceptor festékekkel jelölt molekulák expressziós szintjének állandónak kell lenniük. Ideális esetben ugyanazt az epitópot használjuk, amelyet egyszer donor és egyszer akceptor jelölt antitesttel jelölünk meg. Az I_2^D és az I_3^A paramétereket ezeken a mintákon mérjük, és legalább 5-10 felvétel átlagolása szükséges a megfelelő pontosság eléréséhez. Az L_D és L_A a donor és akceptor festékek átlagos száma

antitestenként. A B_D és a B_A a donor és akceptor konjugált antitest által jelölt receptorok átlagos száma sejtenként. Az ε_D és ε_A a donor és akceptor festék moláris abszorpciós koefficiense a donor gerjesztés hullámhosszán. Az α standard tárgylemezek segítségével is meghatározható, ebben az esetben a B_D és a B_A paraméterek a donor és akceptor konjugált antitestek moláris koncentrációjával egyenlők.

A FRET hatásfok a donor és akceptor antitesttel jelölt mintán mért intenzitásokból a 18. egyenlet szerint számolható

$$E = \frac{A}{\alpha \cdot (\varepsilon_D R - 1) \cdot [B_2 I_0 S_4 + B_1 I_2 S_6 + I_1 (S_2 - B_2 S_6) - B_1 I_0 S_2 - I_2 S_4] + A} \quad (18)$$

ahol az

$$A = S_2 \{ B_2 I_0 + I_1 S_1 + I_3 S_2 - S_2 (B_3 I_0 + I_1 S_3) + B_1 I_0 (S_2 S_3 - S_1) + (B_3 I_0 - I_3) S_1 S_4 + (B_3 I_1 - B_1 I_3) (S_2 S_5 - S_1 S_6) + I_2 [B_1 S_5 - B_3 S_4 S_5 + B_3 S_6 + S_3 (S_4 - B_1 S_6) - 1] - B_2 [I_0 S_3 S_4 + I_3 (S_6 - S_4 S_5) + I_1 (S_5 - S_3 S_6)] \} \quad (19)$$

A FRET hatásfok ismeretében a valós (FRET hiányában, spektrális átfedések nélkül mérhető) donor, akceptor és autofluoreszcencia intenzitást a 20-22. egyenletnek megfelelően számíthatjuk ki.

$$I_D = \frac{1}{1-E} \cdot \frac{I_0 \cdot B_1 - I_1}{B_1 \cdot S_5 - 1} \quad (20)$$

$$I_A = \frac{I_0 \cdot B_3 - I_1 \cdot B_3 \cdot S_5 + I_3 \cdot (B_1 \cdot S_5 - 1)}{B_1 \cdot S_5 - 1} \quad (21)$$

$$AF = \frac{I_1 \cdot S_5 - I_0}{B_1 \cdot S_5 - 1} \quad (22)$$

A FRET pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció nélkül is kiszámítható, ebben az esetben ugyanazokat az egyenleteket használjuk fel, de az S_5 , S_6 és B faktorok értéke 0, így a 18. és a 19. egyenlet a 23. egyenletté egyszerűsödik. Ha nem történik autofluoreszcencia-korrekció, akkor minden csatornából csak a műszer háttérét vonjuk ki (nem autofluoreszcencia korrigált kiértékelés). Lehetőség van továbbá arra, hogy jelöletlen mintákon meghatározzuk az átlagos autofluoreszcencia intenzitást az I_1 , I_2 és I_3 csatornákból, majd ezeket az értékeket mindhárom csatornából konstansként levonjuk. Ez a korábban már alkalmazott módszerünk, amihez a kiértékelő program első változatát fejlesztette munkacsoportunk [74], ezt a módszert átlagos autofluoreszcencia korrekciónak nevezzük.

$$E = \frac{S_2(I_1S_1 + I_3S_2 - S_2I_1S_3 - I_3S_1S_4 + I_2S_3S_4 - I_2)}{\alpha \cdot (\text{epsR} - 1) \cdot (I_1S_2 - I_2S_4) + S_2(I_1S_1 + I_3S_2 - S_2I_1S_3 - I_3S_1S_4 + I_2S_3S_4 - I_2)} \quad (23)$$

Eredmények

I. A Panoramic Confocal automata patológiai szkener tesztelése

A Panoramic Confocal egy automata konfokális patológiai szkener, amely potenciálisan alkalmas lehet molekuláris interakciók gyors és automatizált vizsgálatára. Ennek feltétele, hogy képalkotás során térben stabilan tartsa a mintát, lehetőleg magas fényhatékonysággal rendelkezzen, intenzitás válasza lineáris legyen és elég érzékenyen detektáljon alacsony expressziós szintű fehérjéket is.

I.1. A Panoramic Confocal excitációs teljesítményének és fényhatékonyságának vizsgálata

A Panoramic Confocal excitációs fény teljesítményét megvizsgáltuk 20× és 40× objektívvel a forgó lemez nélkül, és konfokális módban is. A legmagasabb fényerőt a TRITC csatornában mértük (2. táblázat), a kamera maximális kvantumhatásfoka szintén a TRITC csatorna hullámhossz tartományába esik, ezek alapján következtethetünk arra, hogy a mikroszkóp detektálási érzékenysége a TRITC csatornában a legnagyobb.

maximum excitációs fény intenzitás (mW)				
Csatorna	20× objektív		40× objektív	
	widefield	konfokális	widefield	konfokális
DAPI 386/23 nm	9,3	4,1	3,3	1,51
FITC 475/28 nm	69,3	31,1	24,1	11,2
TRITC 550/88 nm	92,1	41,5	31	14,2
Cy5 650/13 nm	62,1	27,4	21,3	9,9

2. táblázat Maximum excitációs fényintenzitás a minta síkjában.

Megvizsgáltuk a különböző optikai komponenseken mérhető fényhatásfokokat is (maradék teljesítmény/bemenő teljesítmény) (3. táblázat). A különböző optikai elemek fényhatásfoka enyhe hullámhossz függést mutat. A forgó lemezen a fény 44-47% -a jut át. A 20× objektív fényhatékonysága 91-98%, a 40× objektív esetében ez csak 32-34%, feltehetően a nagyobb számú optikai elemnek betudhatóan.

excitációs fény intenzitás (maradék/bemenő %)				
Csatorna	konfokális egység után		objektív után	
	20× objektív	40× objektív	20× objektív	40× objektív
DAPI	44,2%	46,0%	91,3%	32,3%
FITC	44,9%	46,5%	97,6%	34,0%
TRITC	45,1%	45,8%	93,9%	31,6%
Cy5	44,1%	46,6%	92,8%	31,8%

3. táblázat A konfokális egység és az objektívek transzmissziója.

A teljes optikai rendszer fényhatékonyságát is vizsgáltuk és összehasonlítottuk egy Carl Zeiss LSM 880 mikroszkópon hasonló körülmények között mért értékekkel (4. táblázat). Számított widefield módban a valós widefield módban (eltávolított forgó lemez) mérhetőhöz képest az intenzitás 29-36 %-a maradt meg azonos expozíciós idő mellett, míg konfokális módban ez az érték 4,1%-4,3 %. A referenciaként használt LSM 880 mikroszkóp esetében a nyitott konfokális apertúrával készült felvételeket tekintettük a Panoramic Confocal widefield módjával ekvivalensnek, míg az egy Airy egységre állított diafragmával készült képeket a Panoramic Confocal konfokális üzemmódjával. A referencia konfokális mikroszkóp esetében az intenzitásváltozás nagyon hasonló a Panoramic Confocal estében mértékhez (3,3%-4,8%). Megemlítendő ugyanakkor, hogy a konfokális rekonstrukcióhoz a Panoramic Confocallal mért intenzitások 4×-5× nagyobbak voltak a referencia mikroszkóppal mért értékeknél, így jobb SNR, vagy gyorsabb képalkotás érhető el vele.

relatív fényhatékonyság különböző képalkotási módokban			
Csatorna	Panoramic confocal		referencia: Zeiss LSM 880
	számított teljes látóterés / teljes látóterés	konfokális / teljes látóterés	1 Airy egység diafragma / nyitott diafragma
FITC	33,7%	4,3%	4,1%
TRITC	35,9%	4,2%	4,8%
Cy5	29,4%	4,1%	3,3%

4. táblázat A Panoramic Confocal és Zeiss LSM 880 konfokálisításának fényhatékonysága.

I.2. Konfokális teljesítmény és dekonvolúció

Meghatároztuk a Panoramic Confocal pontkiterjedési függvényét 4 fluoreszcencia csatornában 20× és 40× objektívvel. Az 5. táblázatban bemutatjuk a mért PSF kiterjedését X;Y és Z dimenzióban, valamint a szimmetria értékét (tökéletes szimmetria= 1). Összehasonlításként feltüntettük egy konfokális lézerpasztázó mikroszkóp (CLSM) elméleti értékeit.

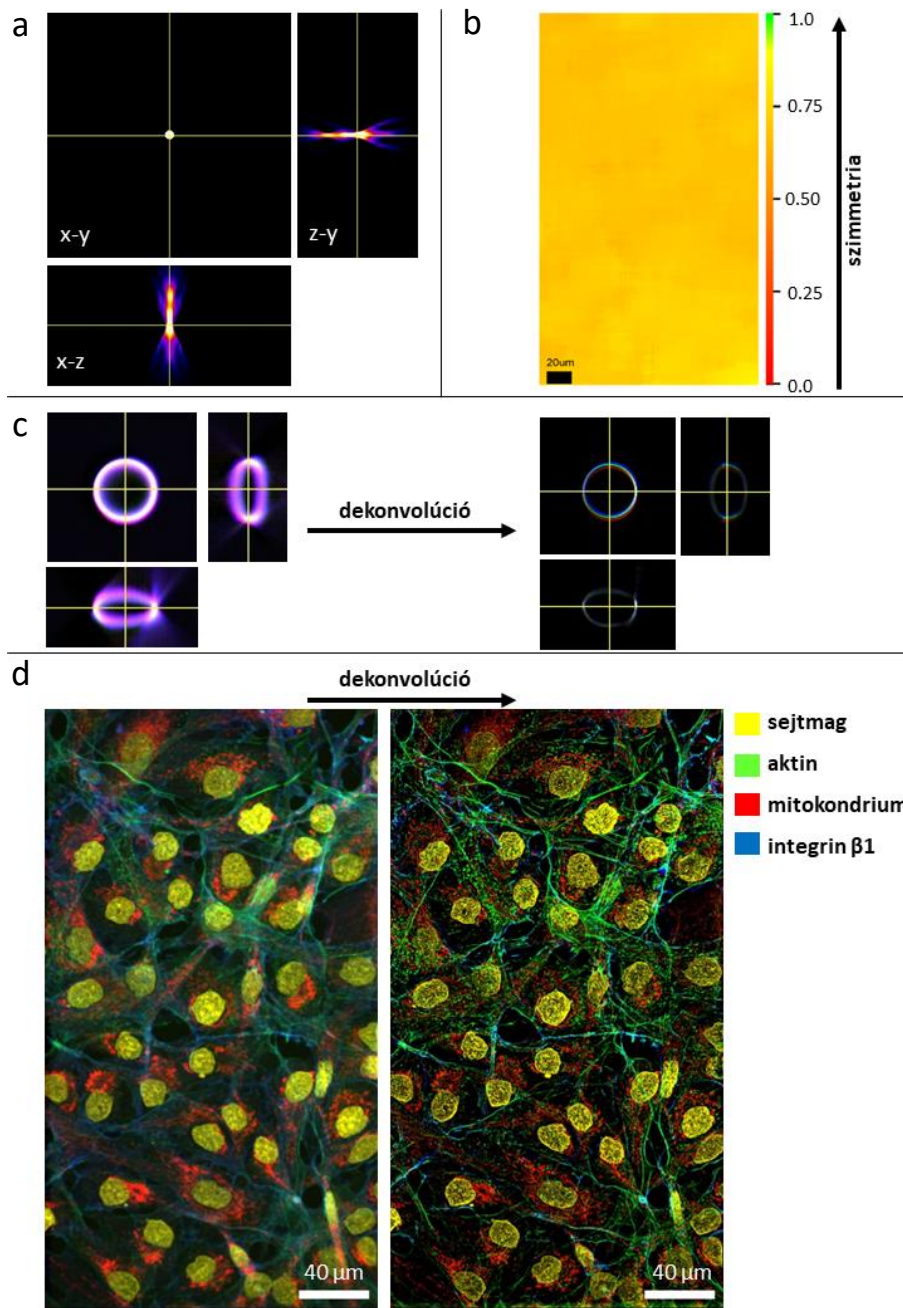
20X	mért PSF (nm)				elméleti PSF (nm) (CLSM)			
	FWHM	DAPI	FITC	TRITC	Cy5	DAPI	FITC	TRITC
X	749 ± 103	733 ± 88	846 ± 85	842 ± 112	267	330	365	423
Y	579 ± 82	716 ± 84	831 ± 44	866 ± 46				
Z	1689 ± 1689	4103 ± 244	4749 ± 288	4836 ± 367	1150	1420	1570	1810
szimmetria	0,852 ± 0,01	0,871 ± 0,04	0,899 ± 0,03	0,931 ± 0,01	1	1	1	1

40X	mért PSF (nm)				elméleti PSF (nm) (CLSM)			
	FWHM	DAPI	FITC	TRITC	Cy5	DAPI	FITC	TRITC
X	529 ± 10	586 ± 13	702 ± 19	611 ± 24	184	218	252	282
Y	363 ± 18	423 ± 20	439 ± 24	592 ± 12				
Z	1640 ± 108	2326 ± 72	2560 ± 145	2649 ± 54	699	829	959	1070
szimmetria	0,673 ± 0,03	0,697 ± 0,06	0,702 ± 0,03	0,714 ± 0,02	1	1	1	1

5. táblázat A Panoramic Confocal mért PSF dimenziói ± SD 20× és 40× objektívvel, valamint egy lézerpasztázó konfokális mikroszkóp elméleti értékei.

A Panoramic Confocal mért PSF értékei minden irányban jelentősen nagyobbak a konfokális leképezés elméleti értékeinél, valamint a szimmetria is jelentősen elmarad az optimális 1-es értéktől. A PSF tulajdonságiból levonható az a következtetés, hogy elméleti modellel nem lehetséges a dekonvolúciós algoritmusok futtatása a Panoramic Confocallal készített felvételeken.

A mért PSF ortogonális vetületein (4./a ábra) szintén jól látható az aszimmetria. A PSF szimmetria térbeli eloszlását vizsgálva (4./b ábra), a PSF bár nem szimmetrikus, annak térbeli eloszlása homogénnek tekinthető. A homogén szimmetria eloszlás megteremti a lehetőségét annak, hogy csatornánként egy-egy empirikusan meghatározott rendszer-PSF-et felhasználva elvégezhető legyen a dekonvolúció.



4. ábra. PSF és dekonvolúció

a, Mért rendszer-PSF ortogonális vetületei.

b, A PSF szimmetriájának térbeli eloszlása.

c, Egy 15 μm átmérőjű felületszínezett fluoreszcens gyöngy ortogonális projekciója dekonvolúció előtt és után. A dekonvolúcióhoz az *a* ábrán bemutatott PSF-et használtuk.

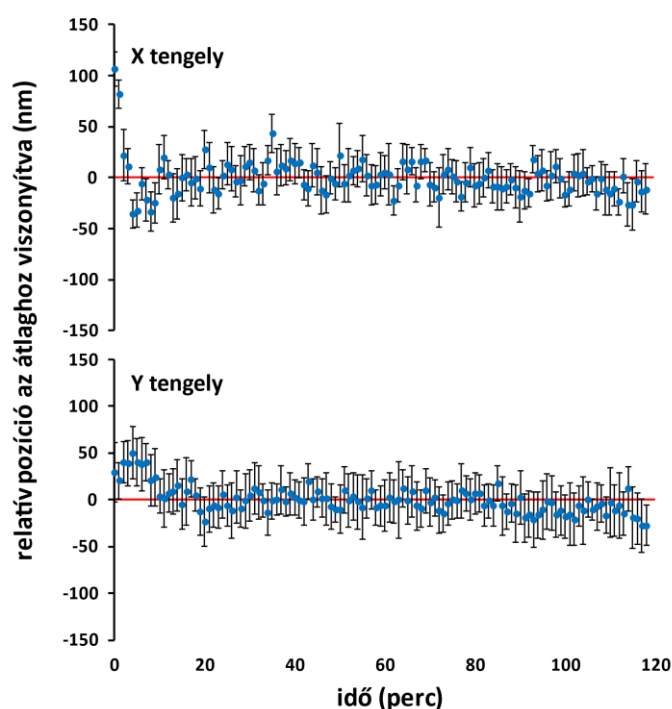
d, Z irányú projekció egy 4 csatornás 3 dimenziós konfokális látótérről a Panoramic Confocallal felvéve, dekonvolúció előtt és után.

A dekonvolúció teszteléséhez 15 μm átmérőjű, felületükön fluoreszcensen festett gyöngyöket vizsgáltunk. A 4./c ábrán egy ilyen gyöngy ortogonális projekciója látható három csatorna

kompozit képén dekonvolúció előtt és azt követően. A dekonvolúció a várakozásoknak megfelelően csökkentette a kép elmosódottságát, nagyságrendileg egy képpont vastagságú gyűrűt eredményezve, ami közel áll a minta valóságos fizikai struktúrájához. További tesztelés céljából dekonvolúciót végeztünk 4 fluoreszcens festékkel jelölt A172 sejtekről készült felvételeken is. A 4./d ábrán ennek az eredménye látható Z irányú átlagintenzitás projekciót követően. A gyöngyökhöz hasonlóan ebben az esetben is javulást tapasztaltunk a kép élességében, ezáltal nagyban javult a finomszerkezetű szubcelluláris struktúrák egymástól való vizuális elkülöníthetősége. Az automatikus mérés közbeni dekonvolúciós eljárás a mikroszkóp gyártójával közös fejlesztés eredményeként elérhető a mérőszoftver részeként.

1.3. A tárgyasztal stabilitása és relokalizációs pontossága

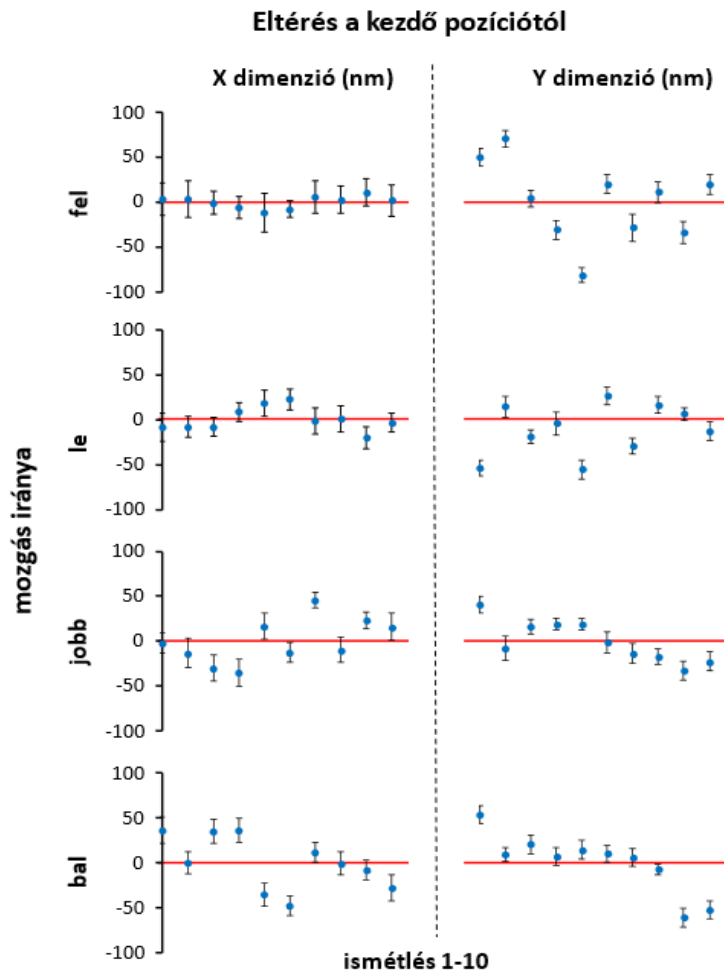
A megfelelő minőségű digitális tárgylemezek létrehozásához elengedhetetlen előfeltétel a megfelelő stabilitású és precizitású motorizált tárgyasztal. A tárgyasztal stabilitásának vizsgálatához 0,5 μm átmérőjű Tetraspeck gyöngyökről percenként felvételeket készítettünk 120 percen keresztül a 20 \times nagyítású objektívvel. 15 gyöngy mozgását követtük Fiji TrackMate plugin segítségével. Az első tíz percben enyhe mozgást tapasztaltunk az X és Y tengely mentén, az elmozdulás nagysága nem érte el egy pixel méretét (<325 nm). A mozgás megszűnésének magyarázata lehet a beálló termális egyensúly (5. ábra).



5. ábra. Tárgyztal stabilitása

500 nm átmérőjű fluoreszcens gyöngyökről percenként felvételeket készítettünk két órán keresztül. Az egyedi gyöngyök középpontjának mozgását a saját centrális pozíciójukhoz hasonlítottuk. 15 gyöngy X és Y tengely menti elmozdulásának átlagát \pm SD ábrázoltuk az idő függvényében.

A mikroszkóp relokációs pontosságának meghatározásához Tetraspeck gyöngyökről felvételt készítettünk, majd tízszer oda-vissza mozdítottuk egy-egy látótérrel a mintát, és minden ciklus végén felvételt készítettünk. Az elkészült felvételeken Fiji TrackMate plugin segítségével meghatároztuk az elmozdulást a megelőző ciklushoz képest. A mérést a sík mind a 4 kitüntetett irányában elvégeztük. A 6. ábrán látható, hogy a relokáció pontatlansága minden esetben kisebb volt egy pixel nagyságánál, a hiba nagysága mindig az elmozdulás tengelyén volt nagyobb.



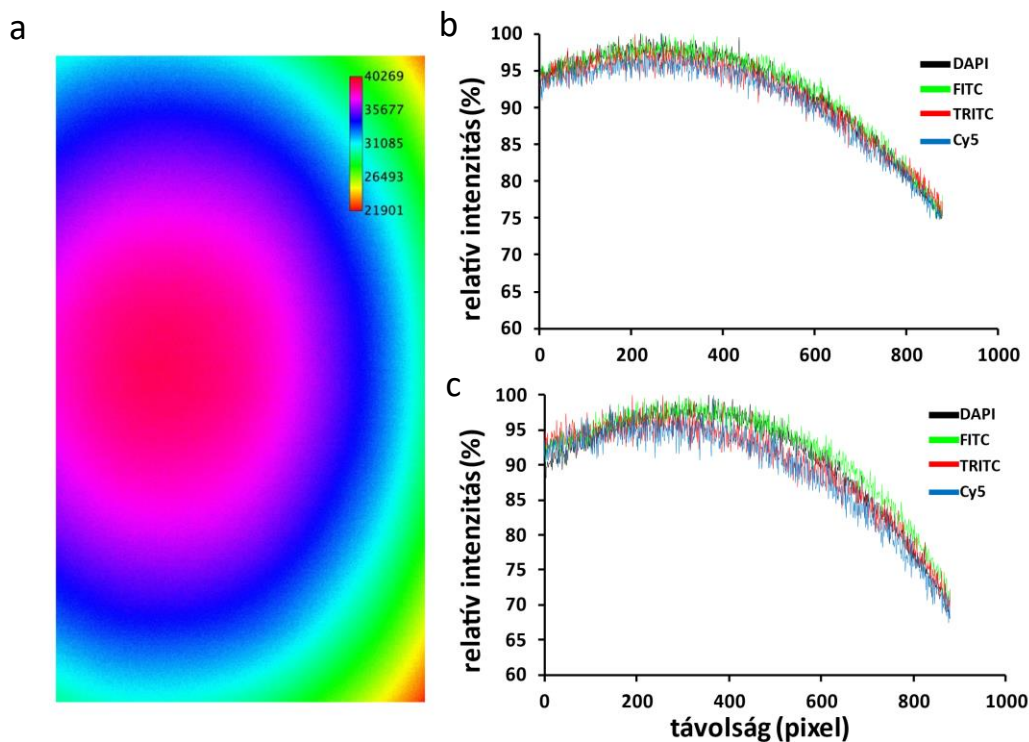
6. ábra. Relokalizációs pontosság

500 nm átmérőjű fluoreszcens gyöngyökről szekvenciálisan 10 felvételt készítettünk úgy, hogy két felvétel között egy látótérnyit oda-vissza mozgattuk a mintát. A kísérletet a tárgyasztal mind a négy alap mozgási irányában elvégeztük. Az egyedi gyöngyök középpontjának elmozdulásához a közvetlenül a mozgatás előtt mért koordináták adták a referenciát. 15 gyöngy átlagát \pm SD ábrázoltuk.

Méréseink alapján a Panoramic Confocal mintakezelése- mind időben, mind térben- elég stabil jó minőségű digitális tárgylemezek felvételéhez.

I.4. A megvilágítás homogenitása

Kvantitatív mérések végzéséhez, valamint a digitális tárgylemez létrehozásakor történő képösszefűzés jó működéséhez kellően homogén intenzitás eloszlású megvilágító fény szükséges. A Panoramic Confocal megvilágítási fényerősség eloszlását Ted Pella fluoreszcens tárgylemezeken widefield módban mind a 20 \times és a 40 \times objektívekkel megvizsgáltuk a használt négy fluoreszcencia csatornában.



7. ábra. A megvilágítás homogenitása

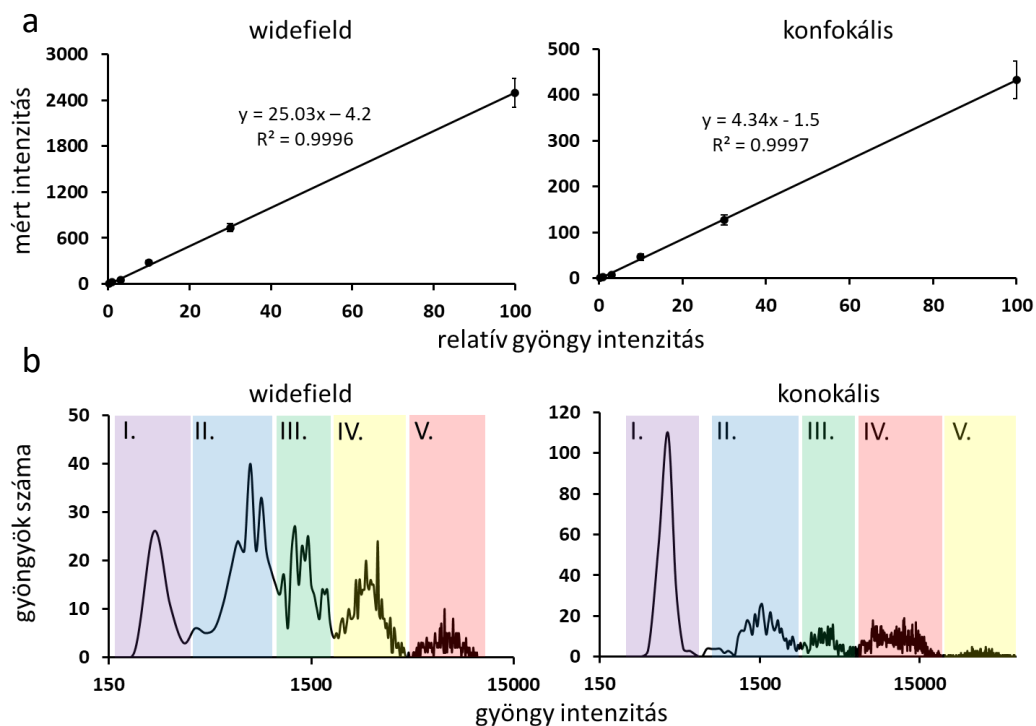
- a, Fluoreszcens homogén standard tárgylemez képe (20× objektív, DAPI csatorna, teljes látóterés mód)
- b, Átlós intenzitás profilok a 4 fő fluoreszcencia csatornában 20× objektív.
- c, Átlós intenzitás profilok a 4 fő fluoreszcencia csatornában 40× objektív.

A megvilágítás középpontja nem esik egybe a rögzített kép középpontjával (7./a ábra), aminek oka a mikroszkóp speciális optikai rendszerében keresendő. A megvilágítás homogenitása mindkét objektív esetében egyenetlennek tekinthető, valamint enyhe hullámhosszfüggést mutat (7./b;c ábra). Ezek alapján levonható a következtetés, hogy a megfelelő működéshez korrekciós eljárás használata szükséges. A mikroszkópban eredendően rendelkezésre álló szoftveres korrekciós eljárás statisztikai alapú. Ez nagyszámú, alul áteresztő szűrőn átengedett kép átlagával végzi a korrekciót és nagy területű digitális tárgylemezek esetén jó eredményt ad, különösen, ha nincsenek azokban kisméretű intenzitás ingadozások (pl. változatos szövettani összetételek miatt). A tapasztalataink miatt bevezetésre került egy második korrekciós módszer is. Ennek alkalmazásakor egy homogén fluoreszcens mintáról csatornánként, szűrőkészlethez és objektívhez rendelt „flat-field” képekkel végezzük az intenzitás korrekciót minden nyers képen, ill. konfokális üzemmódban a két kamera-félen is külön-külön. Ez a módszer alkalmas kisebb területről és térben változatos mintákról készült

felvételek megfelelő korrekciójára, valamint kvantitatív mérések esetén is megbízható eredményeket ad.

1.5. Linearitás és szenzitivitás

Ahhoz, hogy egy mikroszkóppal kvantitatív méréseket végezhessünk, az adott képpontban mért intenzitásnak egyenes arányosságban kell állnia az ott keletkező fotonok számával. Ez a feltétel különösen fontos, ha a mért intenzitások arányát vizsgáljuk, tipikusan ilyenek tekinthetők például az intenzitás alapú FRET mérések. Ahhoz, hogy ezeket a méréseket biológiailag releváns mintákon is elvégezhessük, a mikroszkópnak alacsony expressziós szintek mellett is kellően érzékenynek kell lennie.



8. ábra. Linearitás és szenzitivitás

a, A Panoramic Confocal intenzitás válasza teljes látóterés és konfokális módban. InSpeck green linearitás kalibrációs gyöngyökkel, 20× objektívvel mérve. Minden mérési pont 30 gyöngy átlagintenzitása \pm SD.

b, A Panoramic Confocal szenzitivitása widefield és konfokális képalkotási módban. A teszteléshez QIFIKIT fluoreszcencia standard gyöngyöket használtunk, melyek 5 populációban ismert számú egér IgG Fc fragmentumot hordoznak a felszínükön, ezekhez kötöttünk Alexa Fluor-488 konjugált másodlagos antitesteket. Teljes látóterés módban 1190 gyöngyöt, konfokális módban 3196 gyöngyöt ábrázoltunk. Az Fc fragmentumok száma az 5 populációban a következő volt: I:2200; II:14000; III:48000; IV:169000; V:724000.

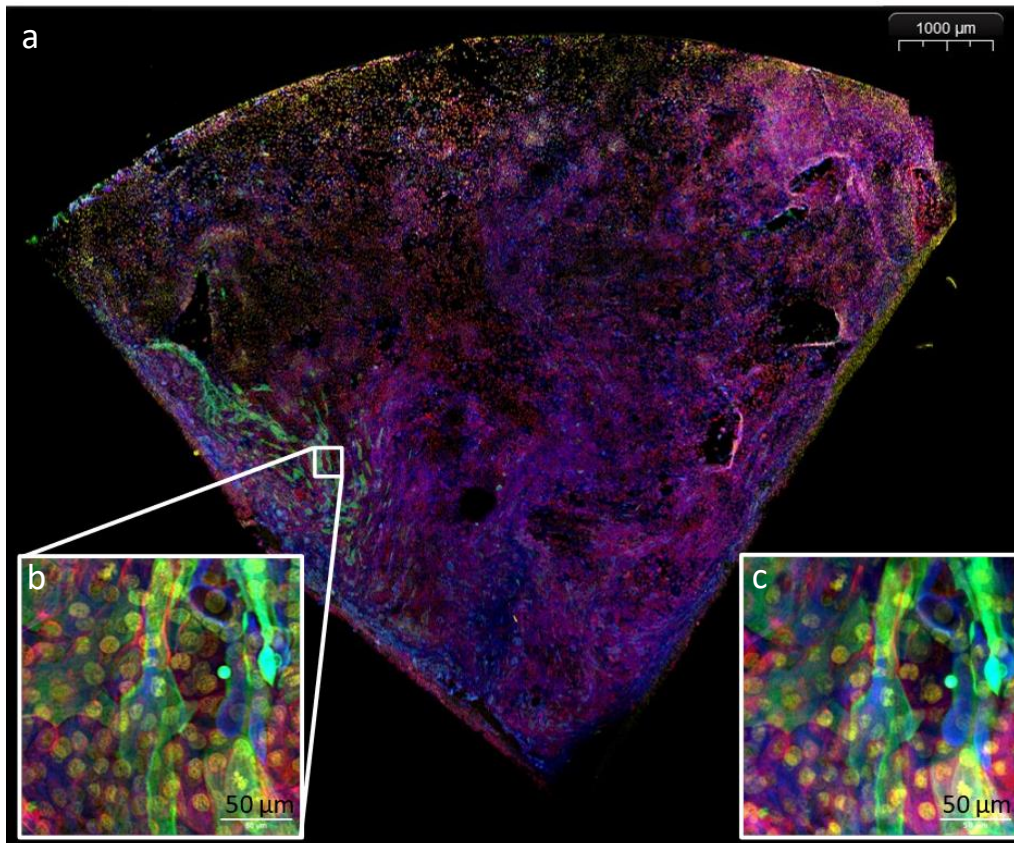
A mikroszkóp intenzitás válaszáinak linearitását InSpeck green fluoreszcencia linearitás kalibrációs gyöngyök segítségével határoztuk meg. A 8./a ábrán látható a műszer

intenzitásválasza lineáris widefield és konfokális módban is. Az illesztés jóságát mutató R^2 paraméter 0,9996 a widefield, és 0,9997 a konfokális képalkotási módban.

A mikroszkóp szenzitivitásának meghatározásához QIFIKIT gyöngyöket használtunk teljes látóterés és konfokális módban (8./b ábra). A QIFIKIT gyöngyök 5 különböző intenzitású alpopulációból állnak, a mikroszkóp mind az 5 alpopulációt képes volt kimutatni mindkét képalkotási módban. A QIFIKIT gyöngyök átlagos átmérője $10\ \mu\text{m}$, hasonlóan egy átlagos sejthez, így feltételezhetjük, hogy a QIFIKIT-en kimutatható 2000 epitóp / gyöngy fluoreszcensen jelölt sejtek esetében is hasonló nagyságrendű epitópsűrűségnek felel meg.

1.6. Mérések nagy területű és vastagságú mintákon

A Panoramic Confocal 3D-s képalkotási képességeit egy különösen kihívásokkal teli mintán vizsgáltuk: egy kontaktlencse felületén növesztett, több sejtrétegből felépülő, limbális őssejthiány transzplantációs kezelésére szolgáló mintán. A minta mezenchimális jellegű, vimentin pozitív „tápláló” sejtrétegből, valamint citokeratin 19 és citokeratin 3 pozitív, eltérő irányba differenciálódó epiteliális sejtekből áll. Ezt a három differenciációs markert immunfluoreszcencián jelöltük, továbbá a magi DNS-t DAPI jelöléssel tettük láthatóvá. A negyed kontaktlencséről konfokális módban felvételt készítettünk a Panoramic Confocallal a minta teljes vastagságában, ami ebben az esetben $50\ \mu\text{m}$ volt, a kontaktlencse beágyazás után is megmaradó görbülete miatt. A mintáról készült felvétel átlagos Z irányú leképzése a 9./a ábrán látható.



9. ábra. Multispektrális képalkotás nagy kiterjedésű mintákon

Conjunctivolimbális biopsziából növesztett többrétegű sejt készítmény egy negyed kontaktlencse felületén. Vimentin: piros, 20 ms expozíciós idő; citokeratin 3: zöld, 40 ms expozíciós idő; citokeratin 19: kék, 20 ms expozíciós idő; DNS: sárga, 300 ms expozíciós idő. 25 konfokális szelet került felvételre 2 µm lépésközzel, 20× nagyítású objektívvel. A digitális tárgylemez 1,14 cm² nagyságú, ami 63.100 exponált látótérből épül fel, a felvétel 7 óra 18 perc 36 másodpercet vett igénybe. Összesen 2×10^{10} voxel tárolunk 16 bites formátumban egy 78,4 GB méretű MRXS kiterjesztésű fájlban. A kumulált átlagos voxel idő, ami magában foglalja a digitális tárgylemez létrehozását is 0,97 µs volt.

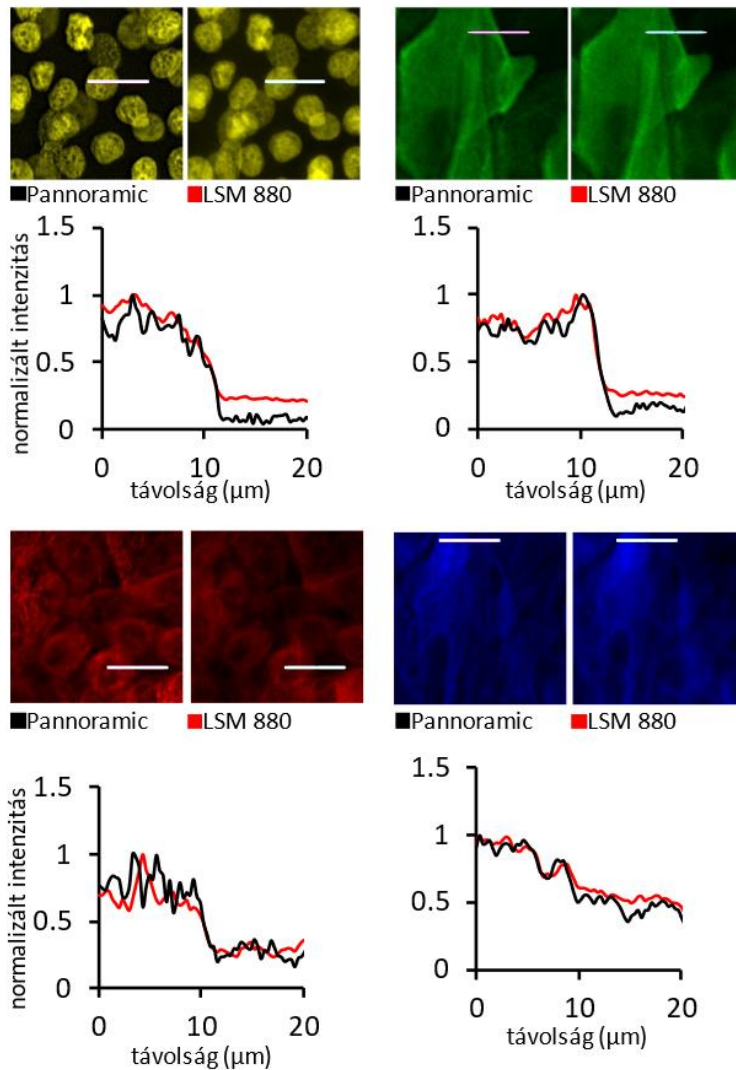
a, A teljes digitális tárgylemez z irányú átlag intenzitás projekciója.

b, Egy kiemelt konfokális szelet.

c, A b résszel megegyező területről készült felvétel Zeiss LSM 880 konfokális mikroszkóppal, 40× víz immerziós objektívvel.

Egy kisebb területet a 9./b ábrán kinagyítottuk a minta nagyságának érzékeltetése miatt. Referenciaként a 9./c ábrán bemutatjuk a megegyező területről LSM 880 mikroszkóppal készült konfokális felvételt.

A 9./b;c ábrán szereplő látótereket a 10. ábrán fluoreszcens csatornánként mutatjuk be. Minden csatorna tartalmaz egy 20 µm hosszúságú sávot, ami sejtmentes és magas intenzitású sejt területen is áthalad, ennek a sávnak a normalizált intenzitás profilját mindkét mikroszkóp esetében feltüntettük a képek alatt.



10. ábra. Térbeli lokalizáció

A 9./b;c ábra egy területe csatornákra bontva. Vimentin: piros, citokeratin 3: zöld, citokeratin 19: kék, DNS: sárga. A képek alatt a 20 μm hosszúságú normalizált intenzitásprofilok a fehér vonalakkal jelölt területekről származnak.

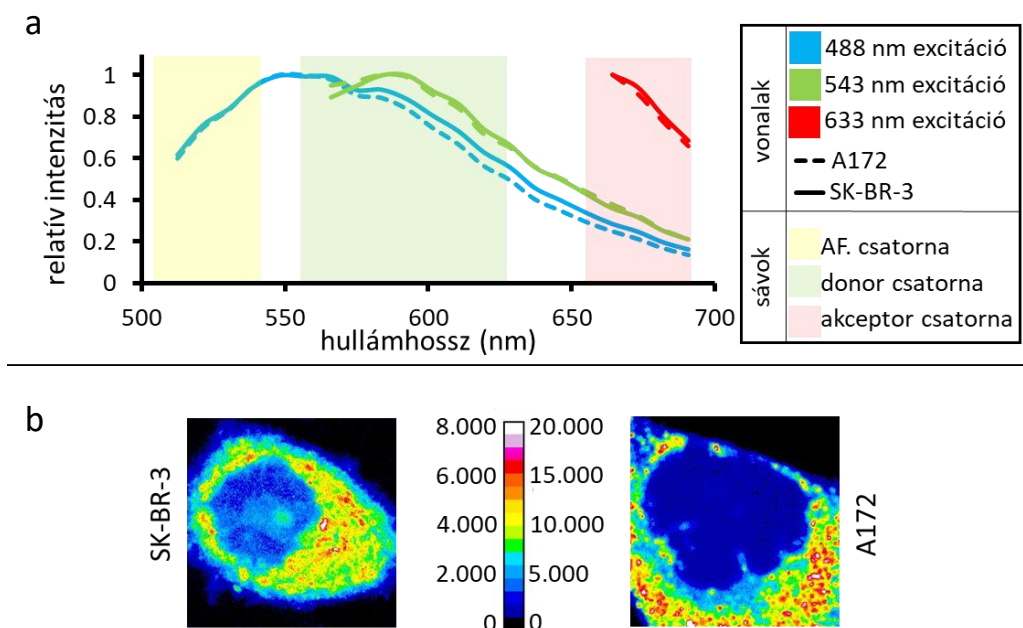
Az intenzitásprofilokat megvizsgálva a Pannoramic Confocal két csatornában jobb, másik két csatornában pedig azonos kontrasztot mutat mint az LSM 880 mikroszkóp. Egyértelmű előnye a Pannoramic Confocalnak, hogy az LSM 880 10 μs -os voxel idejével szemben hasonló képminőséget 1 μs -os voxel idővel tudtunk elérni.

II. Pixelenkénti autofluoreszcencia korrigált FRET

A spektrális átvilágításra korrigált kvantitatív (3 szűrős) FRET módszer egy költséghatékony és sokoldalú mérési eljárás, ami alkalmazható áramlási citometriában és a fluoreszcencia mikroszkópia különböző módozataiban, de pontosságát csökkentheti a minta autofluoreszcenciája. Ennek kiküszöbölésére implementáltuk és teszteltük a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciót.

II.1. A celluláris autofluoreszcencia vizsgálata

Az autofluoreszcencia korrekciós eljárások tesztelésének első lépéseként meghatároztuk az A172 és SK-BR-3 sejtvonalak autofluoreszcencia spektrumait szuszpenzióban és üvegfelülethez tapadva is. A letapadó sejtek spektrumát a FRET mérések esetében detektált releváns emissziós hullámhossz-sávokkal együtt a 11./a ábrán mutatjuk be. A tripszinnel kezelt és az üveg felülethez tapadt sejtek autofluoreszcencia spektrumai annyira közel voltak egymáshoz, hogy az ábra méretarányain elkülöníthetetlenek lennének egymástól, ezért csak a letapadt sejtek spektrumait mutatjuk be. Ebből levonhatjuk a következtetést, hogy a tripszines kezelés nem befolyásolja a sejtek autofluoreszcencia spektrumát. Mivel a tripszines kezelés nem befolyásolja az autofluoreszcencia eloszlását, így lehetőségünk nyílik áramlási citometriás mérésekkel összehasonlítani a mikroszkópiás méréseinket. A sejtvonalak autofluoreszcencia spektrumai egymáshoz képest is csak minimális eltérést mutatnak. Az autofluoreszcencia spektrális homogenitásából arra következtettünk, hogy lehetséges FRET mérések során egy kiegészítő autofluoreszcencia csatorna használata, aminek a segítségével megvalósítható a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció a mérések során használt fluoreszcencia csatornában. Ez a kiegészítő csatorna excitációs és emissziós hullámhosszait tekintve jól elkülönül a FRET hatásfok kiszámolásához használt csatornáktól, ami előrelépés a munka alapjait adó sejtenkénti autofluoreszcencia korrekciós citometriás eljáráshoz képest, ahol az autofluoreszcencia, donor és akceptor csatorna excitációja azonos hullámhosszon történt.



11. ábra. A172 és SK-BR-3 sejtek autofluoreszcencia tulajdonságai

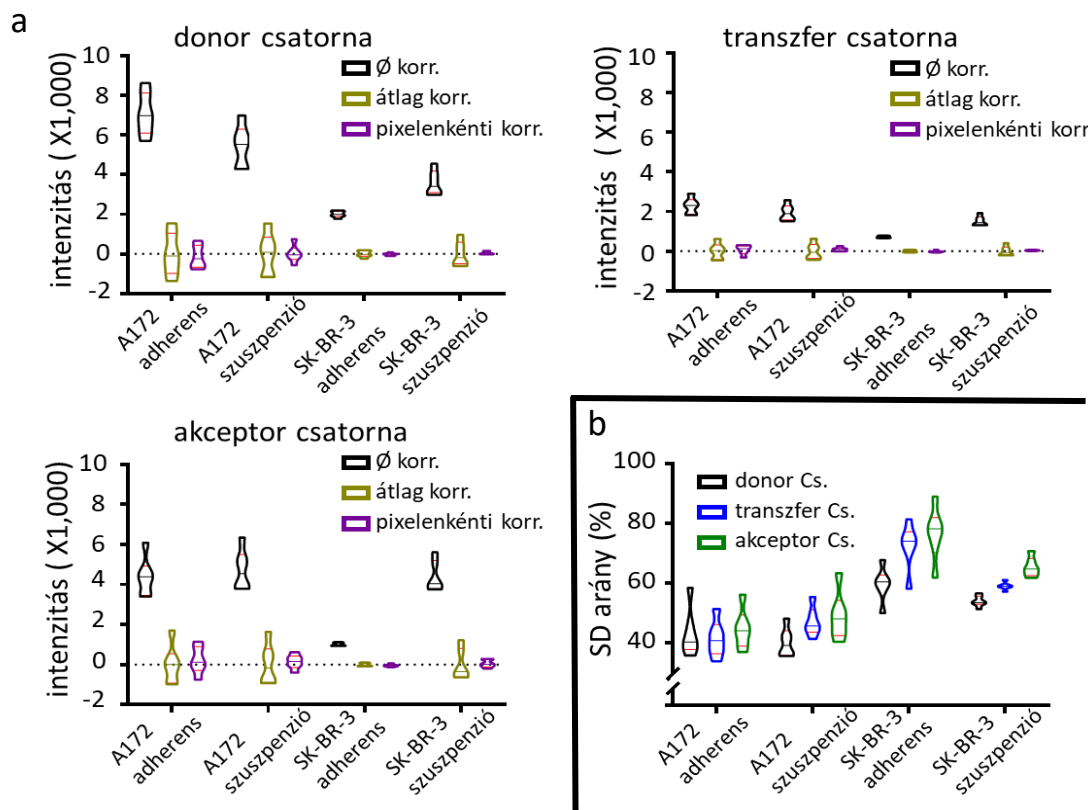
- a, A172 és SK-BR-3 sejtek autofluoreszcencia emissziós spektrumai LSM 880 konfokális mikroszkóp spektrális detektorával mérve, 488 543 és 633 nm excitációs hullámhosszok mellett. FRET mérésekhez használt emissziós hullámhossztartományokat színes sávok jelölik.
- b, SK-BR-3 és A172 sejt szubcelluláris autofluoreszcencia eloszlása.

Vizsgáltuk még az SK-BR-3 és A172 sejtek szubcelluláris autofluoreszcencia eloszlását, amit a 11./b ábrán mutatunk be. A sejtek autofluoreszcencia intenzitás eloszlása nagy térbeli változatosságot mutatott. Ezek alapján úgy ítéltük meg, hogy van értelme tovább folytatni a pixelenkénti autofluoreszcencia korrigált FRET mérések fejlesztését.

II.2. Autofluoreszcencia korrekció jelöletlen mintákon

Annak eldöntésére, hogy mennyire hatékony a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció az átlag autofluoreszcencia korrekcióhoz viszonyítva, a két módszert jelöletlen A172 és SK-BR-3 sejteken teszteltük, azok adherens és felfuszpendált formájában is. A korrekciós módszerek hatékonyságát mind a három, a spektrálisan korrigált, intenzitás alapú FRET méréshez használt csatornában elvégeztük. Jelöletlen mintáknál azt várjuk, hogy tökéletes autofluoreszcencia korrekció esetén az eredményként kapott képek átlag intenzitása 0 értéket vesz fel, a pixelenkénti szórás pedig alacsony. A mért autofluoreszcencia értékeket korrekció előtt és a két korrekciós eljárás elvégzése után a 12./a ábrán mutatjuk be. A vártak megfelelően a sejtenként integrált autofluoreszcencia intenzitások mindkét módszerrel közel kerültek a 0 értékhez a három vizsgált fluoreszcencia csatornában (donor, transzfer, akceptor), vagyis átlagokat vizsgálva mindkét módszer eltávolítja a celluláris háttérfluoreszcenciát. Az ábrákon az is jól

látszik, hogy átlag autofluoreszcencia korrekció esetén az átlagok nagyobb tartományban szóródnak a 0 érték körül, hiszen a térben ingadozó értékeket egy átlagos konstanssal korrigáljuk. Ezt alátámasztandó meghatároztuk a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval kapott képek szórásának arányát az átlag korrekcióval mértékhez képest. Ennek eredményét a 12./b ábrán mutatjuk be. A szórások elemzéséből kiderül, hogy A172 sejtek esetében a pixelenkénti korrekció 50-60%-kal csökkenti a szórást, míg SK-BR-3 sejtek esetében ez az érték 20-40% -ig terjed. Ezek alapján kijelenthető, hogy a pixelenkénti korrekció az elvártan megfelelően nullára csökkenti az átlag autofluoreszcencia intenzitást, és nagymértékben csökkenti a sejtenkénti és a pixelenkénti szórást. Természetesen a detektálás Poisson zaja továbbra is terheli az egyes pixelekben mért értékeket, így teljesen egyenletes korrigált intenzitást nem várhatunk. Ezzel együtt várhatóan a származtatott paraméterek, mint pl. a FRET hatásfok meghatározása pontosabbá válik a pixelenkénti korrekcióval.



12. ábra. Autofluoreszcencia korrekció jelöletlen mintákon

a, Autofluoreszcencia a FRET mérésekhez használt donor, transzfer és akceptor csatornáknak, korrekció előtt, átlag autofluoreszcencia és pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció után, adherens és szuszpenzióban lévő A172 és SK-BR-3 sejteken.

b, A pixelenkénti és az átlagos autofluoreszcencia korrekcióval kapott intenzitás értékek szórásának aránya.

A grafikonok 6 független minta felhasználásával készültek.

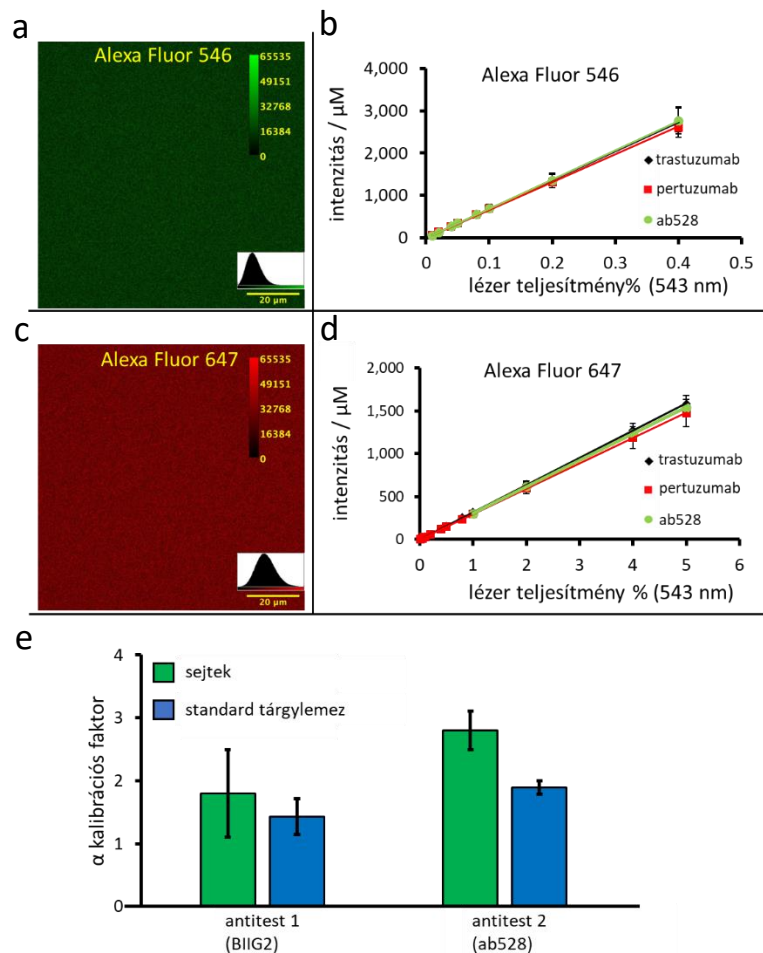
II.3. Korrekciós faktorok meghatározása antitest alapú standard lemezek

Egy spektrálisan korrigált intenzitás alapú FRET méréshez több korrekciós faktort is meg kell határoznunk: spektrális átvilágítás korrekciós faktorokat (8-16. egyenlet) és az alfa (α) kalibrációs faktort (17. egyenlet). Minden korrekciós faktor meghatározásához egyszeresen jelölt mintákra van szükségünk. Mivel az egyszeresen jelölt sejt mintáknak is van autofluoreszcenciájuk, amelynek van szórása sejt és pixel szinten is, így az autofluoreszcencia és a spektrális átvilágítás aránya az adott pixelben ismeretlen, ami lehetetlenné teszi a spektrális korrekciós faktor bizonyossággal történő meghatározást. Ezt a problémát kiküszöbölendő kidolgoztunk egy módszert, amellyel sejtmentes kalibrációs tárgylemez hozható létre (az előállítási protokoll megtalálható az Anyagok és módszerek fejezetben). Ezek a lemezek 4°C-on legalább 6 hónapig eltarthatóak érzékelhető minőségromlás nélkül. A 13./a és c ábrán mintafelvételek láthatóak ilyen standard tárgylemezekről. A standard lemezeket teszteltük S és alfa faktor meghatározáshoz is. A mért átlagintenzitásokat a fotometriásan meghatározott fluoreszcens festék koncentrációjával normalizáltuk (13./b; d ábra). Ezek az értékek alacsony szórás mellett nagy homogenitást mutattak különböző antitestekkel készült minták között, az excitációs intenzitások széles tartományában. A standard lemezek stabil emissziós intenzitása és a Panoramic Confocal lineáris intenzitás válasza (8./a ábra) alapján feltételeztük, hogy a standard lemezek alkalmasak az S és alfa korrekciós faktorok meghatározására mind lézerpasztázó konfokális mikroszkóppal, mind a Panoramic Confocallal. A standard lemezek megbízhatóságát az alfa faktor meghatározásban 7-7 donor valamint akceptor tartalmú standard lemezen 49 kombinációban teszteltük (6. táblázat). A meghatározott alfa faktorok varianciája 12,5 % volt.

alfa								
Festék	Alexa Fluor 546 (donor)							
	antitest	Tr. 1	Tr. 2	Tr. 3	Pr. 1	Pr. 2	Pr. 3	ab528
Alexa Fluor 647 (akceptor)	Tr. 1	0,305	0,393	0,356	0,347	0,347	0,360	0,370
	Tr. 2	0,277	0,356	0,323	0,314	0,314	0,326	0,335
	Tr. 3	0,310	0,399	0,361	0,352	0,352	0,366	0,376
	Pr. 1	0,276	0,355	0,321	0,313	0,313	0,325	0,334
	Pr. 2	0,301	0,387	0,350	0,342	0,342	0,355	0,364
	Pr. 3	0,239	0,308	0,279	0,272	0,272	0,282	0,290
	ab528	0,236	0,303	0,275	0,268	0,268	0,278	0,286

6. táblázat Alfa kalibrációs faktorok számítása 7 donor és 7 akceptor valamennyi lehetséges kombinációja esetére. Az Alexa Fluor 546 donorral és az Alexa Fluor 647 akceptorral három trastuzumab (Tr.), három pertuzumab (Pr.) és egy ab528 antitest preparátumot konjugáltunk, és mindegyikből standard tárgylemezt készítettünk, melyek megegyező akvizíciós paraméterek mellett kerültek felvételre. A koncentrációk ismeretében a 49 különböző kombinációból számítható alfa faktor értékeket a táblázat mutatja. Az értékek átlaga 0,322, SD=0,040, CV=0,125.

További tesztelésként az alfa faktort meghatároztuk BIIG2 és ab528 antitestekkel sejteken és standard lemezeken is (13./e ábra). A standard lemezeken meghatározott alfa faktorok kisebb szórást mutattak, és a két különböző antitesttel meghatározott alfa faktor közelebb volt egymáshoz. Mivel az alfa egy spektrális paraméter, elméletileg független a felhasznált antitesttől. A sejtes mérések eltérése részben a sejtek autofluoreszcenciájával magyarázható, részben azzal, hogy az antitestek affinitása az epitópjukhoz megváltozhat a jelölési arányuk függvényében [90], így a sejtes mintán az elméletitől eltérhet az átlagos jelölési arány. Ennek kiküszöbölésére jól alkalmazható az antitest alapú standard tárgylemez, mivel ez a törzsoldattal megegyező jelölési arányú antitesteket tartalmaz.



13. ábra. Standard tárgylemezek S és α kalibrációs faktor meghatározásához

a;c, Alexa Fluor 546 és Alexa Fluor 647 konjugált trastuzumab filmréteg és azok intenzitás hisztogramjai.

b;d, Három különböző antitest Alexa Fluor 546 és Alexa Fluor 647 konjugátumainak koncentráció normalizált intenzitása a megvilágító lézer (543 nm) teljesítményének függvényében. Minden pont 5 mérés átlaga \pm SD.

e, α kalibrációs faktor BIIG2 és ab528 antitestekkel A172 sejtvonalon és standard tárgylemezen meghatározva. 6 kép átlaga \pm SD.

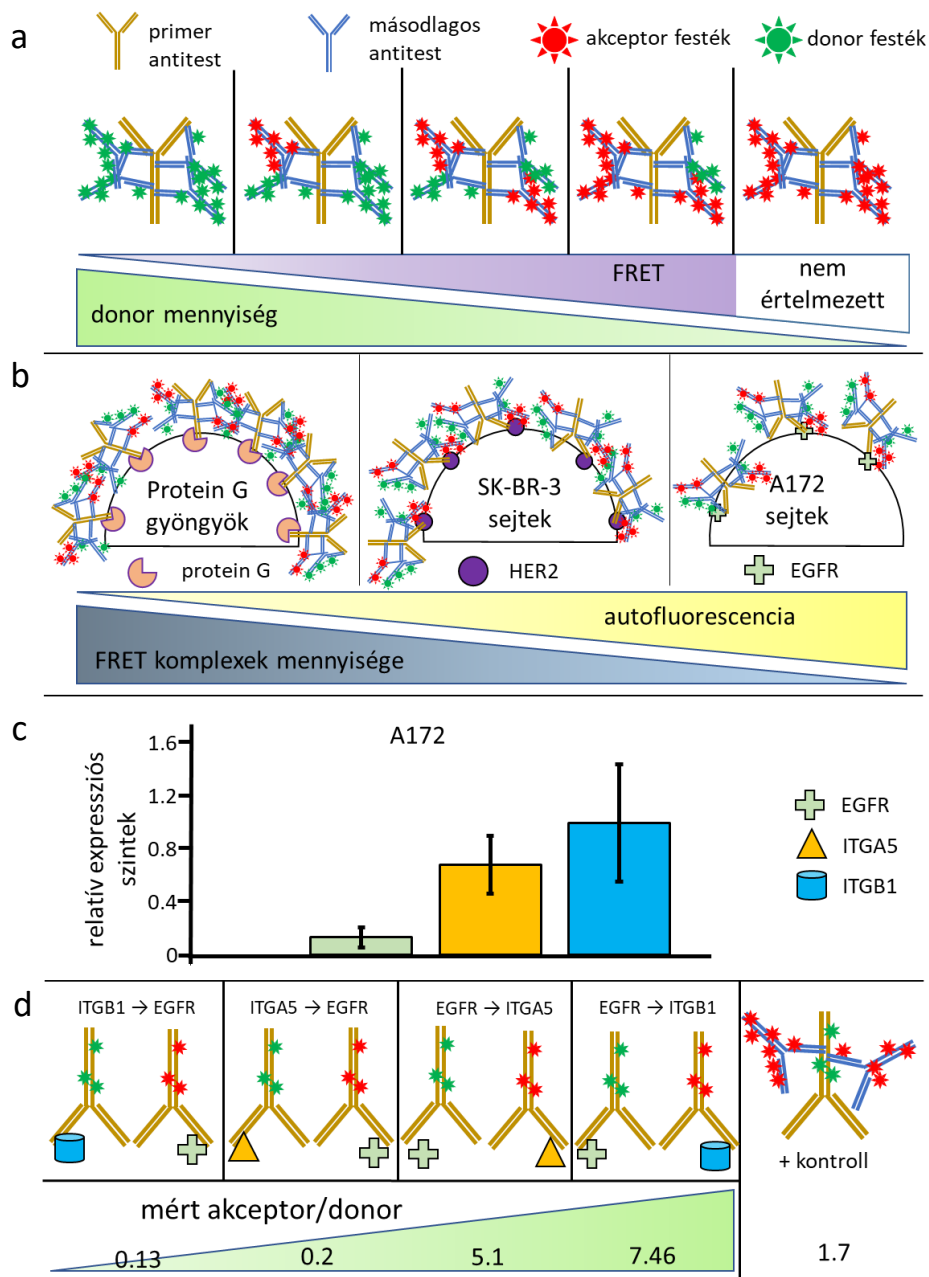
Össességében ezek a standard lemezek könnyen előállítható és olcsó megoldások a korrekciós faktorok meghatározására FRET mérések során. További előnyük még, hogy függetlenek a felhasznált antitest fajtájától, így a legolcsóbb és legkönnyebben hozzáférhető antitestek is használhatóak a mérések során, nem szükséges a jelöléshez ideális antitestet erre a célra nagy mennyiségben felhasználni.

II.3. Modellrendszer FRET mérések teszteléséhez

Annak tesztelésére, hogy a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció javítja-e a FRET mérés pontosságát az átlag autofluoreszcencia korrigálthoz viszonyítva, létrehoztunk egy modellrendszert. Ennek a rendszernek az alapját minden esetben egy jelöletlen elsődleges

antitest képezte (14./a ábra), ehhez az antitesthez másodlagos antitestek keverékét kötöttük. A másodlagos antitest keverékeket úgy állítottuk össze, hogy változó arányban tartalmazzon donor és akceptor jelölt antitesteket. Így változó donor akceptor arányú molekulakomplexek jönnek létre. Következésképpen a rendszerünk változó arányú FRET hatásfokkal rendelkezik, az alacsonytól a nagyon magasig. Ezeket az elsődleges antitesteket protein G-vel bevont gyöngyökhöz, A172 és SK-BR-3 sejtekhez kötöttük a 14./b ábrán látható módon. A protein G gyöngyök nagy sűrűségben tartalmaznak antitestkötő helyeket és extrém alacsony autofluoreszcenciával rendelkeznek. A felületükön hordozott protein G képes megkötni a humán IgG trastuzumabot és az egérből származó ab528 antitestet is. Az SK-BR-3 sejtek nagy mennyiségben fejezik ki a HER2 fehérjét (sejtenként ~800.000), ehhez kötődik a trastuzumab, ezek a sejtek közepes autofluoreszcenciával jellemezhetőek. Az A172 sejtek magas autofluoreszcenciával rendelkeznek és alacsony, ~80.000/sejt EGFR expressziós szinttel, amihez kötjük az ab528 antitesteket. Ebben a kísérleti rendszerben a magas és alacsony FRET hatásfok, expressziós szint és autofluoreszcencia összes kombinációja előállítható. Ezek a minták elkészíthetőek adherens és szuszpenziós formában is, ezáltal a FRET hatásfokok megmérhetőek áramlási citométerrel és fluoreszcenciás mikroszkóppal is.

A teszteléshez egy biológiailag releváns interakciókon alapuló modellrendszert is létrehoztunk. Ehhez az A172 sejtvonalat használtunk, amely az EGFR-t, $\alpha 5$ (ITGA5) és $\beta 1$ (ITGB1) integrint QIFIKIT-es méréseink szerint (14./c ábra) sejtenként 80, 420, ill. 615 ezres nagyságrendben fejezi ki. Ez alapján az EGFR-integrin interakciókat vizsgáltuk a 14./d ábrán szereplő módon, ami lehetőséget adott változó donor-akceptor arányok vizsgálatára is. Ezzel párhuzamosan pozitív kontrollokat is létrehoztunk, melyekhez egy olyan indirekt jelölést alkalmaztunk, ahol az elsődleges antitest donor festékkel konjugált (anti-EGFR ab528 vagy anti-ITGA5 BIIG2 vagy anti-ITGB1 TS2) volt, ehhez másodlagos jelölésként a megfelelő specificitású akceptor festékkel konjugált másodlagos antitestet használtuk. Az így kialakított kísérleti rendszeren lehetőség van a FRET mérési módszer tesztelésére több autofluoreszcencia korrekciós eljárás mellett, valamint a különböző mérőműszerek összehasonlítására.



14. ábra. Modellrendszer a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciós FRET mérések teszteléséhez.

a, Mérési módszerek tesztelésére használt változó donor-akceptor arányú FRET komplexek sematikus ábrázolása.

b, A panelben szereplő FRET komplexek relatív aránya valamint az autofluoreszcencia erőssége protein G gyöngyökön, SK-BR-3 és A172 sejteken.

c, Sejt felszíni fehérjék relatív expressziós szintjei A172 sejteken (6 felvétel átlaga ± SD).

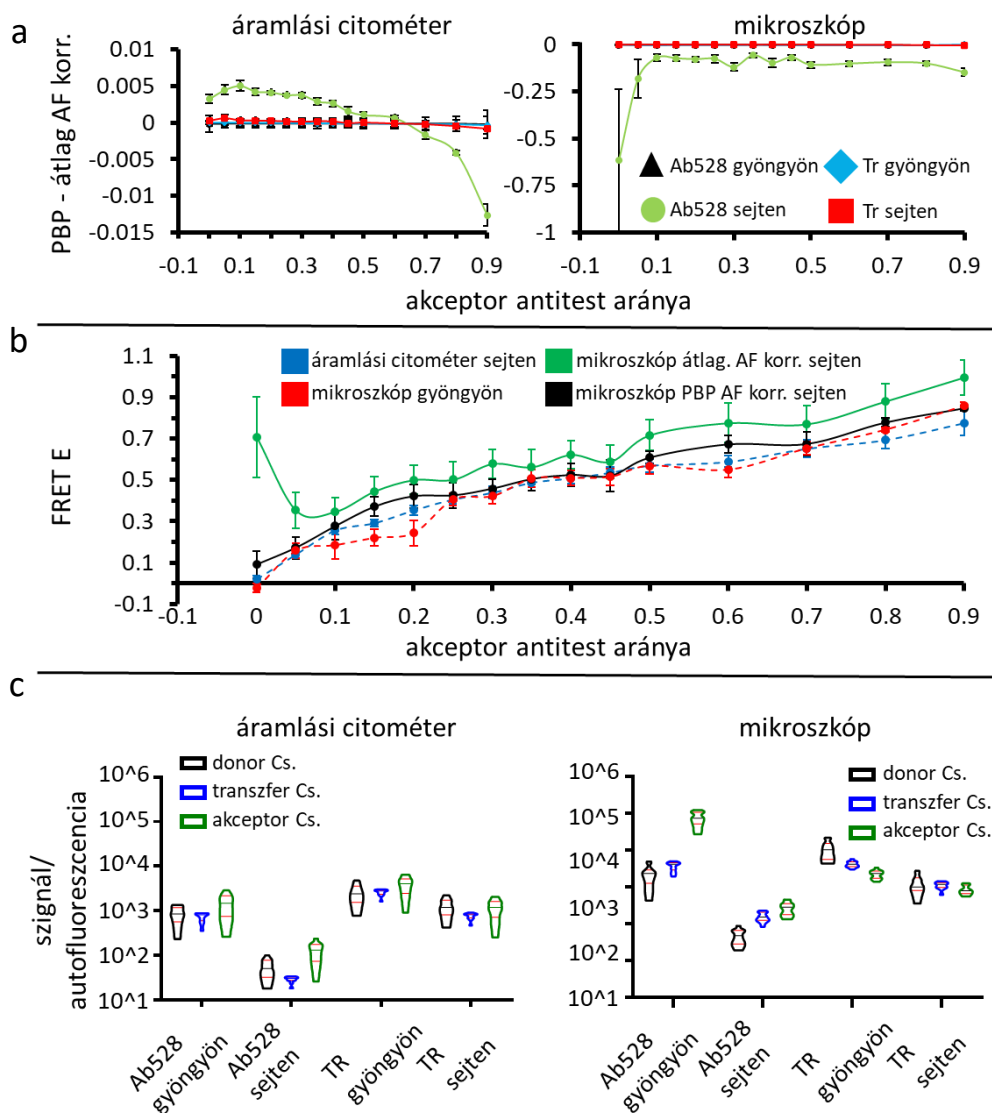
d, Biológiaiailag releváns FRET párok és a rájuk jellemző akceptor-donor arány A172 glioblasztóma sejteken.

II.4. FRET mérések gyöngyökön és sejteken változó donor/akceptor/autofluoreszcencia arányok mellett

A gyöngyökkel és a sejtekkel létrehozott mintákon lemértük a FRET hatásfokokat áramlási citométerrel és lézerpásztázó fluoreszcenciás mikroszkóppal is. A kiértékelés során átlagos autofluoreszcencia és pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciót is végeztünk. Az átlagos autofluoreszcencia korrekcióval kapott eredményeket kivontuk a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval kapottból, és a kettő különbségét és annak szórását az akceptor festék összes fluorofóron belüli arányának függvényében ábrázoltuk (15./a ábra). Az így kapott különbségek elhanyagolhatóak voltak egy esetet, a magas autofluoreszcenciájú és egyben alacsony jelölési intenzitású (ab528 antitest A172 sejteken) mintát leszámítva. A különbség a mikroszkóppal végzett mérések esetében volt a nagyobb: 0,1 körül mozgott, erős emelkedő tendenciával az alacsonyabb akceptor arányok felé.

Annak megállapítására, hogy melyik korrekciós eljárással nyert eredmények írják le jobban a tényleges molekuláris interakciókat, megvizsgáltuk a FRET hatásfokok abszolút értékeit. A 15./b ábrán az ab528 elsődleges antitesttel A172 sejteken és gyöngyökön mért FRET hatásfokokat tüntettük fel. Az áttekinthetőség kedvéért csak a magas intenzitás miatt pontosnak várható gyöngyökön végzett mikroszkópos, valamint a sejtenkénti átlagolás miatt pontosnak várt áramlási citométeres mérést, valamint a pixelenként és az átlagosan korrigált sejteken végzett mikroszkópos méréseket ábrázoltuk. A különböző módszerekkel mért FRET hatásfokok — az A172 sejteken átlagos autofluoreszcencia korrekcióval, mikroszkóppal mértet leszámítva — mind együtt futnak. Mivel ezeken a mintákon egymással azonos FRET komplexek helyezkednek el, csak az ezek mellé társuló autofluoreszcencia intenzitásában van különbség, levonhatjuk a következtetést, hogy az átlagos autofluoreszcencia korrekcióhoz képest bizonyos esetekben a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció jobb mérési eredményeket ad.

Annak eldöntésére, hogy milyen körülmények között előnyösebb a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció használata, minden mérés és FRET esetén releváns fluoreszcencia csatornában vizsgáltuk a specifikus szignál arányát az autofluoreszcenciához viszonyítva (15./c ábra). Látható, hogy az A172 sejteken anti-EGFR ab528 antitesttel mért minták esetében a legalacsonyabb a szignál/autofluoreszcencia arány. Ebből arra következtethetünk, hogy alacsony szignál és magas autofluoreszcenciájú minták esetében javítja leginkább a FRET mérések megbízhatóságát a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció.



15. ábra. Autofluoreszcencia korrekciós módszerek hatása a gyöngyökön és sejteken áramlási citométerrel és konfokális mikroszkóppal mért FRET hatékonyságra

a, Különbség az átlag és a pixelenkénti (PBP) korrekcióval mért FRET hatásfokok között, áramlási citométerrel és konfokális mikroszkóppal mérve. A 12. ábra szerinti 2 gyöngy és 2 sejt alapú, változó sztöchiometriájú FRET komplexeket tartalmazó minta került összehasonlításra. Háttérkapuzás után minden mérési pont legalább 1700 sejt, ill. gyöngy, vagy 5000 pixel átlaga \pm SD

b, FRET hatásfok az akceptor arány függvényében, azokon a mintákon, ahol gyöngyöz, ill. A172 sejtekhez kötött ab528 antitest hordozta a FRET komplexeket

c, Fluoreszcencia jel az autofluoreszcenciához viszonyítva, a FRET méréshez használt csatornáknak az 50% akceptor antitest arányú mintákon.

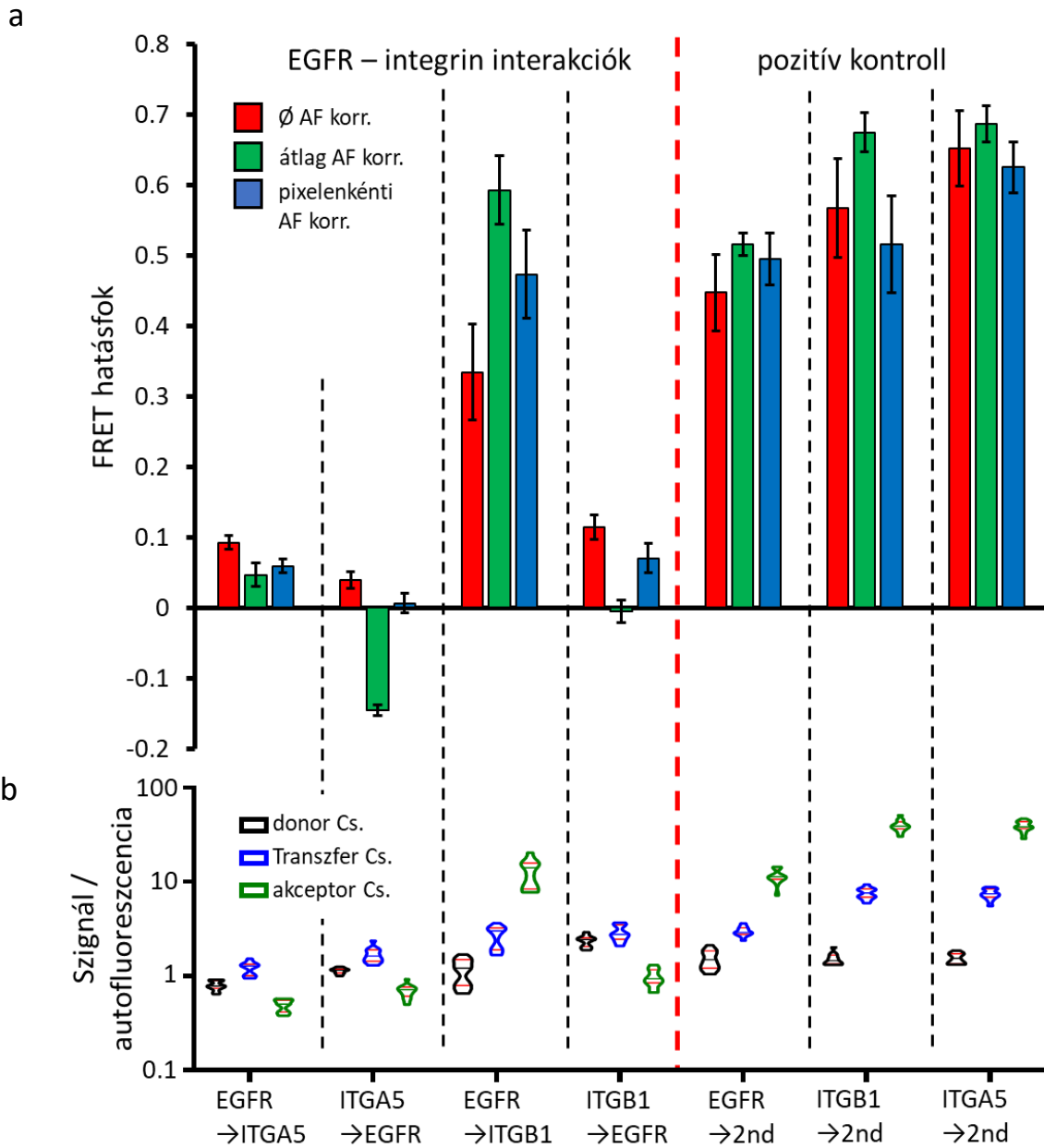
II.5. FRET mérések biológiailag releváns molekulapárok között és indirekt jelölés alapú pozitív kontrollokon

A FRET méréseket biológiailag releváns molekulapárokon is elvégeztük. Ennek során A172 sejteken mértük a FRET hatásfokokat EGFR és ITGA5 valamint ITGB1 között. Mivel ezek az

integrinek ötszörös és nyolcszoros mennyiségben találhatóak az A172 sejtek felszínén az EGFR-hez viszonyítva (14./c ábra), így az epitópok közötti FRET hatékonyságot mindkét lehetséges jelölési kombinációval megmértük. Ez azt jelenti, hogy adott EGFR-integrin pár esetén két minta készült, az egyik mintán az EGFR-hez volt kötve a donorral jelölt antitest, míg a másik mintán az integrinhez. Ezzel az eljárással kiküszöbölhető az akceptor/donor arány esetleges torzító hatása, amely pl. nagyszámú akceptorral való véletlenszerű együttállás miatt növeli a FRET E értékét. A kiértékelést elvégeztük autofluoreszcencia korrekció nélkül, valamint átlag és pixelenkénti korrekcióval is. Ezeken a mintákon a FRET hatásfokok jól követték (16./a ábra bal oldal) az akceptor/donor arányokat (14./d ábra), vagyis azokban az esetekben, ahol az EGFR mint akceptor volt jelen, alacsonyabb FRET hatásfokokat mértünk, mint mikor donorként. A korrekció nélkül és a pixelenkénti korrekcióval kapott értékek viszonya az egyes esetek között koherens, viszont az átlag korrekcióval kapott FRET hatásfok az ITGA5→EGFR és ITGB1→EGFR mintákban lényegesen alacsonyabb a másik két módszerhez képest, előbbi esetben kevesebb, mint -0,1. Ez azt mutatja, hogy az átlagos autofluoreszcencia korrekció erős negatív műtermékeket képes kialakítani, különösen alacsony FRET hatásfokú minták esetében (16./a ábra bal oldal). Az EGFR és ITGB1 között mért FRET hatásfokok magasabbak voltak, mint az EGFR és az ITGA5 között, ami arra utalhat, hogy a jelölések során az ITGB1-et jelölő TS2 antitest térbeli orientációja kedvezőbb a FRET kialakulásához, mint az ITGA5-öt jelölő BIIG2 antitesté. Ezt azért feltételezzük, mert az $\alpha 5\beta 1$ integrin heterodimerként fordul elő a sejtek felszínén, így a két alegység és az EGFR között hasonló mértékű interakciót várunk.

Abban az esetben, amikor az ITGB1 volt az akceptor, az átlagos autofluoreszcencia korrekció nagyon magas FRET hatásfokot eredményezett és 0-t, amikor donor volt az ITGB1. Ezeken a mintákon a pixelenkénti korrekció mindkét mérési irányban nullától magasabb FRET hatásfokot eredményezett, amelynek aránya a donor és akceptor festékek arányát is jól követte. Ez az eredmény megerősíti, hogy az átlagos autofluoreszcencia korrekciós eljárás rosszabbul működik, mint a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció. Megfigyelhető még, hogy az összes biológiailag releváns mintán a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció a másik két korrekciós módszerrel mért eredmények között helyezkedik el (16./a ábra bal oldal). Az, hogy az átlag és a nem autofluoreszcencia korrigált FRET E a legmagasabb vagy a legnagyobb értéket vette fel, összefüggést mutatott az adott minta szignál/autofluoreszcencia arányával (16./b ábra). Azokban az esetekben, amikor a szignál/autofluoreszcencia arány a donor csatornában volt magasabb, a korrekció nélküli FRET értékek voltak magasak, azokon a mintákon, ahol a szignál/autofluoreszcencia az akceptor csatornában volt magas, az átlag

autofluoreszcencia korrekció adott magas FRET hatásfokokat.



16. ábra. FRET biológiailag releváns molekulapárok között és pozitív kontrollokban.

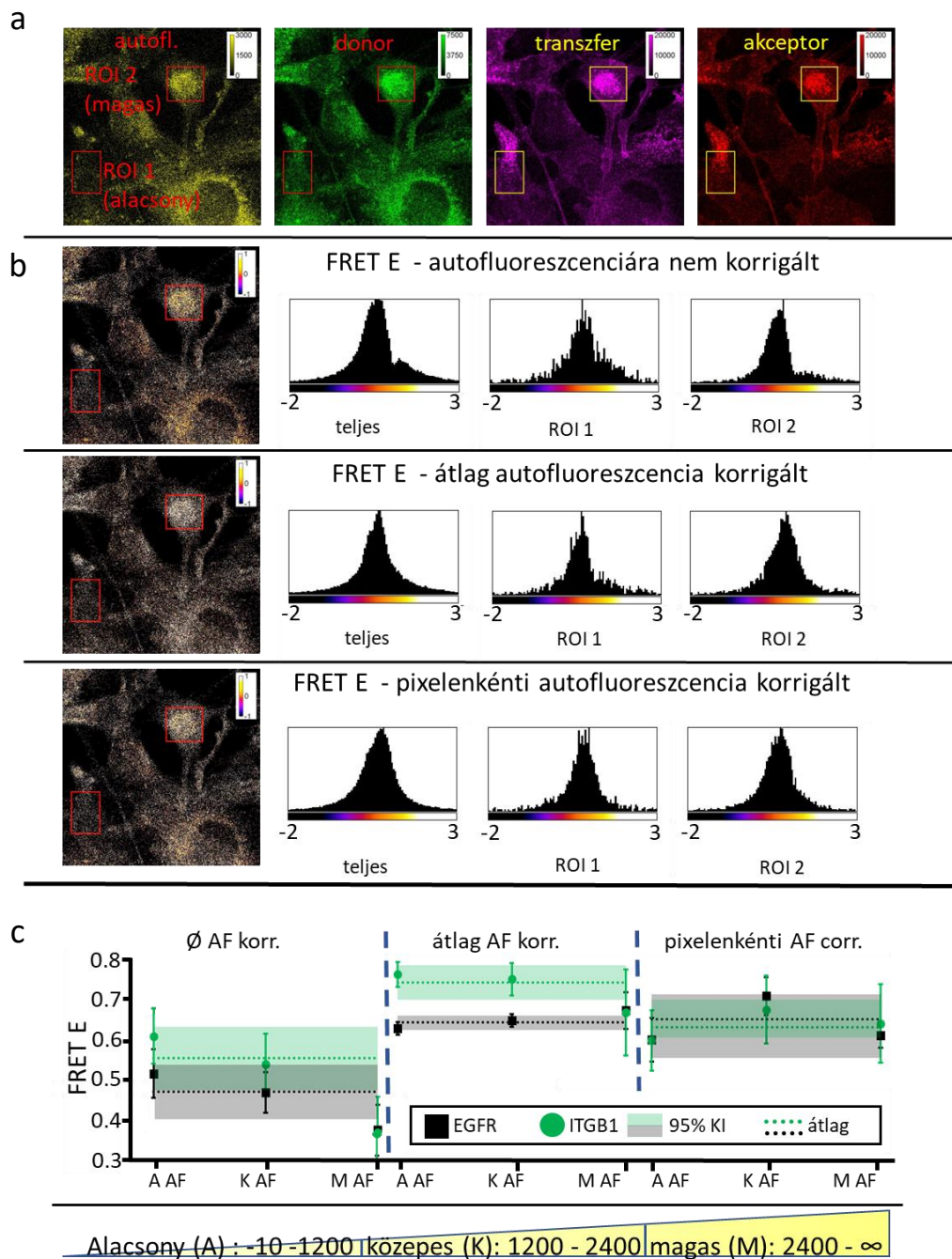
FRET mérés eredményei EGFR és ITGA5 vagy ITGB1 között, direkt immunfluoreszcenciás jelöléssel, mind a két energiáttranszfer irányban. A pozitív kontroll minták esetén ugyanezen molekulák elleni monoklonális antitestek hordozták a donor festéket, míg specifikus másodlagos antitestek az akceptor festéket.

a, Autofluoreszcencia korrekció nélkül, átlag autofluoreszcencia korrekcióval és pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval mért FRET hatásfokok. 12 kép átlaga, a hibajelek a 95% konfidencia intervallumot mutatják.

b, Fluoreszcens jel az autofluoreszcenciához viszonyítva, A grafikonok 12 független minta felhasználásával készültek.

A pozitív kontrollok esetében is megmértük a FRET hatásfokokat (16./a ábra jobb oldal). A mért akceptor/donor arányok ezeken a mintákon megegyeztek egymással (14./d ábra), ami arra utal, hogy a mért FRET hatásfok különbségek nem fakadhatnak a festékek közötti arányok változásából. Az átlag autofluoreszcencia korrigált FRET hatásfokok jól követték a szignál/autofluoreszcencia arányokban tapasztalható trendet, ami az átlagos korrekció tendenciózus torzító hatására utal. Ilyen összefüggést a korrekció nélkül és a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval kapott FRET hatásfok esetében nem találtunk. Ugyanakkor a pixelenkénti korrekcióval a FRET hatásfokok nagyon hasonlóak voltak mind a két egér monoklonális antitest esetében (anti-EGFR és anti-ITGB1), de ezektől különbözött a patkány monoklonális anti-ITGA5 esetében mért FRET hatásfok. Feltételezve, hogy a donorral jelölt elsődleges és az akceptorral jelölt másodlagos antitestek komplexei hasonlóbbak, ha a másodlagos antitestek azonos keverékét használjuk, a patkány- és egérelles antitestet tartalmazó FRET komplexek közötti különbség elfogadható. Ugyanakkor a két egér-ellenes másodlagos antitest közel azonos értékei egyértelműen jelzik, hogy a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció jobb, mint az átlag korrekció, vagy mintha nem használnánk semmilyen korrekciót.

A további elemzést az EGFR alapú pozitív kontroll mintát használva végeztük. A 17./a ábrán két régiót (ROI) jelöltünk ki, egy magas és egy alacsony autofluoreszcenciájút, majd ezekben és a teljes képen feltüntettük a három különböző módszerrel előállított FRET hatásfok eloszlásokat. A pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval készült eloszlások mindhárom esetben hasonlóak voltak. Autofluoreszcencia korrekció nélkül a magas autofluoreszcenciájú terület eloszlása torzult normális eloszlástól eltérő alakra, ami a teljes kép eloszlásában is megjelenik. Az átlagos autofluoreszcencia korrekciós eljárással torzulást az alacsony autofluoreszcenciájú területen is tapasztaltunk.



17. ábra. Autofluoreszcencia hatása a mért FRET hatásokra különböző korrekciós eljárások mellett

a, A négy, FRET méréshez használt fluoreszcencia csatorna képe egy EGFR → másodlagos antitest minta esetében. Régió (ROI) 1: alacsony autofluoreszcenciájú terület. ROI 2: magas autofluoreszcenciájú terület.

b, Pixelenkénti FRET eloszlás képe a 3 alkalmazott korrekciós megoldással, valamint a FRET E hisztogramok a teljes képen és a kijelölt régiókban.

c, EGFR és ITGB1 alapú pozitív kontroll mintákról készült 12-12 FRET kép összes pixelét összegeztük, majd három csoportba osztottuk az autofluoreszcencia nagysága alapján: alacsony (-10—1.200), közepes (1.200—2.400), és magas (2.400—max). A pontok az adott csoportban az átlagos FRET intenzitást jelölik hibajelként a 95% konfidencia intervallummal. A pontozott vonalak az összes pixel átlagát, az áttetsző sávok pedig a hozzájuk tartozó 95% konfidencia intervallumot jelölik.

Annak felderítésére, hogy mi áll a torzult eloszlások háttérében, az EGFR és ITGB1 alapú pozitív kontroll minták képpontjait összesítettük, majd autofluoreszcencia intenzitás szerint három csoportba osztottuk őket (17./b ábra). Az autofluoreszcencia korrekció nélkül számolt FRET értékek fordítottan arányosak az autofluoreszcenciával, alacsony autofluoreszcencia mellett a FRET hatásfok átfed a pixelenként korrigált FRET hatásfokkal, de ahogy nő az autofluoreszcencia, egyre alulkorrigáltabbá válik a mérés. Átlag autofluoreszcencia korrekcióval a globális átlag távol van egymástól az EGFR és az ITGB1 esetében és összességében túlkorrigált. A pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval mért FRET hatásfok független volt az autofluoreszcencia nagyságától.

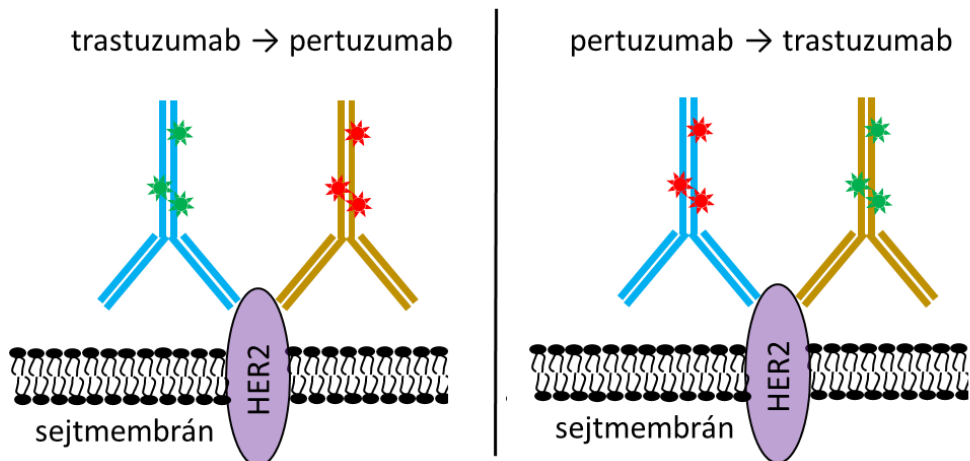
A bemutatott eredményekből arra következtettünk, hogy a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció növeli a FRET számítás pontosságát és megszünteti a torzítást, amelyet a korrekció hiánya, ill. az átlagos korrekció alacsony, ill. magas jel / autofluoreszcencia arány mellett okoz.

III. FRET mérés a Panoramic Confocal automata patológiai szkennelvel

Arra alapozva, hogy a Panoramic Confocal automata patológiai szkennert optikai tulajdonságai alkalmassá teszik kvantitatív mérések végzésére, implementáltuk a készülékre a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciós FRET mérési eljárást.

III.1. Modellrendszer a FRET mérések teszteléséhez a Panoramic Confocalon

A Panoramic Confocal teszteléséhez egy olyan modellrendszert alkalmaztunk, ahol két egymással nem kompetáló, HER2 specifikus monoklonális antitest keverékével jelöltük a HER2 molekulát (18. ábra). Minden esetben két mintát hoztunk létre, az egyiket a trastuzumab, míg a másikat a pertuzumab antitest volt donor festékkel konjugálva. Ezt a jelölést üveg felületre növesztett SK-BR-3 sejtvonalon, és N87 eredetű egérben növesztett tumorból készített fagyasztva metszett mintákon is elvégeztük. Az így készített minták mind a Panoramic Confocallal mind LSM880 lézerpásztázó konfokális mikroszkóppal lemérhetőek, valamint minden jelölés esetében hasonló FRET hatásfokot várunk.

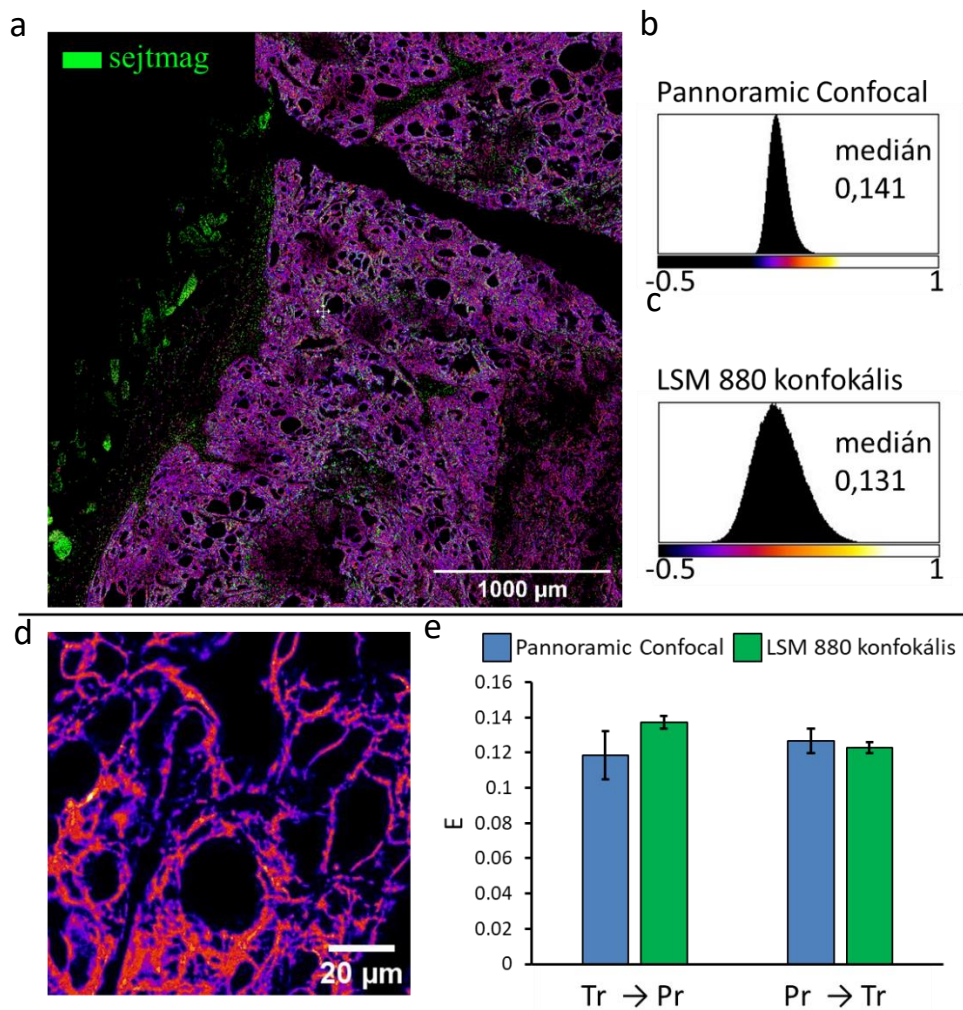


18. ábra. HER2 alapú intramolekuláris FRET modell

Mérési módszerek tesztelésére használt FRET komplexek sematikus ábrázolása.

III.2. FRET mérések Panoramic Confocallal és LSM 880 mikroszkóppal

A mintákat mindkét mikroszkóppal lemértük, és pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval létrehoztuk a FRET hatásfok térképeket. A 19./a ábrán a Panoramic Confocallal készült nagyméretű FRET térkép látható fagyasztva metszett mintán, valamint a pixelenkénti FRET hatásfok eloszlása. Kontrollként feltüntettük az LSM 880 konfokális mikroszkóppal ugyanerről a mintáról készült felvételek FRET hatásfok eloszlását. A két műszerrel mért FRET mediánja közel megegyező volt, azonban a Panoramic Confocallal keskenyebb FRET eloszlást mértünk, amit a műszer jobb fényhatékonyságából eredő (azonos expozíciós idők mellett) jobb jel-zaj arányának tulajdonítunk.



19. ábra. Intramolekuláris FRET mérés Panoramic Confocallal és LSM 880 konfokális mikroszkóppal

a, Panoramic Confocallal felvett több mm² nagyságú trastuzumab \rightarrow pertuzumab FRET térkép N87 eredetű egérben növesztett tumorból készített fagyasztva metszett mintán.

b, A FRET térkép hisztogramja

c, Ugyanezen a mintán Zeiss LSM 880 konfokális mikroszkóppal készült FRET mérés hisztogramja.

d, trastuzumab \rightarrow pertuzumab FRET térkép nagyítva

e, FRET hatásfok trastuzumab és pertuzumab között, SK-BR-3 sejteken mindkét irányban mérve, Panoramic Confocallal és Zeiss LSM 880 konfokális mikroszkóppal. 12 felvétel átlaga, a hibajel a 95% konfidencia intervallumot jelöli.

Az SK-BR-3 sejtvonalon mért FRET hatásfokokat a 19./b ábrán mutatom be, a FRET hatásfokok a fagyasztva metszett mintákon mérttel közel azonosnak adódtak. Ebben az esetben sem találtunk szignifikáns különbséget a két mikroszkóppal mért FRET hatásfokok között. Ebből arra következtettünk, hogy a Panoramic Confocal alkalmas pontos FRET mérésre, mind adherens sejtkultúrák, mind fagyasztva metszett szövetek esetében, azonos molekuláris

modellrendszer esetén a minta forrásától és előkészítésétől függetlenül hibahatáron belül azonos FRET hatásfokot eredményez.

Megbeszélés

A Panoramic Confocal egy automata konfokális patológiai szkennel, amely potenciálisan alkalmas lehet molekuláris interakciók gyors és automatizált vizsgálatára. Ennek eldöntésére megvizsgáltuk a Panoramic Confocal főbb képalkotási paramétereit. Azokban az esetekben, mikor ez releváns volt, a Panoramic Confocalt egy LSM 880 lézerpásztázó konfokális mikroszkóppal hasonlítottuk össze. Megállapítottuk, hogy a mikroszkóp maximális fényhatásfoka a TRITC csatornában van, ami megegyezik a későbbi FRET mérések donor csatornájával.

A mikroszkóp fényhatékonysága nagyon hasonló volt a referencia Zeiss mikroszkóphoz. Megemlítendő továbbá, hogy a konfokális rekonstrukcióhoz a Panoramic Confocallal mért intenzitások $4\times-5\times$ nagyobbak voltak a referencia mikroszkóppal mért értékeknél, így jobb jel-zaj arány (SNR), vagy gyorsabb képalkotás érhető el vele.

A Panoramic Confocal pontkiterjedései függvényeit vizsgálva azt találtuk, hogy a PSF jelentősen eltér a CLSM mikroszkópok elméleti értékeitől mind szimmetriában, mind pedig méreteit tekintve (5. táblázat). Ez azt jelenti, hogy hagyományos konfokális mikroszkópokhoz képest a Panoramic Confocal rosszabb konfokális feloldóképességgel rendelkezik a tér mindhárom irányában [12]. Azonban azt is megállapítottuk, hogy minden fluoreszcens optikai úthoz és objektívhez hozzárendelhető egy empirikusan meghatározott rendszer-PSF, amelyet felhasználva dekonvolúció végezhető a felvételeken. A dekonvolúciót követően nagyban javult a finomszerkezetű szubcelluláris struktúrák egymástól való vizuális elkülöníthetősége. Az automatikus mérés közbeni dekonvolúciós eljárás a mikroszkóp gyártójával közös fejlesztés eredményeként elérhetővé vált a mérőszoftver részeként.

A Panoramic Confocal automata mintakezeléssel rendelkezik. Ennek vizsgáltuk az időbeni stabilitását valamint a relokalizációs pontosságát. A mikroszkóp időben stabilnak tekinthető, két órás időtávon a minta elmozdulása kevesebb volt, mint egy pixel; a relokalizációs pontatlanság 10 ismétlést követően egyszer sem érte el az egy pixelnyi távolságot. Mivel a tárgyasztal pontatlanságai szubpixeles nagyságúak, ez a gyakorlatban nem befolyásolja a Panoramic Confocallal végzett mérések minőségét.

Kvantitatív mérések végzéséhez, valamint a digitális tárgylemez létrehozásakor történő képösszefűzés jó működéséhez homogén intenzitás eloszlású megvilágító fény szükséges [8, 91]. A Panoramic Confocal megvilágítási fényerősség eloszlását vizsgálva azt találtuk, hogy a mikroszkóp minden csatornájában eltért a megvilágítás középpontja a rögzített kép

középpontjától, ennek oka az Aurox cc88 konfokális egység speciális optikai rendszere. A megvilágítás minden csatornában inhomogén volt enyhe hullámhosszfüggés mellett. Ennek megfelelően elengedhetetlen a megfelelő korrekciós eljárás használata, különösen kvantitatív mérések végzéséhez [92]. A mikroszkópban a tapasztalatunkra épülő fejlesztés eredményeként jelenleg már két szoftveres korrekciós eljárás áll rendelkezésre. Az első egy statisztikai alapú, amely több alul áteresztő szűrőn átengedett kép átlagával végzi a korrekciót, ez alkalmas nagy területű digitális tárgylemezek létrehozásához. A második módszerrel egy homogén fluoreszcens mintáról minden optikai úthoz külön felvett képpel végezzük az intenzitás korrekciót még a konfokális kép kiszámítása előtt, ami alkalmas kisméretű felvételek megfelelő korrekciójára, valamint kvantitatív mérések esetén is jobb eredményeket ad.

Minden mikroszkóp kritikus tulajdonsága, hogy az adott képpontból érkező fotonok számával milyen arányban áll a mért intenzitás. Ideális esetben egy mikroszkóp intenzitásválasza lineáris [92]. A lineáris intenzitásválasz különösen fontos, amikor két spektrálisan eltérő fluoreszcens csatornában mért intenzitások arányát hasonlítjuk össze [93]. Ilyenek például a FRET mérések is. Mivel a mikroszkóp intenzitásválasza minden képalkotási módban lineáris, így feltételezhetjük, hogy a mikroszkóp alkalmas kvantitatív mérésekre. A linearitás mérés elvégzése után megvizsgáltuk a mikroszkóp szenzitivitását. A megfelelő szenzitivitás kiemelkedő fontosságú, hogy kvantitatív méréseket végezhessünk normál expressziós szintű biológiai mintákon [93, 94]. Minél jobb érzékenységgel rendelkezik a mikroszkóp, annál alacsonyabb expressziós szintet és / vagy kisebb mértékű interakciót tudunk kimutatni intenzitás alapú FRET mérések során [95]. A Panoramic Confocal esetében ~2000 epitóp/sejt már megbízhatóan kvantitálható.

A Panoramic Confocal képalkotását vizsgálva azt találtuk, hogy a mikroszkóp még olyan kihívásokkal teli minták esetében is, mint egy tárgylemezre rögzített negyed kontaktlencse, látható illesztési hibák nélkül képes a digitális tárgylemez létrehozására, annak ellenére, hogy ez a minta komplex 3D-s struktúrával és nagy területtel rendelkezik. Ezen a mintán összehasonlítva a Panoramic Confocal és a kontroll LSM 880 mikroszkóp kontrasztarányát azt találtuk, hogy a Panoramic Confocal két csatornában jobb a másik két vizsgált csatornában pedig megegyező kontraszt arányú képeket rögzített. Kiemelendő továbbá, hogy ezt tized annyi voxel idő alatt volt képes elérni, mint a kontroll mikroszkóp. A mikroszkóp gyors képalkotása rendkívül előnyös lehet nagyméretű minták esetében, de szükség esetén hosszabb expozícióra és jobb jel-zaj arány elérésére is használható.

Összefoglalva a Panoramic Confocal képalkotása a megvilágítás inhomogenitásának megfelelő korrekciója mellett alkalmas kvantitatív mérések elvégzésére.

A Panoramic Confocal optikai rendszere alkalmas a spektrális átvilágításra korrigált FRET mérések kivitelezésére. A FRET egy költséghatékony és sokoldalú mérési eljárás molekuláris interakciók mérésére [68]. Alkalmazható áramlási citometriában és a fluoreszcencia mikroszkópia különböző módozataiban [61]. Azonban az ilyen mérések eredményét befolyásolhatja a minta autofluoreszcenciája [75]. A szövetekre gyakran jellemző a magas és változatos autofluoreszcencia [96, 97], ezért mielőtt implementáltuk volna a spektrálisan korrigált FRET mérést a Panoramic Confocalra, egy másik mikroszkópon teszteltük a lehetséges megoldásokat az autofluoreszcencia zavaró hatásának kiküszöbölésére. Az átlagos autofluoreszcencia korrekció egy egyszerű megközelítés, ami szinte minden intenzitás alapú FRET mérés esetén könnyen használható [73, 74], azonban, mivel a térben heterogén eloszlású jelet egy konstanssal korrigálja, hibalehetőséget hordoz magában [83, 84]. Emiatt átalakítottunk és implementáltunk egy korábban áramlási citometriában használt eljárást [83], amely a mikroszopos mérés során pixelenként képes korrigálni az autofluoreszcencia torzító hatását. A mérési protokollhoz csatlakozó új kiértékelési algoritmust a korábban fejlesztett Fiji (ImageJ) [89] RiFRET [74] pluginünkben is megvalósítottuk, ill. nagy méréshalmazok teljesen automatikus értékelésének a lehetőségével is kiegészítettük.

A fejlesztés során két sejtvonalon is vizsgáltuk a celluláris autofluoreszcenciát, és azt tapasztaltuk, hogy annak spektruma még a két sejtvonal között is csak minimális eltéréseket mutat, ám szubcelluláris intenzitás eloszlása változatos. A spektrum sejten belüli homogenitása fontos feltétele a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció implementálásához, az intenzitás térbeli heterogenitása pedig szükségessé teszi azt.

A korrekciós módokat először jelöletlen sejteken teszteltük. Ilyen mintákon a tökéletes autofluoreszcencia korrekció elméletileg zérus átlagos intenzitású, alacsony szórású képeket eredményez. Az átlagos autofluoreszcencia korrekció mellett a korrigált képek átlagintenzitása közel került a 0 intenzitáshoz, a szórása viszont megegyezett a korrigálatlan képek szórásával. Ezzel szemben a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciós eljárással nem csak az intenzitások átlaga esett közel a nulla értékhez, de jelentősen csökkent a pixelértékek szórása is, bizonyos esetekben akár 60 %-al.

Ahhoz, hogy a FRET mérések során megbízhatóan meg tudjuk határozni az S és α kalibrációs faktorokat a minták autofluoreszcenciájának zavaró hatása nélkül, homogén, sejtmentes standard tárgylemezeket hoztunk létre. Azt tapasztaltuk, hogy ennek segítségével pontosabban és alacsonyabb szórással határozható meg az α kalibrációs faktor, mint mikor erre sejtes mintákat használunk. Bár más innovatív α kalibrációs módszerek is rendelkezésre állnak [98], ezen lemezek további előnye, hogy felhasználhatóak a Panoramic Confocal inhomogén

megvilágításának korrekciójához a már említett módszerrel, valamint olcsón elkészíthetőek és hónapokig felhasználhatóak.

A továbbiakban egy olyan modellrendszert hoztunk létre, amelyben magas és alacsony FRET hatásfok, expressziós szint és autofluoreszcencia összes kombinációja előállítható és összehasonlítható. Ebben a rendszerben áramlási citométerrel és konfokális mikroszkóppal is mértük a FRET hatékonyságot, és teszteltük a két autofluoreszcencia korrekciós eljárást. A két korrekciós módszer között az eltérések magasabbak voltak a mikroszkópos mérés esetében, de jelentős eltérést mindkét esetben csak a legalacsonyabb jel/autofluoreszcencia arányú minták esetében tapasztaltunk. A mikroszkópos és áramlási citometriás méréseket összehasonlítva azt találtuk, hogy az átlagos autofluoreszcencia korrekció erős pozitív műterméket eredményezett az alacsony szignál/autofluoreszcencia arányú, alacsony FRET hatásfokú mintákon.

A két módszer további összehasonlítására FRET méréseket végeztünk biológiailag releváns mintákon, valamint a hozzájuk tartozó magas FRET hatásfokú kontrollokon. Az ITGA5 →EGFR minta esetében az átlag autofluoreszcencia korrekció erős negatív műterméket eredményezett. Mivel itt magas az autofluoreszcencia, alacsony az akceptor jel, és a FRET hatékonyság is, ez további bizonyítéka annak, hogy az átlag autofluoreszcencia korrekciós eljárás alacsony szignál/autofluoreszcencia arányú minták esetében kerülendő, helyette a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciós eljárás használata ajánlott. Ezzel szemben az egyenes, alacsony autofluoreszcenciájú, magas jelölési intenzitású minták esetében az átlagos autofluoreszcencia korrekció is várhatóan helyes eredményre vezet.

A korrekciós eljárások közötti különbségek alaposabb feltárása érdekében az EGFR alapú pozitív kontroll mintán alacsony és magas autofluoreszcenciájú területeket jelöltünk ki, majd meghatároztuk a FRET hatásfokokat az átlagos és a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval, illetve korrekció nélkül. Az így kapott FRET hatásfokok eloszlását megvizsgáltuk a teljes képen, valamint az alacsony és magas autofluoreszcenciájú területen is. A pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval mindhárom esetben hasonló normális eloszlást követő FRET hisztogramot kaptunk. Az autofluoreszcencia korrekció nélkül a magas autofluoreszcenciájú terület FRET eloszlása torzult leginkább, míg az átlagos autofluoreszcencia korrekciós eljárással hasonló torzulást az alacsony autofluoreszcenciájú területen is tapasztaltunk.

Ezen torzulások hátterének felderítésére az EGFR és az ITGB1 alapú pozitív kontroll minták összes pixelét összesítettük, és autofluoreszcencia szerint alacsony, közepes és magas csoportokra osztottuk őket. Ennek eredményeit megvizsgálva azt találtuk, hogy korrekció nélkül és átlagos autofluoreszcencia korrekció mellett a FRET hatásfok nem független az

autofluoreszcencia nagyságától, a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval mért FRET hatásfok viszont független volt az autofluoreszcencia nagyságától.

A bemutatott eredményekből arra következtettünk, hogy a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció növeli a FRET számítás pontosságát és megszünteti a torzítást, amelyet az alacsony jel/ autofluoreszcencia arányú mintákon figyeltünk meg.

A Panoramic Confocalra implementált pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciós eljárást trastuzumab/pertuzumab intramolekuláris FRET mintákon teszteltük, úgy, hogy ezt a jelölést üveg felületen növesztett SK-BR-3 sejtvonalon, és N87 eredetű egérben növesztett tumorból készített fagyasztva metszett mintákon is elvégeztük. Kontrollként Zeiss LSM 880 lézerpasztázó mikroszkópot használtunk. A két mikroszkóppal mért FRET hatásfok között nem találtunk különbséget, ebből arra következtettünk, hogy a Panoramic Confocal alkalmas pontos FRET mérésre mind sejt kultúrák, mind szövettani metszetek esetében. Emellett a Panoramic Confocal alacsonyabb expozíciós idő mellett képes hasonló vagy jobb kontrasztarányú képek felvételére, mint a kontroll LSM 880, valamint alkalmas teljes tárgylemezek szkennelésére. Összességében a Panoramic Confocalra implementált pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciós FRET mérési módszer megteremti a technikai alapját annak, hogy a molekuláris interakciók vizsgálata a kutatólaborok után a patodiagnosztika területén is megjelenhessen. A biztató eredmények alapján jelenleg a klinikai minták gyűjtése zajlik az EGFR-integrin interakciók további vizsgálatához. Emellett az utóbbi időben több olyan vizsgálatot végeztek, melyek további, potenciálisan diagnosztikailag releváns molekulapárokra hívták fel a figyelmet. Pl. a HER2-HER3 heteroasszociáció mértéke magas prediktív értékkel bír az emlőtumorok metasztázis képző képességére és kiújulására [99], és felvetették ugyanezen interakció fontosságát kolorektális karcinómák esetében is [100], továbbá a HER2-HER2 homoasszociáció is jó prognosztikai markernek bizonyult a korai emlődaganatokban [101]. Szintén emlőtumorokban az Akt/PKB aktiváció mértéke potenciális prognosztikai marker [102]. Itt azonban a FRET mérését nem egy bimolekuláris interakció meghatározására használták, hanem egy pan-Akt és egy foszfo-Akt ellenes antitest közötti FRET alapján zárták ki a jelölés során fellépő aspecifikus kötődést [102].

A PD-1 és PD-L1 interakciójáról kimutatták melanómában, hogy a mértéke független a PD-L1 mennyiségétől és a magas interakció rontja a beteg túlélési esélyeit [103], azonban nem kissejtes tüdőrák és melanóma esetén a magas interakció növeli a PD-1 és a PD-L1 inhibitorok terápiás hatékonyságát is [104].

Ezen felül nemrég hoztak létre egy olyan tárgylemez formátumú FRET alapú peptid microarray-t, amivel több mátrix metalloproteináz aktivitása is hatékonyan mérhető. Ezzel

számos szervi daganat malignitásáról és metasztázis képző képességéről információt nyerhetünk. Mindezen prediktív interakciók a továbbfejlesztett Panoramic Confocal segítségével teljes metszeten, ill. metszet microarray-eken potenciálisan nagy hatékonysággal vizsgálhatók [105].

Összefoglalás

A digitális patológia gyors fejlődése lehetővé teszi szöveti szintű morfológiai felvételek készítését. Immunhisztokémiai jelölések alkalmazásával ezek a morfológiai jegyek egy vagy két molekula expressziós szintjével korrelálthatóak. Napjainkban a fluoreszcenciás patológiai szkennerek megjelenése és elterjedése zajlik, melyek lehetővé teszik több molekula azonos mintában történő, multiplex jelölésen alapuló vizsgálatát. A Panoramic Confocal az első digitális patológiai szkennert, amely a hagyományos transzmissziós és fluoreszcenciás képalkotáson túl konfokalitást is biztosít. A szkennert a konfokális képalkotás, stabilitás, pontosság, linearitás és érzékenység szempontjából vizsgáltuk. A konfokális kép pontkiterjedési függvényét aszimmetrikusnak, de térben invariánsnak mértük; ennek alapján dekonvolúciós algoritmust implementáltunk a műszerhez. Az X-Y dimenzióban mért stabilitás és relokálási pontatlanság jóval a felbontási határ alatt volt. Az intenzitásválasz lineáris volt ($R^2 \geq 0,9996$). A kalibrált mérések azt mutatták, hogy indirekt jelölés alkalmazásával sejtenként ≥ 2000 molekula jól detektálható és leképezhető. A megvilágítást vizsgálva azt találtuk, hogy a mikroszkóp megvilágítása aszimmetrikus és inhomogén. Ennek kiküszöbölésére bevezettünk egy korrekciós módszert, amely alkalmas kisebb területről és térben változatos mintákról készült felvételek megfelelő korrekciójára is, valamint megbízható kvantitatív eredményeket ad. Ennek alkalmazásával, ill. a mérési pontosság ismeretében a Panoramic Confocal alkalmas lehet szövettani metszeteken molekuláris interakciók mérésére. A Förster rezonancia energiáttranszfer (FRET) népszerű eszköz a molekuláris kölcsönhatások tanulmányozására, mivel a 1-10 nm-es tartományban igen érzékeny a távolságra. Az intenzitás alapú, spektrálisan korrigált FRET mérési módszer előnye, hogy háromdimenziós, valamint időfüggő mérésekre is alkalmas. Annak érdekében, hogy használható legyen magas autofluoreszcenciájú metszetek mikroszkópos mérése során pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval, az áramlási citometriában használt sejtenkénti korrekciós algoritmust adaptáltuk. A kidolgozott pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció javítja a mérések pontosságát és különösen alacsony szignál/autofluoreszcencia értékek, valamint térben változatos autofluoreszcenciájú minták esetében ajánlható. Az analízis elvégzésére írt Fiji/ImageJ plugin szabadon elérhető.

A mérési eljárást a Panoramic Confocal készülékkel is teszteltük, ahol a sejteken és fagyasztva metszett szöveten mért FRET hatásfokok a kontrollként használt LSM 880 lézerpásztázó mikroszkóppal mértékekkel egyezést mutattak. Ez alapján a pixelenkénti autofluoreszcencia korrigált FRET mérés implementálásra került a Panoramic Confocal digitális patológiai szkennert szoftverében, megteremtve a diagnosztikai célú FRET mérések a metodológiai és instrumentális alapját.

Summary

The rapid development of digital pathology allows morphological imaging at the tissue level. Using immunohistochemical markers, these morphological features can be correlated with the expression level of one or two molecules in the same slide. The recent emergence of fluorescence pathology scanners, however, allows multiplex detection of several molecules in the same sample. The Panoramic Confocal is the first digital pathology scanner to provide confocal imaging in addition to conventional transmission and fluorescence imaging. We evaluated the scanner for confocal image quality, stability, accuracy, linearity and sensitivity. The point spread function of the confocal image was asymmetric, but spatially invariant; therefore, we have implemented a deconvolution algorithm for the instrument. The stability and relocalisation inaccuracy in the X-Y dimensions were well below the resolution limit. The intensity response was linear ($R^2 \geq 0.9996$). Calibrated measurements showed that ≥ 2000 molecules per cell could be reliably detected and mapped using indirect labelling. We found that the microscope illumination is asymmetric and inhomogeneous. To overcome this, we introduced a correction method that is suitable for the proper correction of images also from small areas as well as spatially diverse samples, and gives reliable results for quantitative measurements. Based on this and findings on instrument precision, the Panoramic Confocal appears suitable for measuring molecular interactions in histological sections.

Förster resonance energy transfer (FRET) is a popular tool for studying molecular interactions due to its high distance sensitivity in the 1-10 nm range. The intensity-based, spectrally corrected FRET measurement method has the advantage of being suitable for three-dimensional as well as time-lapse measurements. To use this method in microscopy with pixel-by-pixel autofluorescence correction, the flow cytometric cell-by-cell autofluorescence correction algorithm has been adapted. The implementation of pixelwise autofluorescence correction improves the accuracy of measurements and is particularly recommended for samples with low signal/autofluorescence ratios and spatially variable autofluorescence intensities. The Fiji/ImageJ plugin written to perform the analysis is freely available.

The measurement procedure was also tested with the Panoramic Confocal, where FRET efficiencies measured on cells and tissue cryosections were in accordance with those measured as control with an LSM 880 laser scanning microscope. Based on this, the pixel-by-pixel autofluorescence corrected FRET measurements have been implemented in the Panoramic Confocal digital pathology scanner software, providing the methodological and instrumental basis for diagnostic FRET measurements.

Irodalomjegyzék

Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Hamilton, P.W., et al., *Digital pathology and image analysis in tissue biomarker research*. *Methods*, 2014. **70**(1): p. 59-73.
2. Barisoni, L., et al., *Digital pathology and computational image analysis in nephropathology*. *Nat Rev Nephrol*, 2020. **16**(11): p. 669-685.
3. Jahn, S.W., M. Plass, and F. Moinfar, *Digital Pathology: Advantages, Limitations and Emerging Perspectives*. *J Clin Med*, 2020. **9**(11).
4. Frassetto, F., et al., *Best Practice Recommendations for the Implementation of a Digital Pathology Workflow in the Anatomic Pathology Laboratory by the European Society of Digital and Integrative Pathology (ESDIP)*. *Diagnostics (Basel)*, 2021. **11**(11).
5. Cheng, C., et al., *High-content image-based analysis and proteomic profiling identifies Tau phosphorylation inhibitors in a human iPSC-derived glutamatergic neuronal model of tauopathy*. *Sci Rep*, 2021. **11**(1): p. 17029.
6. Frankenstein, Z., et al., *Automated 3D scoring of fluorescence in situ hybridization (FISH) using a confocal whole slide imaging scanner*. *Appl Microsc*, 2021. **51**(1): p. 4.
7. Neil, M.A.A., T. Wilson, and R. Juskaitis, *A light efficient optically sectioning microscope*. *Journal of Microscopy-Oxford*, 1998. **189**: p. 114-117.
8. Paulik, R., M. Kozlovsky, and B. Molnar, *Regression Based Iterative Illumination Compensation Method for Multi-Focal Whole Slide Imaging System*. *Sensors (Basel)*, 2021. **21**(21).
9. Pantanowitz, L., et al., *American Telemedicine Association clinical guidelines for telepathology*. *J Pathol Inform*, 2014. **5**(1): p. 39.
10. Helin, H., et al., *Optimized JPEG 2000 Compression for Efficient Storage of Histopathological Whole-Slide Images*. *J Pathol Inform*, 2018. **9**: p. 20.
11. Bankhead, P., et al., *QuPath: Open source software for digital pathology image analysis*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 16878.
12. Biggs, D.S., *3D deconvolution microscopy*. *Curr Protoc Cytom*, 2010. **Chapter 12**: p. Unit 12 19 1-20.
13. Theer, P., C. Mongis, and M. Knop, *PSFj: know your fluorescence microscope*. *Nat Methods*, 2014. **11**(10): p. 981-2.
14. Blissitt, P.A. and N. American Association of Neuroscience, *Clinical practice guideline series update: care of the adult patient with a brain tumor*. *J Neurosci Nurs*, 2014. **46**(6): p. 367-8.
15. Davis, M.E., *Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment*. *Clin J Oncol Nurs*, 2016. **20**(5 Suppl): p. S2-8.
16. Kleihues, P. and H. Ohgaki, *Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors*. *Toxicol Pathol*, 2000. **28**(1): p. 164-70.
17. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. *Am J Pathol*, 2007. **170**(5): p. 1445-53.
18. Thakkar, J.P., et al., *Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014. **23**(10): p. 1985-96.
19. Kunwar, S., et al., *Genetic subgroups of anaplastic astrocytomas correlate with patient age and survival*. *Cancer Res*, 2001. **61**(20): p. 7683-8.

20. Misra, A., et al., *A complex rearrangement of chromosome 7 in human astrocytoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004. **151**(2): p. 162-70.
21. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. E359-86.
22. Curtis, C., et al., *The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups*. *Nature*, 2012. **486**(7403): p. 346-52.
23. Harbeck, N. and M. Gnant, *Breast cancer*. *Lancet*, 2017. **389**(10074): p. 1134-1150.
24. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer Statistics, 2017*. *CA Cancer J Clin*, 2017. **67**(1): p. 7-30.
25. Butti, R., et al., *Breast cancer stem cells: Biology and therapeutic implications*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019. **107**: p. 38-52.
26. Yarden, Y., *The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities*. *Eur J Cancer*, 2001. **37 Suppl 4**: p. S3-8.
27. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(2): p. 127-37.
28. Ohgaki, H., et al., *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 6892-9.
29. Taylor, T.E., F.B. Furnari, and W.K. Cavenee, *Targeting EGFR for treatment of glioblastoma: molecular basis to overcome resistance*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012. **12**(3): p. 197-209.
30. Levantini, E., et al., *EGFR signaling pathway as therapeutic target in human cancers*. *Semin Cancer Biol*, 2022. **85**: p. 253-275.
31. Yarden, Y. and J. Schlessinger, *Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor*. *Biochemistry*, 1987. **26**(5): p. 1443-51.
32. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. *Cell*, 1999. **96**(6): p. 857-68.
33. Downward, J., *Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt*. *Curr Opin Cell Biol*, 1998. **10**(2): p. 262-7.
34. Habib, A.A., et al., *The epidermal growth factor receptor associates with and recruits phosphatidylinositol 3-kinase to the platelet-derived growth factor beta receptor*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(12): p. 6885-91.
35. Daub, H., et al., *Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors*. *Nature*, 1996. **379**(6565): p. 557-60.
36. Gupta, R., et al., *Evaluation of EGFR abnormalities in patients with pulmonary adenocarcinoma: the need to test neoplasms with more than one method*. *Mod Pathol*, 2009. **22**(1): p. 128-33.
37. Sainsbury, J.R., et al., *Epidermal-growth-factor receptor status as predictor of early recurrence of and death from breast cancer*. *Lancet*, 1987. **1**(8547): p. 1398-402.
38. Schmidt-Ullrich, R.K., et al., *ERBB receptor tyrosine kinases and cellular radiation responses*. *Oncogene*, 2003. **22**(37): p. 5855-65.
39. Friedlander, E., et al., *ErbB-directed immunotherapy: antibodies in current practice and promising new agents*. *Immunol Lett*, 2008. **116**(2): p. 126-40.
40. Ferlay, J., et al., *Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods*. *Int J Cancer*, 2019. **144**(8): p. 1941-1953.
41. Pegram, M.D., G. Pauletti, and D.J. Slamon, *HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy*. *Breast Cancer Res Treat*, 1998. **52**(1-3): p. 65-77.

42. Slamon, D.J., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. N Engl J Med, 2001. **344**(11): p. 783-92.
43. Bergado-Baez, G., et al., *Polyclonal antibody-induced downregulation of HER1/EGFR and HER2 surpasses the effect of combinations of specific registered antibodies*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 951267.
44. Barok, M., et al., *Cancer-derived exosomes from HER2-positive cancer cells carry trastuzumab-emptansine into cancer cells leading to growth inhibition and caspase activation*. BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 504.
45. Chari, R.V., *Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs*. Acc Chem Res, 2008. **41**(1): p. 98-107.
46. Modi, S., et al., *Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer*. N Engl J Med, 2022. **387**(1): p. 9-20.
47. Szoor, A., et al., *Trastuzumab derived HER2-specific CARs for the treatment of trastuzumab-resistant breast cancer: CAR T cells penetrate and eradicate tumors that are not accessible to antibodies*. Cancer Lett, 2020. **484**: p. 1-8.
48. Katz, B.Z., et al., *Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(3): p. 1047-60.
49. Dzobo, K. and C. Dandara, *The Extracellular Matrix: Its Composition, Function, Remodeling, and Role in Tumorigenesis*. Biomimetics (Basel), 2023. **8**(2).
50. King, W.G., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(8): p. 4406-18.
51. Janouskova, H., et al., *Integrin alpha5beta1 plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma*. Cancer Res, 2012. **72**(14): p. 3463-70.
52. Hehlhans, S., M. Haase, and N. Cordes, *Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1775**(1): p. 163-80.
53. Mocanu, M.M., et al., *Associations of ErbB2, beta1-integrin and lipid rafts on Herceptin (Trastuzumab) resistant and sensitive tumor cell lines*. Cancer Lett, 2005. **227**(2): p. 201-12.
54. Khwaja, A., et al., *Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway*. EMBO J, 1997. **16**(10): p. 2783-93.
55. Guo, W. and F.G. Giancotti, *Integrin signalling during tumour progression*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 816-26.
56. Katz, M., et al., *A reciprocal tensin-3-cten switch mediates EGF-driven mammary cell migration*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(8): p. 961-9.
57. Petras, M., et al., *Molecular interactions of ErbB1 (EGFR) and integrin-beta1 in astrocytoma frozen sections predict clinical outcome and correlate with Akt-mediated in vitro radioresistance*. Neuro Oncol, 2013. **15**(8): p. 1027-40.
58. Stryer, L. and R.P. Haugland, *Energy transfer: a spectroscopic ruler*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1967. **58**(2): p. 719-26.
59. Szabo, A., et al., *Quo vadis FRET? Forster's method in the era of superresolution*. Methods Appl Fluoresc, 2020. **8**(3): p. 032003.

60. Shrestha, D., et al., *Understanding FRET as a research tool for cellular studies*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(4): p. 6718-56.
61. Szollosi, J., S. Damjanovich, and L. Matyus, *Application of fluorescence resonance energy transfer in the clinical laboratory: routine and research*. Cytometry, 1998. **34**(4): p. 159-79.
62. *Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy*, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J.R. Lakowicz, Editor. 2006, Springer US: Boston, MA. p. 27-61.
63. Nagy, P., et al., *Measuring FRET in flow cytometry and microscopy*. Curr Protoc Cytom, 2006. **Chapter 12**: p. Unit12 8.
64. Pither, C.E., L.D. Bridenbaugh, and F. Reynolds, *Preoperative intercostal nerve block: effect on the endocrine metabolic response to surgery*. Br J Anaesth, 1988. **60**(6): p. 730-2.
65. Gohring, J., et al., *Temporal analysis of T-cell receptor-imposed forces via quantitative single molecule FRET measurements*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 2502.
66. Jares-Erijman, E.A. and T.M. Jovin, *FRET imaging*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(11): p. 1387-95.
67. Schneckenburger, H., *Forster resonance energy transfer-what can we learn and how can we use it?* Methods Appl Fluoresc, 2019. **8**(1): p. 013001.
68. Coullomb, A., et al., *QuantTI-FRET: a framework for quantitative FRET measurements in living cells*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 6504.
69. Vereb, G., J. Matko, and J. Szollosi, *Cytometry of fluorescence resonance energy transfer*. Methods Cell Biol, 2004. **75**: p. 105-52.
70. Levitt, J.A., et al., *Quantitative real-time imaging of intracellular FRET biosensor dynamics using rapid multi-beam confocal FLIM*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 5146.
71. Harkes, R., et al., *Dynamic FRET-FLIM based screening of signal transduction pathways*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 20711.
72. Fazekas, Z., et al., *Two-sided fluorescence resonance energy transfer for assessing molecular interactions of up to three distinct species in confocal microscopy*. Cytometry A, 2008. **73**(3): p. 209-19.
73. Roszik, J., J. Szollosi, and G. Vereb, *AccPbFRET: an ImageJ plugin for semi-automatic, fully corrected analysis of acceptor photobleaching FRET images*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**: p. 346.
74. Roszik, J., et al., *Evaluation of intensity-based ratiometric FRET in image cytometry-- approaches and a software solution*. Cytometry A, 2009. **75**(9): p. 761-7.
75. Leavesley, S.J. and T.C. Rich, *Overcoming limitations of FRET measurements*. Cytometry A, 2016. **89**(4): p. 325-7.
76. Petrovics, R., et al., *A rapid and concise setup for the fast screening of FRET pairs using bioorthogonalized fluorescent dyes*. Org Biomol Chem, 2018. **16**(16): p. 2997-3005.
77. Pham, H., et al., *Forster resonance energy transfer biosensors for fluorescence and time-gated luminescence analysis of rac1 activity*. Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 5291.
78. Hochreiter, B., et al., *Advanced FRET normalization allows quantitative analysis of protein interactions including stoichiometries and relative affinities in living cells*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 8233.
79. Nagy, P., et al., *Maximum likelihood estimation of FRET efficiency and its implications for distortions in pixelwise calculation of FRET in microscopy*. Cytometry A, 2014. **85**(11): p. 942-52.

80. Hochreiter, B., et al., *A Novel FRET Approach Quantifies the Interaction Strength of Peroxisomal Targeting Signals and Their Receptor in Living Cells*. *Cells*, 2020. **9**(11).
81. Nagy, P., et al., *rFRET: A comprehensive, Matlab-based program for analyzing intensity-based ratiometric microscopic FRET experiments*. *Cytometry A*, 2016. **89**(4): p. 376-84.
82. Panchuk-Voloshina, N., et al., *Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates*. *J Histochem Cytochem*, 1999. **47**(9): p. 1179-88.
83. Sebestyen, Z., et al., *Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer*. *Cytometry*, 2002. **48**(3): p. 124-35.
84. Leavesley, S.J., et al., *Assessing FRET using spectral techniques*. *Cytometry A*, 2013. **83**(10): p. 898-912.
85. Cardoso Dos Santos, M., et al., *Time-Gated FRET Nanoprobes for Autofluorescence-Free Long-Term In Vivo Imaging of Developing Zebrafish*. *Adv Mater*, 2020. **32**(39): p. e2003912.
86. Toth, E., et al., *Limbal and Conjunctival Epithelial Cell Cultivation on Contact Lenses-Different Affixing Techniques and the Effect of Feeder Cells*. *Eye Contact Lens*, 2017. **43**(3): p. 162-167.
87. Zsebik, B., et al., *Cultivation of Human Oral Mucosal Explants on Contact Lenses*. *Curr Eye Res*, 2017. **42**(8): p. 1094-1099.
88. Tinevez, J.Y., et al., *TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking*. *Methods*, 2017. **115**: p. 80-90.
89. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 676-82.
90. Szabo, A., et al., *The Effect of Fluorophore Conjugation on Antibody Affinity and the Photophysical Properties of Dyes*. *Biophys J*, 2018. **114**(3): p. 688-700.
91. Zakaria, M.F., H. Ibrahim, and S.A. Suandi. *A review: Image compensation techniques. in 2010 2nd International Conference on Computer Engineering and Technology*. 2010.
92. Wolf, D.E., C. Samarasekera, and J.R. Swedlow, *Quantitative analysis of digital microscope images*. *Methods Cell Biol*, 2013. **114**: p. 337-67.
93. Waters, J.C. and T. Wittmann, *Concepts in quantitative fluorescence microscopy*. *Methods Cell Biol*, 2014. **123**: p. 1-18.
94. Lambert, T.J. and J.C. Waters, *Assessing camera performance for quantitative microscopy*. *Methods Cell Biol*, 2014. **123**: p. 35-53.
95. Kamino, K., et al., *Optimal inference of molecular interaction dynamics in FRET microscopy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023. **120**(15): p. e2211807120.
96. Yang, Y., et al., *Multiplex Immunohistochemistry Staining for Paraffin-embedded Lung Cancer Tissue*. *J Vis Exp*, 2023(201).
97. Jo, G., et al., *Rational Design of a Small Molecular Near-Infrared Fluorophore for Improved In Vivo Fluorescence Imaging*. *Materials (Basel)*, 2023. **16**(22).
98. Batta, A., T. Hajdu, and P. Nagy, *Improved estimation of the ratio of detection efficiencies of excited acceptors and donors for FRET measurements*. *Cytometry A*, 2023. **103**(7): p. 563-574.

99. Weitsman, G., et al., *HER2-HER3 dimer quantification by FLIM-FRET predicts breast cancer metastatic relapse independently of HER2 IHC status*. *Oncotarget*, 2016. **7**(32): p. 51012-51026.
100. Barber, P.R., et al., *HER2-HER3 Heterodimer Quantification by FRET-FLIM and Patient Subclass Analysis of the COIN Colorectal Trial*. *J Natl Cancer Inst*, 2020. **112**(9): p. 944-954.
101. Spears, M., et al., *In situ detection of HER2:HER2 and HER2:HER3 protein-protein interactions demonstrates prognostic significance in early breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. **132**(2): p. 463-70.
102. Veeriah, S., et al., *High-throughput time-resolved FRET reveals Akt/PKB activation as a poor prognostic marker in breast cancer*. *Cancer Res*, 2014. **74**(18): p. 4983-95.
103. Sanchez-Magraner, L., et al., *High PD-1/PD-L1 Checkpoint Interaction Infers Tumor Selection and Therapeutic Sensitivity to Anti-PD-1/PD-L1 Treatment*. *Cancer Res*, 2020. **80**(19): p. 4244-4257.
104. Larijani, B., et al., *Quantification of biomarker functionality predicts patient outcomes*. *Br J Cancer*, 2021. **124**(10): p. 1618-1620.
105. Jian, M., et al., *Development of a peptide microarray-based metal-enhanced fluorescence assay for ultrasensitive detection of multiple matrix metalloproteinase activities by using a gold nanorod-polymer substrate*. *Biosens Bioelectron*, 2024. **246**: p. 115871.

Az értekezés alapjául szolgáló és egyéb saját közlemények (DEENK által hitelesített jegyzék)



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/312/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Rebenku István
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Rebenku, I.**, Lloyd, C. B., Szöllősi, J., Vereb, G.: Pixel-by-pixel autofluorescence corrected FRET in fluorescence microscopy improves accuracy for samples with spatially varied autofluorescence to signal ratio.
Sci. Rep. 13 (1), 1-15, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-30098-w>
IF: 4.996 (2021)
2. **Rebenku, I.**, Bartha, F., Katona, T., Zsebik, B., Antalffy, G., Takács, L., Molnár, B., Vereb, G.: Taking molecular pathology to the next level: whole slide multicolor confocal imaging with the Panoramic Confocal digital pathology scanner.
Cytom. Part A. 103 (3), 198-207, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.24675>
IF: 4.714 (2021)

További közlemények

3. Bankó, C., Nagy, Z. L., Nagy, M., Szemán-Nagy, G., **Rebenku, I.**, Imre, L., Tiba, A., Hajdu, A., Szöllősi, J., Kéki, S., Bacsó, Z.: Isocyanide Substitution in Acridine Orange Shifts DNA Damage-Mediated Phototoxicity to Permeabilization of the Lysosomal Membrane in Cancer Cells.
Cancers (Basel). 13 (22), 1-24, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13225652>
IF: 6.575
4. Csomós, I., Nagy, P., Filep, C. B., **Rebenku, I.**, Nizsalóczki, E., Kovács, T., Vámosi, G., Máttyus, L., Dóczy-Bodnár, A.: Opposing Effects of Chelidonine on Tyrosine and Serine Phosphorylation of STAT3 in Human Uveal Melanoma Cells.
Int. J. Mol. Sci. 22 (23), 1-14, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222312974>
IF: 6.208





5. Nemes, D., Kovács, R. L., Nagy, F., Tóth, Z., Herczegh, P., Borbás, A., Kelemen, V., Pfliegler, V. P., **Rebenku, I.**, Hajdu, P., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Comparative biocompatibility and antimicrobial studies of sorbic acid derivatives.
Eur. J. Pharm. Sci. 143, 1-9, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105162>
IF: 4.384
6. Hajdu, T., Váradi, T., **Rebenku, I.**, Kovács, T., Szöllősi, J., Nagy, P.: Comprehensive Model for Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Binding Involving Conformational States of the Extracellular and the Kinase Domains.
Front. Cell. Dev. Biol. 8, 1-53, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2020.00776>
IF: 6.684
7. Nagy, F., Tóth, Z., Bozó, A., Czeglédi, A., **Rebenku, I.**, Majoros, L., Kovács, R. L.: Fluconazole is not inferior than caspofungin, micafungin or amphotericin B in the presence of 50% human serum against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms.
Med. Mycol. 57 (5), 573-581, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myy108>
IF: 2.822

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 36,383

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
9,71**

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.06.29.



Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetem kifejezni témavezetőmnek, Dr. Vereb György egyetemi tanárnak a témaválasztásért, és kitartó támogatásáért munkám során.

Köszönöm a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet volt és jelenlegi igazgatójának Dr. Szöllősi Jánosnak és Dr. Panyi Györgynek, hogy lehetővé tették munkavégzésem az intézetben.

Hálával tartozom Vágóné Toldi Hajnalkának a kísérletek elvégzésében nyújtott támogatásáért.

Köszönöm a disszertáció alapjául szolgáló közlemények összes társszerzőjének az általuk nyújtott segítséget és tanácsokat.

Hálával tartozom a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet összes dolgozójának.

Köszönöm a családomnak, akik mindenben támogattak a munkám során.

A munkát a GINOP-2.3.2-15-2016-00050 és GINOP-2.2.1-15-2017-00072 pályázatok támogatták.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai