DIFFERENCIÁL-POLARIZÁCIÓS LÉZERPÁSZTÁZÓ MIKROSKÓP FEJLESZTÉSE
ÉS FELHASZNÁLÁSA ANIZOTRÓP BIOLÓGIAI
SZERKEZETEK FELTÁRÁSÁBAN

Ph.D. értekezés

Steinbach Gábor

Témavezető: Prof. Dr. Garab Győző

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológiai Doktori Iskola

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Növénybiológiai Intézet

2012

Szeged

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. A fény polarizációja	7
2.1.1. A fény mint elektromágneses hullám	7
2.1.2. Lineáris és cirkuláris polarizáció.....	7
2.1.3. Kettőtörő anyagok, polarizációs állapotok transzformációs lehetőségei	9
2.1.4. A polarizációs állapot matematikai jellemzése	13
2.1.5. Poláros fény kölcsönhatása rendezett szerkezetekkel	15
2.2. Differenciál-polarizációs mérések.....	16
2.3. A növényi sejtfa szerkezete.....	17
2.4. Amiloidok	20
2.5. Fénybegyűjtő antennakomplexek és jelentőségük.....	22
3. Célkitűzés	26
4. Anyagok és módszerek.....	27
4.1. Gyöngyvirágsejtfa-minták	27
4.2. Amiloid-filamentumok előkészítése, festése	27
4.3. Zn-porfirin molekulák.....	28
4.4. Konfokális mikroszkópia.....	29
4.5. Modulációs mérés technika	33
4.5.1. Fotoelasztikus modulátoron alapuló mérőmódszer	33
4.5.2. Jelfeldolgozás fázisérzékeny erősítő használatával.....	35
4.6. Mueller-mátrix mérések	37
4.7. Az első generációs DP-LSM felépítése és működése	38
4.7.1. Differenciál-polarizációs paraméterek mérése.....	39
4.7.2. Korrekció a Mueller-mátrix vizsgálatok alapján.....	41
5. Eredmények és diszkusszió	43
5.1. A dikroikus tükrök torzítása, korrekciók	43
5.2. Növényi sejtfa anizotróp tulajdonságai.....	45
5.2.1. Differenciál-polarizációs leképezések	45
5.2.2. Térbeli FDLD-mérések.....	47
5.3. Amiloid-filamentumok finomszerkezete.....	48

5.3.1. Rendezettség-mintázatok FDLT-képeken	48
5.3.2. Térfrekvencia-analízis.....	49
5.3.3. 3D modellezés	51
5.4. Zn-porfirin molekulák önszerveződésének vizsgálata	52
5.4.1. Rendeződés mágneses térben	52
5.4.2. Az aggregátumok felépítésének DP vizsgálata	52
5.4.3. A térbeli felépítés modellezése.....	54
5.5. DP-LSM kiegészítő egység fejlesztése Olympus FV500-as mikroszkópra	56
5.5.1. A DP-LSM séma adaptálása új generációs LSM-ekre	56
5.5.2. Elektronikai összehangolás és skálázás.....	59
5.5.3. Lineáris dikroizmus és fluoreszcencia-detektált lineáris dikroizmus	60
5.5.4. A fluoreszcencia-emisszió anizotrópiája	61
5.5.5. A fluoreszcencia-emisszió polarizációfoka.....	61
5.5.6. Az átalakítás hatása a mikroszkópra	63
5.5.7. A kiépített rendszer	64
5.5.8. FDLT-leképezés az FV500 alapú DP-LSM-mel	65
5.6. Nagyfrekvenciás modulációval rendelkező DP-LSM építése	67
5.6.1. Nagyfrekvenciás modulátor	67
5.6.2. Optomechanikai összeépítés	67
5.6.3. A modulátor optikai tulajdonságainak vizsgálata	70
5.6.4. HFR DP-LSM felhasználói felület	72
5.6.5. Nagyfrekvenciás FDLT-leképezések.....	74
6. Köszönetnyilvánítás.....	76
7. Irodalomjegyzék.....	77
8. Összefoglalás.....	88
9. Summary	92
Függelékek	95
F.1. Mueller-mátrix mérések.....	95
F.2. A HFR-PEM vezérlőegység funkciói	96
F.3. A SetDP program	97
F.4. Publikációs lista	99
F.4.1. A dolgozatban felhasznált közleményeim listája	99
F.4.2. További publikációim	99

Rövidítések jegyzéke

- ADC – analóg-digitális átlalkító (analog-digital converter)
- $\mathbf{B}$ – a mágneses indukció vektora
- BChl – bakterio-klorofill (bacteriochlorophyll)
- c – fénysebesség vákuumban (299792458 m/s) [<http://physics.nist.gov>]
- CD – cirkuláris dikroizmus (circular dichroism)
- CLSM vagy LSM – (konfokális) lézerpásztázó mikroszkóp (confocal laserscanning microscope)
- CPL – cirkulárisan poláros lumineszcencia (circularly polarized luminescence)
- DAC – digitális-analóg átlalkító (digital-analog converter)
- DB – dikroikus sugáosztó, dikroikus tükör (dichroic beamsplitter)
- DP – differenciál-polarizációs (mérés, paraméter) (differential polarization)
- $\mathbf{E}$ – az elektromos térerősség vektora
- FDCD – fluoreszcencia-detektált cirkuláris dikroizmus
(fluorescence detected circular dichroism)
- FDLD – fluoreszcencia-detektált lineáris dikroizmus
(fluorescence detected linear dichroism)
- FFT – gyors Fourier-transzformáció (fast Fourier transform)
- FP – a fluoreszcencia polarizációja (fluorescence polarization)
- HFR – nagyfrekvenciás (modulátor, DP-LSM) (high frequency)
- λ – a fény hullámhossza
- LB – lineáris kettőstörés, optikai fázistolás (linear birefringence)
- LD – lineáris dikroizmus (linear dichroism)
- μ_a – az abszorpció transzíciós vektor
- n , n_o , n_e – törésmutató, ordinárius és extraordinárius törésmutató
- NA – mikroszkópobjektív numerikus apertúrája (numerical aperture)
- OD – optikai sűrűség (optical density)
- P – a fluoreszcencia emisszió
- PEM – fotoelasztikus modulátor (photoelastic modulator)
- PHF – kettőshélix szálak (paired helical filaments)
- PMT – foto-elektronsokszorozó cső (photomultiplier tube)
- r – a fluoreszcencia-emisszió anizotrópiája
- SU – konfokális mikroszkóp pásztázó egysége (scanning unit)

1. Bevezetés

Biológiai minták között általános a hierarchikusan rendezett, komplex molekuláris szerkezetek előfordulása: például cellulózsálak, összetapadt membránrégiók, párhuzamosan futó makromolekula-láncok, önszerveződő aggregátumok formájában. Az ilyen struktúrák esetében a minta és a polarizált fény kölcsönhatását felhasználva más módszerekkel nem kinyerhető információt kaphatunk a minta anizotróp molekuláris szerkezetéről.

A Szegedi Biológiai Kutatóközpontban konfokális lézerpásztázó mikroszkópra kidolgozott differenciál-polarizációs mérési technika (DP-LSM) egyesíti a fénymikroszkópos minta-előkészítés egyszerűségét, a konfokális fluoreszcens leképezés minőségét és a dikrográfok által biztosított szerkezeti információk elérhetőségét. A polarizációs mennyiségek ilyen módon való feltérképezése egy mikroszkopikus skálán működő dikrográfot valósít meg (bár a spektrális mérési lehetőségeket nélkülözni kénytelen, illetve meghatározott hullámhosszakra korlátozott, ugyanakkor a fluoreszcencia polarizáció-tartalmának vizsgálatával a dikrográfok lehetőségeit meghaladja).

Doktori kutatómunkám fő célja volt bemutatni a DP-LSM hatékonyságát különféle biológiai rendszerek rendezett szerkezetének feltárásában, valamint továbbfejleszteni az eljárást és alkalmazhatóságát szélesebb körben kiterjeszteni. A mikroszkópos munkámnak előzménye az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) petesejtet a dajkasejtekkel összekötő gyűrűcsatornáinak vizsgálata volt, ahol a DP-LSM hatékony kiegészítő technikának bizonyult a knock-out mutánsokban az aktin-alapú O-gyűrű anizotróp szerkezetének feltárásában, és ezáltal hozzájárult a vizsgált enzimek funkciójának azonosításához [Gorjanác és mtsai, 2006].

Nem csak a szűkebb értelemben vett szerkezetvizsgálati módszerek kerülnek szóba a DP-LSM-mel kapcsolatban. Meg kell említeni az olyan alkalmazásokat is, amelyekben a differenciál-polarizációs méréstechnika a molekulák mikrokörnyezetének vizsgálatában jelentett fontos kutatási előrelépést: sikerült például humán limfociták sejtmembránjában kialakuló lipidraftokat azonosítani a fluoreszcens jelölők polarizációfok-változásának mikroszkópos leképezésével [Gombos és mtsai, 2008].

A mikroszkópos munkába való bekapcsolódásom révén egy régóta zajló növénybiológiai kutatómunkában is részt vállalhattam. A fotoszintetikus membránok 3D topológiájának kérdései erősen megosztották-megosztják a téma kutatóit [Menke, 1960; Weier és mtsai, 1963; Heslop-Harrison 1963; Wehrmayer 1964; Paolillo 1970]. Mustárdy és munkatársai elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján a sztrómamembránok és a gránum összekapcsolódásának helikális modelljét állították fel [Mustárdy és Jánossy, 1979; Mustárdy és Garab, 2003]. Más kutatócsoportok ezzel szemben alternatív térbeli szerkezetet javasoltak [Shimoni és mtsai, 2005]. A nagyfelbontású elektronmikroszkópos tomográfiához [Mustárdy és mtsai, 2008a; Mustárdy és mtsai, 2008b; Garab és Carmen, 2008] DP-LSM-en folytatott vizsgálatok is kapcsolódtak: a rendezett fotoszintetikus membránrendszerek DP-LSM-mel feltérképezhető [Steinbach és mtsai, 2005], és az elektronmikroszkópos vizsgálatokkal összhangban álló [Dekker és Boekema, 2005] erős kettőstörő tulajdonsága nagy jelentőséggel bír a mikromanipulációs technikák számára [Garab és mtsai, 2005a].

A doktori kutatómunkám során többféle fejlesztéssel és alkalmazással összefüggő témával foglalkoztam. A dolgozat fejezetei a megvalósítás időrendjét követik: először a növényi sejtfalon (*Convallaria majalis*) és a humán amiloid-filamentumokon végzett vizsgálatok során nyert, valamint a mesterséges porfirin-molekulák önszerveződő képességével kapcsolatos eredményeimet ismertetem. Ezekhez a kutatásokhoz a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Zeiss LSM410-es mikroszkópjára épített DP-LSM-et használtam. A megjelent publikációknak, konferenciákon bemutatott közleményeknek köszönhetően nőtt meg a bizalom és az érdeklődés a DP-LSM iránt, így kerülhetett sor az ELTE Immunológiai Tanszékén lévő Olympus FV500-as mikroszkóp DP-egységgel való felszerelésére, és ezzel párhuzamosan a szegedi DP-LSM-en elvégzett nagyfrekvenciás fejlesztésre. Eredményeim lezárásaként ezt a két munkafolyamatot mutatom be.

Doktori értekezésemben az eddig megjelent munkáimra, publikációimra támaszkodtam: Steinbach és mtsai, 2008; Steinbach és mtsai, 2009; Steinbach, 2011a; Steinbach és mtsai, 2011b; Chappaz-Gillot és mtsai, 2012. A technikai fejlesztésekkel kapcsolatban tudományos folyóiratban közlemény még nem jelent meg. A nagyfrekvenciás mérőrendszer modulátora jelenleg szabadalmaztatási eljárás alatt áll. [Bognár és mtsai, 2012].

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A fény polarizációja

2.1.1. A fény mint elektromágneses hullám

Az elektromágneses tér viselkedésének törvényszerűségeit Maxwell fogalmazta meg 1865-ben [Maxwell, 1865], melyekből következnek a fény mint *tranzverzális* elektromágneses hullám tulajdonságai. Az elektromos és a mágneses tér két, egymásra merőleges síkban fekvő, időben változó nagyságú vektorral ($\mathbf{E}$ és $\mathbf{B}$) írható le (1. ábra), amelyek merőlegesek a hullám haladási irányára ($\mathbf{k}$) is.

1. ábra. Elemi fényhullám, $\mathbf{E}$ és $\mathbf{B}$ jelöli az elektromos és a mágneses térerősség-vektor irányát, $\mathbf{k}$ a hullámterjedés iránya

A terjedő fényhullám alapvető jellemzői a hullámhossz (λ), illetve a frekvencia (ν), amiből meghatározható az egy foton által hordozott energia mennyisége is. ($\lambda=c/\nu$, $E=h\nu$, ahol $c=299792458$ m/s – a fénysebesség vákuumban, $h=6,62606957\times10^{-34}$ J·s – Planck-állandó [<http://physics.nist.gov>].)

2.1.2. Lineáris és cirkuláris polarizáció

A fényhullám fontos állapotjelzője a polarizációs tulajdonsága, amelyet az elektromos térerősség vektorának síkjával határozunk meg.

Egy szokványos fényforrás esetében nincs ilyen rezgési sík: ebben az esetben polarizálatlan fényről beszélünk (2/a ábra). A lineárisan poláros fény esetében az elektromos vektor egy kitüntetett síkban rezeg. A 2/b, 2/c és 2/d ábrán a különböző síkok mentén polarizált lineárisan poláros elemi hullámokat szemléltetem.

Speciális polarizációs állapot valósul meg akkor is, ha az E vektor nem egy síkot tart meg, hanem spirálisan – kör vagy ellipszis mentén – körbejárja a terjedés irányát: ebben az esetben cirkulárisan, ill. elliptikusan poláros fényről beszélünk. Ha a forgás – a hullámterjedés irányából nézve – jobbra történik, akkor jobbra (2/e ábra), ha balra, akkor balra (2/e ábra) cirkulárisan poláros hullámnak nevezzük [Nagy, 1977].

2. ábra. a) polarizálatlan nyaláb, b-d) különböző síkokban valamint e) jobbra f) balra cirkulárisan és g) elliptikusan polarizált nyalábok. Az eredő elektromos térerősség zölddel, az E vektor függőleges és vízszintes komponensei rendre sárgával és kékkel jelölve.

Bizonyos állatok, főként rovarok szeme alkalmas a fény polarizációs állapotának érzékelésre, az emberi szem azonban erre nem képes, ehelyett műszeres vizsgálatokra van szükség. Műszeres vizsgálatokat valószínűleg a vikingek is végeztek kordierit, illetve turmalinkristály segítségével már a 8-11. században [Hegedűs és mtsai, 2007; Horváth és mtsai, 2008]. Ezek a kristályok *dikroikus tulajdonságúak*: a különböző síkok mentén polarizált fényt eltérő mértékben nyelik el. A polárszűrő erős lineáris dikroizmussal rendelkezik: a kitüntetett irányára merőleges síkban polarizált fényt gyakorlatilag teljesen elnyeli.

Az elektromos tér vektora felbontható tetszőleges koordináta-rendszerben vett összetevőkre: meghatározható ez által az adott síkra vonatkozó polarizációs komponens nagysága. A síkkal párhuzamos polárszűrőn csak ez a komponens jut át.

2.1.3. Kettőstörő anyagok, polarizációs állapotok transzformációs lehetőségei

A közegben haladó fényhullám hullámhossza az anyag törésmutatójának (a terjedési sebesség relatív csökkenésének, $n=c_{\text{vákuum}}/c_{\text{közeg}}$) megfelelően változik: $\lambda'=\lambda/n$ (a vákuum törésmutatója 1). A 3/a ábrán látható, vákuumban terjedő sugárhoz képest az $n>1$ törésmutatóval rendelkező közegben a hullámhossz lecsökken (3/b ábra), de a polarizációs állapot változatlan.

Kettőstörőnek azokat az anyagoknak azokat nevezzük, amelyek a különböző síkok mentén polarizált fénynyalábokra vonatkoztatva eltérő törésmutatóval rendelkeznek. Ezt a közeg erős belső rendezettsége (anizotrópiája) vagy mechanikai feszültség okozza [Ábrahám, 1998].

3. ábra. 45° -os sík mentén polarizált hullám áthaladása a) vákuumban és b) közegen, valamint c) függőleges tengelyű kettőtörő anyagon

A kettőtörő anyagokon áthaladva a fény a kristály tengelyeinek megfelelő komponensekre bomlik, ezekre külön törésmutató (n_o és n_e , ordinárius és extraordinárius törésmutató) vonatkozik. A komponensek egymásra merőleges síkban polarizált lineárisan poláros hullámok. A kettőtörő anyagban az n_o és n_e törésmutatók eltérése miatt fáziseltolódást – *retardációt* – tapasztalunk az áthaladó nyaláb polarizációs komponensei között. A 3/c ábrán megfigyelhető, hogy a függőleges komponens hullámhossza csökken, a vízszintesé változatlan marad. Az ennek következtében fellépő fáziseltolódás a kilépő nyaláb függőleges és vízszintes komponensei között okozza a polarizáció megváltozását. (A gyakorlatban nem fordul elő $n_o=1$ és $n_e>1$ törésmutatókkal rendelkező anyag: a fenti példában n_o és n_e eltérése a lényeges.)

Megfigyelhető, hogy a komponensek fázisának egymáshoz viszonyított speciális eltolása milyen változást eredményez az eredő polarizációs állapotában. A 4. ábrán látható, hogy az egyik (függőleges) komponensnek a hullámhossz negyedével, felével vagy háromnegyedével való retardációja a 45° -ban lineárisan polarizált nyalábon (4/a ábra) milyen változást idézett elő. A lineárisan polarizált nyaláb jobbra cirkulárisan polárosra (4/b ábra), illetve az eredetire merőleges síkban polarizáltra (4/c ábra) változik, majd a retardáció további növelésével balra cirkulárisan poláros állapotba kerül (4/d ábra). Ez utóbbi, $\frac{3}{4}\lambda$ -nak megfelelő retardáció azonos a $-\frac{1}{4}\lambda$ -val.

A polarizációs állapotok fázistolással való megváltoztatása kulcsmozzanata a differenciál-polarizációs méréseket lehetővé tevő nagyfrekvenciás modulációnak.

4. ábra. A komponensek relatív fázistolásának hatása az eredő fénypolarizációra.

a) eredeti, átlós sík mentén polarizált nyaláb, (0° -os fáziskülönbség a komponenseken)

b) negyed hullámnyi fázistolás ($\lambda/4$, 90° -os fáziskülönbség),

c) fél hullámnyi fázistolás ($\lambda/2$, 180° -os fáziskülönbség),

d) háromnegyed hullámnyi fázistolás ($3\lambda/4$, 270° -os fáziskülönbség,

azonos a $-\lambda/4$, -90° -kal)

2.1.4. A polarizációs állapot matematikai jellemzése

A fénysugár polarizációs állapota többféle módon is leírható matematikailag. Például a két komplex komponensből álló Jones-vektorral vagy a négy valós komponenset tartalmazó Stokes-vektorral, amely reprezentáció részletes jellemzést és rugalmas felhasználási lehetőségeket tesz elérhetővé. A polarizációs állapotot módosító optikai eszközök hatását 4x4 elemű mátrixokkal adhatjuk meg.

Tekintsük át a fény polarizációs állapotát leíró négykomponensű Stokes-vektor komponenseit. A leíráshoz a laboratóriumhoz rögzített koordinátarendszert használunk. A z tengely a terjedés iránya, xy síkban rezeg az elektromos tér vektora (E) [Goldstein és Colett, 2003].

E_x és E_y a vízszintes és a függőleges komponensek amplitúdója, φ a komponensek közötti fáziskülönbség.

S_0 – a teljes fényintenzitást jelenti: az elektromágneses hullám merőleges komponensei összegeként határozható meg.

$$S_0 = \langle E_x^2 \rangle + \langle E_y^2 \rangle$$

S_1 – A vízszintes és a függőleges komponensek különbsége a koordinátatengelyek irányába eső lineáris polarizációt jellemzi.

$$S_1 = \langle E_x^2 \rangle - \langle E_y^2 \rangle$$

S_2 – Szemléletesen a diagonális +45°-os, illetve -45°-os polarizáció különbsége.

$$S_2 = 2\langle E_x E_y \cos \varphi \rangle$$

S_3 – Megmutatja a nyaláb jobbra vagy balra cirkulárisan polarizált állapotát. (Szemléletesen a jobbra, illetve balra cirkulárisan poláros komponensek különbségével egyezik meg.)

$$S_3 = 2\langle E_x E_y \sin \varphi \rangle$$

Oszlopvektorba rendezve:

$$S = \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \langle E_x^2 \rangle + \langle E_y^2 \rangle \\ \langle E_x^2 \rangle - \langle E_y^2 \rangle \\ 2\langle E_x E_y \cos \varphi \rangle \\ 2\langle E_x E_y \sin \varphi \rangle \end{pmatrix} \text{ másképpen: } S = \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I^H + I^V \\ I^H - I^V \\ I^{+45} - I^{-45} \\ I^R - I^L \end{pmatrix}$$

Polarizált fényre az $S_0^2 = S_1^2 + S_2^2 + S_3^2$, részlegesen polarizált fényre az $S_0^2 \geq S_1^2 + S_2^2 + S_3^2$ feltétel teljesül. Polarizálatlan nyalábra: $S_1 = 0, S_2 = 0, S_3 = 0$.

Szokásosan a teljes intenzitás $I_0 = \langle E_x^2 \rangle + \langle E_y^2 \rangle$ jelölésével a vektor elemei normáltak, így például a függőleges síkban polarizált fény $S = I_0 \begin{pmatrix} 1 \\ -1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$, a jobbra

cirkulárisan polarizált nyaláb $S = I_0 \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{pmatrix}$ alakban írható le. Az így előálló Stokes-vektorokkal jellemzett sugár optikai elemekkel történő kölcsönhatását mátrixműveletekként írhatjuk le.

A S_0 -ból előálló S' vektort az $S' = MS_0$ kifejezéssel határozhatjuk meg, ahol M a 4x4 elemet tartalmazó Mueller-mátrix. Egy optikai elemhez tartozó Mueller-mátrix elemeinek értéke függhet a beeső fény irányától és hullámhosszától is. Általános esetben 16 független elemről beszélhetünk, az anyagi szerkezet függvényében ez csökkenhet (szimmetrikus/antiszimmetrikus elemek, blokkdiagonális felépítés) [Azzam és Bashara, 1977; Kim és mtsai, 1987].

Egy optikai elem Mueller-mátrixának meghatározásával megismerhetjük a polarizált fényre gyakorolt (esetleg nemkívánatos) módosító hatását, és a méréseink során kapott eredményeket a változtatás ismeretében korrigálhatjuk. (A minták következőkben tárgyalt kölcsönhatása a poláros fényvel elméletileg leírható lenne a rájuk vonatkozó Mueller-mátrixsal is: ez a jellemzés teljes képet adna a polarometriai tulajdonságaikról, azonban ennek mérés technikai akadályai vannak.)

2.1.5. Poláros fény kölcsönhatása rendezett szerkezetekkel

A biológiai vizsgálatokban gyakran jelentős szerepet játszó rendezett minták szerkezetéről polarizációs spektroszkópiai mérések segítségével nyerhetünk fontos információkat. A lineárisan polarizált nyalábban az elektromos térerősség vektora egy meghatározott síkban rezeg, így érzékelhető kölcsönhatásba képes lépni egy egységes orientációjú molekuláris szerkezet párhuzamosan rendezett átmeneti dipólusaival. A poláros fény elnyelésének valószínűsége az abszorpciós dipólus polarizációs síkkal bezárt szögétől függ:

$$P_{abszorpció} \sim (\mathbf{E}\boldsymbol{\mu}_a)^2 = E^2\mu_a^2\cos^2\alpha$$
, ahol $\mathbf{E}$ az elektromos térerősség vektora, $\boldsymbol{\mu}_a$ az abszorpciós tranzíciós vektor.

Ezt a tényt használhatjuk ki a polarizált fénnel történő molekulaszervezeti mérések kivitelezéséhez: pl. a lineáris dikroizmus (LD) meghatározható két, merőleges síkban polarizált sugár abszorpciójának különbségéből [Garab, 1996].

Fluorofórok esetében az abszorpció mértéke követhető az emittált – az abszorpcióval arányos intenzitású – fluoreszcens fény mérésével is (fluoreszcencia-detektált lineáris dikroizmus: FDLD-mérés).

Mindkét vizsgálati mód, az LD és az FDLD is a mintában elhelyezkedő abszorpciós dipólusok irányeloszlásáról szolgáltat információt.

Az LD- és FDLD-mérések esetében a megvilágítás, illetve a gerjesztés polarizációjának változtatásáról van szó. Ezzel analóg módon mérhető a fluoreszcencia anizotrópiája (r), ahol az (abszorpciós dipólusokkal nem feltétlenül párhuzamos) emissziós dipólusokhoz tartozó fluoreszcencia-emisszió polarizációfokából következtethetünk a dipólusok orientációjára. A minta homogén gerjesztésének fontos feltétele ebben az esetben, hogy a megvilágítás depolarizált fénnel történjen. (A poláros gerjesztés okozta fotoszelekció az abszorpció irányfüggő volta miatt befolyásolhatná a vizsgálatot – ld. LD- és FDLD-mérések.) A detektor elé helyezett függőleges, illetve vízszintes polarizációs irányú analizátorszűrővel vizsgálhatjuk a fluoreszcens fény (lineárisan) polarizált voltát.

2.2. Differenciál-polarizációs mérések

A poláros fény és a minta közötti kölcsönhatás érzékeléséhez – elegendő laterális felbontás hiányában – makroszkopikusan rendezett mintára van szükségünk. A minta átfogó szerkezeti orientációját nélkülöző rendszerben az egyes területek kiolthatják egymás hatását, a róluk származó ellenkező előjelű értékek kiátlagolódnak. (Hasonló ez a fel nem mágnesezett vasdomének rendezetlen állapotához: nem tapasztalunk kifelé mutató mágneses teret [Feynman és mtsai, 1970].)

A mintarendezés történhet elektromos vagy mágneses térrel, mechanikus úton, pl. gélben történő összenyomással (membránok esetében), vagy ülepítéssel [Breton és Vermeiglio, 1976; Garab, 1996]. Azonban nem minden esetben hajtható végre ilyen egységes rendezés. Gyakran szeretnénk szövetpreparátumokon, egész sejteken folytatni vizsgálatokat: ez esetben csak mikroszkópos eszközök jöhetnek számításba.

A polarizációs mikroszkópiát, ahol a mintát keresztezett polarizátorok közé helyezik, elterjedten használják az anyagtudományokban, a krisztallográfiában és a biológiában is [Nägeli és Schwendener, 1867]. Leggyakoribb biológiai alkalmazási területe azonban nem a szerkezetvizsgálat, hanem a megfelelő kontraszt elérése átlátszó, abszorpciójukban csak minimális különbségeket, inkább a kettőstörő tulajdonságukban mintázatot mutató objektumok esetében [Bradbury és Evennett, 1996]. Az optikai vagy szerkezeti anizotrópiával rendelkező minták rendszerint lineáris kettőstöréssel (LB) is rendelkeznek. A polarizációs mikroszkóp alkalmas ennek kimutatására: a keresztezett polárszűrők közé helyezett minta vizsgálata során egy kompenzátor lemezt alkalmaznak, ami a minta saját kettőstörésével együtt lehetővé teszi bizonyos fény mennyiség eljutását a megfigyelőhöz a szűrők ellenére. A kompenzátorlemez használata erősen kettőstörő anyagok vizsgálata esetén el is hagyható. Serepe elsősorban a gyengén kettőstörő mintáknál jelentős, ahol a törésmutatókban jelentkező csekély különbség színeltérésként jelenik meg a leképezés során [Robinson és Bradbury, 1992].

A differenciál-polarizációs mérés jelentősen eltér a polarizációs mikroszkóp működési elvétől. A DP-mennyiségek mérése két, ortogonális polarizációs állapothoz tartozó intenzitásmérés különbségén alapszik.

Az anizotróp minták rendszerint jelentős lineáris dikroizmussal és polarizált fluoreszcencia-emissziós tulajdonsággal rendelkeznek. Amennyiben a látható tartományban jelentős a fényelnyelésük, úgy közvetlenül is könnyen vizsgálhatók [Axelrod, 1989], azonban a nem pigmentált minták esetében is megoldható a mérés kivitelezése megfelelő, pontos interkalálódási szöggel rendelkező fluoreszcens festékek alkalmazásával [Makovitzky, 1984; Makovitzky 1987].

A képképző differenciál-polarizációs mikroszkópia Mickols és munkatársai [1985] fejlesztése volt. A méréstechnika arra alapult, hogy két, merőleges polárszűrő-állás segítségével elkészített kép különbségét képezve anizotrópia-térkép állítható elő.

A továbbfejlesztett méréstechnika konfokális mikroszkópra épült a dikrográfokhoz hasonló nagyfrekvenciás modulációt használva [Juang és mtsai, 1988; Finzi és mtsai, 1989]. Az első LSM-re épített polarizáció-modulálással működő berendezés pálcika alakú molekulák orientációs szögének vizsgálatára szolgált LD-mérések kivitelezésével [Gupta és mtsai, 1994]. Ez a mérési összeállítás csak vékony mintákon működött.

2.3. A növényi sejtfa szerkezete

A sejtfa a növényi sejtek legfeltűnőbb alkotórésze: elsősorban ez különbözteti meg a növényi és állati szövetből származó sejteket. A sejtfa többé-kevésbé szilárd vázat alkot a növényi citoplazma körül. A szilárdításon kívül feladata még a külső környezettel való kapcsolattartás (mechanikai szűrés 5 nm átmérőig, ioncserélő felület), valamint védelem a káros külső hatásoktól, mint pl. szárazság, mikrobák, UV-fény, sérülés [Fridvalszky és Hortobágyi, 1978; Cseh, 2007].

Az elsődleges sejtfa szerkezetét a poliszacharid mátrixba ágyazott cellulóz mikrofibrillumok adják, biztosítva a sejtfa szilárdságát, valamint rugalmasságát a növekedéshez (5. és 6. ábra). A sejt növekedésében jelentős szerepet játszik a cellulózsálak iránya és a szerkezet rugalmassága [Baskin, 2005]. A növekedési szakasz lezárultával a szekunder sejtfa (belső réteg) megvastagszik, a beépülő szilárdítóanyagok (pl. lignin) következtében rigiddé válik. A cellulózsálak rendezettsége megnő, lignin keresztkötések alakulnak ki közöttük [Cosgrove, 2002].

5 ábra. A sejtfal építőanyagai és szerkezete [Cosgrove, 2005 nyomán]

A cellulózkötegek a sejt belső felszínén haladó, (a plazmamembránhoz kötött) mikrotubulusokhoz kapcsolódó „rozetta komplexekből” (cellulose synthase complex) kerülnek a sejtfal újabb rétegére. A rétegek többé-kevésbé párhuzamos lefutású szálakat tartalmaznak, ehhez képest az újabb rétegek szálai szöget zárnak be az előzőekkel (7. ábra).

6. ábra. Cellulózsálak beépülése a sejtfalba [Gunning és Steer, 1996 nyomán]

7. ábra. Cellulózsál rétegek és a szálhoz kötődő fluoreszcens dipól

A mikrotubulusok rendezettségének szétzilálásával (kolhicin vagy oryzalin hozzáadásával) a sejtfal szerkezete, ezáltal a sejt alakja jelentősen befolyásolható: tumorszerű, alakatlan sejtek jönnek létre [Cosgrove, 2002].

Fluoreszcens jelöléssel végzett rendezettség-vizsgálatokat végeztek már növényi sejtfalon: Verbelen és munkatársa egymást követő konfokális mikroszkópos képek készítésével hasonlították össze a különböző növekedési fázisban lévő sejtek sejtfal-rendezettségét [Verbelen és Kerstens, 2000]. A mikroszkóp tárgyasztalát forgatva készítették el a merőleges gerjesztési irányokhoz tartozó fluoreszcens felvételeket a kongó vörös festékkel jelölt lúdfű (*Arabidopsis thaliana*) és kukorica (*Zea mays*) növényekből származó gyökér-, valamint saláta (*Valerianella locusta*) levélmintákról.

2.4. Amiloidok

Az amiloidok rendezett fibrilláris szerkezetű fehérje-aggregátumok, számos szervben (vese, mellékvese, lép, máj, gyomor-béltraktus, synoviális membrán stb.) rakódnak le, azok fiziológiás funkcióját jelentősen befolyásolva [Ramírez-Alvarado és mtsai, 2000]. Külön csoportot alkotnak az agyban lerakódó amiloid-depozitumok, melyek számos neurodegeneratív betegség (Alzheimer-kór, Creutzfeldt-Jakob-kór – CJD) kialakulásáért felelősek. Ma, miután a várható életkor növekedtével az Alzheimer-kórban szenvedő betegek száma világszerte emelkedik, az agyban lerakódó amiloidok (ún. neurofibrillumok, erek amiloid plakkjai) vizsgálata és jellemzése kiemelt fontossággal bír [Kelly, 1998; Sipe és Cohen 2000; Chiti és Dobson 2006].

A patohisztológiai vizsgálatokon kívül a fehérjék feltekeredésének-összeépülésének nyomon követésében és a sejtekben szerepet játszó biológiai funkcióik megismerésében is fontos szem előtt tartani szerkezeti tulajdonságaikat [Dobson, 2003].

A fibrillumok felépítésében rosszul vagy csak részben feltekeredett fehérjék a kiinduló építőkövek, ezek aggregálódása nyomán alakulnak ki a protofibrillumok, majd a vastagabb szálak (8. ábra): ezek már mikroszkóposan is megfigyelhető lerakódásokat, plakkokat hoznak létre [Dobson, 2003; Giurleo és mtsai, 2008].

8. ábra. Az amiloidszálak kialakulásának lépései [Giurleo és mtsai, 2008 nyomán]

Az amiloidszál tengelyére merőlegesen futó β -redők alkotják a szál magját [Blake és Serpell, 1996; Sunde és mtsai, 1997], felépülésük lépésről lépésre történik [Kodali és Wetzel, 2007, Kellermayer és mtsai, 2008; Celej és mtsai, 2009; Makovitzky és Richter, 2009].

A szálak az esetek jelentős részében a protofilamentum-párok egymás köré tekeredéséből alakulnak ki [Jimenez és mtsai, 1999]. A kettős hélix szerkezet (paired helical filaments; PHF) jellemzően 5-20 nm-es átmérővel és 75-160 nm-es periódushosszal rendelkezik [Kirschner és mtsai, 1986; Crowther és mtsai, 1991; Reusche és mtsai, 1992; Ferrari és mtsai, 2003].

A szálak rendeződését, strukturális felépítését vizsgálták polarizációs optikai módszerekkel is: általánosak a hagyományos polarizációs mikroszkóppal elvégzett kettőstörés-mérések [Appel és mtsai, 2005]. Végeztek differenciál-polarizációs kísérleteket is: Jin és munkatársai [2003] az LD-méréseik eredményeként erős anizotrópiát észleltek.

2.5. Fénybegyűjtő antennakomplexek és jelentőségük

A Földet érő energiamennyiség többszörösen fedezi a szükségleteinket. A teljes emberiség által fogyasztott teljesítményt – ami 2000-ben 13 TW volt, és az előrejelzések szerint 2050-re megduplázódik – sok nagyságrenddel felülmúlja a napfényből származó energia, de az ún. technikai potenciál is 50TW-ra tehető [Garab, 2009]. A napenergia felhasználásával egy csapásra meg tudnánk oldani a fosszilis energiahordozók kimerülésének problémáját – még azzal együtt is, hogy természetesen elméletileg sem hasznosítható az összes teljesítmény (9. ábra), továbbá az üvegházhatásért felelős CO₂ kibocsátás sem jelentene gondot.

9. ábra. A rendelkezésre álló napenergiából fedezhető az akár 20 TW-os igény is, a lakatlan területekre telepített mindössze 10% hatékonyságú erőművekkel.

[Service, 2005 nyomán]

A nehézség azonban az, hogy rendelkezésre álló fényenergia nagyon híg formában ér el minket. A fényenergiát már 2,5 milliárd éve hasznosító szervezetek [Blankenship, 2002b] olyan molekuláris antennarendszerrel válaszoltak erre a kihívásra, amely képes a nagy területről összegyűjtött fényenergiát az azt hasznosítani képes reakciócentrumokba vezetni (10. ábra). A reakciócentrumok kihasználtsága így optimális – különös tekintettel az antennarendszer energiatovábbító mechanizmusainak szabályozására a fényintenzitás függvényében [Barzda és mtsai, 1995; Lepetit és mtsai, 2012]).

10. ábra. A fényenergia hasznosítása kiterjedt fénybegyűjtő antennakomplex segítségével történik: a pigment molekulák a reakciócentrumhoz továbbítják az elnyelt energiát, ahol a töltésszeparáció megy végbe. [Blankenship, 2002a nyomán]

A különböző fotoszintetizáló szervezetek, baktériumok és magasabb rendű növények számos antenna-topológiát fejlesztettek ki az evolúció során (11. ábra): mindegyik azt a célt szolgálta, hogy a lehető leghatékonyabban továbbítsa az elnyelt fényenergiát a reakciócentrum felé.

11. ábra. Fénybegyűjtő komplexek: a) a bakteriális LH2 komplex szerkezete

(*Rhodospseudomonas acidophila*) b) fikobiliszóma (cianobaktérium)

[Blankenship, 2002b]

c) LHCII szuperkomplex magasabb rendű növényekben [Kouřil és mtsai, 2012]

A mesterséges fényhasznosításnak is jelentős lendületet adna, ha sikerülne hatékony megoldást találni a fény nagy területen történő, olcsó – tehát a tényleges hasznosítást végző elemeket csak kis mennyiségben tartalmazó – begyűjtésére.

12. ábra. Mesterséges napenergia-hasznosító rendszerek:

- a) nincs „antennarendszer” [<http://www.mygreeneducation.com>]
- b) az energiát hasznosító torony körül (nagy felületű és olcsó) tükrök segítenek a fényhasznosításban [Whelan, 2008]

Bizonyos „mechanikus” megoldások már működnek ezen az elven (12. ábra), de érdemes a természettől ellesni a molekuláris antennák használatának módját, különös tekintettel az olyan önszerveződő molekulákra, amelyek képesek a rendezett szerkezetet a közöttük kialakuló kölcsönhatások révén létrehozni.

3. Célkitűzés

Doktori kutatómunkám fő célja a differenciál-polarizációs lézerpásztázó mikroszkóp (DP-LSM) alkalmazhatóságának vizsgálata. Munkámhoz tartozott a korábban összeállított DP-LSM technikai továbbfejlesztése és a DP-technika adaptálása új generációs konfokális mikroszkópokra, ezáltal szélesebb körben elérhetővé tenni ezt a technikát.

I. Biológiai alkalmazások:

1. lineáris dikroizmus mérések fluoreszcensen jelölt növényi sejtfalakon, a cellulózsálak rendezettségének leképezése
2. amiloid-filamentumok szupramolekuláris szerkezetének feltérképezése differenciál-polarizációs módszerekkel és az 3D-s modellek alkotása
3. Zn-ketol porfirin molekulák önszerveződő tulajdonságainak nyomon követése, aggregátumaik szerkezetének megismerése mesterséges fénybegyűjtő antennarendszerek (mesterséges kloroszómák) kialakítása számára

II. Technikai fejlesztések:

1. korrekciók meghatározása a DP leképezés számára a dikroikus tükrökön elvégzett Mueller-mátrix mérésekkel
2. a DP-kiegészítő berendezés adaptálása új generációs konfokális mikroszkópra
(a konfokális mikroszkóp és a DP-kiegészítő elemek hardveres és szoftveres összekapcsolása, tesztelése)
3. nagyfrekvenciás DP-LSM prototípus (HRF DP-LSM készülék) építése

4. Anyagok és módszerek

4.1. Gyöngyvirágsejtfal-minták

A mikroszkópos minta gyöngyvirág növényből (*Convallaria majalis*) származott. A 15 μm vastag gyökérmetszetet acridine orange festéssel, Eukitt beágyazással készítették el [Schaffer és Bauch, 2004]. A metszetet a Carl Zeiss Jena GmbH forgalmazta mikroszkópos tesztmintaként. A Johannes Lieder GmbH & Co. KG Laboratorium terméke.

4.2. Amiloid-filamentumok előkészítése, festése

A humán amiloidszálak preparálása Pras és Linke [Pras és mtsai, 1968; Linke, 1983] eljárása szerint történt. A mikroszkópos minta-előkészítés lépéseit részletesen Scherzinger és Appel [Scherzinger és mtsai, 1997; Appel és mtsai, 2005] ismertették. A szeleteket az amiloidok vizsgálatára széles körben elterjedt kongó vörös fluoreszcens festék 0,1%-os vizes oldatában festették meg 10 percig [Romhányi, 1979], amit 30 perces kimosási fázis, majd a minták gumiarábikum-oldatos lefedése követett [Romhányi, 1958]. A mérésre előkészített mintákat Makovitzky József (Department of Neuropathology, University of Heidelberg, Heidelberg, Németország) volt szíves rendelkezésemre bocsátani.

A kongó vörös fluoreszcens festék hosszúkás molekulája az amiloid-filamentumhoz való rendezett kötődése során megtartja annak irányát, így lehetővé válik a fibrillumok vizsgálata polarizációs és fluoreszcens úton. A mikroszkópos mérés során a festékmolekula orientációjáról nyertünk információt: a szoros kötődés miatt vonhatunk le az amiloidszálakra vonatkozó következtetéseket. (A kötődési irány festéktípustól függ, például a Rivanol a szálakra merőlegesen kötődik.)

4.3. Zn-porfirin molekulák

Az önszerveződésre képes bakterio-klorofill (BChl) molekulák kloroszómákat építve igen hatékony energiatovábbító antennarendszereket képesek létrehozni. Ezt a természetes példát követve merült fel az igény a mesterségesen szintetizált, a BChl-hoz hasonló, de azoknál tartósabb porfirinmolekulák előállítására. A távoli cél olcsó, nem mérgező, a környezetet nem szennyező hibrid napelemek létrehozása biomimetikus alapokon.

A méréseimhez felhasznált cink-ketol porfirinmolekulák (13. ábra) preparálását Silviu Balaban és kutatócsoportja dolgozta ki [Balaban és mtsai, 2009], és Anita Župčanová (Biological Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budejovice, Csehország) közreműködésével juthattam hozzá a mintákhoz, amelyeken a DP-LSM-mel történő vizsgálatokat elvégeztem.

13. ábra. Szintetikus 3,13-Zn-ketol porfirin

4.4. Konfokális mikroszkópia

A fénymikroszkópos technikák felbontóképessége a diffrakció által korlátozott. Függ az objektív numerikus apertúrájától (NA) és az alkalmazott fény hullámhosszától (λ) is: $d = 0,61 \lambda / NA$. A gyakorlatban elérhető felső határ az objektívek numerikus apertúrájára 1,4 körül van [Bradbury és Bracegirdle, 1998], az általam használt olajimmerziós objektívra $NA=1,3$.

A teljes mintát megvilágító világos látóterű mikroszkópnál jobb feloldást lehet elérni a konfokális elrendezés alkalmazásával, ahol a fényforrás mintára eső fókuszpontja a detektor előtt található apertúrán képződik le, így a fókuszon kívülről származó sugarak nem jutnak keresztül rajta a detektorig (14. ábra). A detektort (ami rendszerint egy PMT) csak a fókuszsíkból induló fotonok érik el. Gyakran alkalmazzák a fókusználhatóság terén előnyös tulajdonságokkal bíró koherens lézerfényvel történő pásztázást (CLSM) [Füzessy, 1997].

14. ábra. a CLSM felépítése:

a detektor (PMT) előtt elhelyezett apertúra kizárja a fókuszsíkon kívülről származó fénysugarakat [<http://www.zeiss.de> nyomán]

A pontról pontra történő képfelvétel esetén a felbontóképesség javul: $d = 0,43 \lambda/NA$ [Shinya, 1995; Tolardo di Franca, 1955]. További előnye a konfokális mikroszkópoknak, hogy nem csak jobb laterális feloldást biztosítanak, hanem mélység-információkkal is szolgálnak, hiszen a leképzésben ténylegesen részt vevő sugarak a minta egy adott síkjából érkeznek [Sheppard és Shotton, 1997]. A z koordináta ismerete – elegendő számú egymás alatt elhelyezkedő képsík felvétele esetén – térbeli rekonstrukcióra is lehetőséget ad, így érzékeny objektumok (pl. élő sejtek) roncsolásmentes, optikai szeletelésére is alkalmas. A leggyakrabban alkalmazott fluoreszcens felvételi módban, kis fényelnyelésű (OD) minták esetében a rétegek egymásra hatása csekély. A felbontóképesség z irányban elmarad a laterális feloldástól: $d_z = 2 \lambda n/NA^2$ [Diaspro és mtsai, 2008].

A fókuszon kívüli területek elhagyása nemcsak a 3D rekonstrukció lehetőségét teremti meg, de az egyes szeletek képminősége is javul, mivel a konfokális üzemmódban rögzített képek mentesek lesznek az életlen részekről.

15. ábra. Magasságadatok szemléltetése a) reflexiós és
b) fluoreszcens mérés esetén

A 15. ábrán az optikai szeletelés eredményéből összeépített hamisszínes domborzati térkép látható: a rekonstrukció során a konfokális módban rögzített egyes szeletek magassági információját felhasználva határozható meg az adott fényvisszaverésre (15/a ábra) vagy fluoreszcenciára (15/b ábra) alkalmas terület térbeli helyzete.

A mikroszkópos mérés során az egyes pixelek értéke a képpont területén eltöltött idő alatt felvett fényintenzitás átlaga: a képre kerülő (relatív) zaj a felvételre fordított idő négyzetgyökével csökken. (Azonban, mint látni fogjuk, az alkalmazott DP-méréstechnikához szükséges sebesség elég alacsony felső korláttal rendelkezik, nem választható meg szabadon a szokásos konfokális leképezésre vonatkozó ideális zaj-sebesség egyensúly.)

A pontról pontra haladó pásztázás és a mikroszkópban a képalkotáshoz használt digitális adatrögzítés teremtette meg a lehetőséget a kiegészítő adatfeldolgozó egység csatlakoztatására és a további információkat nyújtó polarizációs mérések elvégzésére.

A biológiai minták mérése során használt Zeiss LSM410-es konfokális mikroszkóp (16/a ábra) alapja egy Zeiss Axiovert 135 típusú fluoreszcens mikroszkóp (M), ehhez kapcsolódik a háromcsatornás pásztázó egység (SU), beépített 543 nm-es és 633 nm-es HeNe lézerekkel és külső (488 és 514 nm-es gerjesztést biztosító) Ar-ion lézerrel. Ezen a mikroszkópon került sor a nagyfrekvenciás modulációval kapcsolatos munka elvégzésére is.

16. ábra. a) a Zeiss LSM410-es mikroszkóp [Zeiss, 1995]
és b) az Olympus FV500-as mikroszkóp sémája [Olympus, 2003].
M: mikroszkóp, SU: pásztázó egység, D: detektorok, L: lézerek,
P: apertúrák (pinhole)

Az új generációs konfokális mikroszkópcsaládhoz épített DP-kiegészítőegységet az ELTE Immunológiai Tanszékén működő Olympus FV500-as mikroszkóphoz (16/b ábra) kapcsoltam hozzá. Ez a mikroszkóp 3+1 csatornás pásztázó egységgel rendelkezik. Optikai szállal becsatolt 543 nm-es és 633 nm-es HeNe lézerekkel és többvonalas Ar-ion lézerrel gerjeszthetők a minták.

4.5. Modulációs mérés technika

4.5.1. Fotoelasztikus modulátoron alapuló mérő módszer

A nagysebességű differenciál-polarizációs mérések egyik meghatározó eleme a fotoelasztikus modulátor (Photo Elastic Modulator: PEM). A PEM-ben található amorf kvarc mechanikai feszültség hatására kettőtörő tulajdonságot mutat. Segítségével fázistolást lehet létrehozni az áthaladó nyalábnak az eszköz ordinárius és extraordinárius tengelyeivel párhuzamos polarizációs komponensein. (Ezeket a tengelyeket a mechanikai gerjesztés jelöli ki.)

A változtatható fázistolást használjuk ki a mérés során igényelt polarizációs állapotok nagysebességű periodikus előállítására. A PEM-re a tengelyével 45° -os szöget bezáró síkban polarizált nyalábot ejtünk. A tengellyel párhuzamos és merőleges komponensek számára biztosított eltérő optikai úthosszal fáziskülönbséget hozunk létre köztük, ezáltal módosítjuk a nyaláb polarizációját a különböző mértékben elliptikusan poláros állapotokon keresztül.

Az időben periodikus előfeszítés hatására a fázistolás is periodikusan változik az alábbi időfüggvénynek megfelelően (17. ábra). A 180° -os (azaz $\lambda/2$ -es) fázistolás az előjelétől függetlenül az eredetire merőleges síkú polarizációt hoz létre. A $\lambda/2$ -es amplitúdójú moduláció ezáltal a mechanikai rezgés frekvenciájának kétszeresével hozza létre a polarizáció modulációját.

Az 50 kHz-es rezgési frekvenciával rendelkező, $\lambda/2$ amplitúdójú rezgést végző modulátor kétszeres gyakorisággal, 100 kHz-cel állítja elő a merőleges tengelyek szerint lineárisan poláros fényt. A $\lambda/4$ -es amplitúdó esetén a keltett cirkuláris polarizáció előjelfüggő, a polarizáció modulációs frekvenciája megegyezik a mechanikai rezgés frekvenciájával.

A megfelelő moduláció előállításához szükséges meghajtófeszültség a PEM-en áthaladó fény hullámhosszának és a kívánt retardáció mértékének függvénye. A fenti módszerrel előállított, egymást rövid időn belül követő ortogonális polarizációs állapotok kedvező lehetőséget teremtenek a lineáris dikroizmus, illetve a fluoreszcencia-detektált lineáris dikroizmus mérésére.

17. ábra. A polarizációs állapot megváltozása a PEM kettőstörésének függvényében. Ld. még 4. ábra.

A PEM polarizációs állapotot megváltoztató hatását kihasználhatjuk a fluoreszcens fény polarizációs állapotának vizsgálatokor is. A PEM-et követő polárszűrő (analizátor) csak abban az esetben engedi át a ráeső nyalábot, ha a PEM az analizátor irányának megfelelően módosította a fluoreszcens fény polarizációját (18. ábra). Így a mérendő komponensek (18/a ábra: függőleges, 18/b ábra: vízszintes lineárisan poláros, 18/c ábra: balra, 18/d ábra: jobbra cirkulárisan poláros) polárszűrővel párhuzamos síknak megfelelő lineárisan polarizált állapotba konvertálásával a szűrőn keresztül juttathatók, és a különbségük (a következőkben részletezett fázisérzékeny erősítővel) meghatározható.

A konverzió során a PEM tengelye 45°-os szöget zár be a mérés koordinátarendszerének tengelyeivel, csakúgy, mint az analizátor irányával.

18. ábra. Fluoreszcencia-analízis

Háromféle fotoelasztikus modulátort használtam: HINDS Instruments PEM-90-es egységet a szegedi DP-LSM mérésekre; HINDS Instruments PEM-100-as egységet építettem be az Olympus FV500-as mikroszkópba, és az Envitech Kft-vel való együttműködésből származó egyedi építésű modulátort alkalmaztam a nagyfrekvenciás prototípusban a megfelelő polarizációs állapotok előállítására.

4.5.2. Jelfeldolgozás fázisérzékeny erősítő használatával

Az ortogonális polarizációs állapotokhoz tartozó intenzitásértékek különbségének meghatározásához a KFKI-ban fejlesztett (Pawel Kamasa, Wiegner FK, Budapest) ISA buszos fázisérzékeny detektorkártyát, illetve a SIGNAL Recovery 7280 típusú lock-in erősítőt használtam. A DP-mérések során az erősítő a kristály rezgési frekvenciájának *kétszeresén* működik, ez a tulajdonképpeni *modulációs frekvencia*. (Ez a kétszeres frekvenciájú referencijel a vizsgálataim során használt mindhárom PEM meghajtóegységből közvetlenül kinyerhető volt.)

A mérés során az erősítő integrációs idejét a pásztázási sebességgel együtt változó pixelátlépési időhöz (dwell time) igazítottam. A ténylegesen egy pixelhez tartozó

adatfelvételi idő kis mértékben változik a mérés során: a teljes képre vonatkozó átlagértékeket tüntettem fel.

a teljes pásztázás ideje	pixelátlépési idő (dwell time)	integrációs idő	modulációs ciklusok száma az integrációs idő alatt	
			100 kHz	400 kHz
64,5 s	244 μ s	200 μ s	20	80
32,2 s	122 μ s	100 μ s	10	40
16,1 s	61 μ s	50 μ s	5	20
8,06 s	31 μ s	20 μ s	2	8
4,03 s	15 μ s	10 μ s	1	4

1. táblázat. A jellemző képalkotási idők és a hozzájuk tartozó mérési paraméterek
(zöld kiemeléssel a gyakorlatban használható ciklusszámok)

Az erősítő által alkalmazott integrációs idők nem lépik át a dwell time-ot – nem mosódnak össze az egyes adatpontok a kiértékelés során. (Bizonyos esetben szükség lehet az időállandó manuális, a fentiektől eltérő megválasztására, pl. a felbontóképességet lényegesen felülmúló zoom használatakor.) Az integrációs idő a moduláció periódusidején keresztül meghatározza a modulációs ciklusok számát, ezen keresztül a leképezés zaját is. (A ciklusok száma az egy adatpont megméréséhez rendelkezésre álló információ mennyiségét befolyásolja.)

4.6. Mueller-mátrix mérések

A polarimetriai vizsgálatokat a Szegedi Tudományegyetem Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékén végeztem el, Wollam M-2000F ellipszométer használatával.

Az ellipszométer 245 és 1000 nm között képes megvizsgálni a mintáról visszaverődő vagy a vizsgált optikai elemen áthaladó fény polarizációs állapotának megváltozását. A gyors mérést egy nagysebességű forgó kompenzátorlemez és a spektrum CCD-detektoros mérésével éri el, ami nagyobb pontosságot biztosít a hagyományos forgó analizátoros ill. forgó polarizátoros elrendezéseknél (Rotating Compensator Ellipsometers).

Szokásos alkalmazási területe az ellipszometriás vizsgálatoknak a vékonyréteg-minták vizsgálata. A bonyolult szerkezetű (pl. anizotróp és depolarizáló tulajdonságokkal egyszerre rendelkező) objektumok adatainak kiértékeléséhez a műszer a felhasználó rendelkezésére bocsátja a Mueller-mátrix 11 elemét is: $M_{1,2}$; $M_{1,3}$; $M_{1,4}$; $M_{2,1}$; $M_{2,2}$; $M_{2,3}$; $M_{2,4}$; $M_{3,1}$; $M_{3,2}$; $M_{3,3}$; $M_{3,4}$ [<http://www.jawoollam.com>].

A méréseket a LSM fő dikroikus tükrein (DB) végeztem el, a mérés során a dikroikus tükrök a mikroszkópban (SU-ban) elfoglalt helyzetükkel azonos módon 45°-os szöget zártak be a beeső mérőfényvel.

4.7. Az első generációs DP-LSM felépítése és működése

A Szegedi Biológiai Kutatóközpontban kifejlesztett differenciál-polarizációs lézerpasztázó mikroszkóp (19. ábra) mind a gerjesztő, mind az emissziós fénypályában lehetővé teszi a fény polarizációs állapotának modulálását a *képfelvétel folyamán*, ezáltal a gyakran használt differenciál-polarizációs mennyiségek meghatározhatók, feltérképezhetők [Garab és mtsai, 2005b; Garab és mtsai, 2007]. A DP-LSM a makroszkopikus dikrográfus vizsgálatok és a konfokális mikroszkópos képalkotás előnyeit egyesíti.

19. ábra. A DP-LSM sémája: a Zeiss LSM410 (kék) és a kapcsolódó DP-kiegészítő egység elemei (piros: a gerjesztőfény modulációjával történő mérésekhez, zöld: a fluoreszcencia polarizációjának analíziséhez)

A gerjesztőlézer, illetve a mintáról származó fluoreszcens fény polarizációs állapotának megváltoztatását egy, a HINDS Instrumentstől származó PEM-90-es fotoelasztikus modulátor végezte.

A nagyfrekvenciás jel demodulálása a KFKI-ban megépített (Pawel Kamasa, SZFKI) ISA buszos mérőkártya segítségével történt. A kártyát vezérlő és a számításokat végző programot az MTA SZBK-ban fejlesztették [Pomozi, 2002].

4.7.1. Differenciál-polarizációs paraméterek mérése

A differenciál-polarizációs mennyiségek, amint néhány esetben már láttuk, két ortogonális polarizációs állapothoz tartozó intenzitásmérésből származtathatók: változtathatjuk a gerjesztőfény polarizációját, illetve a fluoreszcens fény analízise során kiválaszthatjuk a különböző polarizációs komponenseket; ezzel szinkronban rögzítjük a fluoreszcencia vagy (abszorpciómérés esetén) a mintán áthaladó fény intenzitását.

A méréstechnikai módok maguk kínálják a csoportosítás kézenfekvő módját:

	Lézersugár-moduláció	Fluoreszcencia-analízis
Lineáris polarizáció	Lineáris dikroizmus (LD) Fluoreszcencia-detektált lineáris dikroizmus (FDLD) Lineáris kettőstörés (LB)	Polarizációfok (P) Anizotróp fluoreszcencia (r)
Cirkuláris polarizáció	Cirkuláris dikroizmus (CD) Fluoreszcencia-detektált cirkuláris dikroizmus (FDCD)	Cirkulárisan polarizált lumineszcencia (CPL)

2. táblázat. A DP-mennyiségek csoportosítása

A differenciál-polarizációs mennyiségek általános alakja:	$DP = \frac{I_{pol1} - I_{pol2}}{I} = \frac{\Delta I}{I}$	Moduláció helye
Polarizációfok (P)	$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$	Detektálás
Anizotróp fluoreszcencia (r)	$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$	Detektálás
Cirkulárisan polarizált lumineszcencia (CPL)	$CPL = \frac{I_{jobb} - I_{bal}}{I_{jobb} + I_{bal}}$	Detektálás
Lineáris dikroizmus (LD)	$LD = A_{\parallel} - A_{\perp} = -\frac{1}{\ln(10)} \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_0}$	Gerjesztés
Cirkuláris dikroizmus (CD)	$CD = A_{jobb} - A_{bal}$ $= -\frac{1}{\ln(10)} \frac{I_{jobb} - I_{bal}}{I_0}$	Gerjesztés
Fluoreszcencia-detektált lineáris dikroizmus (FDLD)	$FDLD = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$	Gerjesztés
Fluoreszcencia-detektált cirkuláris dikroizmus (FDCD)	$FDCD = \frac{I_{jobb} - I_{bal}}{I_{jobb} + I_{bal}}$	Gerjesztés

3. táblázat. A DP-mennyiségek matematikai definíciója [Pomozi, 2002]

Bizonyos DP-mennyiségek megmérhetőek polárszűrők megfelelő forgatásával, illetve különböző feltételek (gerjesztőfény polarizációs állapota, a detektor vagy kamera elé helyezett analizátor iránya) mellett rögzített képeken végzett utólagos számításokkal. Az egymás után készített felvételekből származó információ azonban

nem feltétlenül megbízható. A biológiai mintákra jellemző az időben változó fluoreszcencia-intenzitás (pl. a gerjesztés hatására csökkenő autofluoreszcencia), valamint a célobjektum elmozdulása (élő sejtek): a nagyfrekvenciás polarizáció-moduláción alapuló mérés legfontosabb előnye, hogy ezeket a hibalehetőségeket kiküszöböli. Pontonként rögzítve az ortogonális polarizációs állapotokhoz tartozó intenzitás-különbségeket, elkerüljük az időbeli és térbeli változások okozta mérési hibák keletkezését. A képpontok adatai a moduláció és a pásztázási sebesség összehangolásának köszönhetően 10-20 elemi mérés átlagából származnak. A szükséges ciklusszám erősen függ az alkalmazott fázisérzékeny erősítő zajszűrő képességétől, típusától.

4.7.2. Korrekció a Mueller-mátrix vizsgálatok alapján

A fényútban lévő dikroikus tükrök módosító hatásait kiküszöbölni az elem polarizációs tulajdonságainak megismerésével lehet. Erre szolgált az adott optikai elem és a polarizált fény kölcsönhatásait leíró Mueller-mátrixok elemeinek meghatározása.

Alkalmazható matematikai módszer a polarizációs állapot-módosításokat mátrix-szorzásként kezelni, ez esetben a mért vektort az inverz mátrixszal megszorozva állíthatjuk vissza az eredeti állapotot. A művelet elvégzéséhez elvben rendelkezünk kellene a teljes Stokes-vektorral, amire általában nincs gyakorlati lehetőségünk. A korrekciót közelítő módon végezhetjük el, amennyiben lehetőségünk van az adott sugárnak egyszerre több független polarizációs paraméterét is mérni (pl. S_0 , S_1 , S_2 – intenzitás, ortogonális polarizáció, diagonális polarizáció).

A DP-LSM készülékben a polarizációs állapot módosulásának fő oka, hogy a dikroikus tükrök nyalábosztóként való alkalmazásuk során 45° -os szöget zárnak be a fényúttal. A visszaverődés/áthaladás során fázistolás léphet fel a beeső fénysugár merőleges vetülete által kijelölt tengely irányában.

A dielektrikum tükrök Mueller-mátrixa két 2×2 -es al mátrixból áll, amint ezt a mért adatok is megerősítették. Az al mátrix-szerkezet esetünkben azt jelenti, hogy a polarizációs állapotok kölcsönhatása két csoportra bomlik: az ortogonális polarizációs arányok megváltozására, valamint a diagonális lineáris polarizáció és a cirkulárisan poláros állapotok egymásba alakulására. Az ortogonális polarizációs sík nem fordul el.

Elvégzett LD- és FDLD-méréseim függőlegesen és vízszintesen polarizált nyalábokkal történtek, így elegendő az ortogonális tengelyek irányába eső lineáris polarizációt módosító mátrix-elemek figyelembe vétele. Ezek hatása az egyes polarizációs komponensek intenzitásának csökkenése: skálázással állítottam vissza az eredeti szinteket a számítások elvégzését követően.

5. Eredmények és diszkusszió

5.1. A dikroikus tükrök torzítása, korrekciók

A lézer hullámhosszától függő korrekció megvalósítja a mért nyers intenzitásértékek visszaszámítását a dikroikus tükrök lineáris polarizációtól függő aszimmetrikus elnyelésének megfelelően. A differenciál-polarizációs értékeket meghatározó algoritmusba beépítettem a lineárisan poláros fény komponenseinek a dikroikus tükrön való intenzitásváltozásait leíró változókat; ez lehetővé teszi a kvantitatív analízisre alkalmas méréseket (pl. a dipólusok irányeloszlásának meghatározásához). A vizsgált dikroikus tükrök Mueller-mátrix adatait a különböző hullámhosszakra a Függelékben közlöm.

A dikroikus tükrök Mueller-mátrixa 2x2-es almátrixokból áll.

$$\begin{pmatrix} S_1' \\ S_2' \\ S_3' \\ S_4' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & M_{1,2} & 0 & 0 \\ M_{2,1} & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & M_{3,3} & M_{3,4} \\ 0 & 0 & M_{4,3} & M_{4,4} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_1 \\ S_2 \\ S_3 \\ S_4 \end{pmatrix}$$

Tehát a DB polarizáció-módosító hatása a függőleges, illetve a vízszintes síkban polarizált nyalábra:

$$\begin{pmatrix} S_1' \\ S_2' \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} S_1 + S_2 M_{1,2} \\ S_1 M_{1,2} + S_2 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}, \text{ ahol } S_1 = 1, S_2 = \pm 1, S_3 = 0, S_4 = 0.$$

A 488 nm-es lézerhez a szükséges értékek: $M_{1,2} = M_{2,1} = -0,28 =: M$, 487,6 nm-nél.

Az első vektorkomponenssel reprezentált intenzitások aránya a megváltozást követően: $\frac{S_1'}{S_1'} \Big|_{S_2=1} = \frac{1+M}{1-M} = 0,5625$. Ez az érték szolgál a kiértékelőprogramban a korrekció elvégzésére (20. és 21. ábra).

20. ábra. Összehasonlító FDLD-leképezés a) korrigálatlan értékekkel és
b) korrekcióval acridine orange festékkel jelölt gyöngyvirág-mintán

21. ábra. Összehasonlító FDLD-leképezés a) korrigálatlan értékekkel, b) korrekcióval
kongó vörössel festett olasz nád sejtfa-preparátumon
(Zsiros Ottó – MTA SZBK – mintája)

5.2. Növényi sejtfalak anizotróp tulajdonságai

5.2.1. Differenciál-polarizációs leképezések

A gyöngyvirágmintán elvégzett mikroszkópos méréseink azt a célt szolgálták, hogy demonstrálják az FDLD-leképezések alkalmasságát az optikai anizotrópia feltérképezésére. Ezek a mérések nem csak síkban, hanem 3D-ben is elvégezhetőek voltak.

22. ábra. a) transzmisszió, b) lineáris dikroizmus-leképezés
c) konfokális fluoreszcencia-intenzitás leképezés
d) fluoreszcencia-detektált lineáris dikroizmus-leképezés

A sejtfal lineáris dikroizmusát 488 nm-es lézerfényel megvilágítva vizsgáltam. Az LD-leképezés transzmissziós módban történik (22/a ábra), az ábráról leolvashatók az igen alacsony értékek (22/b ábra). Ebben az esetben az egymás alatt elhelyezkedő mintasíkok befolyásolják/lerontják egymás polarizációs hatását. Ez a kölcsönhatás kimutatható volt a lineáris kettőstörés-mérések során is [Baskin és mtsai, 1999]. A

vastag mintában előálló fényszórás további problémákat okoz, a konfokális leképezéssel azonban ezek a korlátozó tényezők kiküszöbölhetők.

A konfokális módban felvett fluoreszcens kép a minta egy vékony szeletéből (optikai szeletelés) származik. A képalkotó sugarak kb. 2 μm vastag rétegből származnak. A 22/c ábrán látható a homályos, életlen területek eltűnése: kontrasztos, éles képet kapunk. A fluoreszcens mérésen alapuló FDLD-leképezés rendelkezik a konfokális kép minden előnyével. (A modulációs technika további zajszűrést is biztosít: a fázisérzékeny detektálás elnyomja a modulációtól független zavarokat.) A 22/d ábrán egyértelműen megfigyelhetjük az acridine orange festékkel láthatóvá tett cellulózzsálak irányulását. A hamisszínes ábra pozitív értékei (sárga színnel jelölve) a függőleges, negatív értékei (kék színnel) a vízszintes orientációjú területekhez tartoznak. A 45°-ban, átlósan elhelyezkedő szálak szürke jelölése hasonló a rendezetlen területekhez: a függőleges és a vízszintes síkban polarizált gerjesztésre vonatkozó fényelnyelési tulajdonságaik szintén kiegyenlítik egymást ezek a kérdéses területek a minta elforgatásával egyértelműen azonosíthatók: 23. ábra.).

23. ábra. FDLD-leképezés a) az eredeti minta b) 45°-os és c) 90°-os elforgatással

Az eredmények összhangban állnak Verbelen és Kerstens eredményeivel [Verbelen és Kerstens, 2000; Kerstens és Verbelen 2003]. Ők a tárgyasztal 90°-os elforgatásával egymást követő képekből számolták ki a kongó vörössel festett cellulózzsálak anizotrópiáját.

5.2.2. Térbeli FDLD-mérések

Konfokális technikával a polarizációs vizsgálatok is elvégezhetőek az optikai szeletelés együtt, így a térbeli rekonstrukció is lehetővé válik. A rekonstrukciót követően a különböző irányokban megdöntött adathalmazzal végeztem el, ezekből látható egy válogatás a 24. ábrán. Az ábra elemei az első sorban a 12° -kal felfelé, a második sorban a 12° -kal ill. az 5° -kal balra döntött, az eredeti irányból megfigyelt, az 5° -kal ill. a 12° -kal jobbra döntött, valamint a harmadik sorban a 12° -kal lefelé döntött rekonstrukciót ábrázolják. Megfigyelhető, hogy a szállítószövet eredeti iránya nem volt merőleges a képfelvétel síkjára (a második sor második eleme mutatja a merőleges formát). A nem konfokális módban felvett LD-leképezés kis értékeit részben az egymást követő szeletek különbözőségei okozzák.

24. ábra. Az FDLD-mérési módban elvégzett optikai szeletelést követő
5 és 12° -ban megdöntött térbeli rekonstrukciós eredmények

5.3. Amiloid-filamentumok finomszerkezete

5.3.1. Rendezettség-mintázatok FDLD-képeken

A kongó vörössel festett minták jól detektálható fluoreszcens képet mutattak; a konfokális leképezési technikának köszönhetően lehetőség nyílt a minta optikai szeletelésére is. A 25. ábra bal oldalán (a) a fluoreszcencia-intenzitás, jobb oldalán (b) a DP-mérés eredménye látható. A rendparaméter (S) skálája -0,3-tól (kék) 0,3-ig (sárga) fut. A pozitív S értékek a függőlegeshez közeli orientációra utalnak, a negatív értékek a vízszintesre. A $\pm 45^\circ$ -os átlós irány a rendezetlen területekhez hasonlóan semleges – nulla – DP-értékkal szürkének látszik a függőleges és vízszintes polarizációs irányokhoz tartozó hasonló intenzitásértékek miatt.

Az 25/b ábrán a könnyen áttekinthető kék-sárga hamisszínes megjelenítés mellett a hisztogramokon megfigyelhető a különféle irányban húzódó filamentum-szerkezetekhez tartozó DP-értékek eloszlása.

Az 26. ábrán az egymás alatti ábrarészekon megfigyelhető, hogy a rétegek hasonló, de nem teljesen azonos rendezettséggel bírnak. A szeletelés 1 μm -es függőleges lépésközzel készült.

25. ábra. a) fluoreszcencia-intenzitás

b) DP-leképezés és a különböző irányokba futó szálak területein mért értékek

26. ábra. Bal oldali oszlop: fluoreszcencia-intenzitás, jobb oldal: DP-leképezés.

Az optikai szeletelés során a felvételek egymástól mért távolsága 1 μm volt.

5.3.2. Térfrekvencia-analízis

Erősebb nagyításban a minták egységesen rendezettnek tekinthető területein a polarizációs mintázat – előjelváltással is együtt járó – periodikus változását figyelhetjük meg a 27. ábrán, a pirossal jelölt csíkok mentén.

27. ábra. A DP-képeken megjelenő periodikus mintázat elemzését gyors Fourier-transzformációval végeztem el a bejelölt egyenesek mentén.

Bal oszlop: fluoreszcencia, jobb oszlop: FDLT-leképezés

Az első térfrekvenciacsúcs	Periódushossz
$0,645 \mu\text{m}^{-1}$	$1,55 \mu\text{m}$
$0,576 \mu\text{m}^{-1}$	$1,736 \mu\text{m}$
$0,668 \mu\text{m}^{-1}$	$1,497 \mu\text{m}$
$0,677 \mu\text{m}^{-1}$	$1,48 \mu\text{m}$
$0,629 \mu\text{m}^{-1}$	$1,589 \mu\text{m}$

4. táblázat. A térbeli FFT analízis eredménye a piros vonalak mentén

A vonalakkal jelölt adatsorokon FFT analízist alkalmazva egy $1,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$ periodicitású szerkezetet figyeltem meg.

5.3.3. 3D modellezés

A szakirodalomban az amiloid-filamentumok helikális finomszerkezetéről talált információk alapján [Jimenez és mtsai, 1999, Ferrari és mtsai, 2003, Crowther és mtsai, 1991] valószínűsíthető, hogy a kis léptékű helikális szerkezetek többszörösen feltekeredett formában, mikronos skálán is megjelenhetnek. A feltekeredett biológiai minták között nem ritka a hierarchikus, több léptékben is megfigyelhető csavart struktúra (pl. a kettős szálú DNS további feltekeredése).

28. ábra. Helikális amiloidkötegek és az elemi szál menetemelkedésének aránya

A 28. ábrán Giurleo és munkatársai [2008] által is leírt, a 8. ábrán „fibrillumok”-ként jelölt szálak szuperhelikális elrendeződését ábrázoltam. (A használt 3D renderelő program: POV-Ray 3.62, Persistence of Vision Raytracer [<http://www.povray.org>].) A fő hélix periódusa 3,2 μm, a DP-leképezések során tapasztalt ismétlési távolság kétszerese. Az egymás mellett futó hélixek fázisa azonos, ebben az esetben alakul ki egységes polarizációs mintázat, a mikroszkópos felbontás nem elegendő a szálak egyedi azonosításához.

5.4. Zn-porfirin molekulák önszerveződésének vizsgálata

5.4.1. Rendeződés mágneses térben

A Zn-porfirin molekulák pálcikákba (rodok) rendeződtek, illetve ezekből (pl. az oldószer elpárolgása esetén) nagyobb aggregátumok képződtek. Az egyedi rodok külső mágneses tér hatására a mágneses pólusok irányába álltak be (29. ábra). A leképezést és a számlálást a Zeiss 410-es LSM-en hajtottam végre.

29. ábra. Rendeződés 1,7 T mágneses térben

α a rodok függőlegessel bezárt szöge

(15 mikroszkópos felvételen 280 szögmérés eredménye)

5.4.2. Az aggregátumok felépítésének DP vizsgálata

A rodok és a nagyobb aggregátumok DP-LSM-mel történő vizsgálata feltárta a pálcikák homogén szerkezetét (30. ábrán, „A”-val jelölve és a 32. ábrán), valamint a transzmissziós mikroszkópban csak összekuszálódott aggregátumként azonosítható egységeket felépítő pálcikák jelenlétét. Az egymást részben elfedő rodok tökéletesen azonosíthatóak voltak a polarizációs mintázatuk alapján (30. ábrán „B”-vel jelölve). Az aggregátumok képződése nagyrészt a mikroszkópos munka idejének és

körülményeinek volt tulajdonítható. A mágneses térben való rendezettség vizsgálatakor nem tapasztaltam a rodok között jelentős összetapadást.

30. ábra. FDLD-leképezések a Zn-porfirin molekulák aggregátumain. Az elforgatott felvételeken nyomon követhető az átlós területek rendezettsége.
(Az érték- és a méretskála mindegyik képen megegyezik.)

31. ábra Anizotrópia-leképezések (r) a Zn-porfirin molekulák aggregátumain

A DP-LSM-mel folytatott vizsgálatok, az abszorpciós (30. ábra) és emissziós dipólusok (31. ábra) rendezettségének feltérképezése más, a társszerzők által elvégzett makroszkopikus mérésekkel (LD spektrum és FP mérés mágneses térben) együtt lehetővé tették a tranzíciós dipólusok szögének meghatározását a porfirinmolekula koordináta-rendszerében. A DP leképezések megmutatták a rodok egységes szerkezetét, homogén felépítését a teljes hosszukra nézve (32. ábra).

32. ábra Homogén DP mintázat a rodok mentén

a) FDL D leképezés

b) anizotrópia-leképezés (r)

Az egyes rodokon mérhető anizotrópia-értékből kiszámított fluoreszcencia-polarizáció (FP) nagysága 2,3 volt. Összehasonlításképpen: a makroszkópos FP mérés 1,7 T mágneses térben rendezett mintára csak 1,4-es eredményt adott. A különbség részben a mágneses térben is csak részben rendezett mintából (ld. 29. ábra), részben az aggregátumok vegyes irányeloszlású komponenseiből adódik.

5.4.3. A térbeli felépítés modellezése

A mérési adatok és a kiszámított szögértékek alapján konstruáltam meg a nanorodok (egy lehetséges) 3D szerkezetét: a 33. ábrán látható csöves felépítés az elemi alkotóegység, ezek egymás mellett vagy egymásba ágyazva is.

33. ábra Zn-porfirin molekulák aggregátumaiból képződő nanorodok 3D-s rekonstrukciója felülről és megdöntve

A hengeres elrendezésben a porfirinmolekulák központi cinkatomjához az alattuk lévő réteg oldallánca kapcsolódik. (A gyűrűknek a hengerben való elhelyezkedéséből látszik, hogy a mágneses térben való rendeződésért nem a porfirinváz felel.) A 3D model elkészítéséhez a POV-Ray 3.62, Persistence of Vision Raytracer szoftvert [<http://www.povray.org>] használtam.

5.5. DP-LSM kiegészítő egység fejlesztése Olympus FV500-as mikroszkópra

5.5.1. A DP-LSM séma adaptálása új generációs LSM-ekre

A kompakt felépítésű új generációs mikroszkópokon a zártabb kivitel és a nehezebben módosítható belső mechanika miatt szükség volt az eredeti mérési elrendezés átalakítására, ezt követően kerülhetett sor a mikroszkóphoz használatos DP kiegészítő optikai-mechanikai elemek legyártására és illesztésére.

A fejlesztés az ELTE Immunológiai Tanszékén lévő Olympus 500-as mikroszkópon történt. Jól elkülönülnek egymástól a szerkezeti blokkok (34. ábra): a mikroszkóp (M) és a lézeres egység (SU, a hátsó fehér doboz). Közéjük építhető be a fotoelasztikus modulátor a közel végtelenre korrigált optikai rendszernek köszönhetően.

A mikroszkóp és a pásztázó egység egyetlen fényúttal van összekötve – itt nyílnak lehetőségek a modulátor elhelyezésére. A külső lézerforrásokat egyesítve, optikai kábel segítségével csatolják be a pásztázó egységbe – a mikroszkóphoz biztosított fényvezető megtartja a lézer eredeti polarizációs síkját –, a kábel kapcsolódásánál építhető be a depolarizátor elem.

34. ábra. Az Olympus FluoView 500-as confokális mikroszkóp moduljai: fluoreszcens mikroszkóp (M) és a pásztázó egység (SU)

A modulátor helyének kiválasztása eltérést jelentett az eddigi felépítéshez (19. ábra) képest. A 35. ábrán látható a mikroszkóp (kékkel) és a hozzá kapcsolt DP kiegészítő egységek (pirossal és zölddel jelölve a mérési módoknak megfelelően) sémája. A közös fénypálya helyezett PEM (i) a lineárisan polarizált lézerfényt modulálja az LD- és FDL-mérések kivitelezésekor, ebben az esetben a mintáról származó (fluoreszcens) fénynek csak az intenzitása játszik szerepet a mérés során, a polarizációs állapotát nem vizsgálom; (ii) nem változtat a depolarizált gerjesztő lézersugár állapotán (depolarizátor még a pásztázó egységen kívül helyezkedik el), ellenben a segítségével elvégezhettem a mintáról származó fluoreszcens fény polarizációs analízisét.

35. ábra. Olympus FV500-as mikroszkópra tervezett DP-LSM sémája

36. ábra. a) az eltávolított pásztázó egység (SU)
b) a pásztázó egységet a mikroszkóppal összekötő eredeti cső

A pásztázó egységet a mikroszkóppal összekötő cső könnyűszerrel megbontható (36. ábra) és lehetőség adódik a modulátor-elem (PEM) elhelyezésére egy speciálisan kialakított tartóban, ami lemásolja a csatlakozó felületeket. A PEM tengelye 45° -os szöget zár be az analízis, illetve a gerjesztés által meghatározott koordináta-rendszer tengelyeivel (37. ábra). A modulátor forgatásával lehetséges a koordináta-rendszer elforgatása is, amint arra a PEM-et tartó elem lehetőséget ad. (Későbbi verzióban akár motorizált megoldással is – különös tekintettel a várhatóan hamarosan elérhető, a jelenleginél kisebb tokozással rendelkező modulátorokra.)

37. ábra. a) a modulátort tartó toldalékelem a PEM-mel és
b) az eredeti összekötő csőhöz csatlakoztatva

A PEM 45°-os elforgatásával térképezhető fel az anizotrópia nagysága az átlós komponensekre nézve.

A mikroszkópfejlesztéshez szükséges optomechanikai elemeket a Femtonics Kft. gyártotta le.

5.5.2. Elektronikai összehangolás és skálázás

A DP-mérést megelőzően elvégeztem a lock-in erősítőből (Signal Recovery 7280) származó jel szélsőértékeinek pontos szimmetrizálását (az erősítő kimenete alapértelmezésben előjeles analóg értéket ad, ezt jelenítettem meg a csak pozitív értékeket tartalmazó, de szimmetrikus szintelítetttségű DP-skálán).

Először egy közelítő feszültségérték-eltolást valósítottam meg, amire kétféle lehetőségem is adódott. A részletesebb beállítási lehetőségekkel rendelkező típuson ofszet lehetőség állt rendelkezésemre a kimenő csatorna számára. Az így beállított DC eltolással tudtam biztosítani, hogy a mikroszkóp csak pozitív jeleket kapjon: így a DP-jel nulla szintje az intenzitás-skála 50%-ával egyezik meg.

A másik lehetőség a jelszint megfelelő beállítására – ami egyszerűbb, olcsóbb típusokon, mint például a szintén kipróbált Signal Recovery 7225, az ofszet beállítás lehetőségének hiányában szükséges is –, hogy a mikroszkóp elektronikája az inicializációs folyamat során mért feszültségértéket tekinti nulla szintnek. A Signal Recovery erősítő programozható DAC portja segítségével ezzel az *eltolt* nulla értékkel (mérési csatornánként, függetlenül) definiáltam a skála helyét a DP-adatok gyűjtését végző csatorna számára.

Ezt követte a finomhangolás. A skála végponti értékeihez tartozó bemeneti feszültség szinteket a DAC-ból vezettem a mikroszkóp bemenetére, és a hozzájuk tartozó szoftveres értékeket jelöltem ki a skála végpontjául. Az Olympus FV500-as mikroszkóp 12 bites digitalizálási mélysége elegendő tartalékkal bírt a végérték-korrektúra elvégzésére, az exportálható képfile-ok színmélysége 8 bit csatornánként.

5.5.3. Lineáris dikroizmus és fluoreszcencia-detektált lineáris dikroizmus

38. ábra. Modulált gerjesztéssel végrehajtható (LD, FDL) mérések sémája

Az LD- és FDL-mérések kivitelezéséhez a polarizált lézerfényt moduláltam a közös fénypálya helyezett PEM segítségével (38. ábra). A modulált lineárisan poláros gerjesztő- (FDL) ill. mérőfény (LD mérés esetén) szelektíven nyelődik el a mintában elhelyezkedő abszorpciós dipólusoknak köszönhetően.

5.5.4. A fluoreszcencia-emisszió anizotrópiája

39. ábra. Az anizotrópia-mérés sémája

A mintát polarizálatlan lézerfény éri, irányfüggetlenül gerjesztve a fluorofor molekulákat. A fluoreszcencia analízise a közös fényútba helyezett PEM-mel és a detektor előtt lévő analizátor (A) polárszűrővel történik (39. ábra). A demoduláláshoz itt is a PMT-vel összekötött lock-in erősítőt alkalmaztam.

5.5.5. A fluoreszcencia-emisszió polarizációfoka

A közös fényútba elhelyezett modulátor az állandó lineáris polarizációjú gerjesztőfény miatt nem alkalmazható megoldás a polarizációfok-mérés esetében, itt teljesen más elrendezést használtam. A fluoreszcens fényútba épített polarizációs osztókocka teszi lehetővé a különböző tengelyek mentén polarizált komponensek intenzitásának összehasonlítását (40. ábra). Az ilyen megoldások mindenképpen megkövetelik a DP-feltét befogadására szolgáló mikroszkóp alapos átvizsgálását: olyan pozíciót kell keresni, ahol nem zavarja meg a gyári működést. A minimális beavatkozás elvének megfelelően olyan módon alakítható át a fedőlap, hogy a szükséges elemek belógathatók legyenek a scanning unit belsejébe anélkül, hogy az alkatrészek épségét kockáztatnánk. A teljes fedőlap könnyűszerrel lecserélhető. Az „utángyártott” lap (41.

ábra) hordozza a DP-méréshez szükséges alkatrészeket, így szükség esetére megőrzi az eredeti mikroszkópelemeket gyári állapotukban.

40. ábra. A polarizációfok-mérés sémája

T: tükör, PO: polarizációs osztókocka

41. ábra. A polarizációfok-mérését biztosító fedőlap

5.5.6. Az átalakítás hatása a mikroszkópra

A felhasználói szempontból legfontosabb eltérések a kiegészítő cső alkalmazása esetén: a megszokottól 22 μm -rel eltérő fókuszsík-helyzet és a képkivágás 42. ábrán bemutatott megváltozása.

A fókuszsík eltérése az okulárral való megfigyeléshez képest értendő. A helyes sík beállítása a mikroszkóp szoftveresen vezérelhető motoros objektív-mozgatásával végezhető el.

42. ábra. A képkivágás méretének 7,3%-kal történő csökkenése az új összekötő-elem behelyezésekor:

a) eredeti (transzmissziós) felvétel

b) ugyanaz a minta a DP kiegészítők használatakor

A 42. ábrán bemutatott fém tesztminta felvételén látszik, hogy a nagyítás az összekötő cső behelyezésével megváltozik. A képkivágás lecsökkenését a mikroszkóp szoftvere nem követi, így az automatikus méretezési funkciók csak hozzávetőleges eredményt szolgáltatnak; az elkészített képek méretezésekor ezt a 7,3%-os különbséget figyelembe vettem.

5.5.7. A kiépített rendszer

43. ábra. A differenciál-polarizációs mérőrendszer elemei:

Konfokális mikroszkóp

a: fluoreszcens mikroszkóp

b: pásztázó egység

c: összekapcsolt lézerforrások

d: fluoreszcens kép

DP-kiegészítők

A: fotoelasztikus modulátor (PEM)

B: a PEM-et rögzítő összekötő elem

C: PEM vezérlő

D: lock-in erősítő

E: detektorok jelének kicsatolása és a DP érték visszavezetése a mikroszkópba

F: DP kép megjelenítése

Az Olympus FV500-as konfokális mikroszkópba épített DP-LSM rendszer (43. ábra) gyakorlati bemutatóját a 2011. augusztus 23-27. között Budapesten megrendezett 8. EBSA konferencián tartottuk. (Kiállító: Biofotonika Kft. [<http://www.ebsa2011.org>].)

5.5.8. FDLD-leképezés az FV500 alapú DP-LSM-mel

A tesztméréseket az acridin orange festékkel jelölt gyöngyvirágmintán végeztem el. A 44-46. ábrákon a mérések fluoreszcens és DP értékeit mutatom be FDLD módban rögzített felvételeken.

44. ábra. a) fluoreszcens felvétel b) DP-leképezés

45 ábra. a) fluoreszcens felvétel b) DP-leképezés

46. ábra. a) fluoreszcens felvétel b) DP-leképezés

A fluoreszcens kép sötét pixeleihez szürke (0 értékű) területek tartoznak a DP megjelenítésnél, mivel a Signal Recovery erősítő nem rendelkezik diszkriminátor funkcióval a fluoreszcens fényt ki nem bocsátó területek kizárására. A Zeiss mikroszkópon működő ISA mérőkártyás lock-in vezérlőprogramja elvégezte ezt a válogatást, ezért látható fekete háttér a DP-mérések képein. A nyilak jelölik a hamisszínes skála különböző irányokhoz tartozó színmegfeleltetését. A felvételek tökéletes minőségű DP-leképezésről tanuskodnak.

Az Olympus FV500-as új generációs mikroszkópokra adaptált DP-kiegészítő a mikroszkóp belső szerkezetének módosítása nélkül alkalmas a DP-LSM technika megvalósítására.

5.6. Nagyfrekvenciás modulációval rendelkező DP-LSM építése

5.6.1. Nagyfrekvenciás modulátor

A 200 kHz-es mechanikus rezgési frekvenciára képes fotoelasztikus modulátor (47. ábra) az Envitech Kft.-vel való együttműködésből származott. A nagyobb rezgési sebesség miatt a szokásos stabilizálási módszerek helyett újat kellett találni, ez megnehezítette a gyártást. (A kristály sajátrezgésének használata nem volt alkalmas a generátor frekvenciájának megtartására.) Az alapjaiban áttervezett vezérlőegységhez a mikroszkópban már eddig is használt Hinds PEM-90-es modulátor tokozási geometriáját társították, hogy a különböző modulátorok felcserélhetők legyenek. (Mint később rámutatok, ez nem volt megvalósítható.)

47 ábra. Nagyfrekvenciás modulátor

5.6.2. Optomechanikai összeépítés

A modulátor beépítésének leginkább kérdéses pontja az volt, hogy helyet találjak számára az LSM410 gerjesztő fényútvárában. A fejlesztés során végigpróbált megoldások, amelyek során az eddig használt elrendezéshez hasonlóan a mikroszkóp pásztázó egységébe való beépítéssel kísérleteztem (többek között az eredeti PEM-tartó sín

használatával), zsákutcának bizonyultak. Egyrészt problémát jelentett, hogy a speciális nagyfrekvenciás modulátorkristály nem rendelkezik olyan nagy aktív felülettel, mint a kereskedelemben hozzáférhető lassabb társai (pl. HINDS Instruments, PEM-100), így figyelembe kellett vennem a rajta áthaladó lézernyaláb átmérőjét. Az optikai padon történő bemérések megmutatták, hogy a kis torzítású modulációra alkalmas terület a tágítatlan lézernyaláb átmérőjével összemérhető, így a nyalábtágító teleszkóprendszer előtt lehetett megtalálni az optimális helyet a lézer-fényút számára. Másrészről meg kellett oldani azt a kérdést, hogy a HFR-PEM optikai tengelye nem párhuzamos a tokozás élével, így hasznosabb olyan helyet és tartót tervezni, ahol az forgatható.

Erre a problémára gyökeresen új megoldást kellett találnom. Az új generációs mikroszkópokra is gondolva jobb megoldásnak tűnt a pásztázó egységen kívülre, a lézerbecsatolás elé helyezni a modulátort. A Zeiss LSM-en direkt bevezetéssel rendelkeznek a külső lézerek, így a mikroszkóp-egység és a lézerforrás között alakítottam ki megfelelő méretű befogadó helyet a modulátor és állítható felfüggesztése számára (48. ábra) a lézerforrás kismértékű módosításával. A PEM vastagsága tokozással együtt 26 mm, így elegendőnek bizonyult a rendelkezésre álló 35 mm.

48. ábra. A lézer kilépőnyílásának átalakításával létrehozott 35 mm-es hely a PEM számára.

A modulátor rögzítéséhez felhasználhatók a tokozáson biztosított furatok. Ezek segítségével egy köríven végighaladva a kristálytengely és a lézer polarizációs síkja közötti szög beállítható (49. ábra).

49. ábra. a) HRF-PEM rögzítésére szolgáló tartóelem
(a 3D tervezés Krzysztof Pawlak – MTA SZBK – munkája)
b) a rászzerelt modulátor

5.6.3. A modulátor optikai tulajdonságainak vizsgálata

A mérések kivitelezésének szempontjából kiemelten fontos a PEM működésének ellenőrzése először optikai padon, önállóan (50. ábra), majd a mikroszkópba épített állapotában (51. ábra). Ez utóbbi vizsgálatokat a leendő leképezések körülményeinek megfelelően, a mikroszkóp optomechanikai lehetőségeit kihasználva végeztem el, de a mérőfény pásztázása nélkül. A fix pontra irányított lézersugár intenzitását a mikroszkóp saját, polárszűrővel rendelkező transzmissziós detektorával mértem, a mikroszkópból kivezetett jel paramétereit pedig a referenciajelhez szinkronizált oszcilloszkópon vizsgáltam (52. ábra).

A PEM-tartó lehetőséget biztosított a pozíció és a befogási szög változtatására is a megfelelő modulációs eredmény elérése érdekében.

50. ábra. A HRF-PEM bemérése optikai padon

51. ábra. A HFR-PEM mikroszkópban történő bemérésére szolgáló elrendezés

52. ábra. A HFR-PEM bemérése a mikroszkópban

5.6.4. HFR DP-LSM felhasználói felület

A nagyfrekvenciás DP-LSM megvalósítása egységes mérőkörnyezet kiépítését jelentette. A mérőrendszer fotóján (53/a ábra) való eligazodást a sémás blokkvázlat leírása (53/b ábra) segíti.

53. ábra. A: Mikroszkóp-képernyő B: Zeiss Axiovert 135 fluoreszcens mikroszkóp C: Lézerpásztázó egység (Zeiss LSM 410) D: HRF-PEM (a pásztázó egység mögött) E: Program-képernyő F: Fázisérzékeny erősítő (Signal Recovery 7280) G: HRF-PEM vezérlő

A mérési paraméterek felhasználóbarát beállítását és a lock-in erősítővel való kapcsolattartást a HFR DP-LSM számára kifejlesztett program végzi, amely a soros porton (RS232) kommunikál az eszközzel. A mikroszkóp-vezérlő számítógép szintén soros porton keresztül kezeli az LSM egységet, így a program a COM2 portot veheti igénybe. Az összeköttetéshez szükséges adatkábelt az erősítő technikai leírása alapján készítettem el [Signal Recovery, 2005].

A programot C nyelven írtam, az Open Watcom fordító használatával, a fejlesztőkörnyezet (Integrated Development Environment) által biztosított szolgáltatások igénybe vételével [<http://www.openwatcom.org>]. A program a szabványos Windows könyvtári függvényekre (API) támaszkodik [<http://msdn.microsoft.com>].

A kapcsolódáshoz a felhasználói beállítások megkönnyítése érdekében az erősítő alapértelmezett kommunikációs paramétereit használtam: 9600 bit/sec adatátviteli sebesség, 8 adatbit, 1 stopbit, paritás nélkül. A programom sűgőja tájékoztatást is ad ezekről az adatokról (54. ábra).

54. ábra. A mikroszkópvezérlő program és a SetDP működés közben

A SETDP.EXE az erősítővel való kapcsolat kiépítése után az inicializációs beállításokat végzi el, alkalmas a felhasználói igényeknek megfelelően változó mérési paraméterek (az adott alkalmazástól függő érzékenység, integrációs időállandó) beállítására, valamint lehetővé teszi az általános parancstovábbítást. Ezen kívül meghatározza a mérési feltételeknek megfelelő retardációs értéket is, amire a fotoelasztikus modulátor működtetéséhez van szükség (55. ábra).

55. ábra. A HFR-PEM rezgési amplitúdójának nagysága függ az alkalmazott lézer hullámhosszától, illetve az igényelt relatív fázistolás nagyságától.

A SETDP.EXE program Measure / Init PEM funkciója megadja a PEM-vezérlőn a SET MEAPAR /RETARD menüpontban beállítandó amplitúdóértéket.

5.6.5. Nagyfrekvenciás FDLD-leképezések

Az általam megépített HRF DP-LSM prototípusán a képfelvételi idő 25%-ra csökkent az eddigi DP-LSM mérésekhez képest. Ez elsősorban olyan kísérleti környezetben jelent előnyt, ahol az időtényező fontos: élő sejtek vizsgálata, nagy képszámot előállító optikai szeletelések, sorozatmérés. A mérések sikeres DP-leképezéssel jártak (56. ábra).

Fontos megemlíteni, hogy az erősítő zajszűrő képességén sok múlik: a Signal Recovery erősítővel végzett 8 s-os képalkotáshoz (20 μ s-os integrálási idő) tartozó FDLD-leképezés is kiértékelhető minőségű (57. ábra).

A mérések – mint a bemutatott felvételeken is látható – jelentős zajjal rendelkeznek. Ennek egyik oka a nagyfrekvenciás moduláció mérsékelt stabilitása: ezen a területen még további fejlesztőmunkára lehet szükség.

56 ábra. a) Fluoreszcencia leképezés

b) DP-leképezés (16 sec képkötés, 20 µs integrációs idővel)

57 ábra. a) Fluoreszcencia

b) DP-leképezés (8 s-os képkötés, 10 µs integrációs idővel)

A lock-in erősítőn alkalmazott 180°-os fázistolás miatt a DP képen a kék-sárga színskála az elvárásoknak megfelelően fordul.

A nagyfrekvenciás modulációval rendelkező HFR DP-LSM rendszer alkalmas a DP mérések csökkentett idő alatt történő kivitelezésére. Az új HRF-PEM javítja az eljárás sorozatmérésekre, optikai szelektelésre való alkalmasságát.

6. Köszönetnyilvánítás

A dolgozatban szereplő eredményeket a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpontjának Növénybiológiai Intézetében, a Fotoszintetikus Membrán Csoportban, illetve az Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Karán, az Immunológiai Tanszék felügyelete alatt álló konfokális laborban értem el.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Garab Győzőnek, a kutatásaim során nyújtott támogató és ösztönző segítséget, dolgozatomra vonatkozó javaslatait; Krzysztof Pawlaknak, közvetlen munkatársamnak pedig az eredményes együttműködést és a műszaki tervek elkészítését.

Hálával tartozom Dr. Pomozi Istvánnak, Dr. Menczel Lászlónak és Dr. Ujhelyi Ferencnek a mikroszkóp fejlesztésével, Scherman Lászlónak és Dr. Ronkay Ferencnek az elektronikai problémákkal kapcsolatos gyümölcsöző konzultációkért.

Köszönöm a Szegedi Tudományegyetem Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék munkatársainak, hogy lehetővé tették az ellipszometriás mérések elvégzését, valamint köszönöm Prof. Dr. Makovitzky Józsefnek, hogy rendelkezésemre bocsátotta a fluoreszcensen jelzett amiloid-preparátumokat. Anita Župčanovának és Prof. Dr. Silviu Balabánnak köszönöm a mesterséges profirin-molekulákon történő mérések lehetőségének biztosítását.

Szeretném köszönetemet kifejezni a technikai fejlesztésekben játszott szerepükért Dr. Pawel Kamasának, Dr. Czitrovsky Aladárnak, Dr. Nagy Attilának, Illyés Árpádnak, Bognár Károlynak, valamint Dr. Rózsa Balásznak, Katona Gergelynek és Csákány Attilának.

Külön köszönöm Dr. Matkó Jánosnak az Olympus mikroszkópon végzett átalakítások lehetővé tételét és befogadó szívéllyességét, amivel munkámat az ELTÉ-n támogatta.

Köszönettel tartozom a Fotoszintetikus Membrán Csoport tagjainak a munkám során nyújtott segítségükért, szakmai és emberi támogatásukért.

Végül – de nem utolsó sorban – köszönöm családomnak, barátaimnak, menyasszonyomnak a támogatást és azt a kitartó érdeklődést, amelyet kutatásom iránt mindvégig tanúsítottak, és amellyel hatékony munkára ösztönöztek.

7. Irodalomjegyzék

Ábrahám Gy. (1998) Optika. Panem Könyvkiadó, Budapest

Appel T. R., Richter S., Linke R. P., Makovitzky J. (2005) Histochemical and topo-optical investigations on tissue-isolated and in vitro amyloid fibril, *Amyloid* 12:174–183.

Axelrod D. (1989) Fluorescence polarization microscopy. *Meth Cell Biol* 30:333–352. 8.

Azzam R. M. A., Bashara N. M. (1977) Ellipsometry and polarized light. Published by North-Holland Pub. Co., sole distributors for the U.S.A. and Canada, Elsevier North-Holland in Amsterdam, New York, USA

Balaban T. S., Bhise A. D., Bringmann G., Bürck J., Chappaz-Gillot C., Eichhöfer A., Fenske D., Götz D. C. G., Knauer M., Mizoguchi T., Mössinger D., Rösner H., Roussel C., Schraut M., Tamiaki H., Vanthuyne N. (2009) Mimics of the self-assembling chlorosomal bacteriochlorophylls: regio- and stereoselective synthesis and stereoanalysis of acyl(1-hydroxyalkyl)porphyrins. *J Am Chem Soc* 131:14480–14492.

Barzda V., Simidjiev I., Vianelli A., Jennings R, Garab G. (1995) Light induced reversible structural changes in chirally organized macroaggregates of purified chlorophyll a/b protein complexes. In: Mathis P. editor *Photosynthesis: From light to biosphere*. Vol 1. pp. 319-322. Kluwer Academic Publ. Dordrecht – Boston – London

Baskin T. I., Meekes H. T. H. M., Liang B. M., Sharp R. E. (1999) Regulation of growth anisotropy in well-watered and water-stressed maize roots. II. Role of cortical microtubules and cellulose microfibrils. *Plant Physiol* 119:681–692.

Baskin T. I. (2005) Anisotropic expansion of the plant cell wall. *Ann Rev Cell Dev Biol* 21:203–222.

- Blake C., Serpell L. (1996)** Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous beta-sheet helix. *Structure* 4:989–998.
- Blankenship R. E. (2002a)** Photosynthesis: The light reactions In: Taiz L., Zeiger E. editors *Plant physiology*. 3rd edn. pp. 111–143 Sinauer Associates Sunderland, USA
- Blankenship R. E. (2002b)** *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Blackwell Science Ltd. Oxford
- Bognár K., Czitrovsky A., Illyés Á., Nagy A., Garab Gy., Steinbach G. (2012*)** Magas frekvenciás fotoelasztikus fénymodulátor. *Benyújtott szabadalom.
- Bradbury S., Evennett P. J. (1996)** *Contrast Techniques in Light Microscopy*. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford
- Bradbury S., Bracegirdle B. (1998)** *Introduction to Light Microscopy*. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford
- Breton J., Vermeglio A. (1976)** Orientation of photosynthetic pigments in vivo. In: Govindjee, editor. *Photosynthesis*. Academic Press, New York 153 –193.
- Chappaz-Gillot C, Marek P. L., Blaive B. J., Canard G., Bürck J., Garab G., Hahn H., Jávorfí T., Kelemen L., Krupke R., Mössinger D., Ormos P., Malla Reddy C., Roussel C., Steinbach G., Szabó M., Ulrich A. S., Vanthuyne N., Vijayaraghavan A., Zupcanova A., Balaban T. S. (2012)** Anisotropic organization and microscopic manipulation of self-assembling synthetic porphyrin microrods that mimic chlorosomes: bacterial light-harvesting systems. *J Am Chem Soc* 134:944-954.
- Celej M. S., Caarls W., Demchenko A. P., Jovin T. M. (2009)** A triple-emission fluorescent probe reveals distinctive amyloid fibrillar polymorphism of wild-type alpha-synuclein and its familial Parkinson's disease mutants. *Biochemistry* 48:7465–7472.

- Chiti F., Dobson C. (2006)** Protein misfolding, functional amyloid, and human disease, *Annu Rev Biochem* 75: 333–366.
- Cosgrove D. J. (2002)** Cell walls: structure, biogenesis and expansion In: Taiz L., Zeiger E. editors *Plant physiology*. 3rd edn. pp. 313–338 Sinauer Associates Sunderland, USA
- Cosgrove D. J. (2005)** Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:850–861.
- Crowther R. A. (1991)** Straight and paired helical filaments in Alzheimer-disease have a common structural unit. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2288-2292.
- Cseh E. (2007)** Anyagfelvétel, anyagszállítás a növényben. In: Láng F. szerk. *Növényélettan*. 3. kiadás pp 63–118. Eötvös kiadó, Budapest
- Dekker J. P., Boekema E. J. (2005).** Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta* 1706: 12–39.
- Diaspro A., Faretta M., Sapuppo P. (2008)** Confocal book. Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim
- Dobson C. M. (2003)** Protein folding and misfolding, *Nature* 426: 884-890.
- Feynman R. P., Leighton R. B., Sands M. (1970)** Mai fizika 6. – Kristályszerkezetek Dia-, para- és ferromágnesesség Folyadékok áramlása. Műszaki könyvkiadó, Budapest
- Ferrari A., Hoerndli F., Baechi T., Nitsch R. M., Götz J. (2003)** Beta-amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture, *J Biol Chem* 278: 40162-40168.
- Finzi L., Bustamante C., Garab G., Juang C. B. (1989)** Direct observation of large chiral domains in chloroplast thylakoid membranes by differential polarization microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8748–8752.

- Fridvalszky L., Hortobágyi T. (1978)** Sejttan. In: Haraszty Á. szerk. Növénysszervezetan és növényélettan. pp. 35–154. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest
- Füzessy Z. (1997)** Fotonika optika alapjai. Műegyetemi Kiadó, Budapest
- Garab G. (1996)** Linear and circular dichroism. In: Amesz J, Hoff A editors. Biophysical Techniques in Photosynthesis. pp 11–40. Kluwer Academic, Amsterdam
- Garab G., Galajda P., Pomozi I., Finzi L., Praznovszky T., Ormos P., van Amerongen H. (2005a)** Alignment of biological microparticles by a polarized laser beam. Eur Biophys J 34:335-43.
- Garab G., Pomozi I., Jörgens R., Weiss G. (2005b)** Method and apparatus for determining the polarization properties of light emitted, reflected or transmitted by a material using a laser scanning microscope. US Patent 6,856,391.
- Garab G., Pomozi I., Jörgens R., Weiss G. (2007)** Method and apparatus for determining the polarization properties of light emitted, reflected or transmitted by a material using a laser scanning microscope. EP 1 334 339 (01 996 722.3) Patent
- Garab G., Carmen A. M. (2008)** Reply: on three-dimensional models of higher-plant thylakoid networks: elements of consensus, controversies, and future experiments. 20:2549–2551
- Garab G. (2009)** Kimeríthetetlen energiaforrásunk, a napfény. Magyar Kémikusok Lapja LXIV. éf., 5. sz. 140-145.
- Giurleo J. T., He X., Talaga D. S. (2008)** β -Lactoglobulin assembles into amyloid through sequential aggregated intermediates, J Mol Biol 381:1332–1348.
- Goldstein D., Collett E. (2003)** Polarized Light. CRC, Press New York

- Gombos** I., Steinbach G., Pomozi I., Balogh A., Vámosi G., Gansen A., László G., Garab G., Matkó J. (2008) Some new faces of membrane microdomains: a complex confocal fluorescence, differential polarization and FCS imaging study on live immune cells Cytometry Part A 73A:220–229.
- Gorjanacz** M., Török I., Pomozi I., Garab G., Szlanka T., Kiss I., Mechler B.M. (2006) Domains of importin- α 2 required for ring canal assembly during Drosophila oogenesis. J Struct Biol 154:27–41.
- Gunning** B. S., Steer M. W. (1996) Plant Cell Biology: Structure and Function. Jones and Bartlett Publishers, Boston.
- Gupta** V. K., Kornfield J. A., Ferencz A., Wenger G. (1994) Controlling Molecular Order in „Hairy-Rod” Langmuir-blodgett films: a Polarisation-Modulation Microscopy Study. Science 265:940–942.
- Hegedüs** R., Åkesson S., Wehner R., Horváth G. (2007) Could Vikings have navigated under foggy and cloudy conditions by skylight polarization? On the atmospheric optical prerequisites of polarimetric Viking navigation under foggy and cloudy skies. Proc R Soc A 463:1081–1095
- Heslop-Harrison** J. (1963). Structure and morphogenesis of lamellar systems in grana-containing chloroplasts. I. Membrane structure and lamellar architecture. Planta 60:243–260.
- Horváth** G., Barta A., Hegedüs R., Pomozi I., Suhai B., Åkesson S., Meyer-Rochow B., Wehner R. (2008) Sarkított fénnel a vikingek nyomában az Északi-sarkvidéken. A polarimetrikus viking navigáció légköroptikai feltételeinek kísérleti vizsgálata. Fizikai Szemle 4. szám 131-140.
- <http://msdn.microsoft.com/en-us/library> (a letöltés dátuma: 2012. 03. 12.)
- <http://physics.nist.gov> National Institute of Standards and Technology (a letöltés dátuma: 2012. 03. 12.)

http://www.ebsa2011.org/doc/EBSA2011_exhibition.pdf (a letöltés dátuma: 2012. 03. 12.)

<http://www.jawoollam.com/pdf/M2000Brochure.pdf> (a letöltés dátuma: 2012. 03. 12.)

<http://www.mygreeneducation.com/solar-power-jobs-coming-to-north-carolina/>
(a letöltés dátuma: 2012. 04. 19.)

<http://www.openwatcom.org> (a letöltés dátuma: 2012. 03. 12.)

<http://www.povray.org> (a letöltés dátuma: 2012. 03. 12.)

[http://www.zeiss.de/C1256D18002CC306/0/ADD42F725F984706C12577B6002A6F86/\\$file/45-0039_e.pdf](http://www.zeiss.de/C1256D18002CC306/0/ADD42F725F984706C12577B6002A6F86/$file/45-0039_e.pdf) (a letöltés dátuma: 2012. 03. 12.)

Jimenez J. L., Guijarro J. I., Orlova E., Zurdo J., Dobson C. M., Sunde M., Saibil H. R. (1999) Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *EMBO J* 18:815–821.

Jin L.-W., Claborn K. A., Kurimoto M., Geday M. A., Maezawa I., Sohraby F., Estrada M., Kaminsky W., Kahr B. (2003) Imaging linear birefringence and dichroism in cerebral amyloid pathologies. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15294–15298.

Juang C. B., Finzi L., Bustamante C. J. (1988) Design and Application of a Computer-Controlled Confocal Scanning Differential Polarisation Microscope. *Rev Sci Instr* 59: 2399 –2408.

Kellermayer M. S. Z., Karsai A., Benke M., Soos K., Penke B. (2008) Stepwise dynamics of epitaxially growing single amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:141–144.

Kelly J. W. (1998) The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Curr Opin Struct Biol* 8:101–106.

- Kerstens** S., Verbelen J.-P. (2003) Cellulose orientation at the surface of the Arabidopsis seedling. Implications for the biomechanics in plant development. *J Struct Biol* 144:262–270.
- Kim** M., Keller D., Bustamante C. (1987) Differential polarization imaging, Part 1: Theory. *Biophys J* 52: 911–927.
- Kirschner** D. A., Abraham C., Selkoe D. J. (1986) X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross- β conformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:503–507.
- Kodali** R., Wetzel R. (2007) Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly. *Curr Opin Struct Biol* 17:48–57.
- Kouřil** R., Dekker J. P., Boekema E. J. (2012) Supramolecular organization of photosystem II in green plants. *Biochim Biophys Acta* 1817:2–12
- Lepetit** B., Goss R., Jakob T., Wilhelm C. (2012) Molecular dynamics of the diatom thylakoid membrane under different light conditions. *Photosynth Res* 111:245–257
- Linke** R. P. (1983) Senile cardiac amyloid: biochemical and immunohistochemical results, in D. Platt (Ed.), *Cardiology and Ageing*. 1st International Erlangen-Nürnberg Symposium on Experimental Gerontology 20-23 October 1982. Schattauer Verlag, Stuttgart and New York, pp. 81-97.
- Makovitzky** J. (1984) Polarization optical analysis of blood cell membranes. In: *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. Ed.: by Graumann W., Lojda Z., Pearse A. G. E., Schiebler T. H. Vol 15. N/3 G Fischer Verlag, Stuttgart-New York
- Makovitzky** J. (1987) The study of original and induced negative charges of human lymphocyte membrane. *Acta Histochem Suppl-Bd.XXXIV*: 185–194.

- Makovitzky J, Richter S. (2009)** The relevance of the aldehyde bisulfite toluidine blue reaction and its variants in the submicroscopic carbohydrate research. *Acta Histochem* 111:273–291.
- Maxwell J. C. (1865)** A Dynamical Theory of the Electromagnetic Field. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 155:459-512.
- Menke W. (1960)** Das allgemeine Bauprinzip des Lamellarsystems der Chloroplasten. *Experientia* 16:537–538
- Mickols W., Tinoco I., Katz J.E., Maestre M.F., Bustamante C. (1985)** Imaging Differential Polarization Microscope with Electric Readout. *Rev Sci Instr* 56:2228–2236.
- Mustárdy L. A., Jánossy A. G. S. (1979).** Evidence of helical thylakoid arrangement by scanning electron microscopy. *Plant Sci Lett* 16:281–284.
- Mustárdy L., Garab G. (2003)** Granum revisited. A three-dimensional model – where things fall into place. *Trends Plant Sci* 8:117–122.
- Mustárdy L., Buttle K., Steinbach G., Garab G. (2008a)** Three-dimensional architecture of the granum-stroma thylakoid membrane system revealed by electron tomography. In: Allen J. F., Gantt E., Golbeck J. H., Osmond B. eds. *Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis.*: Springer, Heidelberg. pp. 771-774.
- Mustárdy L., Buttle K., Steinbach G., Garab G. (2008b)** The three-dimensional network of the thylakoid membranes in plants: quasihelical model of the granum-stroma assembly. *Plant Cell* 20:2552–2557.
- Nagy K. (1977)** *Elektrodinamika.* Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest
- Nägeli C., Schwendener S. (1867):** *Das Mikroskop: Theorie und Anwendung desselben,* Verlag von Wilhelm Engelmann, Lipcse, 654 p.

- Olympus (2003)** User's Manual Fluoview FV500. Olympus Optical Co., LTD., Hatagaya, Shibuya-ku, Tokyo, Japan
- Paolillo D. J. (1970)** The three-dimensional arrangement of intergranal lamellae in chloroplasts. *J Cell Sci* 6:243–255.
- Pomozi I. (2002):** Polarizációs mintázatok nagy és kis látószögű képalkotó polarimetriai mérése légköri optikai és biológiai vonatkozásokkal. PhD értekezés, ELTE-TTK
- Pras M., Schubert M., Zucker-Franklin D., Rimon A., Franklin E. C. (1968)** The characterization of soluble amyloid prepared in water, *J. Clin Invest* 47:924-933.
- Ramírez-Alvarado M., Merkel J. S., Regan L. (2000)** A systematic exploration of the influence of the protein stability on amyloid fibril formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8979–8984.
- Reusche E., Ogomori K., Diabold J., Johannisson R. (1992)** Electron-microscopic study of paired helical filaments and cerebral amyloid using a novel en-bloc silver staining method. *Virchows Arch, A Pathol Anat Histopathol* 420:519–525.
- Robinson P. C., Bradbury S. (1992)** Qualitative polarized-light microscopy. Oxford University Press
- Romhányi G. (1958),** Submicroscopic structure of elastic fibres as observed in the polarization microscope, *Nature* 182: 929-930.
- Romhányi G. (1979)** Selective demonstration of amyloid deposits and methodical possibilities of analysis of their ultrastructural differences / Selektive Darstellung sowie methodologische Möglichkeiten der Analyse ultrastruktureller Unterschiede von Amyloidablagerungen. *Zentralbl Allg Pathol* 123:9–16.

- Schaffer** J, Bauch H. (2004) Test preparation for microscopes. US Patent. Application number: 20040180384. www.freepatentsonline.com/20040180384.html (a letöltés dátuma: 2012. 03. 12.)
- Scherzinger** E., Lurz R., Turmaine M., Mangiarini L., Hollenbach B., Hasenbank R., Bates G. P., Davies S. W., Lehrach H., Wanker E. E. (1997) Huntington-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* 90:549-558.
- Service** R. F. (2005) Is It Time to Shoot for the Sun? *Science* 309:548-551.
- Sheppard** C.J.R., Shotton D. M. (1997) *Confocal Laser Scanning Microscopy*. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford
- Shimoni** E., Rav-Hon O., Ohad I., Brumfeld V., Reich Z. (2005) Three dimensional organization of higher-plant chloroplast thylakoid membranes revealed by electron tomography. *Plant Cell* 17:2580–2586.
- Shinya** I. (1995) Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. In: Pawley J. B. ed. *Handbook of biological confocal microscopy*. pp. 1-14. Plenum Press, New York, USA
- Signal Recovery** (2005) Model 7280 DSP Lock-in Amplifier Instruction Manual
- Sipe** J. D., Cohen A. S. (2000) Review: History of the amyloid fibril, *J Struct Biol* 130:88–98.
- Steinbach** G., Besson F., Pomozi I., Garab G. (2005) Differential polarization laser scanning microscopy: biological applications. *Proc SPIE* 5969:566–575.
- Steinbach** G., Pomozi I., Zsiros O., Pay A., Horváth G. V., Garab G. (2008) Imaging fluorescence detected linear dichroism of plant cell walls in laser scanning confocal microscope. *Cytometry A* 73A:202–208

- Steinbach G., Pomozi I., Zsiros O., Menczel L., Garab G. (2009)** Imaging anisotropy using differential polarization laser scanning confocal microscopy. *Acta Histochem.* 111:316–325.
- Steinbach G. (2011a)** Differenciál-polarizációs mikroszkópos technikák fejlesztése és amiloid filamentumok finomszerkezeti vizsgálata differenciál-polarizációs lézerpásztázó mikroszkópia felhasználásával. Egészségügyi mérnök diplomamunka, BMGE-VIK
- Steinbach G., Pomozi I., Jánosa D. P., Makovitzky J., Garab G. (2011b)** Confocal fluorescence detected linear dichroism imaging of isolated human amyloid fibrils. Role of supercoiling. *J Fluoresc* 21:983–989.
- Sunde M., Serpell L. C., Bartlam M., Fraser P. E., Pepys M. B., Blake C. C. F. (1997)** The common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* 273:729–739.
- Tolardo di Franca G. (1955)** Resolving power and information. *J Opt Soc Am* 45:497-501.
- Verbelen J.-P., Kerstens S. (2000)** Polarization confocal microscopy and Congo Red fluorescence: A simple and rapid method to determine the mean cellulose fibril orientation in plants. *J Microsc* 198:101–107.
- Weier T. E., Stocking C. R., Thomson W. W., Drever H. J. (1963)** The grana as structural units in chloroplasts of mesophyll of *Nicotiana rustica* and *Phaseolus vulgaris*. *J. Ultrastruct. Res.* 8:122–143
- Wehrmeyer W. (1964).** Über membranbildungsprozesse in chloroplasten. II. Zur entstehung der grana durch membranüberschiebung. *Planta* 63, 13–30.
- Whelan C. (2008)** Is the Sun Setting on Solar Power in Spain? *Scientific American*
- Zeiss LSM410 (1995)** Operating manual. Carl Zeiss Jena GmbH

8. Összefoglalás

Biológiai mintákban megtalálható molekulárisan rendezett szerkezetek vizsgálata számos kutatási területen kiemelt feladat. A dikrográfokban alkalmazott differenciál-polarizációs mérés technika a rendezett molekulászerkezetek megismerésének széles körben elterjedt módja (pl. fehérjék és fotoszintetikus komplexek CD spektruma, makroszkóposan rendezett membránok, komplexek, szuperkomplexek LD spektruma). A dikrográf azonban a minta teljes térfogatára átlagolva határozza meg a szerkezeti paramétereket. Inhomogén minták esetében – mint amilyen a sejt- és szövetpreparátumok nagy többsége – jelentős információ-többletet eredményez a makroszkopikus vizsgálat mikroszkópos leképezéssel való helyettesítése; számos esetben az anizotróp sajátságok csak mikroszkópos technikával tárhatók fel.

A Ph.D. kutatómunkám fő eredményei – a DP-leképezésekkel összefüggő biológiai alkalmazások és a DP-LSM technika továbbfejlesztése – az alábbiakban foglalhatók össze:

1. tézis. A konfokális mikroszkóp fluoreszcens mérési módjai bizonyos esetekben megnehezítik a differenciál-polarizációs mérések kvantitatív kiértékelését: a mikroszkópban alkalmazott dielektrikum-vékonyréteg (dikroikus) tükrök kölcsönhatásba lépnek a poláros fénnel, és módosítják annak polarizációs állapotát. A kapott DP-eredmények megbízhatóságának biztosításához elvégeztem a mikroszkóp polarizációállapot-módosításra alkalmas dikroikus tükreinek részletes polarometriai vizsgálatát, és az eredményeim alapján korrigáltam a mért nyers DP-mennyiségeket a polarizációmódosító hatást figyelembe véve.

A pontos korrekción alapuló adatfeldolgozás lehetővé teszi a valós idejű kvantitatív vizsgálatok elvégzését a DP-LSM-en.

2. tézis. Növényi sejtfaon, acridine orange fluoreszcens festékekkel jelölt cellulózsálak vizsgálataival bemutattam a konfokális differenciál-polarizációs leképezés (FDLD) és a transzmissziós módban végrehajtható LD-mérések közötti minőségi különbséget. Az optikai szelektálás felhasználása kiküszöböli az egymás felett elhelyezkedő rétegek zavaró hatását, jelentősen javítja a felvett kép minőségét.

A DP-LSM technika alkalmas a sejtfa-szerkezetek térbeli kvantitatív vizsgálatára.

3. tézis. Az idegtudományok intenzíven kutatott területe az amiloid-filamentumokból képződött plakkok kialakulásának vizsgálata és jellemzése. Az amiloid-filamentumok, melyek magas szinten rendezett oldhatatlan fehérje-aggregátumok, számos neurodegeneratív betegséggel állnak kapcsolatban. Kongó vörössel festett, humán mintából izolált amiloidsálak anizotróp szerkezetét vizsgáltam, FDLD-leképezés segítségével. A DP mérések felismerhetővé tették az anizotróp szerkezeti sajátosságokat és a fluoreszcens képen homogén területen is jelen lévő periodikus mintázatot.

Az amiloid-filamentumok fluoreszcensen homogén területein a polarizációs mintázat $1,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$ hullámhosszú periodikus változást mutat, ami az elemi sálak ismert, kis léptékű helikális struktúrájának ismételt, mikronos skálán megjelenő szuperhelikális (supercoiled) kialakulását jelzi.

4. tézis. Bár a Földet érő napenergia mennyisége tízezerszeresen felülmúlja a jelenlegi igényeinket, hatalmas területen oszlik el. A természetben kifejlődött fotoszintetikus antennarendszerek példáját követve hasznos lenne önszerveződő molekulákból fénybegyűjtő hálózatot kiépíteni a napelem-technológia hatékonyságának növelésére. A Silviu Balaban és kutatócsoportja által kidolgozott eljárás biomimetikus Zn-ketol porfirin előállítására ígéretes jelöltje a technológiának. A DP-LSM-mel elvégzett vizsgálataim jelentős mértékben hozzájárultak a Zn-ketol porfirinmolekulákból álló nanorodok rendezett belső szerkezetének feltárásához és mágneses térben való manipulálásuk lehetőségeinek megismeréséhez. Mikroszkópos méréseim további

spektroszkópiai technikákkal kiegészítve lehetővé tették a tranzíciós vektorok orientációjának meghatározását és a térbeli szerkezeti modell kialakítását.

Zn-ketol porfirinmolekulák önszerveződő módon homogén szerkezetű anizotróp nanorodokat alkotnak, amelyek külső mágneses térben rendezhetők. A térbeli modellalkotás pontos adatai DP-mérésekből származnak.

5. tézis. A DP-LSM-mel történő mérés hatékonyan alkalmazható szerkezetvizsgálatra, akár élő sejtes környezetben is. Ez teremtette meg az igényt a DP-technika új generációs konfokális mikroszkópokra való adaptálására. A kompakt, modern kivitel több technikai problémát is felvet, ezek miatt szükséges a Zeiss LSM410-es berendezésen alkalmazott sémát módosítani és használhatóvá tenni más gyártók mikroszkóptípusaihoz való csatlakoztatásra is. Az Olympus FV500-as konfokális mikroszkópon megvalósítottam a DP-kiegészítő kapcsolódását és az egységek elektronikai összehangolását.

A DP-LSM technika az új generációs mikroszkópokra is adaptálható; lényegében nem módosítva a mikroszkóp belső szerkezetét, hozzákapcsolható az eredeti berendezéshez. A konfokális mikroszkópok DP-kiegészítővel felszerelve alkalmassá válnak további anizotrópiás szerkezeti tulajdonságok mérésére.

6. tézis. A differenciál-polarizációs mérések megvalósításának meghatározó eleme a fotoelasztikus modulátor. A képfelvételi idő csökkentését elsősorban az korlátozza, hogy a pásztázás során az egy pixelen eltöltött idő alatt elegendő számú modulációs ciklusnak kell végbemennie a megfelelő átlagolás eléréséhez. A modulációs frekvencia növelése a DP-LSM rendszerekben nem volt elérhető a piacon beszerezhető eszközökkel, az Envitech Kft-től származó, velük együtt fejlesztett fotoelasztikus modulátor-egységgel elérhetőnek tűnt a mérési idő lecsökkentése. Elvégeztem a mikroszkóphoz kapcsolódás megtervezését, kivitelezését, majd a teljes rendszer

tesztelését. A kész prototípus megépítéséhez hozzátartozott, hogy a felhasználói felület programját is elkészítsem.

A megépített prototípus 400 kHz-es (optikai) modulációjának köszönhetően a DP-képfelvétel ideje az eredeti 100 kHz-es berendezéshez képest 25%-ra csökkenthető, ami jelentősen javítja az eljárás sorozatmérésekre, optikai szeletelésre, élő sejteken folytatott vizsgálatokra való alkalmasságát.

A dolgozatomban demonstráltam a DP-leképezés hatékonyságát többféle biológiai rendszeren, valamint eredményeket értem el mind a meglévő DP-LSM alkalmazhatóságát, mind a más mikroszkópokra való átépítését illetően. Az elvégzett méréseim és a végrehajtott fejlesztéseim hozzájárulhatnak ennek a biológiai és anyagtudományi szerkezetvizsgálati kutatásokban használható módszernek a szélesebb körben való megismertetéséhez és alkalmazhatóságához.

9. Summary

The elucidation of the molecular architecture of complex, highly organized molecular macro-assemblies is an important task for basic biology. Differential polarization measurements with dichrographs are widely used to gain information about ordered structures (e.g. CD spectra of proteins and photosynthetic membrane-complexes, LD spectra on macroscopically ordered membranes and complexes and supercomplexes). Dichrographs provide data averaged for the whole sample. For inhomogeneous samples – e.g. cells and tissues – measurements on macroscopic scale are not satisfactory, and in some cases not feasible and thus microscopic techniques must be applied. The microscopic DP-imaging technique allows the mapping of anisotropy (using its different parameters) in 2D and 3D.

The main results of my PhD work – related to projects to improve the technique of DP-imaging and to biological applications using the DP-LSM – are summarized as follows:

1st thesis. DP measurements have some difficulties because of the confocal microscope's fluorescent modes: the dichroic mirrors in the fluorescent lightpath can alter the polarization states of light. In order to have reliable DP-values, it was necessary to perform Mueller-matrix measurements on these mirrors; these data were then used for the correction of DP-images in a real-time regime.

The data processing using corrections based on Mueller-matrix analyses, enables us to perform quantitative real time measurements on the DP-LSM.

2nd thesis. By using a cell wall sample of *Convallaria* stained with Acridine Orange I have demonstrated the advantages of FDLT measurements in confocal regime compared to the measurement performed in the non-confocal transmission mode LD imaging. The optical slicing avoided the smearing of the DP-image by the layers above each other, containing dipoles in different orientations, and it provides an excellent image quality in 3D.

The DP-LSM technique is suitable for quantitative measurements on cell walls in 3D.

3rd thesis. In neuroscience, the structure of amyloid filaments and their plaques are currently of substantial interest. These filaments, insoluble, highly ordered protein aggregates are in connection with many neurodegenerative diseases. Isolated human amyloid fibrils stained with Congo Red was mapped using FDL measurements. The DP-images revealed anisotropic structures and periodic patterns at the supermolecular organization level, whereas the fluorescence images appeared to be homogenous.

Amyloid filaments exhibited periodic polarization patterns in DP images. The periodicity was 1.6 μm , evidently originating from a previously unknown suprahelical structure of the filaments, probably formed via supercoiling of a lower level helical structure identified earlier.

4th thesis. Although, the level of solar energy exceeds by about four orders of magnitude the current need of mankind, its density is low. Photosynthetic organisms have developed light harvesting antennae to supply efficiently their photochemical reaction centres by excitation energy. This type of structures have served the basis for designing similar, artificial systems, such as the self-assembling 'artificial chlorosome' composed of a Zn-ketol porphyrin molecule synthesized by Silviu Balaban and his coworkers. Using FDL and r images, I provided evidence for the highly anisotropic molecular organization of these biomimetic structures; DP data, combined with macroscopic LD and fluorescence polarization measurements could be used to determine the orientation of the different transition dipoles of the Zn-ketol porphyrin, leading to the construction of a 3D model of the rods. Strong anisotropy, similar to that in the chlorosomes, together with the possibilities to manipulate these nanorods in magnetic and electric fields make these structures of high interest for solar energy technology.

Synthetic Zn-ketol porphyrins self-assemble into homogenous, magnetically orientable highly anisotropic nanorods, the 3D model of which could be in large part based on DP imaging data.

5th thesis. Since DP-measurements can be efficiently used in characterizing highly organized molecular structures, even in living tissues, it is desirable to adapt this

technique to new generation microscopes. Because of their compact design, however, this required special considerations and technical solutions. I constructed a new generation DP-LSM based on Olympus FV500, via designing a DP-attachment suitable for most new generation microscopes, and special optical pathways for the given model, as well as using electronic units similar to the one in the DP-LSM based on Zeiss LSM410.

The DP-LSM technique can be adapted to new generation microscopes, by using a DP-unit that is readily attachable to new generation microscopes essentially without modifying their internal structures. By this means, LSMs can be equipped with a DP unit, lending the capability to measure additional physical parameters.

6th thesis. The essential unit of the DP-measurement is the photoelastic modulator, which limits the scanning rate for several cycles of its periodicity - for commercially available modulators this is 100 kHz for imaging using linearly polarized light. In order to accelerate the scanning rate, a 400 kHz PEM from Envitech Ltd. was employed. To this end, mechanical and optical difficulties had to be overcome when I tested this unit and assembled into the LSM; also, I wrote a user interface program for DP measurements.

The prototype of the new DP-LSM equipped with a high frequency modulator (HFR-PEM) provide four times quicker measurements. This fact improves considerably its applicability both for optical slicing and measurements on living objects.

In summary, In my PhD work, I have demonstrated the applicability and usefulness of DP-imagings in different biological systems, improved the technical performance of DP-LSM, and constructed a DP attachment for new-generation LSMs as well as the prototype of a HFR DP-LSM. These works are thought to bring differential polarization laser scanning microscopy closer to the everyday practice in biology and material sciences and to aid researchers to unravel novel, anisotropic features in highly organized molecular macroassemblies.

Függelékek

F.1. Mueller-mátrix mérések

1

F.2. A HFR-PEM vezérlőegység funkciói

SET ANALOG		
	CH1Au	1. csatorna erősítése *
	CH2Au	2. csatorna erősítése *
	INT TIM	integrációs idő *
SET MEAPAR		
	PHASE	fázistolás a referenciához képest
	F-MODE	referencia-frekvencia többszörözése a gerjesztéshez képest
	LAMBDA	modulálandó hullámhossz **
	RETARD	retardáció önkényes egységben – SetDP program alapján állítható be
SET DEVICE		
	REFRESH	Kijelző frissítése
	DP3POS	Mérés közben kijelzett paraméter

*: későbbi fejlesztés céljára fenntartva

**: számításokban nem használt

F.3. A SetDP program

File menü

Open COM2 – kapcsolatfelvétel az erősítővel

Close COM2 – kapcsolat lezárása

Exit – kilép a programból

Measure menü

Init Lock-in – mérési alapadatok elküldése az erősítőnek

Init PEM... – retardációs adatok kiszámítása

TC 5us – integrációs időállandó beállítása

TC 10us

TC 20us

TC 50us

Sens 5 mV – mérési érzékenység beállítása

Sens 10 mV

Sens 20 mV

Sens 50 mV

Command... – egyéb utasítások elküldése

Send menü – speciális karakterek és a felhasználó által összeállított parancsok elküldése

CR

LF

CRLF

Message...

Exit! – kilép a programból

Help – Súgó

COM info – szükséges csatlakozási paraméterek listázása

About – a programról

F.4. Publikációs lista

A cikkek összesített impakt faktora: 28,033.

F.4.1. A dolgozatban felhasznált közleményeim listája

A felhasznált cikkek összesített impakt faktora: 15,478.

Steinbach G., Pomozi I., Zsiros O., Páy A., Horváth G. V., Garab G. (2008) Imaging fluorescence detected linear dichroism of plant cell walls in laser scanning confocal microscope. Cytometry A, 73A: 202-208. IF: 3,259

Steinbach G., Pomozi I., Zsiros O., Menczel L., Garab G. (2009) Imaging anisotropy using differential polarization laser scanning confocal microscope. Acta Histochem 111:317-326. IF: 1,234

Steinbach G., Pomozi I., Jánosa D. P., Makovitzky J., Garab G. (2011) Confocal Fluorescence Detected Linear Dichroism Imaging of Isolated Human Amyloid Fibrils. Role of Supercoiling. J Fluoresc 21:983-989. IF: 1,966*

Chappaz-Gillot C., Marek P. L., Blaive B. J., Canard G., Bürck J., Garab G., Hahn H., Jávorfí T., Kelemen L., Krupke R., Mössinger D., Ormos P., Malla Reddy C., Roussel C., **Steinbach G.**, Szabó M., Ulrich A. S., Vanthuyne N., Vijayaraghavan A., Zupcanova A. and Balaban T. S. (2012) Anisotropic organization and microscopic manipulation of self-assembling synthetic porphyrin microrods that mimic chlorosomes: bacterial light-harvesting systems. J Am Chem Soc 134:944-954. IF: 9,019*

*: várható impakt faktor

F.4.2. További publikációim

Steinbach G., Besson F., Pomozi I., Garab G. (2005) Differential polarization laser scanning microscopy: biological applications. Proc SPIE 5969:566–575.

Mustárdy L., Buttle K., **Steinbach G.**, Garab G. (2008) The Three-Dimensional Network of the Thylakoid Membranes in Plants: Quasi-helical Model of the Granum-Stroma Assembly. Plant Cell 20:2552-2557. IF: 9,296

- Mustárdy L., Buttle K., **Steinbach G.**, Garab G. (2008) Three-dimensional architecture of the granum-stroma thylakoid membrane system revealed by electron tomography. In: Allen J. F., Gantt E., Golbeck J. H., Osmond B. eds. Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis.: Springer, Heidelberg. pp. 771-774.
- Gombos I., **Steinbach G.**, Pomozi I., Balogh A., Vámosi G., Gansen A., László G., Garab G., Matkó J. (2008) Some new faces of membrane microdomains: a complex confocal fluorescence, differential polarization and FCS imaging study on live immune cells. Cytometry A 73A:220-229. IF: 3,259
- Bognár K., Czitrovsky A., Illyés Á., Nagy A., Garab Gy., **Steinbach G.** Magas frekvenciás fotoelasztikus fénymodulátor. Benyújtott szabadalom.