

Leképezési és képrekonstrukciós hibák vizsgálata és korrekciója a nagyfeloldású lokalizációs mikroszkópiában

PhD-értékezés

Szerző:

Sinkó József

Témavezetők:

Dr. Erdélyi Miklós és Prof. Dr. Szabó Gábor

Fizika Doktori Iskola

Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

2014

Szeged

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
Bevezetés	5
Tudományos előzmények.....	7
1. Optikai mikroszkópok térbeli feloldása	7
2. Szuperfeloldású mikroszkópiai technikák.....	10
3. A lokalizáción alapuló, szuperfeloldású optikai mikroszkópia	17
4. Kivilágítási technikák a leképezésen alapuló mikroszkópiai technikában.....	26
5. Többszínű, leképezésen alapuló mikroszkópiai technikák.....	30
6. Leképezési hibák	31
7. Optikai rendszer szimulációja	33
Célkitűzések.....	35
Eredmények.....	37
1. Kivilágítási technikák vizsgálata nyalábkövető algoritmussal	37
2. A kromatikus hiba és korrekciója többszínű lokalizációs elven működő mikroszkóp képkészítése során.....	47
3. Tesztminta generáló szimulációs program lokalizációs mikroszkópiai vizsgálatokhoz	60
4. Paraméterek optimalizációja és artifaktumok elemzése a lokalizációs mikroszkópiában....	68
Konklúziók.....	76
Appendix 1	81
Appendix 2	82
A disszertáció összefoglalója	83
Summary	88
Köszönetnyilvánítás	92
Irodalomjegyzék.....	94

Rövidítések jegyzéke

CD – Critical Distance, kritikus távolság: a leképező rendszer által még éppen feloldható pontszerű objektumok távolsága

DOF – Depth Of Field, mélységélesség

EMCCD – Electron Multiplying CCD, elektronsokszorozó funkcióval rendelkező CCD kamera

EPI – epifluoreszcens kivilágítás: a teljes leképezendő tartományt kollimált nyalábbal kivilágító mikroszkópai technika

FOV – Field Of View, képtér, látótér: a leképezendő tartomány képe a kamera felületén

FPALM – Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy, lokalizációs mikroszkópai technika, amely a fluoreszcens festékek (fehérjék) fotoaktiváció segítségével végzett „kapcsolását” felhasználva végzi el a minta leképezését

HILO – Highly Inclined and Laminated Optical sheet microscopy, nagyszögben döntött, a leképezendő tartományban keskeny réteget centráltnan megvilágító mikroszkópai technika

PALM – Photoactivated Localization Microscopy, lokalizációs mikroszkópai technika, amely a fluoreszcens festékek (fehérjék) fotoaktiváció segítségével végzett „kapcsolását” felhasználva végzi el a minta leképezését

PSF – Point Spread Function, pontkiszélesedési függvény: egy pontszerű objektumnak a leképező rendszer által létrehozott képe

ROI – Region Of Interest, a leképezendő tartomány a mintában

sCMOS – scientific CMOS camera

SIM – Structured Illumination Microscopy, strukturált kivilágítású mikroszkóp

STED – Stimulated Emission Depletion, stimulált emisszióval történő kioltás

STORM – Stochastic Optical Reconstruction Microscopy: lokalizációs mikroszkópai technika, amely a fluoreszcens festékeket aktív és passzív állapotok között „kapcsolva” éri el, hogy csak néhány molekula világítson egyszerre a leképezendő tartományban

TIRF – Total Internal Reflection Fluorescence microscope, a teljes visszaverődés során fellépő evaneszcens hullámot kivilágításra felhasználó mikroszkópai technika

VAEM – Variable-Angle Epifluorescence Microscopy, változtatható szögű epifluoreszcens kivilágítás

Bevezetés

Az optikai mikroszkópok szinte már a felfedezésüktől fogva a tudományos megismerés egyik hasznos eszközei voltak. A korábban a szem által nem látható organizmusok, folyamatok láthatóvá tételével nagyban hozzájárultak a biológiai és orvosi kutatásokhoz. A fejlesztés egyik húzóága mindig is a feloldás javítása (nagyítás növelése) volt. Ahogy egyre finomabb struktúrákat oldottak fel a mikroszkóp segítségével újabb és újabb mikrovilágok - manapság pedig már nanovilágok - tárulnak fel. Napjainkban az újszerű optikai mikroszkópiai technikák már pár tíz nanométeres feloldást ígérnek. A mikroszkópok fejlődését mindig jellemezte az erős alkalmazásorientáltság. A legtöbb újonnan kifejlesztett technika egyből talál alkalmazási lehetőséget és csak azok maradhatnak hosszabb távon a tudományos használatban, amelyek az applikációknál egyediséget tudnak felmutatni és hatással tudnak lenni a felhasználó tudományterületre. Mivel igen szerteágazóak a felhasználási területek, abszolút, mindenre megoldást kínáló, minden körülmény között kiváló képet ígérő mikroszkópiai technika nem létezik. Éppen ezért a mikroszkópiai technikák fejlesztésének mindig van létjogosultsága, amennyiben a felhasználási területek ezt megkívánják. Sokszor pedig a már létező mikroszkópiai technikák kombinálásával, együttes használatával lehet a jelenségeket mélyebben értelmezni és így új felfedezésre jutni. A létező technikákat kombináló mikroszkópiát, korrelatív mikroszkópiának nevezzük. Gyakran használják korreláltan az atomerő mikroszkópot és a fluoreszcens mikroszkópot vagy a fluoreszcens mikroszkópot és az elektronmikroszkópot. Mindegyik egy-egy részt ad hozzá a tudományos megismeréshez.

Az utóbbi évek egyik nagy mikroszkópiai technikai fejlesztése a szuperrezolúciós (nagyfeloldású) fluoreszcens optikai mikroszkópiai technikák megjelenése volt. 2014-ben a kémiai Nobel-díjat e technikák kifejlesztéséért osztották ki. Ezek a mikroszkópok látható tartományban üzemelnek és akár pár tíz nanométeres laterális feloldást is képesek elérni. Nagy előnyük, hogy a hagyományos fluoreszcens mikroszkópiai technikákhoz képest nem igényelnek bonyolultabb minta előkészítést vagy komplexebb optikai rendszereket. Doktori disszertációm témája egy szuperrezolúciós technika, a lokalizáción alapuló mikroszkópiai technika mélyebb vizsgálata. Amikor egy-egy új mikroszkópiai módszer megjelenik, rögtön elindul a részletes, mélyreható vizsgálata, határainak megkeresése (a lehetséges alkalmazási területek kutatása mellett). Dolgozatom ebbe a sorba illik bele: leképezési hibák hatásait vizsgálom a lokalizációs mikroszkópiai képkészítés során, illetve keresem, hogy milyen paraméterek mellett optimális a képkészítés, hogyan küszöbölhetőek ki az elkészült képen a képkészítés művi melléktermékei, az artifaktumok.

Doktori tanulmányaim során lehetőségem volt rövid időre a cambridge-i egyetemen, Professzor Clemens Kaminski által vezetett Laser Analytics kutatócsoportjához csatlakozni, illetve együttműködni a londoni National Physical Laboratory, Biophysics and Diagnostics

kutatócsoportjával, melynek vezetője Dr. Alex E. Knight. A disszertációmban szereplő méréseket ezek a kutatócsoportok készítették. 2014 szeptemberétől a Szegedi Tudományegyetem AdOptIm kutatócsoportja (melynek jelenleg magam is tagja vagyok) részére is rendelkezésre fog állni egy lokalizációs mikroszkóp és így Szegeden is megkezdődhet a kísérletes munka és a további fejlesztés, megtartva az együttműködést a cambridge-i és a londoni kutatócsoporttal.

Disszertációmban elsőként egy elméleti áttekintést adok, hangsúlyt fektetve a nagyfeloldású, azon belül is a lokalizációs mikroszkópiai technikára, a leképezés tudományos hátterére és szimulációs eszközeire. A célkitűzések megfogalmazását követően az elért, új tudományos eredményeimet közlöm. A konklúziók levonása során megfogalmazom tézispontjaimat a célkitűzések tükrében és megpróbálok rövid kitekintést adni az egyes tézispontokhoz, továbblépési lehetőségeket felvázolni.

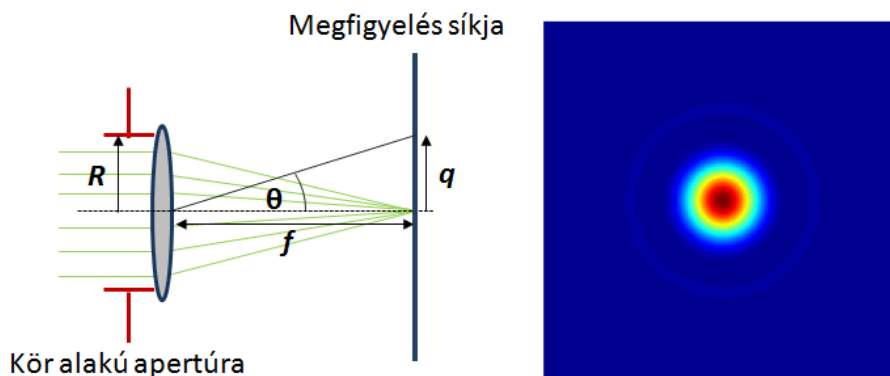
Tudományos előzmények

1. Optikai mikroszkópok térbeli feloldása

A mikroszkópiában a fejlődés egyik hajtómotorja mindig a feloldás javítása, nagyobb nagyítású mikroszkópok építése volt, vagyis, hogy minél finomabb struktúrákat lehessen mikroszkópok segítségével feloldani és tanulmányozni. A feloldás javításában a legfőbb nehézséget a fizikai optika által leírt diffrakció (elhajlás) okozza [1-3]. Egy ideális, pontszerű forrásból kiinduló fénysugarak a leképezés után nem egy pontban fókuszálódnak, hanem egy kiterjedt korongot (Airy- korong) alkotnak [4] (1. ábra). Ennek következtében egy struktúra képe a leképezés után elmosódik, részletek veszhetnek el. Egy pontszerű tárgy képét pontátviteli függvénynek (PSF, Point Spread Function) hívjuk [5]. Ez a függvény jól jellemzi a leképező rendszert. A PSF alakjának megállapítására több megközelítés is létezik (Gauss optika [3], skalárdiffrakciós modellek [1-3], vektordiffrakciós modellek [6-9]). Az Airy korong intenzitáseloszlását a diffrakció elmélet alapján a következő függvény adja:

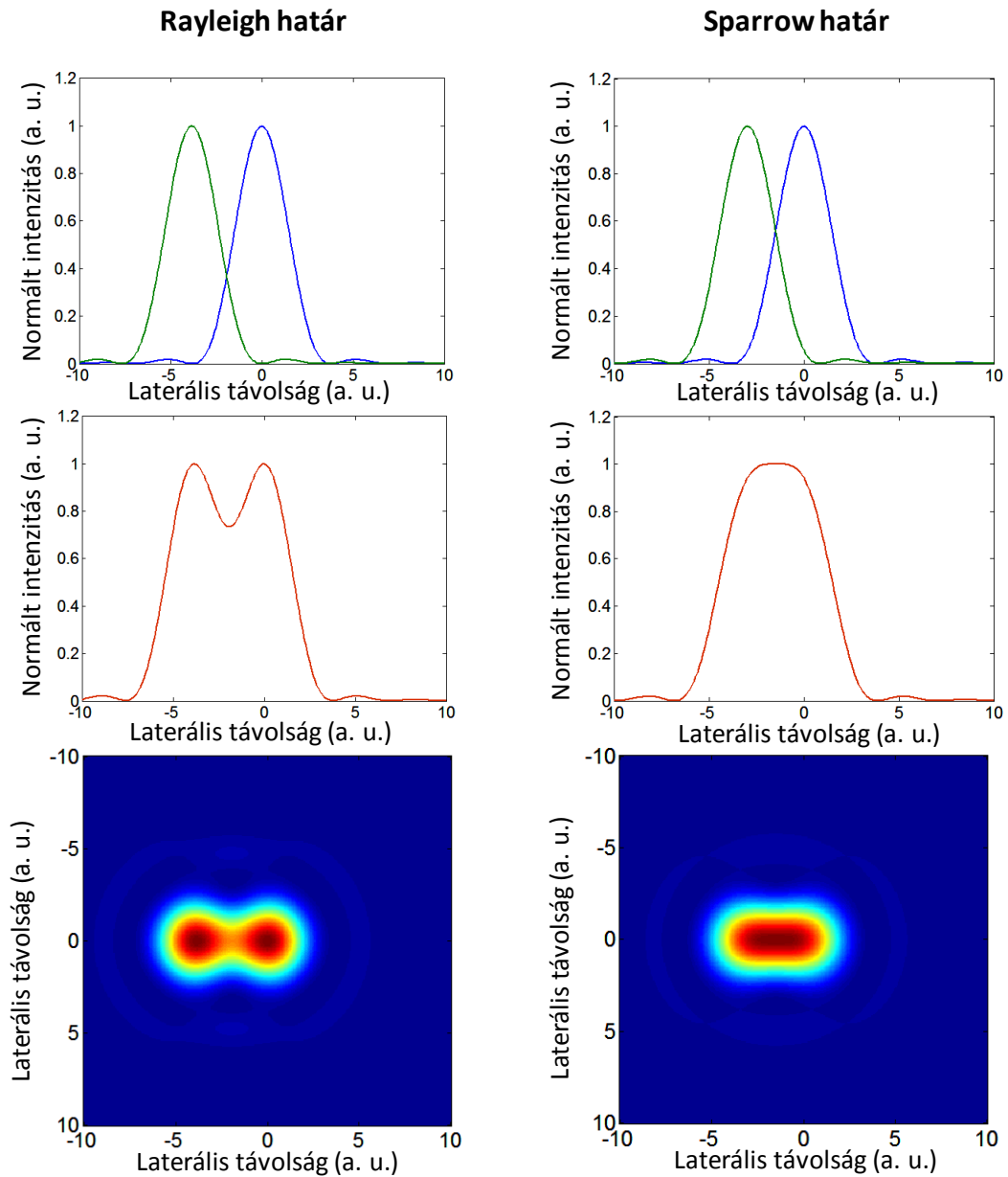
$$I(\theta) = I_0 \left(\frac{J_1(kR \sin \theta)}{kR \sin \theta} \right)^2 \quad (1)$$

ahol I_0 a maximális intenzitás, J_1 az elsőrendű Bessel függvény, k a hullámszám, R a belépő apertúra sugara és θ a megfigyelés szöge. $\sin \theta = q/f$, ahol q az optikai tengelytől mért távolság a megfigyelés síkjában, f pedig a lencse fókusz távolsága.



1. ábra: A leképező rendszer és az elhajlási kép

Egy mikroszkóp feloldásának definiálására és a feloldás határának megállapítására az idők során több definíció is született, ezek közül a Rayleigh és a Sparrow kritériumot tárgyalom részletesen. Mindkét esetben egy kritikus távolság (CD, Critical Distance) kerül meghatározásra, amelynél kisebb távolságra elhelyezkedő pontszerű objektumok már nem tekinthetők feloldhatónak képeik alapján. A különböző feloldási határokat a 2. ábra szemlélteti. Az ábrán látható a két pontszerű objektum képének keresztmetszete külön (zöld és kék görbe), az összegkép keresztmetszete (piros) és a kialakuló intenzitáseloszlás a megfigyelés síkjában.



2. ábra: Rayleigh féle és Sparrow féle feloldási határok szemléltetése két pontforrás segítségével

A Rayleigh határ esetén a kritikus távolság az a távolság, amilyen távolságra elhelyezkedő két pontszerű objektum PSF-jei (Airy függvény) közül az egyiknek a maximuma egybeesik a másik első minimumával. Ez a kritérium talán a leginkább elterjedtebb a mikroszkópiában. Kiszámítása:

$$CD = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (2)$$

ahol λ a hullámhossz illetve NA a leképező objektív numerikus apertúrája.

A Sparrow kritérium úgy határozza meg a kritikus távolságot, hogy ekkora távolságra elhelyezkedő két pontszerű forrás képén, a köztük levő lokális minimum eltűnik, tehát az átfedésnél már nem jelentkezik bemélyedés, megszűnik a nyereg. Kiszámítása:

$$CD = 0,47 \frac{\lambda}{NA} \quad (3)$$

ahol λ a hullámhossz illetve NA a leképező objektív numerikus apertúrája.

Ezeknek a feloldási határoknak a kiszámításai módjait ((2) és (3)) figyelembe véve a laterális irányú feloldás javítására a következő, klasszikusnak tekinthető módszerek állnak rendelkezésre. A hullámhossz csökkentésével a kritikus távolság is csökken. Azonban a kisebb hullámhosszak felé való elmozdulás technikai nehézségekbe ütközhet, ugyanis ultraibolya (UV) tartományban működő optikai eszközök gyártása és használata nehézkes, továbbá a biológiai alkalmazhatóság is kérdőjelessé válik a fototoxicitás illetve a biológiai minta, UV tartományban jelentkező, nagy autofluoreszcenciája miatt. Másik lehetőség a numerikus apertúra növelése, aminek szintén technikai akadályai vannak. A kereskedelmi forgalomban kapható, legnagyobb numerikus apertúrájú, olaj immerziós objektív numerikus apertúrája: $\sim 1,4$ - $1,49$.

Eddig a laterális irányú feloldásról volt szó. Axiális irányban a feloldást a rendszer mélységélessége (DOF, Depth of Field) határozza meg. Nagysága, hasonlóan a laterális irányú feloldáshoz, függ a numerikus apertúrától (NA) és a hullámhossztól (λ).

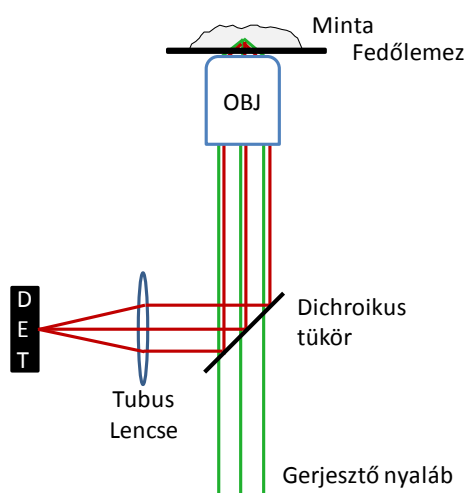
$$DOF = 2 \frac{\lambda}{NA^2} \quad (4)$$

A bevezetett mennyiségek (2)-(4) kifejezéseit figyelembe véve megállapítható, hogy a látható hullámhossz tartományban a kereskedelmi forgalomban elérhető legnagyobb numerikus apertúrát tekintve, a feloldásnál laterális irányban ~ 200 - 250 nm-nél, axiális irányban pedig ~ 500 nm-nél egy határ húzódik, amelyet hagyományos módszerekkel már nem lehet tovább javítani.

A fentebb definiált feloldási határok azonban nem megkerülhetetlen természeti törvények, csupán definíciók, amelyek segítségével az idők során jellemezni lehetett egy-egy mikroszkóp képalkotását. Abban az időben keletkeztek és szolgáltak megfelelő jósági tényezőként, amikor a szem volt a mikroszkópban a detektor, ezért nem vesznek figyelembe olyan, manapság már fontos effektusokat, mint például a detektor pixelméretének vagy a beérkező fotonok számának hatása a képre. Definíció mivoltuk következtében, ezek a határok adott hullámhossz és numerikus apertúra mellett megkerülhetőek, minden esetben valamilyen trükköt alkalmazva a képalkotási technikában. Tehát elérhetőek a kritériumok által meghatározott feloldások alatti feloldásértékek. A diffrakció természetesen továbbra is fellép és meghatározó szerepet játszik a képalkotásban. A hagyományos feloldási határokat átlépő, azoknál jobb feloldást ígérő technikákat, szuperfeloldású mikroszkópiai technikáknak hívjuk.

2. Szuperfeloldású mikroszkópai technikák

A hagyományos mikroszkópai technikák között két főbb típus van: a pásztázáson alapuló (scanning) és a leképezésen alapuló (widefield) technikák. Ezek alapján csoportosítottam a szuperfeloldású technikákat. Először a két csoport alapelrendezéseit és tulajdonságait mutatom be. Azt a térbeli tartományt a mintában, amelyről képet szeretnénk készíteni, leképezendő tartománynak (ROI, Region Of Interest) fogom hívni. Ennek a tartománynak a képe a kamera síkjában a képtér vagy képmező (FOV, Field Of View). A következőkben a fluoreszcens detektálási módban működő mikroszkópokkal fogok foglalkozni. A fluoreszcens pásztázó mikroszkóp egy tipikus, vázlatos felépítése a 3. ábrán látható.

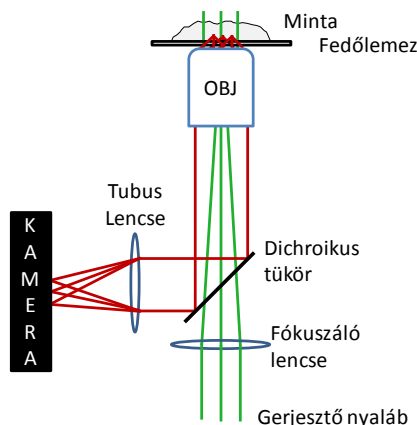


3. ábra: Fluoreszcens pásztázó mikroszkóp felépítése (OBJ: objektív, DET: detektor)

A beérkező kollimált gerjesztő nyaláb áthalad a dichroikus tükrön és az objektív a mintába fókuszálja. A fókuszban elhelyezkedő fluoreszcens molekulák gerjesztődnek. A teljes térszögben kibocsátott fluoreszcens fotonok egy részét az objektív összegyűjti. A dichroikus tükör a detektor karba irányítja a fluoreszcens nyalábot, majd a tubuslencse segítségével egy pontdetektor felületére fókuszálódik (általában félvezető detektor vagy fotoelektron sokszorozó). A pásztázás megvalósulhat a minta mozgásával vagy a fókuszpont pozicionálásával, melyet a gerjesztő nyaláb megfelelő irányításával lehet elérni (például galvo tükrökkel). A galvotükrökkel történő pásztázás gyorsabb, mint a minta mozgásával történő pásztázás. A fókuszon kívülről érkező, zavaró fluoreszcens fotonok számának csökkentése konfokális detektálással lehetséges [10-12]. Ekkor a tubuslencse fókuszába (ami az objektív fókuszsíkjának konfokális síkja) egy túlyukat helyezzünk el. Ennek segítségével kizárhatóak azok a fotonok, amelyek az objektív fókuszán kívülről indultak el, ezzel növelhető a kép kontrasztja. További kontrasztjavítást ígérő technika a többfotonos gerjesztés [13]. Lehetőség van nem csak a ponttal, hanem vonallal történő pásztázásra is. Ekkor egy hengerlencse segítségével a mintába egy vonalat fókuszálnak, a detektor pedig egy vonaldetektor. Ezzel a képkészítés gyorsítható fel, mivel csak egy irányban kell a pásztázást

elvégezni. Szintén a pásztázás gyorsítására találták fel a többfókuszú detektálást [14]. Ekkor több pont képezhető le egyszerre egy lencserendszer segítségével és konfokális detektálás is megvalósítható egy megfelelő tülyuk-rendszerrel rendelkező lemezzel (Nipkow lemez [15]).

A leképezésen alapuló mikroszkópok esetén a teljes ROI-t kivilágítjuk a gerjesztő nyalábbal, majd egy kamera segítségével képet készítünk róla. Egy tipikus felépítés a 4. ábrán látható.



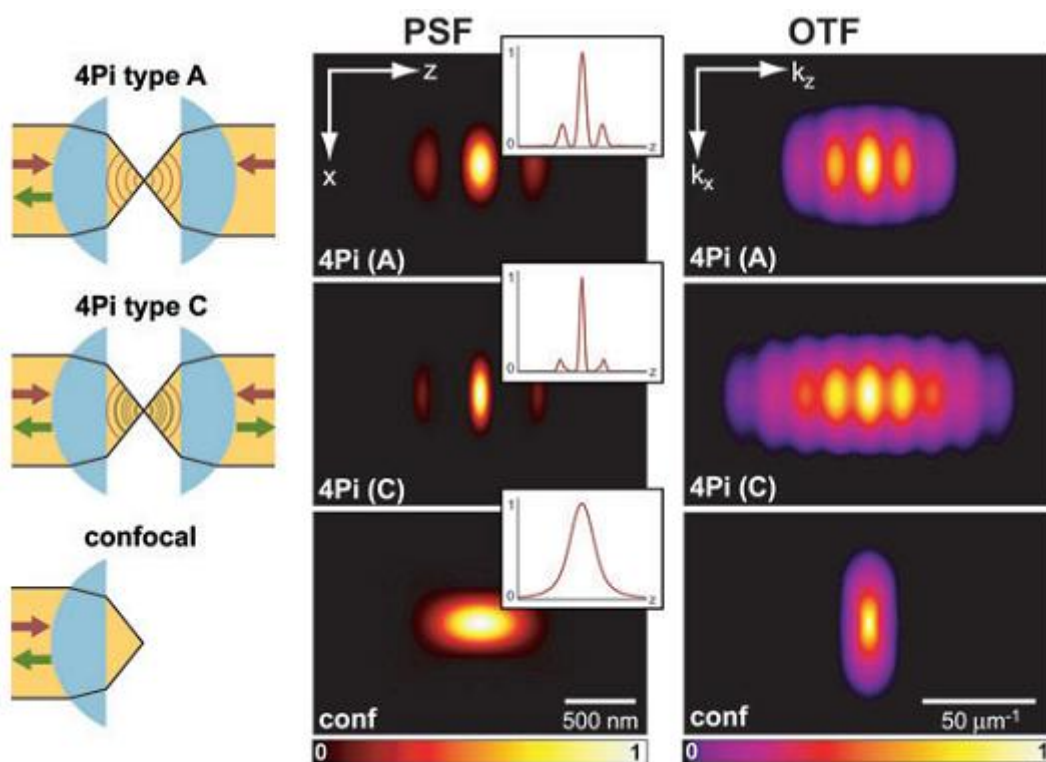
4. ábra: Fluoreszcens, leképezésen alapuló mikroszkóp felépítése

A gerjesztő nyalábot egy fókuszáló lencse segítségével az objektív hátsó fókusz síkjába fókuszáljuk. Eredményképpen a mintában a teljes ROI, ideális esetben egy kollimált nyaláb segítségével, kivilágításra kerül. A tartományon belül elhelyezkedő fluoreszcens molekulák fluoreszkálni fognak és a kibocsátott fotonok egy részét a mikroszkóp objektív összegyűjti. Az egyszerre világító molekulákból álló képet egy tubuslencsén keresztül egy nagy érzékenységű kamera segítségével figyelhetjük meg. A fókusz síkon kívülről érkező zavaró jel csökkentését megcélzó, különböző kivilágítási lehetőségekkel külön fejezetben foglalkozok, amely különösen kritikus a dolgozatom témájául választott lokalizációs mikroszkópban (4. fejezet).

Összehasonlításképpen, a pásztázó technika lassabb, mint a leképezésen alapuló technika, de a konfokális detektálás révén kisebb a fókusz síkon kívülről érkező zavaró háttér mértéke; jobb az optikai szeletelő tulajdonság, akár a mintában egészen mélyen történő leképezés esetén is. Természetesen mindkét technika napjainkban is folyamatosan fejlődik és a gyenge pontok az újabb és újabb módszerek révén kiküszöbölésre vagy enyhítésre kerülnek. Általában a biológiai alkalmazási terület határozza meg a különböző szempontokat mérlegelve (kívánt feloldás, gyorsaság, kontraszt...), hogy melyik technika alkalmazása előnyösebb.

Mindkét megközelítés esetén a fejlesztések egyik iránya a feloldás javítása. A következőkben bemutatom az elmúlt években megjelent, a hagyományos feloldási határ alatti feloldást ígérő módszereket.

A nagyfeloldású pásztázó technikák egyik fajtája során valamilyen fókuszolt intenzitás eloszlását manipuláló módszert használnak. Erre példa a bevonatot tartalmazó objektívek [16] vagy a konfokális mikroszkópokban használható fázis és amplitúdó manipulációt végző lemezek [17-20], amelyek a kivilágító nyaláb útjába helyezve megfelelően módosítják a PSF alakját. A polarizációs viszonyokat változtatva is módosítható a pontátviteli függvény [21]. Ezekkel elérhető, hogy effektíve kisebb térfogatú térrész legyen a mintában gerjesztve, ezáltal a feloldás javul. Axiális irányban jelentős feloldásjavulás érhető el két szembe (4Pi) [22] vagy szöget (Theta) [23] bezáró objektív segítségével. A 4Pi rendszerben a szembefordított két objektívnek a fókusza közös így a gerjesztő nyalábok között interferencia lép fel (5. ábra, Type A), melynek következtében a mintában a fókusz környezetében, a hagyományos konfokális mikroszkópokhoz képest, effektíve kisebb térrész lesz gerjesztve. A detektálás során mindkét objektívből származó információkat felhasználva az axiális feloldás tovább javítható (5. ábra, Type C). Ezzel a technikával ~100 nm-es axiális feloldás érhető el [24].

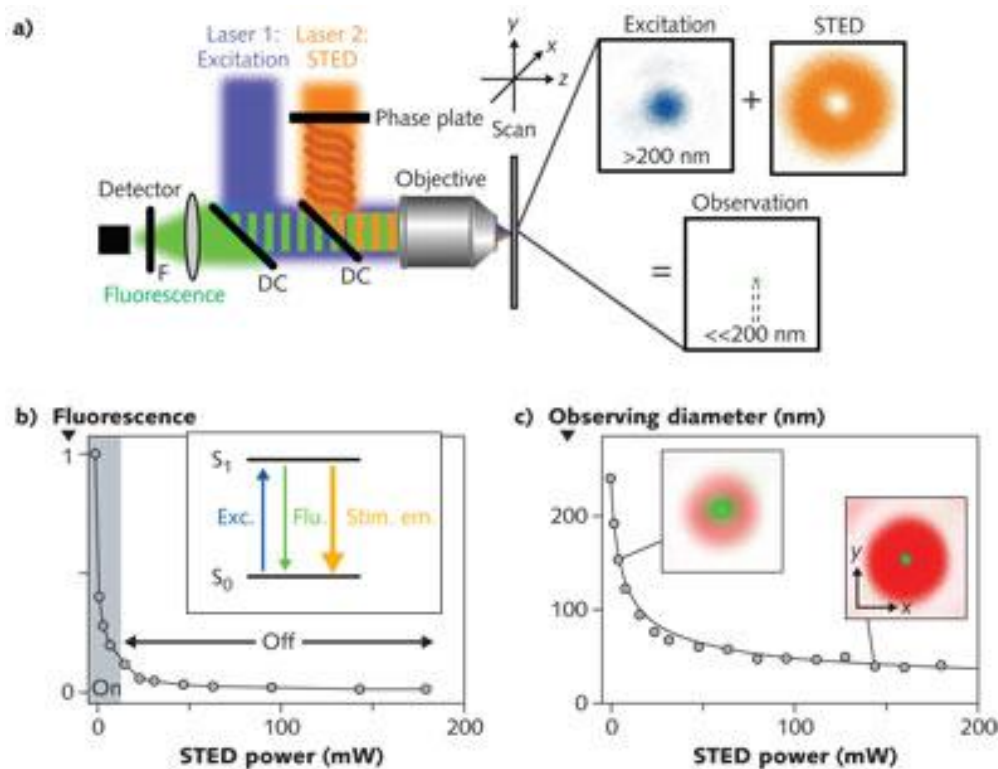


5. ábra: 4Pi fluoreszcens és konfokális mikroszkópok működési elvének, PSF-jének és Optikai Transzfer Függvényének (OTF) összevetése [25]

A technika egyik hátránya, hogy interferometrikus pontosságot kell elérni és tartani a rendszer felépítése és használata során. Továbbá, mivel mind a gerjesztő, mind a fluoreszcens nyaláb áthalad teljesen a mintán, a mintának kellően vékonynak és homogénnek kell lennie. Ez többek között azért fontos, mert a minta a nyalábok fázisviszonyait megváltoztathatja és az interferenciakép nem lesz tökéletes. Figyelembe kell venni továbbá, hogy a nagy numerikus apertúrájú objektívek

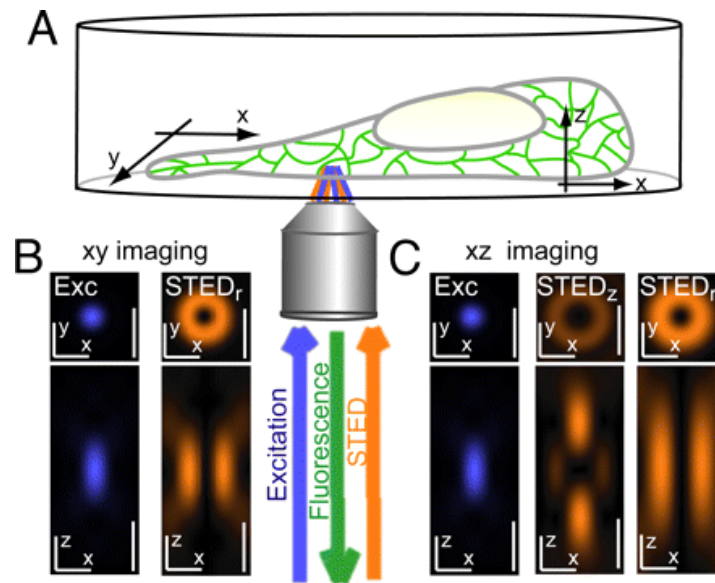
munkatávolsága igen kicsi, tipikusan a száz mikrométeres nagyságrendbe esik, ami igen megnehezíti a 4Pi rendszer építését és limitálja alkalmazhatóságát.

Laterális és axiális irányú nagymértékű feloldásjavulást ígér egy pásztázó mikroszkópban a kényszerített emissziót kioltásra használó technika a STED (Stimulated Emission Depletion) [26-28]. Elve és egy ilyen mikroszkóp felépítése a 6. ábrán látható. Egy gerjesztő nyaláb (Excitation) az objektív fókuszában a mintában elhelyezkedő fluoreszcens festékmolekulákat gerjeszti. Egy másik, nagyobb hullámhosszú, fázismanipulált nyaláb (STED nyaláb) gyűrű formájú fókuszt hoz létre. Hullámhossza olyan, hogy a kivilágított tartományban stimulált emisszióra ösztönzi a gerjesztett állapotban levő molekulákat. Eredményképpen a gyűrű közepén elhelyezkedő molekulák maradnak csupán gerjesztett állapotban. Az általuk teljes térszögben kibocsájtott fluoreszcens fotonok egy részét gyűjti be az objektív és jut el a detektorba. Az effektív PSF átmérő 200 nm alatti, ~50 nm lesz.



6. ábra (a): STED mikroszkóp felépítése, (b) a fluoreszcencia függése a STED nyalábteljesítménytől és (c) az effektív fókuszátmérő függése a STED nyalábteljesítménytől [29]

Növelve a STED nyaláb intenzitását a gerjesztett állapotban levő molekulák száma rohamosan csökken (az ábra (b) része), ezzel együtt az effektív fókuszátmérő pedig csökken, vagyis a feloldás javul. Ha nem csak laterális (x-y), hanem axiális (z) irányban is szeretnénk feloldásjavulást elérni egy másik STED nyalábot is alkalmazni kell (7. ábra, STED_z nyaláb használata mellett). A STED_r a laterális intenzitáseloszlásért felel.

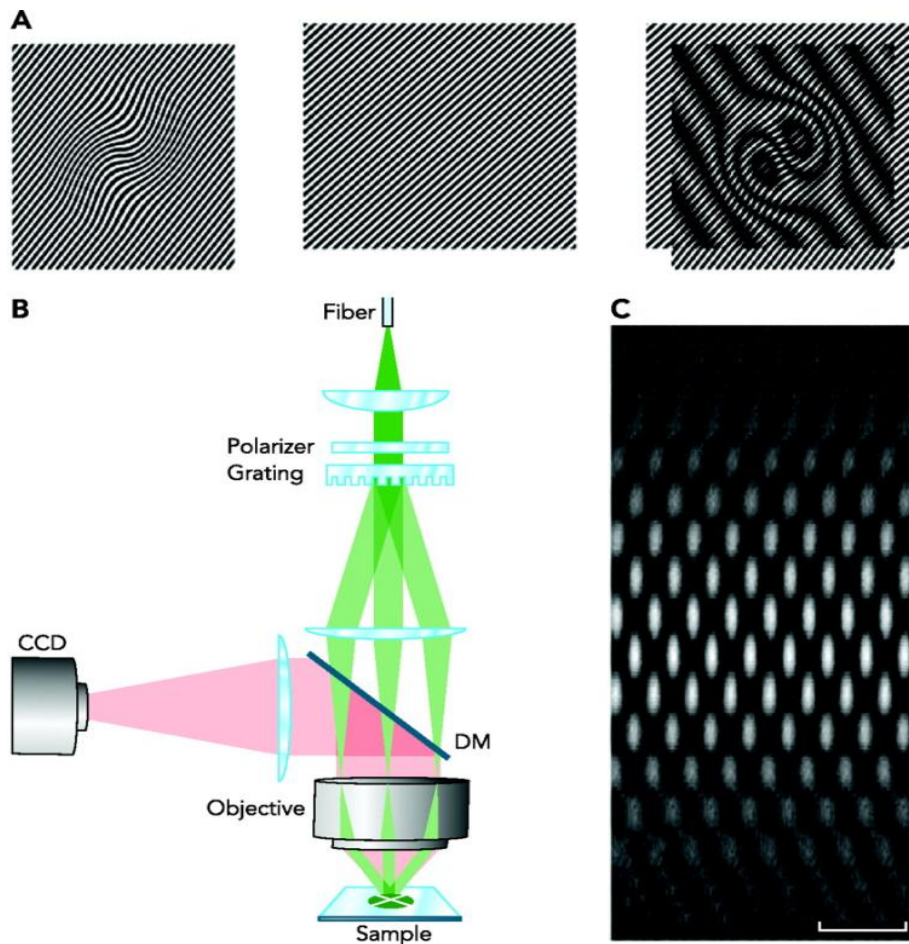


7. ábra (a): STED mikroszkóp alapjai, (b) x-y irányú leképezéshez és (c) x-z irányú leképezéshez szükséges nyalábok [30]

A $STED_z$ nyaláb intenzitása olyan módon van manipulálva, hogy a fókusz sík alatt és felett elhelyezkedő gerjesztett molekulákat kényszerítse kényszerített emisszióra, ezáltal javítva az axiális irányú felbontást, mintegy 100 nm-re. A két STED nyaláb polarizációs nyalábosztókocka segítségével, minimális veszteséggel, egyesíthető [31].

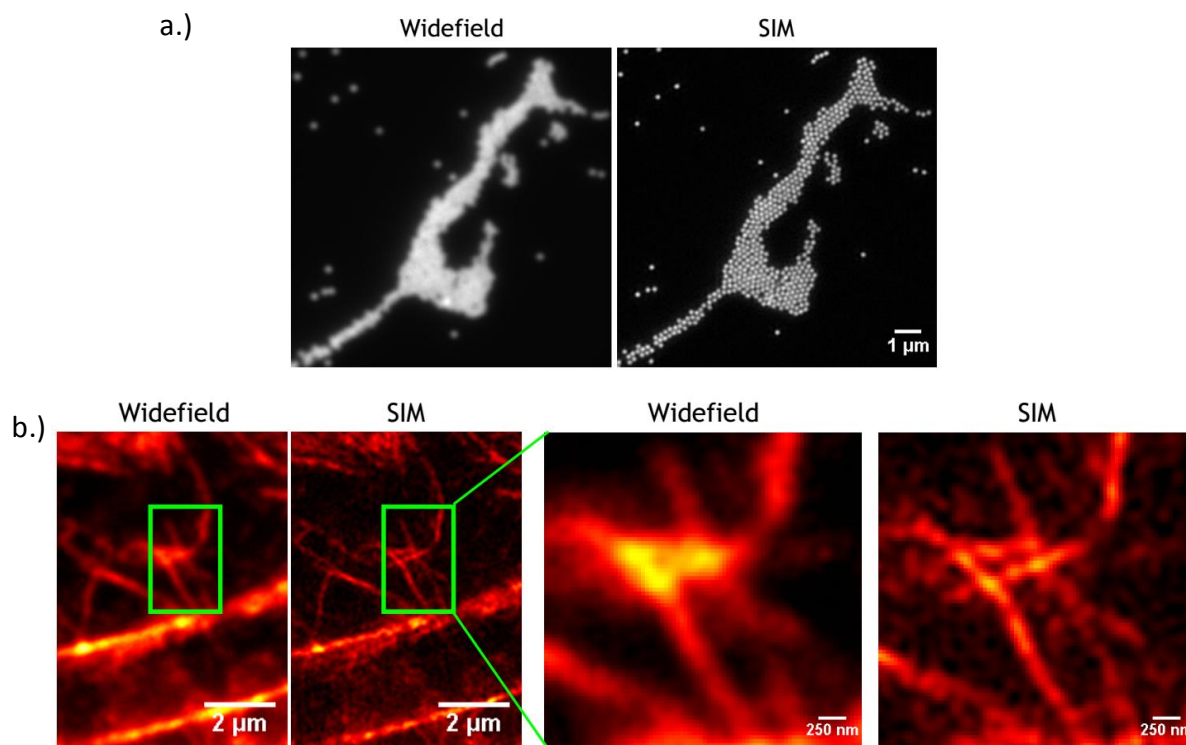
Problémát jelenthet, hogy a teljes mérés alatt a gerjesztő és a STED nyalábot folyamatosan, nagy pontossággal fedésben kell tartani illetve, hogy időigényes a pásztázás. Ez utóbbi többfókuszú STED használatával orvosolható [32, 33]. Biológiai minták esetén gondot okozhat még, hogy a STED nyaláb esetén nagy teljesítménysűrűséget kell alkalmazni, ami roncsolhatja a mintát.

A leképezésen alapuló technikák között kétszeres feloldásjavulást kínál a strukturált kivilágítású mikroszkóp (SIM, Structured Illumination Microscopy) [34], amelynek alapja a Moiré effektus (8. ábra (a) része).



8. ábra (a): SIM mikroszkóp alapjául szolgáló Moiré effektus, (b) SIM mikroszkóp sematikus felépítése és (c) a mintában, mélységben létrejövő mintázat [35]

A feloldandó mintázatot az optikai rendszer által megengedett legnagyobb frekvenciájú, ismert mintázattal világítjuk ki, akkor eredményképpen egy Moiré mintázatot kapunk, amely a mintára jellemző. Mivel ismert a kivilágító nyaláb mintázata az eredeti minta struktúrája rekonstruálható a feloldási határ alatt. A SIM képkészítése során az ismert szinuszos mintával különböző irányokból, különböző fázisértékeknél világítják meg a mintát. ~100 nm-es laterális irányú feloldás érhető el ezzel a technikával. A mintában a mintázatot egy ráccsal hozzák létre (ábra (b) része), amelyen átvilágítva, a -1,0,+1 diffrakciós rendek az ábra (c) részén látható mintázatot hozzák létre a mintán belül mélységben. A hagyományos, leképezésen alapuló (widefield) mikroszkópokhoz képest kétszeres feloldásjavulás érhető el, amelyet a 9. ábra demonstrál. Az ábra (a) részén 170 nm átmérőjű fluoreszcens golyókról készült képek láthatóak. A SIM technika segítségével a golyók feloldhatóak. Az ábra (b) részén pedig fluoreszcens módon festett actin filamentumokról widefield és SIM technikával készült képek szerepelnek.



9. ábra (a): 170 nm átmérőjű fluoreszcens golyókról widefield és SIM mikroszkóppal készült képek, (b) fluoreszcensen festett actin filamentumokról widefield és SIM mikroszkóppal készült képek [36]

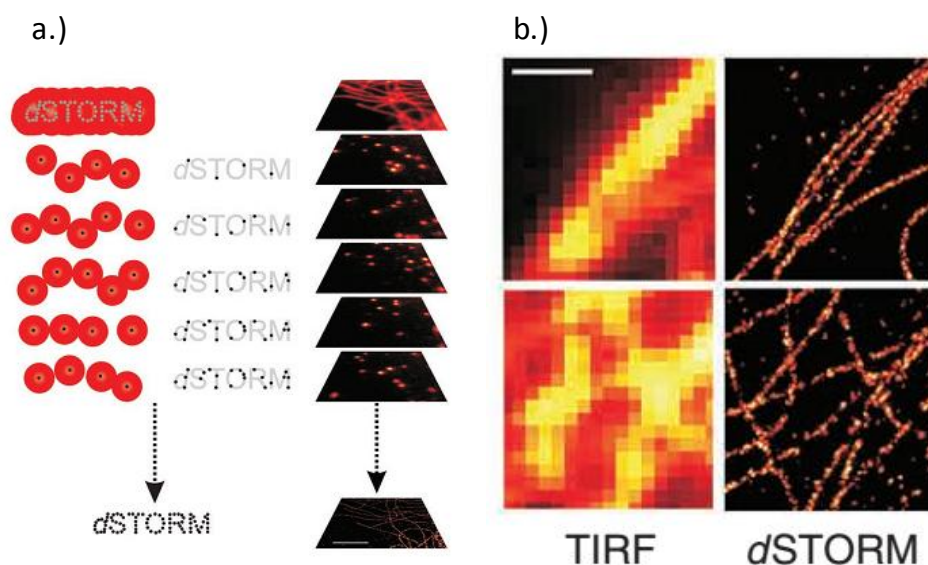
A technika nagy előnye, hogy gyors (~33 kép/sec) képkészítést tesz lehetővé és ezáltal dinamikai mérésekre is alkalmas, viszont igen érzékeny a kivilágító struktúra minőségére, amely interferometrikus pontosságú beállítást igényel. Az újabb SIM módszerekkel [37] a kétszeres feloldásjavulás tovább javítható.

2006-ban közel egy időben három kutatócsoport közel azonos működési elvű, nagyfeloldású, leképezésen alapuló mikroszkópai eljárást publikált, amelyeket összefoglaló néven lokalizációs mikroszkópai technikáknak nevezünk. A három bemutatott módszer: (i) PALM, PhotoActivated Localization Microscopy [38], (ii) STORM, Stochastic Optical Reconstruction Microscopy [39] és (iii) FPALM, Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy [40]. Később újabb technikák jelentek meg: dSTORM, (directSTORM [41]), GSDIM, (ground state depletion microscopy followed by individual molecule return [42]). Ezek a technikák pár tíz nanométeres laterális feloldást tesznek lehetővé. Egyszerű használatuk, egyszerű minta előkészítésük (hagyományos fluoreszcens festés) és más előnyös tulajdonságaik (például in vivo mérés lehetősége [43, 44]) miatt sok esetben kiválthatják az elektronmikroszkópos méréseket. Disszertációm témája ez a mikroszkópai technika, így részletesen a következő fejezetben tárgyalom.

3. A lokalizáción alapuló, szuperfeloldású optikai mikroszkópia

3.1. A lokalizációs mikroszkópiai alapjai

A hagyományos fluoreszcenciás technikák esetén a gerjesztett tartományban elhelyezkedő molekulák mindegyike aktív állapotban van, azaz gerjeszthető. A lokalizációs mikroszkópia során fotokémiai folyamatok révén érjük el azt, hogy egy időben a ROI-ban csak kevés számú molekula legyen aktív állapotban, így az egyes molekulák diffrakciós foltjainak leképezését időben szétválasztjuk (10. ábra (a) része).

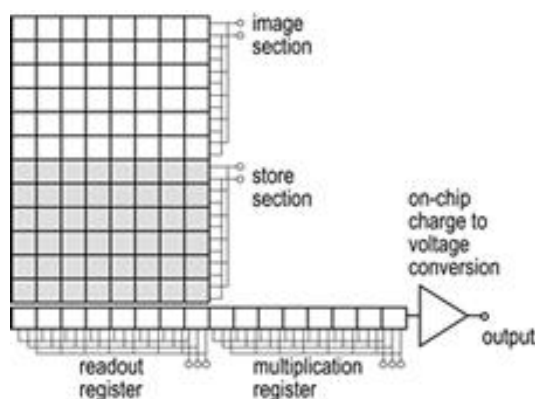


10. ábra (a): dSTORM mikroszkóp alapelve és (b) a hagyományos technikához (TIRF) képest tapasztalt feloldásjavulás COS-7 sejtben levő β -tubulin leképezése esetén (skála: 1 μ m) [45]

Tulajdonképpen egy videót (képcsomagot) készítünk a mintáról, amelynek egyes képkockáin az adott időpontban aktív molekulák képei láthatóak, tehát a video a fluoreszcens molekulák villódzásából áll. Az egyes képkockákat külön-külön kielemezve, a molekulák képeire függvényt illesztve a molekulák pontos pozíciói meghatározhatóak. A képcsomag összes képére elvégezve az elemzést, fel lehet térképezni azt, hogy hol találhatóak fluoreszcens molekulák a mintában. A hagyományos technikához (TIRF) képest tapasztalt feloldásjavulás a 10. ábra (b) részén látható COS-7 sejtben levő AlexaFluor 647 festékkel festett β -tubulin leképezése esetén.

A korábban említett lokalizációs technikák között a fő különbség a festékmolekulák kapcsolási mechanizmusának kivitelezése és vezérlése. A következőkben a dSTORM működési elvét mutatom be részletesen, mivel az együttműködő kutatócsoportoknál ilyen mikroszkópokat használnak. Azonban a disszertációban a későbbiekben bemutatott módszerek a többi szuperfeloldású, leképezésen alapuló mikroszkópiai technikában is alkalmazhatóak, a bemutatott jelenségek ugyanúgy fellépnek.

A dSTORM technika tehát egy leképezésen alapuló, mikroszkópai technika, amelynek egy tipikus elrendezése a korábban bemutatott 4. ábrán látható. Nagy előnye, hogy leképezésen alapuló mikroszkóp rendszerbe implementálható, nem igényel komplexebb optikai elrendezést. Mivel a detektálás molekula szintű, alacsony a mérendő fotonok száma. Az elmúlt tíz év során a fejlesztéseknek köszönhetően olyan kamerák állnak rendelkezésre, amelyek képesek alacsony fotonszámot is detektálni. Ilyen kamerák a sCMOS (Scientific CMOS) és az EMCCD (Electron Multiplying CCD) kamerák [46-49]. A disszertáció mérései EMCCD kamerával készültek. Az EMCCD kamerák úgy működnek, mint egy CCD kamera, csak egy elektronsokszorozó lépés be van építve az adatkonverzió előtt (11. ábra).

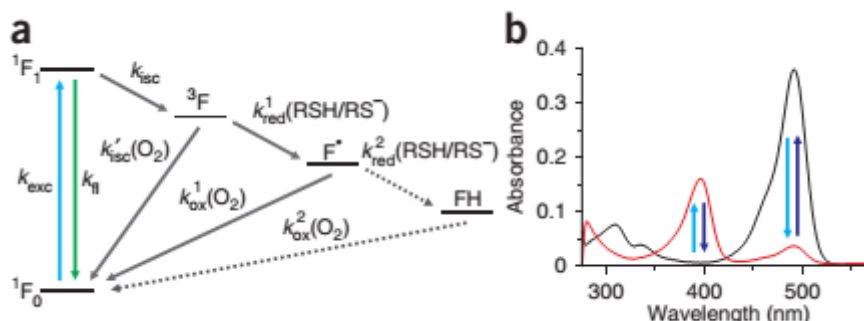


11. ábra: EMCCD vázlatos felépítése [46]

A beérkező fotonok a kamera aktív felületén elektronokat keltnek. A gyűjtési időszak (expozíciós idő) után egy tároló szekcióba (store section) kerülnek, ahonnan megkezdődik a kiolvasás a kiolvasó regisztereken (readout register) keresztül. A feszültségértékké való konverzió (on-chip charge to voltage conversion) előtt egy elektronsokszorozási folyamat van (multiplication register). Hasonlóan a lavina diódákhoz az elektronok az elektromos tér hatására gyorsulnak és ionizáció lévén újabb szabad elektronokat keltnek, így erősíthető fel a jel. Tehát az EMCCD kamerára úgy lehet tekinteni, mintha minden egyes pixele egy lavinadióda lenne. A kamerák tipikus pixelmérete $\sim 16\text{--}24\text{ }\mu\text{m}$, maximális képterület (FOV) változhat 128×128 pixeles, 512×512 pixeles és 1024×1024 pixeles tartomány között [50]. Természetesen minél nagyobb a FOV, annál több idő szükséges a kiolvasáshoz, így a képkészítési frekvencia csökken. A lokalizációs technikákban úgy van a mikroszkóp nagyítása meghatározva, hogy egy molekula képe körül-belül egy 7×7 pixeles tartományra jusson, hogy a lokalizáció függvényillesztéssel lehetővé váljon (részletesen a 3.2 részben).

A lokalizációs technikákban, így a dSTORM esetén is, szükséges a molekulák kapcsolása fluoreszcens és nem fluoreszcens állapot között. Ezt fotokémiai folyamatok segítségével lehet elérni. dSTORM esetén egy úgynevezett puffer oldat segítségével, a festékmolekulák mikro környezetének megváltoztatásával érjük el. A molekuláknak a lokalizációs technika

szempontjából nézve három állapota lehet: aktív (fluoreszcenciára képes), passzív (fluoreszcenciára nem képes) és bleached (a festék molekula szétesett). Az egyes állapotok között átmenetek lehetségesek (12. ábra).



12. ábra (a): dSTORM esetén a puffer oldat jelenlétében a molekulák energiasémája és (b) a gerjesztő és reaktiváló hullámhosszon az abszorbancia [45]

A molekula aktív állapotában a 1F_0 szinglett nívóról, a gerjesztő fény hatására, abszorpció révén a gerjesztett 1F_1 nívóra kerül. Fluoreszcens foton emissziója révén vagy újra az alapnívóra jut vagy pedig nem fluoreszkáló állapotba kerül azáltal, hogy a molekulaszervezettől függő valószínűséggel a metastabil 3F nívóra jut. Ennek a nívónak az élettartama lényegesen (~ezerszer) hosszabb, mint a 1F_1 nívóé. Innen a mintában jelenlevő molekuláris oxigén hatására alapnívóra és így újra aktív állapotba kerülhet. Másik lehetőség, hogy a puffer oldatban levő anyagoknak köszönhetően, azokkal újabb és újabb komplexeket alkotva, újabb és újabb metastabil nívókra jut (F^* és FH), így megnövelve a passzív állapot élettartamát. A szabad oxigén gyökök mindig az alapnívóra való visszajutást segítik, de szerepet játszanak a minta kiégési (bleach) folyamatában is. Ezért általában a puffer oldat olyan anyagokat is tartalmaz, amely megköti a szabad oxigén gyököket és a reaktiválás, vagyis a komplexekben kialakult kötések felszakítását inkább egy 405 nm-es fény segítségével végzik, amely hullámhosszon jó az elnyelő képessége a komplexeknek (kötések felszakadhatnak és a molekula alapnívóra kerülhet), de a festékek nem gerjesztődnek túlságosan. Az ábra (b) része egy Alexa 488 festék és a mintában jelenlevő puffer oldat esetén mutatja be a teljes ciklus abszorbancia-változásait. A kezdetben aktív állapotban levő molekulák 488 nm-es besugárzás után passzív állapotba kerülnek. A minta abszorbanciája 488 nm-en lecsökken (világoskék nyíl) és a komplexek megjelenésével egy abszorpciós csúcs jelenik meg ~405 nm körül. Innen akár spontán módon vagy 405 nm-es reaktiváló fény segítségével újra aktív állapotba kerülhetnek (sötétkék nyíl) és a ciklus kezdődik előlről. A teljes kapcsolási mechanizmus részletesebben megtalálható dSTORM esetén a [45], a többi technika esetén pedig a [51] számú referenciákban. Ezekben szintén megtalálhatóak a használható festékek listája és tulajdonságai.

Tehát a dSTORM képkészítés során a minta egy puffer oldatban helyezkedik el, amely biztosítja a fluoreszcens molekulák kapcsolását aktív és passzív állapotok között. A villogó molekulákról egy EMCCD detektorral felszerelt, leképezésen alapuló mikroszkóp segítségével egy képcsomagot (videót) készítünk. A képcsomag képeit egyenként elemezve egy molekulatérkép kapható a mintáról, amely pár tíz nanométeres feloldással rendelkezik.

3.2 A lokalizációs algoritmus

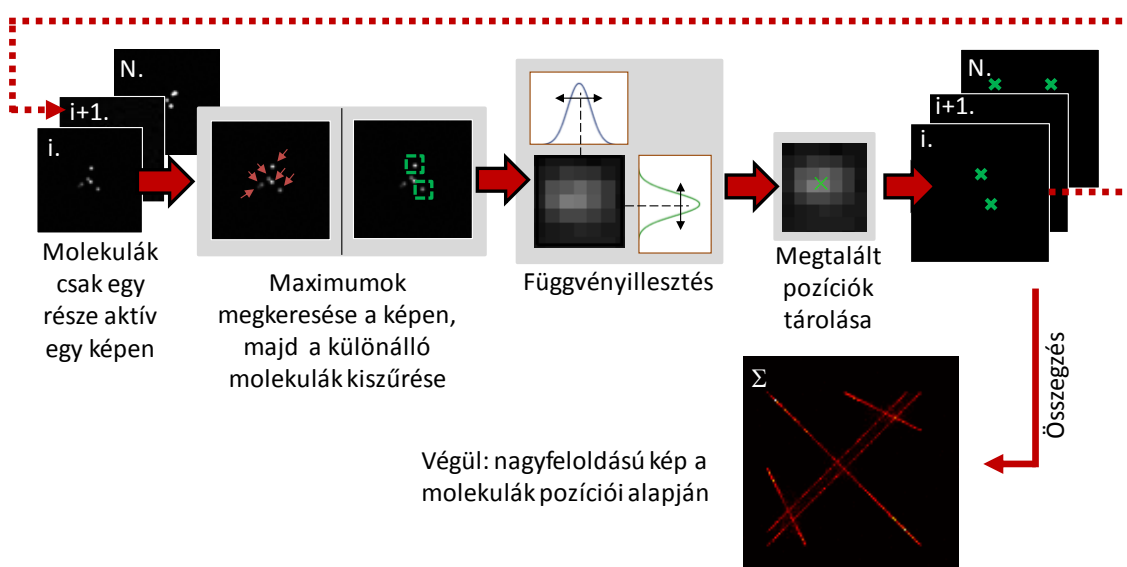
A lokalizációs algoritmus a képkészítés egyik fontos része a lokalizáción alapuló mikroszkópiában. Az utóbbi időben számos szoftver jelent meg a molekulák lokalizálására, legtöbbjük ingyenesen elérhető. A teljesség igénye nélkül néhány példa: rapidSTORM [52], DAOSTORM [53], compressed sensing [54], 3B algoritmus [55], deconSTORM [56], PALMER [57] és rainSTORM [58, 59]. Néhány alapvető lokalizációs elv, amelyet az algoritmusok felhasználnak a különálló molekulák lokalizálására.

- Súlyozott közép: A molekulakép pixeleinek értékei alapján a molekula koordinátáinak meghatározásánál súlyozott közepet számolunk.
- Függvényillesztés legkisebb négyzetes eltérés módszerével: Egy választott PSF függvényt (általában Gauss) illesztünk a molekula képére, a négyzetes eltérést a mért és az illesztett kép között minimalizálva [60]. Az illesztés során illesztendő paraméterek az x , y koordináták. Általában az iteratív Levenberg–Marquardt algoritmust [61] használják, amely mátrixos formába önti az illesztés folyamatát, amely könnyebben programozható.
- Függvényillesztés Maximum Likelihood módszerrel: Egy választott PSF függvényt (általában Gauss) illesztünk a molekula képére a likelihood függvény maximalizálásával [62].

Ezekon kívül egyes algoritmusok képesek átfedő, többszörös molekulaképek illesztésére [63] vagy a nagymennyiségű számolás (akár több tízezer illesztés) felgyorsítására az illesztések GPU-n, párhuzamosan történő futtatásával.

A következőkben a cambridge-i kutatócsoport által kifejlesztett rainSTORM lokalizációs algoritmus működését mutatom be részletesen, amelyet a mérések során is használtam [58, 59]. Az algoritmus folyamatábrája a 13. ábrán látható. A beérkező képcsomagot képről képre elemzi. Az egyes képeken megkeresi a lokális maximumokat, amelyek a lehetséges molekulák képeinek maximumai. Ezután egy döntési folyamat következik a megtalált maximumok sorba állításával: a felhasználó által meghatározott intenzitáshatárok közé eső maximumokkal lép tovább az algoritmus. A maximumok körüli 7×7 pixeles szegmensekre történik az illesztés. A rainSTORM Gauss függvényt illeszt iteratív módon a legkisebb négyzetes eltérés módszerével, a Levenberg–Marquardt algoritmust használva. Illesztendő paraméterek: a középpont x , y koordinátái,

maximuma és az x és y irányú szórás. Lehetőség van a maximális iterációk számának beállítására. Az illesztés folyamatában, minden iteráció végén egy döntési folyamat van: az algoritmus megvizsgálja, hogy a kapott paraméterek a felhasználó által megadott paraméter tartományban vannak-e. Ha nem, akkor az iteráció megszakad (sikertelen). Az illesztés végén egy szűrés van, hogy az illesztett molekulakép és az eredeti molekulakép közötti eltérés (reziduum) a felhasználó által megadott határon belül van-e. Ezen a szűrésen átmenő, sikeres illesztések, tárolásra kerülnek. Miután a képcsomag összes képe elemzésre került, egy lista áll rendelkezésre az illesztések során kapott paraméterekkel. Ezután következik az ábrázolás. A kapott koordináta lista alapján egy kétdimenziós hisztogram készül, amelynek pixelhálójá tízszerese az eredeti kép pixelhálójának. (Tehát ha a mért kép pixelmérete, a fókuszszíkban mérve, 160 nm, akkor a szuperfeloldású kép pixelmérete 16 nm.) Ezzel elkészült a rekonstruált, szuperfeloldású kép.

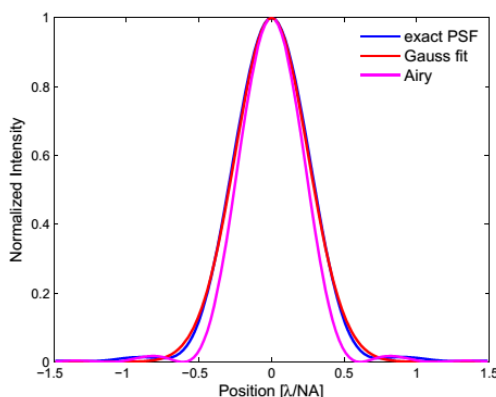


13. ábra: A rainSTORM működési elve [64]

Felmerülhet kérdésként, hogy mennyire helytálló, hogy a PSF illesztésére Gauss modellt használunk. Konkrét méréseket megvizsgálva (14. ábra) megállapítható, hogy ez a modell közelebb van a mért PSF-hez, mint például az Airy modell. Érdemes még figyelembe venni, hogy a PSF alakját befolyásolják a leképező optika aberrációi és a festékmolekula dipólmomentumának iránya is. Ez utóbbi azonban nem számottevő abban az esetben, ha molekulák szabadon és gyorsan elmozdulhatnak (foroghatnak), amelynek következtében a dipólmomentum irányának hatása kiátlagolódik. A PSF alakjáról és azt befolyásoló tényezőkről részletes elemzés a [65] számú referenciában található.

A Gauss függvényvel való illesztés előnye, hogy gyors és egyszerű, a két irányra szeparálható. Mivel a PSF alakja nem figyelhető meg tökéletesen a pixelméret miatt (7 mérési pontunk van

csupán, részletesen a 3.2 részben), így komplexebb modellek használata nem feltétlenül kifizetődő futtatási idő szempontjából.

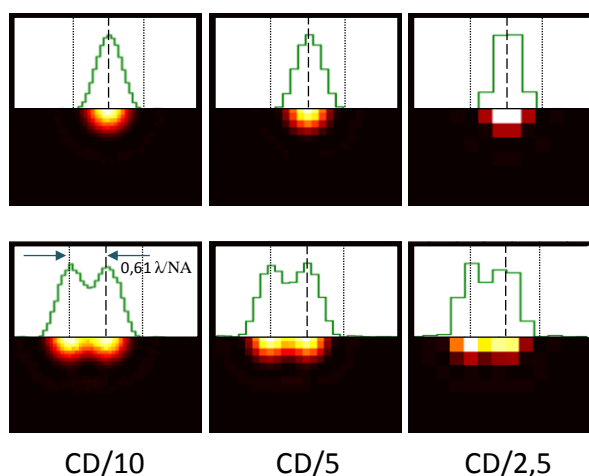


14. ábra: A mért (exact, kék), az Airy modellből számolt (Airy, lila) és a Gauss modellből számolt (Gauss fit, piros) PSF összevetése [65]

Léteznek olyan algoritmusok is, amelyek mért PSF-ek alapján készítenek el egy empirikus PSF modellt, amelyet a lokalizációs algoritmus az illesztések során használ fel [66]. Az algoritmusokról részletes leírás [67] referenciában található.

3.3 A lokalizációs mikroszkóp feloldása

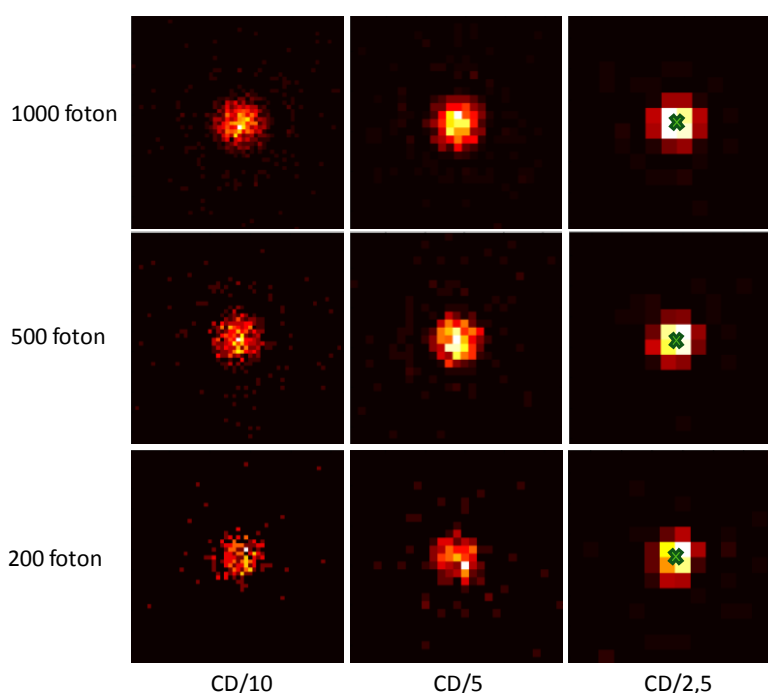
Mint ahogy azt korábban említettem, a hagyományos feloldás definíciók számos paramétert nem vesznek figyelembe, ilyen például a pixelméret, a beérkező fluoreszcens fotonszám vagy a háttérzaj PSF-re tett hatása, amelyek jelentősen befolyásolják egy mikroszkóppal készült kép minőségét. Ezeket mind figyelembe kell venni, amikor egy lokalizációs mikroszkóp egyik legfontosabb tulajdonságáról, a feloldásáról beszélünk. Elsőként tekintsük a pixelméret hatását a PSF-re (15. ábra felső sora).



15. ábra: A pixelméret hatása a PSF-re és két kritikus távolságra elhelyezkedő pontszerű forrás képére (pixelméretetek oszloponként: kritikus távolság/10, kritikus távolság /5 és kritikus távolság /2,5) [64]

A pixelméreteket a következőképpen választottam meg: oszloponként balról jobbra haladva vettem a Rayleigh-kritérium által meghatározott kritikus távolságot és osztottam 10-zel, 5-tel és 2,5-tel. Nagyobb pixelméreteket esetén a PSF-ek egyre kevésbé rajzolódnak ki (az ábra felső sora), a gyűrűs szerkezetük és első minimumhelyük nem határozható meg pontosan. Az ábra második sorában két, a Rayleigh-kritérium által meghatározott kritikus távolságban elhelyezkedő pontszerű forrás képe látható. Nagyobb pixelméreteket felé haladva az elhajlási képek egyre kevésbé rajzolódnak ki, nem határozható meg pontosan az a távolság, amelyre elhelyezkedő két pontszerű objektum még megkülönböztethető.

Másik fontos tényező a beérkező fluoreszcens fotonszám hatása a képre, amely egymolekula szintű detektálás esetén már jelentős befolyásoló tényező a pixelméret mellett (16. ábra).



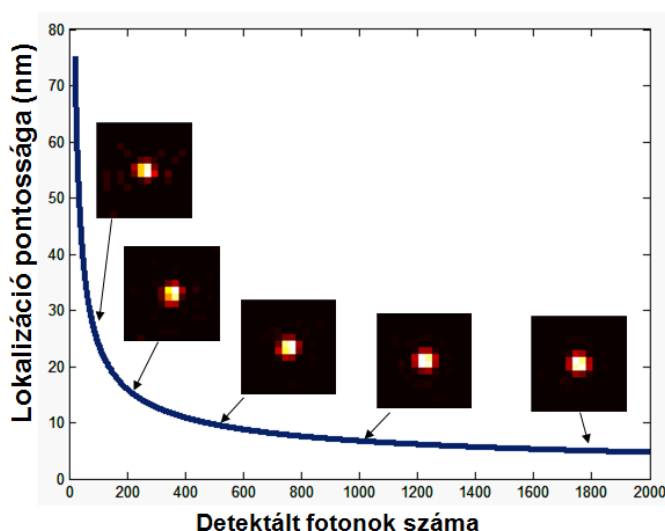
16. ábra: A beérkező fluoreszcens fotonszám és a pixelméret hatása egyetlen PSF-re (pixelméreteket oszloponként: kritikus távolság/10, kritikus távolság /5 és kritikus távolság /2,5, a képek normálva vannak)

Feltételeztem, hogy 200, 500 és 1000 foton érkezik egy pontszerű forrásból, amelyek a detektor felületére érve, a PSF által meghatározott eloszlás szerint oszlanak el a pixeleken véletlenszerű módon. A valószínűségi eloszlás az Airy kép alapján meghatározott függvény volt (1). Az ábra képei az intenzitáscsúchoz normálva vannak, hogy a képek struktúrája jobban látszódjon. Ahogy az várható, kisebb fotonszám mellett a gyűrűs struktúra nem rajzolódik ki, nagyobb pixelméreteket esetén pedig ezen felül a maximum helye sem lesz mérvadó a fotonok véletlenszerű beérkezése miatt (pontatlan lesz az illesztés is). Nagyobb fotonszám felé haladva a struktúra jobban kirajzolódik és kellő számú foton mellett a maximum helye is pontosabb lesz.

A lokalizációs mikroszkópiában a feloldást leginkább a lokalizáció (vagyis az illesztés) pontossága határozza meg. Ezt elsősorban, a fentiekből következően, a pixelméret, a beérkező fluoreszcens fotonszám illetve a háttérzaj (jel/zaj viszony) befolyásolja. A feloldás meghatározására a leginkább elterjedt, a fenti paramétereket egybeolvasztó Thompson-féle formula szolgál. Részletes számolással [68] megmutatható, hogy a lokalizáció pontossága:

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2} \quad (5)$$

ahol s az elhajlási kép standard deviációja (Gauss-eloszlást feltételezve), a a CCD pixel mérete, N a detektált fotonszám és b a zaj. Érdeemes megfigyelni a fotonszámfüggést, ami a mérések során a festékek tulajdonságai miatt különösen kritikus. A lokalizáció pontosságának fotonszámfüggését a 17. ábra mutatja. A pixelméret 130 nm volt, a standard deviáció 208 nm, a zaj 0,7 a detektált fotonok száma pedig 20 és 2000 között változott. Látszik, hogy 10 nm-es pontosság eléréséhez ~500 detektált fotonra van szükség.



17. ábra: A lokalizációs pontosság fotonszám függése és a normált PSF-ek [64]

Ezt figyelembe véve, tovább elemezve az (5) formulát, ha konstans fotonszám mellett nagyon megnöveljük a nagyítást, azaz sok pixelen oszlanak el az emittált fotonok (azért hogy minél több pontra tudjunk illeszteni), akkor egy pixelre kevés foton jut. Következésképpen romlik a jel/zaj viszony és ezzel együtt a lokalizációs pontosság. Másrészt, kicsi nagyítás mellett az összes foton csak kevés pixelen fog eloszlani, eredményképpen ugyan nagy a jel/zaj viszony, de kevés az illesztendő mérési pont, ami pontatlanná teszi az illesztést. Létezik tehát egy optimum. A számolások [68] azt mutatják, hogy a lokalizációs pontosság akkor maximális, ha a diffrakciós kép standard deviációja megegyezik a detektor pixelméretével. Az irodalomban találhatóak további metrikák és módszerek a lokalizációs mikroszkóp feloldásának és képminőségének leírására [69, 70].

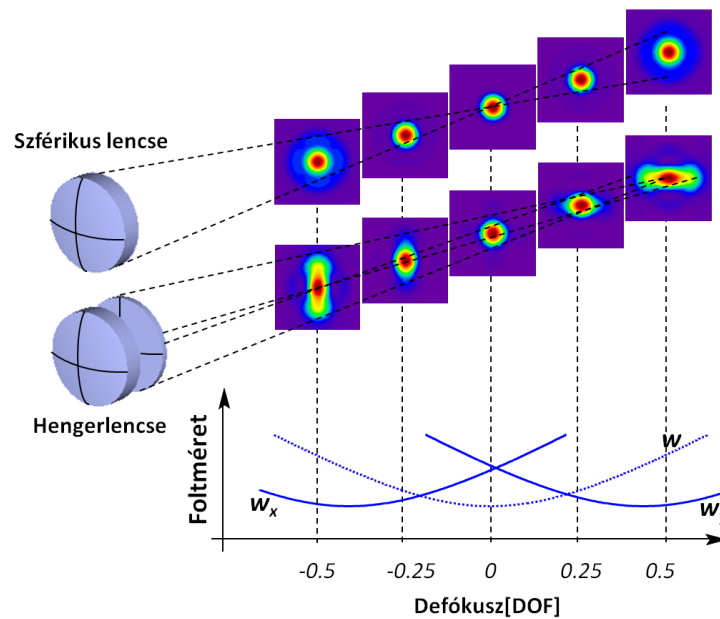
3.4 Háromdimenziós lokalizációs mikroszkópiai technikák

Eddig kétdimenziós lokalizációs mikroszkópiáról volt szó. Háromdimenziós lokalizációs mikroszkóp esetén a laterális lokalizáció mellett az axiális pozíciót is meg kell határozni ahhoz, hogy ebben az irányban is szuperfeloldást érjünk el. Erre akkor van lehetőségünk, ha a harmadik térbeli pozíciót valamilyen módon a PSF alakjába „kódoljuk”. Az 1. táblázatban összegyűjtöttem négy háromdimenziós technikát. További technikák a [71] referenciában találhatók.

1. táblázat: Háromdimenziós lokalizációs technikák

Technika neve (elérhető z irányú feloldás)	Rövid leírás	Előnye	Hátránya
Asztigmias rendszer [72] (~ 55 nm)	A detektorkarba gyenge asztigmatizmust vezetnek be. A z irányú koordináta a PSF ellipticitásába van kódolva	Egyszerűen kivitelezhető, nem igényel komplexebb algoritmust, mint a 2D	A lokalizációs pontosság az ellipszis miatt különbözik x és y irányban (más a standard deviáció)
Leképezés két síkban (biplane) [73] (~75 nm)	A detektor karban nyalábosztás történik és két különböző síkban készülnek képek a molekulákról, 3D PSF modellt illesztve a két síkra a z koordináta meghatározható	Egyszerű kivitelezés, nem igényel komplexebb algoritmust, mint a 2D	Nyalábosztás történik, így kevesebb fotonra történik az illesztés
Interferometrikus technika [74] (<20 nm)	Két szembefordított objektívvel történik a detektálás. A nyalábok interferenciáját figyelik különböző fáziskésések mellett. A z irányú koordináta az interferenciaképek intenzitásarányaiból adódik	Nagy feloldás	Komplex optikai rendszer, megkövetelt interferometrikus pontosság, vékony minta
Dupla hélix rendszer [75] (~ 20 nm)	A detektorkarban egy fázismaszk segítségével a PSF-et egy z irányban forgó, dupla hélixé alakítják. A z irányú koordináta az elfordulás szögéből adódik	Nagy feloldás, egyszerűbb kivitelezés	Fényvesztés lép fel a fázismaszkon

Az egyik legegyszerűbben kivitelezhető és emiatt leginkább elterjedt technika az asztigmatizmust felhasználó technika. A detektorkarban egy hengerlencse segítségével gyenge asztigmatizmust vezetünk be [72]. Ekkor a PSF enyhén elliptikussá válik és a molekula axiális irányú pozícióját (defókuszt) a PSF x és y irányú illesztett standard deviáció arányából (W_x , W_y) lehet megállapítani (18. ábra). Az ábrán W a szimmetrikus, asztigmatizma nélküli standard deviációt jelöli.



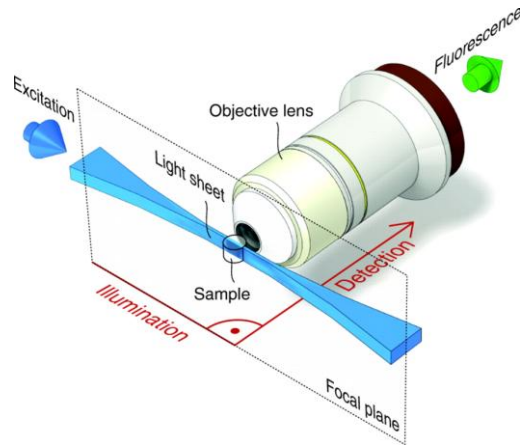
18. ábra: Asztigmias háromdimenziós leképezés elve [64]

Az asztigmias rendszer pontos kalibrálást igényel, ami után a molekula axiális pozíciója 50 nm pontossággal meghatározható. Fontos megemlíteni, hogy az axiális tartományt, amelyen belül ez a pontosság elérhető, a rendszer mélységélessége határozza meg, amely ~500 nm. Azaz lokalizációs mikroszkópokkal felvett 3D képek képtere axiális irányban jelentősen kisebb, mint laterális irányban. Valódi 3D felvételhez a minta pásztázására és az így kapott egyes képek pontos összeillesztésére, regisztrációjára van szükség.

4. Kivilágítási technikák a leképezésen alapuló mikroszkópiai technikában

A mikroszkópiában a kép minőségét jelentősen befolyásolja a fókuszszíkon kívülről érkező háttér zavaró hatása. Jelenlétében a kép elmosódottá válik, és a kontraszt lecsökken. A pásztázó mikroszkópiában a konfokális detektálás segítségével ez a zavaró jel jelentősen csökkenthető. Leképezésen alapuló technikákban felmerülő lehetőségeket ebben a fejezetben tárgyalom. A lokalizáción alapuló mikroszkópiában a fókuszon kívülről érkező háttér csökkentése rendkívüli fontosságú, mivel, ahogy láttuk, a lokalizáció pontosságát nagymértékben befolyásolja a háttérzaj mértéke ((5) összefüggésben a b zaj paraméter).

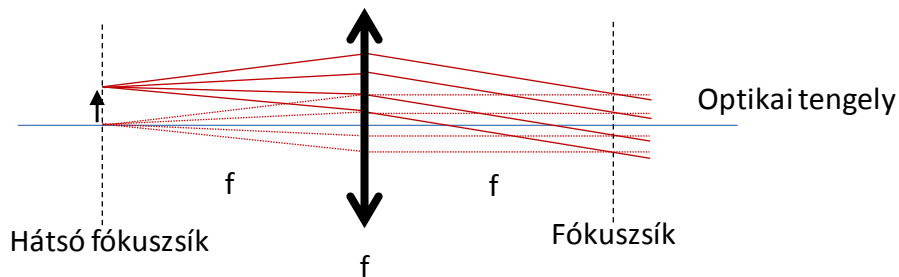
A megfelelő kivilágítás elérésére egy lehetőség a szelektív síkú kivilágítás (SPIM, selective plane illumination microscopy), amely esetén a kivilágító optikai út és a detektorkar egymásra merőlegesen helyezkedik el [76, 77]. A mintában létrehozunk, általában egy hengerlencse segítségével, egy kivilágított réteget és erre merőlegesen történik a leképezés és detektálás (19. ábra), így csak a leképezendő térrész van kivilágítva a mintában.



19. ábra: SPIM kivilágítás és detektálás [78]

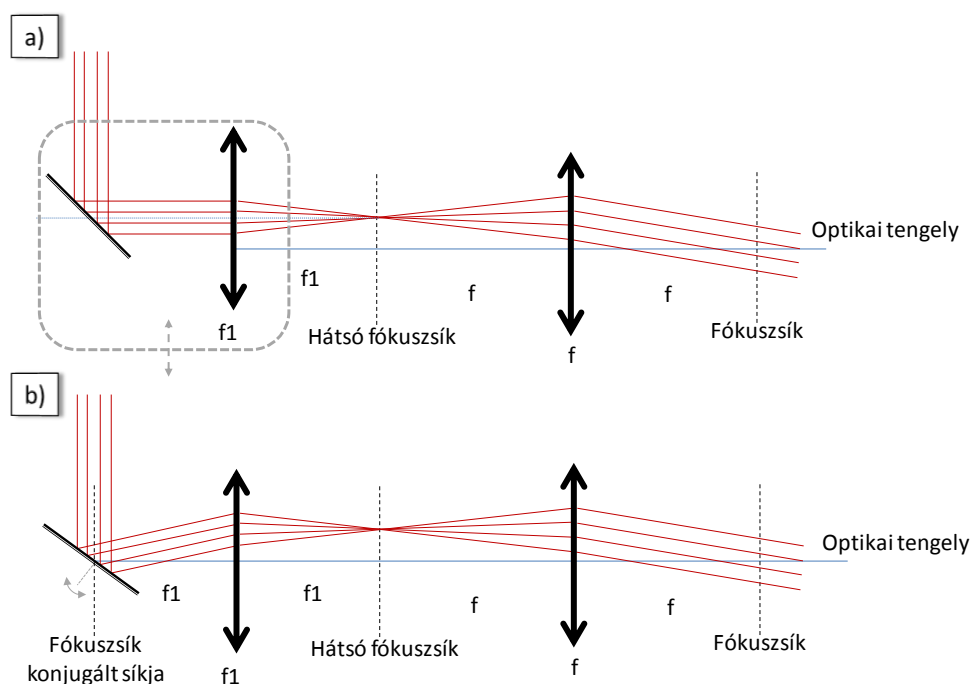
A módszernek technikai hátrányai vannak. A nagy numerikus apertúrájú objektívek munkatávolsága kicsi (100-200 μm), így nehezen lehet az objektív frontlencséje közelében létrehozni a kivilágítást, illetve speciális mintatartó küvetát igényel a technika.

Másik lehetőség a ferdeszögű kivilágítási technikák alkalmazása, amelyek nem igényelnek külön kivilágító nyalábutat. A kivilágítás és a detektálás is ugyanazon objektíven keresztül történik. Az objektívet tekintjük egy ideális f fókusz távolságú lencsének, a fókusz síkban az egész képet pedig világítsuk ki kollimált nyalábbal. Ehhez a beérkező nyalábot az objektív hátsó fókusz síkjába kell fókuszálni (20. ábra).



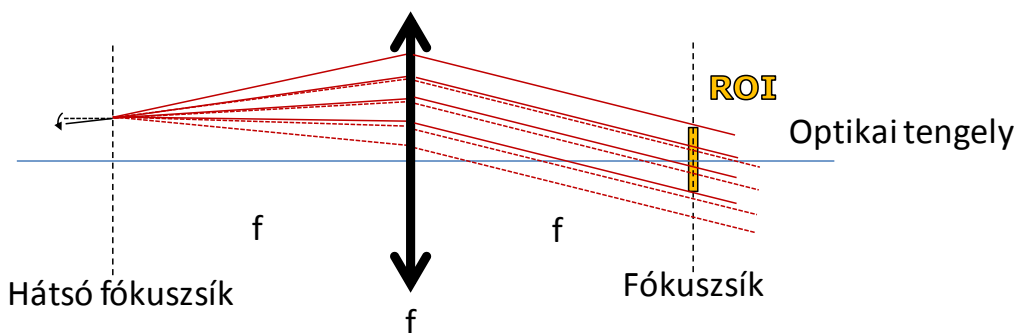
20. ábra: Ferdeszögű kivilágítás ideális esetben

Ha ferdeszögű kivilágítást szeretnénk létrehozni, akkor a beérkező nyalábot egy tengelyen kívüli pontba kell fókuszálni a hátsó fókusz síkban (el kell tolni a fókuszpontot a tengelyhez képest). Ideális esetben ekkor a nyaláb forgáspontja a fókusz sík és a tengely metszéspontjában van. A manipulációt $4f$ rendszerben lehet elvégezni (Appendix 1): a translációt a beérkező nyaláb és a hátsó fókusz síkba fókuszáló lencse transzverzális elmozdításával (21. ábra (a) része) vagy pedig a fókusz sík konjugált síkjában elhelyezett tükör elforgatásával lehet elérni (21. ábra (b) része).



21. ábra: Ferdeszögű kivilágítás megvalósítása (a) translációval és (b) tükörforgatással

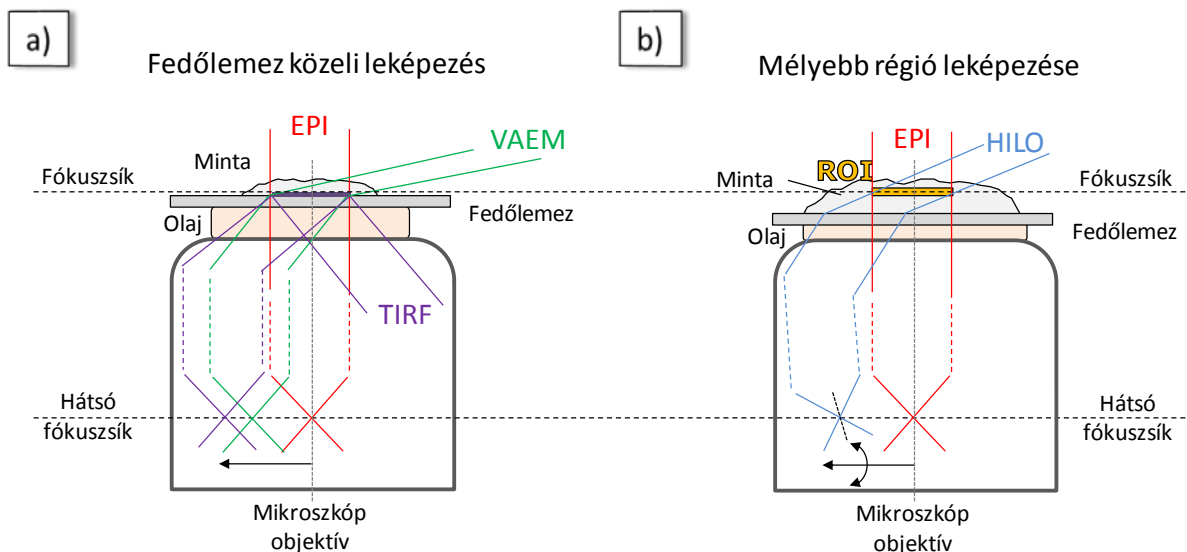
A valóságban azonban, az objektív leképezési hibái miatt, a forgáspont nem tökéletesen a fókusz síkban helyezkedik el. Ennek következtében a ROI kivilágítása a fókusz síkban decentráltá válhat különösen nagy szögek esetén (22. ábra, szaggatott vonalú nyílábmenet). Ennek korrigálására (transzláció a fókusz síkban) egy forgatást kell bevezetni a hátsó oldali fókusz síkban, a fókuszált nyílábban (22. ábra, folytonos vonalú nyílábmenet).



22. ábra: A decentrált kivilágítás esetén szükséges korrekció

Ezt a korrekciós forgatást a fókuszáló lencse (21. ábra (a) részén f_1 lencse) külön translációjával vagy egy újabb $4f$ rendszerben a hátsó fókusz sík konjugált síkjában elhelyezett tükör elforgatásával lehet megvalósítani (a második lehetőségről részletesebben az Eredmények rész első fejezetében). A ferdeszögű kivilágítást tehát meg lehet valósítani optikai elemek translációjával és tükörforgatással bevezetett forgatásokkal, illetve ezek kombinációjával.

A mintába különböző mélységekben elhelyezkedő leképezendő síkok esetén, különböző ferdeszögű kivilágítási technikákat alkalmazhatunk a fókuszsíkon kívülről érkező jel csökkentésére (23. ábra).



23. ábra: A mintában a (a) fedőlemezhez közel vagy (b) mélyebb rétegekben elhelyezkedő leképezendő régió kivilágítási módszerei

A hagyományosnak tekinthető kivilágítási technika az epifluoreszcens kivilágítás (EPI). Ekkor a teljes képteret kivilágítjuk egy kollimált nyalábbal úgy, hogy a beérkező nyalábot az objektív hátsó fókusz síkjába fókuszáljuk. Ekkor azonban a ROI alatti és feletti terület is ki van világítva, így a fókusz síkon kívülről érkező jel rontja a kép minőségét.

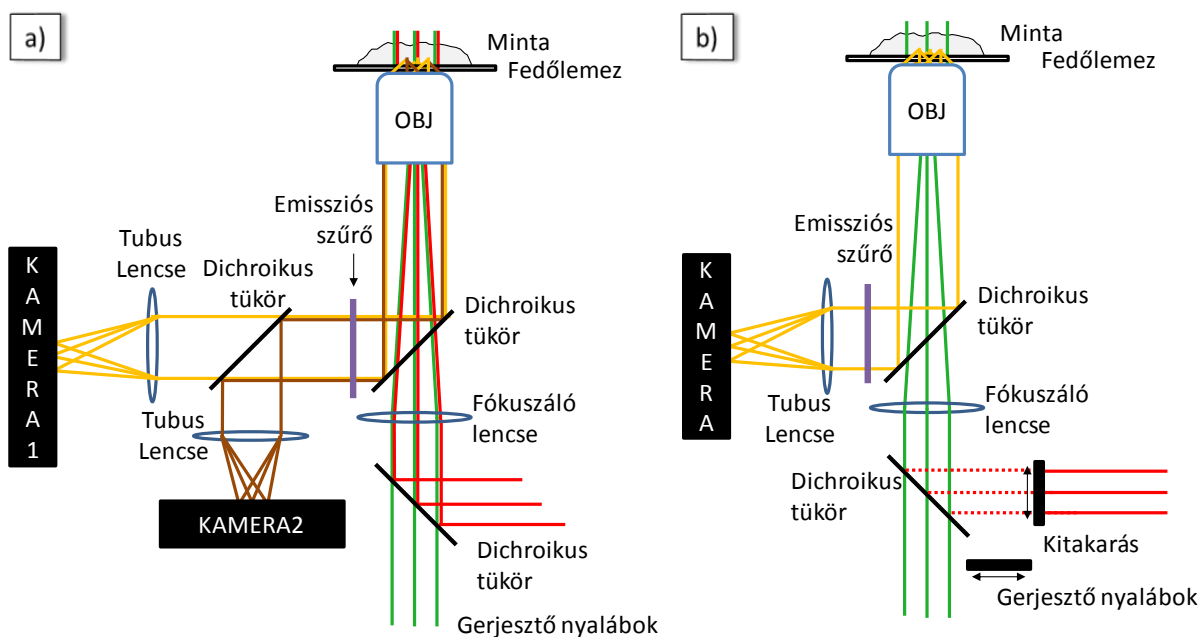
Ha a fedőlemezhez közeli régiót szeretnénk leképezni (23. ábra (a) része), akkor a fókusz síkon kívülről érkező jel csökkentésére a következő lehetőségeink vannak. Ha a ROI a fedőlemeztől ~50-150 nm-es távolságra van (például sejtmembrán leképezése esetén), akkor használhatunk teljes visszaverődést használó kivilágítást (TIRF, Total Internal Reflection Fluorescence microscopy [79]). Ekkor a beérkező nyalábot a hátsó fókusz síkban, egy optikai tengelyen kívüli pontba fókuszáljuk úgy, hogy a fedőlemez-minta határfelületén teljes visszaverődés jöjjön létre. Ekkor egy exponenciálisan, rövid távon (50-150 nm) lecsengő evaneszcens hullám hatol be a mintába, amely egy gerjesztett, kivilágított réteget hoz létre a fedőlemez közvetlen közelében. Ha kicsit mélyebb, de még a fedőlemezhez közel helyezkedik el a ROI (például a sejtmembránon belüli, ahhoz közeli régió), akkor használható a változtatható szögű epifluoreszcens kivilágítás (VAEM, Variable Angle Epifluorescence Microscopy [80]). Ekkor a kritikus szöghöz közel esnek be a sugarak a fedőlemez-minta határfelületére, de nem szenvednek teljes visszaverődést. Eredményképpen egy hegyes szögben teljesen kivilágított ROI-t kapunk. Mélyebben elhelyezkedő ROI esetén (például vastagabb agyi metszet, sejten belüli régió leképezése) a ferdeszögű, rétegszerű kivilágítás (HILO, Highly Inclined and Laminated Optical sheet microscopy [81]) használható a fókusz síkon kívülről

érkező jel csökkentésére (23. ábra (b) része). Ekkor már szükséges az előbb tárgyalt korrekciós forgatás a hátsó fókuszszíkban, mivel a nagy szögek és az objektív leképezési hibái miatt a ROI kivilágítása decentráltá, tökéletlenné válna korrekció nélkül. A fő különbség tehát a VAEM és a HILO kivilágítás között a korrekció, amely a HILO esetében nagyobb szögeket és keskenyebb réteg kivilágítását teszi lehetővé, akár mélyebben elhelyezkedő ROI-k esetén is.

5. Többszínű, leképezésen alapuló mikroszkópai technikák

A fluoreszcens jelölés során használt specifikus kötéseknél köszönhetően lehetőség van a különböző biológiai objektumok, különböző festékekkel történő jelölésére, ami lehetővé teszi, hogy különböző színekben képezzük le azokat. Most röviden áttekintem, hogyan lehet a többszínű leképezést megvalósítani a leképezésen alapuló, fluoreszcens mikroszkópai technikákban, mint amilyen a lokalizációs mikroszkóp is.

Két megközelítés létezik: a (i) szimultán (többcsatornás) és a (ii) szekvenciális (egycsatornás) képkészítés (24. ábra).



24. ábra (a): szimultán (többcsatornás) és (b) szekvenciális (egycsatornás) leképezésen alapuló többszínű mikroszkópai technika

A szimultán, többcsatornás módszer esetén, több hullámhosszon egyszerre történik a gerjesztés és a detektor karban egy dichroikus tükör segítségével választhatóak szét a különböző színű fluoreszcens képek, amelyeket különálló kamerákkal rögzítenek, vagy pedig a képeket egyetlen kamera, különböző területeire irányítják (a FOV mérete emiatt kisebb lehet). Ez a módszer felgyorsítja a mérést, azonban a plusz optikai elemeken fényveszteség vagy aberráció léphet fel (amely befolyásolja a lokalizáció pontosságát), továbbá a spektrális csatornák között áthallás

jelentkezhet. A szekvenciális, egycsatornás rendszerben mindig egy hullámhosszon történik a gerjesztés. A különböző színű képeket egymás után veszik fel. Ekkor a CCD kamera teljes aktív felületét ki lehet használni (nagy FOV). A csatornák közötti áthallást ugyan minimalizálni lehet, de a mérési idő azonban megnövekszik. Ez problémát jelenthet a lokalizációs mikroszkópiában, ahol a véletlenszerű mechanikai elmozdulások (drift) összemérhetőek a feloldással, így hosszabb idejű mérés esetén driftkorrekciót kell alkalmazni.

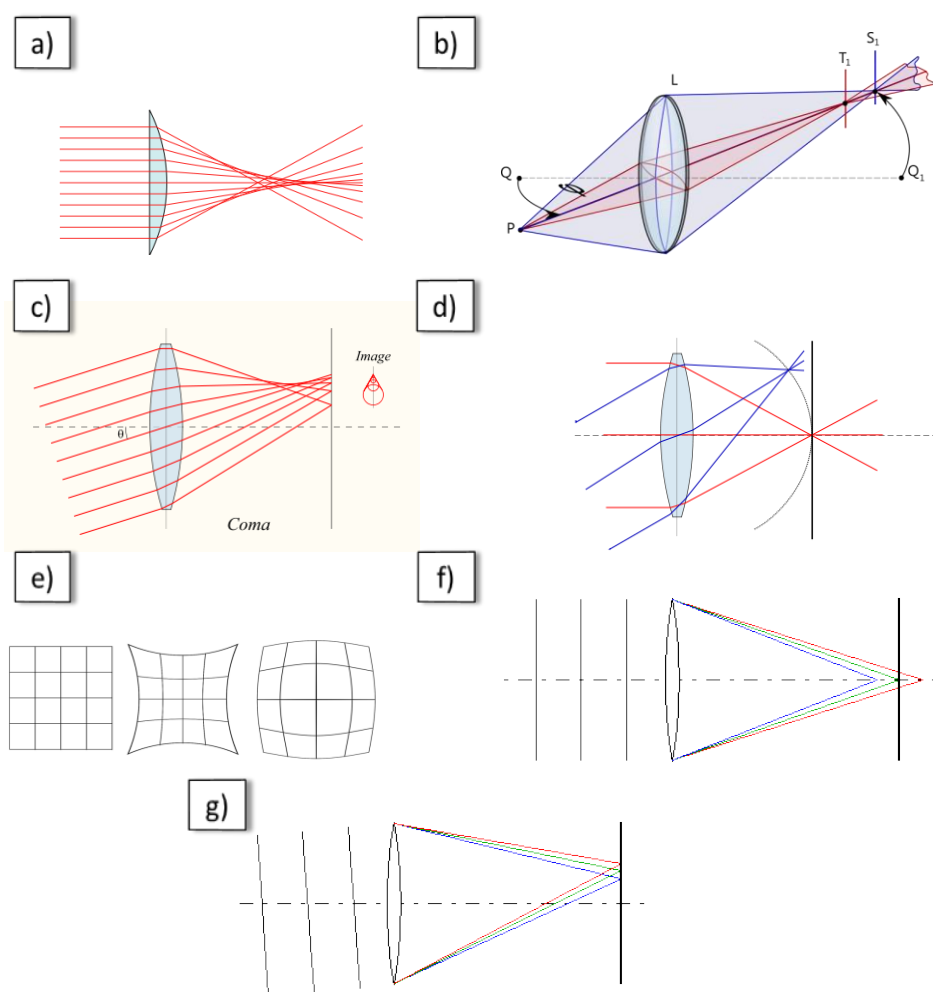
Mindkét esetben rendkívül fontos a különböző színű képek pontos illesztése, regisztrációja, ugyanis a különböző színű képek nem fednek át tökéletesen a fellépő aberrációk miatt, melyek közül a kromatikus hiba döntő szerepet játszik. Az elvárt pontosság a lokalizációs, többszínű mikroszkópiában még nagyobb, a hagyományoshoz képest, a pár tíz nanométeres feloldás miatt. A képek illesztésére szokásos módszer markereket (például arany nanorészecskéket) használni a mintában referenciapontként [82-84]. Ezek a markerek minden hullámhossz csatorna esetén világítanak és pozíciójukat a különböző képeken referenciaként használva, a képek regisztrálhatóak. Pár nanométeres regisztrációs pontosság érhető el ezzel a módszerrel [85]. Azonban használatuk nem mindig praktikus, például élősejtes mérések esetén toxikusságuk miatt, továbbá, ha túl fényes a marker, akkor vagy a fluoreszcens jel veszik el mellette, vagy pedig a kamera pixelai éghetnek ki a túl nagy intenzitás miatt. Egy másik módszer a regisztrációra közvetlenül a minta struktúráját használja, megkeresve azt a képpozíciót, ahol legjobb a korreláció [86]. Ezt azonban nem mindig lehet használni, mivel a korrelációhoz megfelelően strukturált minta szükséges.

6. Leképezési hibák

Az optikai elemeken fellépő leképezési hibák, aberrációk (amelyek fellépnek egy optimalizált optikai elem esetén is) jelentős mértékben befolyásolják a képkészítést. Különösen érzékenyek erre a nagyfeloldású mikroszkópiai technikák, mivel a nagy feloldás legalább ugyanolyan mértékű precizitást kíván (beállítási pontosság, megmunkálási pontosság, stabilitás...). A leképezési hibák szerepet játszanak a ferdeszögű kivilágítások esetén, vagy a PSF alakjában, amely a lokalizáció folyamata során hangsúlyos, illetve a többszínű leképezéseknél is a képek illeszthetőségénél.

Az öt Seidel (harmadrendű) aberráció [87] a szférikus hiba, az asztigmia, a kóma, a Petzval hiba és a torzulás. Több hullámhossz esetén fellép a kromatikus aberráció is. Az egyes hibákat a 25. ábra foglalja össze. Szférikus aberrációval terhelt a leképezés, ha az optikai tengellyel párhuzamosan beérkező sugarak a leképezés után az optikai tengely különböző pontjaiban alkotnak képet, attól függően, hogy az optikai tengelyhez képest milyen távol haladtak. Az asztigmatizmus ferdén beeső nyaláb esetén mutatkozik. Ekkor nem pontszerű a leképezés, a meridián síkban haladó nyalábok máshol metszik egymást (T1), mint a szagittális síkban haladó nyalábok (S1), tehát a két síkban különböző a lencse törőereje. A keletkező két fókuszvonal távolsága az asztigmias távolság.

Fókuszált nyalábba hengerlencsét helyezve szintén asztigmia mutatkozik. A kóma hiba akkor lép fel, ha a főtengelytől távoli, erősen ferde, nagy nyílásszögű nyaláb éri el a lencsét. Ekkor pontszerű kép helyett egy üstökös formájú, elnyúlt kép keletkezik. A Petzval hiba vagy más néven képsík görbület nagy sík tárgy leképezése esetén lép fel. Kiterjedtebb tárgy esetén a kép nem egy síkban keletkezik, hanem egy gömbfelület mentén, mivel a tárgy széléről induló, erősen ferde sugarak fókuszpontja nem ugyanott lesz, mint ahol a tengellyel párhuzamos sugarak fókuszpontja. A torzítás, ellentétben az eddigi hibákkal, nem a kép élességén okoz romlást, hanem a kép tárgyhoz való geometriai viszonyára vonatkozó hiba, amely akkor jön létre, ha a nagyítás nem egyezik meg a kép minden részén. Beszélhetünk párna vagy hordó alakú hibáról. A kromatikus aberráció abból származik, hogy az optikai elemek törésmutatója függ a hullámhossztól. Ennek következtében például a lencse a különböző hullámhosszú nyalábokat különböző helyekre fókuszálja (axiális kromatikus hiba). A kromatikus hiba nem csak a fókustávolságot, hanem a nagyítást is befolyásolja az egyes hullámhosszak esetén (laterális kromatikus hiba). Több hullámhosszú leképezésnél az egyes hullámhosszaknál a fellépő aberrációk mértéke is más lehet.

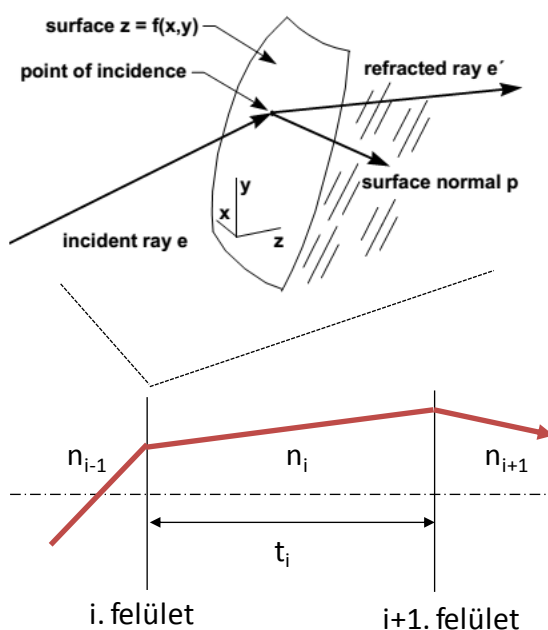


25. ábra: Főbb leképezési hibák: (a) szférikus aberráció, (b) asztigmia, (c) kóma, (d) Petzval hiba, (e) torzulás, (f) axiális és (g) laterális kromatikus aberráció [88, 89]

7. Optikai rendszer szimulációja

Optikai rendszerek modellezésére, mérések szimulációjára széles körben elterjedt módszer a nyalábkövető módszer, amelyet kereskedelmi forgalomban is elérhető szoftverek is alkalmaznak, mint például a Zemax [90] vagy az OSLO [91]. A disszertációmban a számolások során az OSLO szimulációs szoftvert használtam.

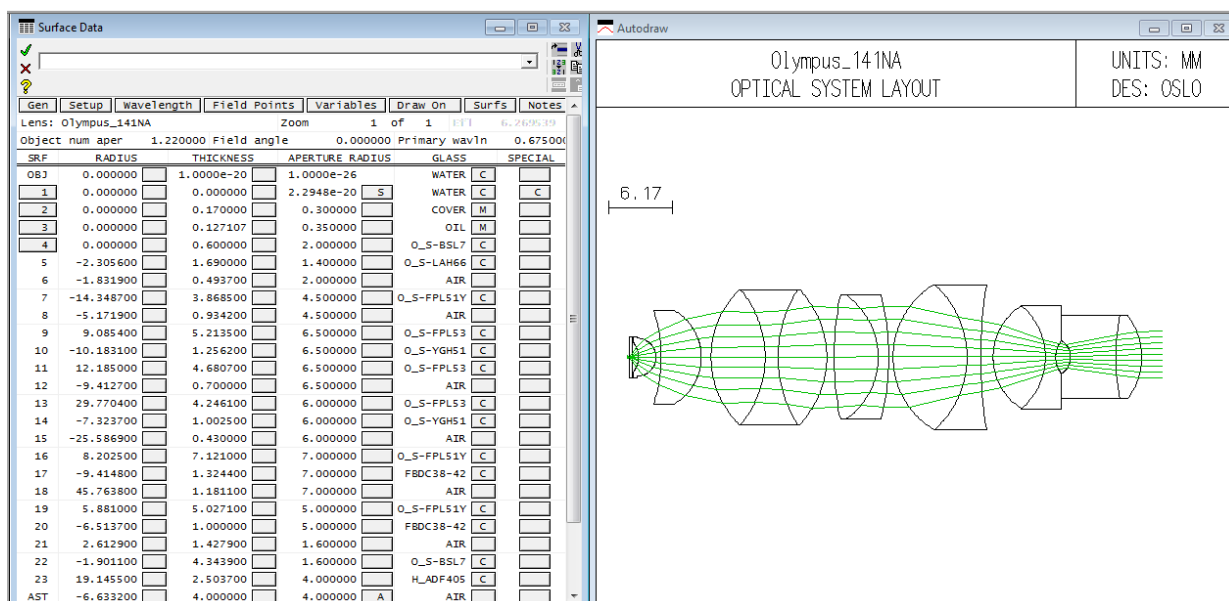
A nyalábkövető módszer lényege, hogy az algoritmus sugárköteget indít az előre definiált tárgy pontjaiból (lehet pontszerű is a tárgy illetve végtelen távoli, ekkor párhuzamos nyalábok érik el a rendszert). Ezek a sugarak az optikai rendszer minden egyes felületén megtörnek, mígnem elérik a képsíkot. Tehát az algoritmus úgy működik, hogy a nyaláb elér egy felületet, ebben a pontban megállapítja a felület normálisát és a Snellius-Descartes törvényt használva kiszámolja a törési szöveget, majd ennek a szögnek az ismeretében kiszámolja, hogy a következő felületet hol és milyen szögben éri el, ahol újfent törést szenved a sugár (26. ábra). Mindezek során a program figyelembe veszi a kitakaró apertúrákat, a rendszer geometriai határait, a definiált visszaverődő felületeket és az esetleges teljes visszaverődést.



26. ábra: A nyalábkövető algoritmus működése [92]

Tehát egy optikai rendszer modelljéhez meg kell adni az optikai elemek anyagát (törésmutatójának megállapításához), a felületek távolságát (sugarak szabad terjedéséhez), a felületek apertúrájának sugarát illetve a görbületi sugarukat (a felületi normálisok kiszámítására). Az elemek anyagát katalógusból is ki lehet választani. Ekkor az Abbé-szám és a diszperziós modell alapján az OSLO automatikusan számolja a törésmutatót a különböző hullámhosszakra. Lehet definiálni egyedi anyagokat is a törésmutató és az Abbé-szám megadásával. Lehetőség van nem csupán

gömbfelületek, hanem cilindrikus, konikus vagy aszférikus felületek definiálására is a megfelelő, felületet leíró polinomok együtthatóinak megadásával. A 27. ábrán egy 1,41 numerikus apertúrájú, olajimmerziós Olympus objektív modellje látható OSLO-ban.



27. ábra: 1,41 numerikus apertúrájú, olajimmerziós Olympus objektív modellje látható OSLO-ban

A felületek pozicionálására is lehetőség van. Kétfajta koordináta rendszert lehet használni: egy lokálist, amely az adott felület síkjában érvényes, origója egy előre meghatározott referenciapont, illetve a globálist, amelyben az összes felület számára egy referenciapont van meghatározva. A következő pozicionálási irányok vannak: decentrálás 3 dimenzióban, forgatás 3 dimenzióban.

Az OSLO tartalmaz beépített rutinokat, amelyek megkönnyítik a használatát és egyszerű módon, grafikus ablakon kaphatunk információt a modellezett rendszerről. Ilyen beépített rutin például a fókusz távolság meghatározása, a PSF számolás vagy az aberráció analízis, amelyeket a disszertációmban is használtam.

Nem csak grafikus felülettel rendelkezik az OSLO, hanem van egy karakteres felülete is, ahol egy speciális, C programnyelvhez közel álló programnyelven (ccl) lehet programozni, saját rutinokat írni, a kiszámolt adatokat elmenteni más programokkal való továbbfelemzéshez vagy ábrázoláshoz (pl. MATLAB). Egy adott felületen a sugarak metszéspontjait kiszámoló és elmentő algoritmus az Appendix 2 részben található.

Célkitűzések

Dolgozatomban a lokalizációs elven működő mikroszkópiában leképezési és képfeldolgozási hibák által okozott effektusok mélyebb vizsgálatát tűzöm ki célul, hogy a technika mélyebb megértéséhez hozzájáruljak. Különböző effektusokat fogok vizsgálni a lokalizációs mikroszkóp teljes képalkotása során: a mikroszkóp kivilágításában, többszínű leképezésében és a képrekonstrukció során. Korrekciós metódusokat is kidolgozok.

1. A mikroszkóp kivilágításánál hagyományosnak tekinthető az epifluoreszcens technika. Ekkor a teljes ROI ki van világítva és a fókuszsíkon kívülről érkező fluoreszcens jel jelentős. A kutatók olyan ferdeszögű kivilágítási metódusokat fejlesztettek ki, amelyek ezt a fajta háttérrel hatékonyan csökkentik. Ezek a kivilágítások egyre nagyobb népszerűségnek örvendenek, de mélyreható, a lokalizációs mikroszkópiához szükséges precizitás szintjén történő elemzésük ez idáig nem történt meg. Az optikai rendszerekben elkerülhetetlen leképezési hibák jelentősen befolyásolják a különböző kivilágítások megvalósítását. Egy olyan elemzés, amely konkrét, modellezett optikai rendszerben elvégzett számolásokon alapul, a kivilágítási technikák megvalósítása, a mikroszkóprendszer építése során segítségül szolgál. A megállapított trendek segítik a leképezés során a kivilágítás szerepének megértését. **Ezek alapján elsőként egy ilyen, a különböző kivilágítási technikák mélyreható, nyalábkövetésen alapuló elemzését tűzöm ki célul. [93]**
2. Nem csak a kivilágítás során, hanem a mikroszkóp detektáló nyalábútjában elhelyezkedő optikai elemek is jelentős aberrációt vezethetnek be, melyek rontják az elkészült kép minőségét. A lokalizációs mikroszkópiában a többszínű detektálás hatékony módszer különböző biológiai objektumok feltérképezésére a specifikus fluoreszcens jelölésnek köszönhetően. A többszínű detektálás esetén kulcskérdés a különböző hullámhosszakhoz tartozó rekonstruált képek összeillesztése, regisztrálása. Az optikai elemek diszperziója miatt azonban kromatikus hiba lép fel a leképezés során. A gyártók megpróbálják ezt korrigálni, kiküszöbölni. Így a hagyományos fluoreszcens mikroszkópok esetében a kromatikus hiba hatása nem jelentős. Azonban a lokalizációs mikroszkópiában a feloldás a pár tíz nanométeres tartományba esik és a gyártók által optimalizált optikai elemek (elsősorban mikroszkóp objektívek, szűrők) esetén a hiba érezteti hatását a feloldáshoz képest. Ezért szükséges a hiba eredetét felderíteni, mértékét megállapítani és egy kalibrációs metódust kidolgozni a korrigáláshoz. **Ezért második célkitűzésként a kromatikus hiba részletes analízisének elvégzését és egy korrekciós módszer kidolgozását tűzöm ki. [94]**

3. Az elkészült kép minőségét nem csak az optikai elemek által bevezetett aberrációk, hanem a lokalizációs mikroszkópiában kulcsszerepet játszó lokalizációt végző rekonstrukciós algoritmusok is befolyásolják. A képkészítés paraméterei, mint például a pixelméret vagy a képkészítési frekvencia szintén kritikus paraméterek, amelyek optimalizálásra szorulnak. Ehhez szükség van egy olyan szimulációs szoftvercsomagra, amely modellezi a teljes képkészítést a lokalizációs mikroszkópiában. Legenerálja a minta geometriája alapján a fluoreszcens festékmolekulák koordinátáit és modellezi időbeli viselkedésüket. A leképező rendszer paramétereit figyelembe véve elkészíti a szimulált képcsomagot, amely bármilyen elérhető lokalizációs rekonstrukciós algoritmus bemeneteként szolgál. **Harmadik pontként egy ilyen tesztminta generáló, szimulációs szoftver elkészítését tűzöm ki célul. [95]**
4. A rekonstruált képen a lokalizációs, rekonstrukciós algoritmus tökéletlensége okán képrekonstrukciós hibák, artifaktumok jelennek meg. Ezek az artifaktumok nagyban függenek a minta geometriájától és festési paramétereitől (festési sűrűség), illetve a leképező rendszer paramétereitől. Megjelenésük legfőbb oka, hogy az átfedő molekulaképek esetén a lokalizáció pontatlan és hamis molekulapozíciókat állapít meg a lokalizációs algoritmus. Az optimalizálási folyamat célja, hogy olyan paramétereket állapítson meg, amelyek mellett a molekulaképek átfedési valószínűsége alacsony. **Negyedik célkitűzésem, hogy a TestSTORM program segítségével különböző geometriájú minták esetén lehetséges artifaktumok elemzését elvégezzem. [95]**

Az egyes pontokban tett célkitűzéseimhez tartozó eredmények ismertetése után a konklúziókban fogom megfogalmazni tézispontjaimat. A tézispontok ismertetése után mindegyikhez továbblépési irányokat, továbbfejlesztési lehetőségeket vázolok fel röviden.

Eredmények

1. Kivilágítási technikák vizsgálata nyalábkövető algoritmussal

Az optikai leképezésen alapuló mikroszkópiai technikák esetén a ferdeszögű kivilágítás egy hatékony kivilágítási módszer a fókuszsíkon kívüli gerjesztésből eredő háttér csökkentésére és ezen keresztül a jel/zaj viszony javítására. Hagyományos nyalábkövetéses módszerrel vizsgáltam a kivilágítás különböző paramétereit és megvalósítását OSLO optikai szimulációs program segítségével. Külön figyelmet fordítottam a lokalizációs mikroszkópiában fellépő problémák tanulmányozására. Az adatok feldolgozását MALAB környezetben végeztem. A számolások során 4f rendszereket tartalmazó elrendezést modelleztem, amelyben a konjugált síkokba tükröket helyeztem el azért, hogy a megfelelő forgatásokat és eltolásokat a fókuszsíkon el tudjam érni. Ahhoz, hogy egy objektívet tartalmazó rendszert nyalábkövető algoritmussal vizsgálni tudjunk, szükséges ismerni az objektív lencserendszerének pontos adatait: az egyes lencsék anyagát (törésmutatóját), a lencsék görbületi sugarait, a felületek távolságát. Ezek az információk általában bizalmasak és a gyártók nem bocsájtják rendelkezésre a konkrét objektív adatait. Ha az objektív szabadalmaztatva van, akkor a szabadalmában ezek az adatok elérhetőek, így a számolások során egy, az Olympus által gyártott, nagy numerikus apertúrájú (1,41), százszoros nagyítású olaj immerziós objektív szabadalmából származó adatait használtam [96]. A megállapított trendek az egyes objektívek között szignifikánsan nem változnak, azonban a pontos számértékekben kis eltérés mutatkozhat. A mintát vizes közegnek feltételeztem, melynek törésmutatója jó közelítéssel megegyezik a víz törésmutatójával (1,33) [97]. A fedőlemezt BK7 üvegnek feltételeztem, amelynek törésmutatója 1,51).

A szimulációk során minden esetben 647 nm-es gerjesztő fényt feltételeztem. Ez a hullámhossz a biológiai alkalmazásoknál gyakran használt Alexa Fluor 647 festék gerjesztő hullámhossza [98].

A szimulációkban a ROI méretei a következők voltak: $20,48 \mu\text{m} \times 20,48 \mu\text{m} \times 0,67 \mu\text{m}$. Laterális méreteit a következőképpen kaptam: Feltételeztem, hogy a FOV egy $16 \mu\text{m}$ pixelmérettel rendelkező kamerán egy $128 \text{ pixel} \times 128 \text{ pixel}$ nagyságú terület. Ezek az értékek tipikusak a lokalizációs mikroszkópiai technikában. Figyelembe véve a nagyítást ($100\times$), megkapható a ROI laterális mérete:

$$\frac{128 \text{ pixel} \times 16 \mu\text{m}}{100} = 20,48 \mu\text{m} \quad (6)$$

Az axiális irányban a ROI méreteit a DOF határozza meg, esetünkben:

$$\frac{2\lambda}{NA^2} = 0,67 \mu\text{m} \quad (7)$$

aminek megállapítása során a hullámhosszat ~668 nm-nek feltételeztem, amely az igen elterjedt Alexa Fluor 647 festék emissziós spektrumának csúcsa.

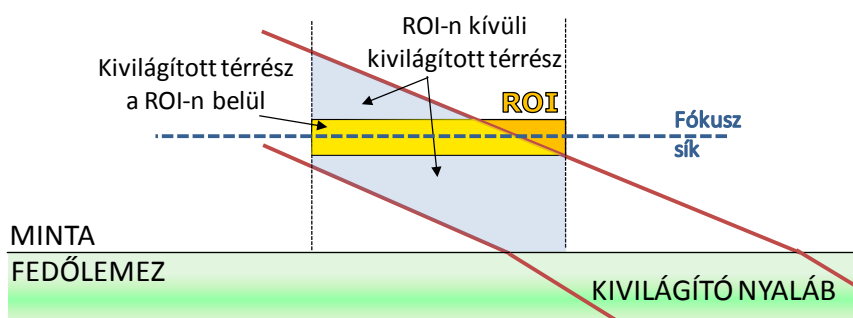
A Tudományos előzmények 4. fejezetben bemutatott kivilágítások (TIRF, VAEM, HILO) egzakt jellemzésére két mennyiséget vezettem be: ILL_{ROI} és ILL_{OUT} . Az ILL_{ROI} jellemzi, hogy a ROI mekkora része van kivilágítva a belépő nyaláb által (8):

$$ILL_{ROI} = \frac{\text{kivilágított térrész a ROI-n belül}}{\text{ROI mérete}} \quad (8)$$

Az ILL_{OUT} mennyiség megmutatja, hogy mekkora térfogatrész van kivilágítva a ROI-n kívül, a ROI méretéhez képest (9):

$$ILL_{OUT} = \frac{\text{ROI-n kívüli kivilágított térrész}}{\text{ROI mérete}} \quad (9)$$

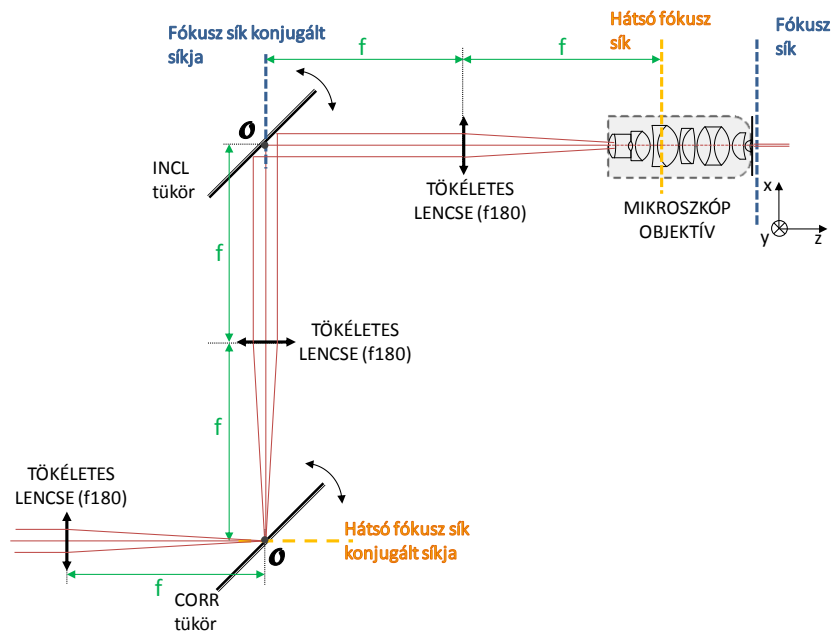
A két mennyiség jelentését a 28. ábra szemlélteti.



28. ábra: ILL_{ROI} és ILL_{OUT} mennyiség szemléltetése ferdeszögű kivilágítás esetén

Ideális esetben az ILL_{ROI} értéke 1 és az ILL_{OUT} mennyiség pedig 0. Tehát csak a ROI térrészt tartalmazó réteg van kivilágítva. Ilyen megvilágítás TIRF módban érhető el. Ekkor az exponenciálisan lecsengő gerjesztő hullámnak köszönhetően mélységben nincs ROI-n kívüli jel.

A modellezett rendszer sematikus ábrája a konjugált síkokban elhelyezett tükrökkel a 29. ábrán látható. Két, egymásba épített 4f rendszert tartalmaz, a megfelelő síkokban elhelyezett forgatható tükrökkel. Az egyik 4f rendszer a fókuszsíkhhoz tartozik (kék felirat), a másik a hátsó fókuszsíkhhoz (narancssárga felirat).



29. ábra: Modellezett rendszer a konjugált síkokban elhelyezett tükrökkel

A számolásokhoz tökéletes lencsét használtam, amelyeknek fókusztávolsága 180 mm volt (mivel minden végtelenre korrigált Olympus objektívhez tartozó tubuslencse fókusztávolsága 180 mm kell legyen ahhoz, hogy a nagyítás az objektívhez megadott érték legyen). Az egymásba épített 4f rendszerek nagyítása $1\times$, így az egész rendszer nagyítása (kicsinyítése) $-100\times$. A konjugált síkokban elhelyezett tükrök tökéletesek, forgatásuk ideális. Forgáspontjuk a felületük centrumában van (29. ábrán O ponttal jelölve). Megjegyzendő, hogy nem minden forgalomban kapható, dönthető tükrőtartó képes ilyen forgatást bevezetni, csak a Gimbal típusúak [99]. Az objektív fókuszsíkjának konjugált síkjában elhelyezett tükrőre a következőkben INCL tükröként fogok hivatkozni és a kezdeti (45° -os) álláshoz képest vett elforgatást INCL szögnek fogom hívni. Ez a tükrő vezeti be az objektív fókuszsíkjában a kivilágító nyaláb döntését. A másik tükrőt CORR tükrőnek fogom nevezni, amely az objektív hátsó fókuszának konjugált síkjában helyezkedik el és forgatása (amelynek szöge a CORR szög) a fókuszsíkban a kivilágító nyaláb eltolását eredményezi. Az elnevezések és a későbbiekben használt koordináta rendszer tengelyeinek irányai megtalálhatóak a 29. ábrán.

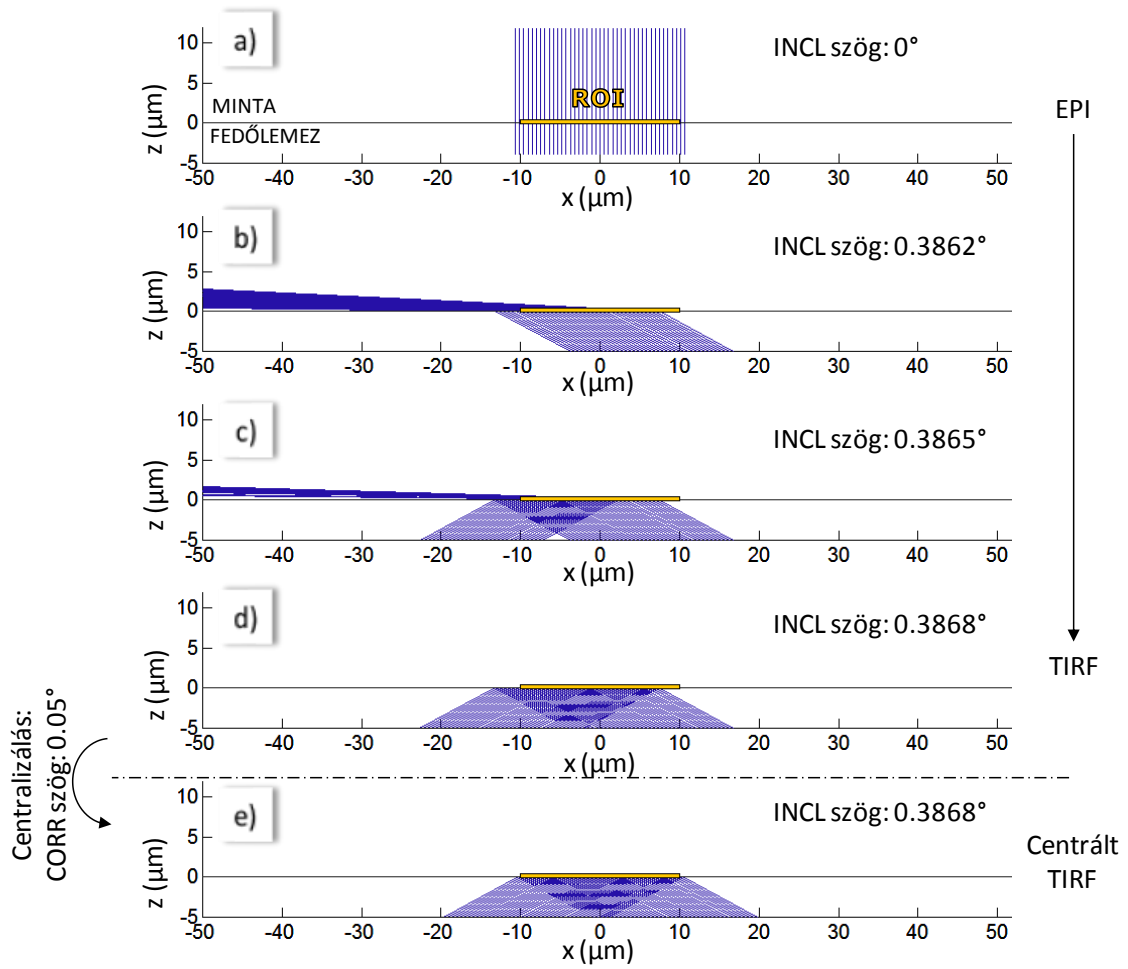
A szimulációk során feltételeztem, hogy a kivilágítás homogén, tehát a kezdeti EPI kivilágítás a ROI-t homogén módon világítja meg. A valóságban a beérkező nyaláb intenzitás eloszlása általában nem homogén, hanem Gauss-os (a TEM(0,0) módus használatának következtében). Homogén kivilágítást például a beérkező nyaláb intenzitását manipuláló maszkok segítségével lehet elérni, vagy a ROI laterális méreteihez képest lényegesen nagyobb átmérőjű kivilágító nyaláb használatával. Ekkor a Gauss eloszlás középső, relatíve homogén tartománya lesz használva a ROI kivilágítására. Ez nem minden esetben kivitelezhető, például olyan fényforrás használata esetén, aminek teljesítménye kicsi. Ekkor a nyalábot kitágítva a bejövő intenzitás jó része nem a ROI-ba

esik és előfordulhat, hogy a gerjesztés intenzitása a ROI-ban pedig nem elég nagy. Nem homogén kivilágítás esetén a kép torzulhat, minősége romolhat: ha nem egyenletesen van gerjesztve a minta, akkor a magasabb gerjesztési intenzitású részek (képtér közepe) hamarabb kiéghetnek, míg az alacsonyabb gerjesztési intenzitású részekből (képtér széle) nem érkezik kellő nagyságú jel. Lokalizációs mikroszkóp esetén a festékmolekulák dinamikai paraméterei (állapotok élettartama) intenzitásfüggőek, tehát nem homogén gerjesztés esetén a minta egyes részei nem optimális paraméterek mellett vannak leképezve, ami rontja a végső rekonstruált kép képminőségét.

1.1 Minta mozgatásával megvalósított különböző mélységű kivilágítások

Minta mozgatásával megvalósított különböző mélységű kivilágítások esetén az optikai rendszer statikus, a tükrök forgatásán kívül az optikai elemek nem mozdulnak el. A leképezendő fókuszsíkot a mintában a minta és így a fedőlemez mozgatásával lehet beállítani. Ez tulajdonképpen azt jelenti, hogy az olajréteg vastagsága változik, miközben a fedőlemez és a minta közelebb vagy távolabb kerül az objektívtől. Ez az eset azt a mintapozicionálást modellezi, amikor a mikroszkópban elhelyezett minta z irányú pozícióját olyan mintatartó segítségével állítjuk be, amelyben található például egy nagy precizitású z irányú piezó eltoló.

Először azt az esetet tekintetem, amikor a leképezendő sík a mintában 50 nm-re helyezkedik el a fedőlemeztől. Ilyen távolság esetén a TIRF kivilágítás a tipikus választás a fókuszsíkon kívüli jel csökkentésére a hagyományos EPI kivilágítás helyett. Ilyen mélységbe eljut az evanescens hullám és a minta egy vékony rétegét gerjeszti. Megvizsgáltam az EPI-TIRF kivilágítások közötti átmenetet. Ezt az INCL tükör mozgatásával és így a hátsó fókusz síkban bevezetett transzlációval lehet elérni. Az INCL szöget 0° (EPI) és $0,3868^\circ$ (TIRF) között változtattam (30. ábra a-d).

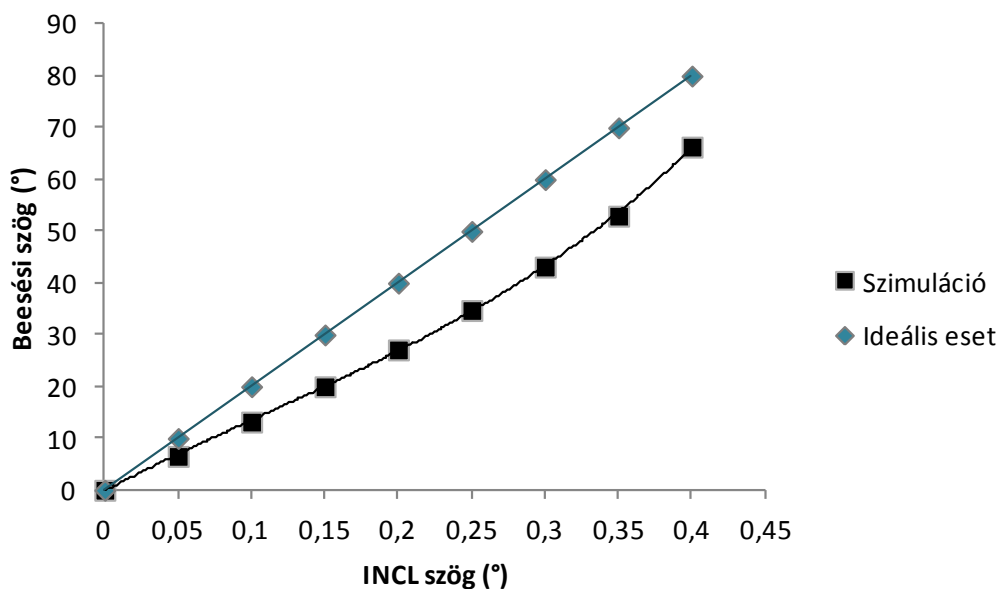


30. ábra (a)-(d): EPI-TIRF kivilágítás közötti átmenet INCL tükör forgatásával megvalósítva, (e) CORR tükör forgatásával centralizált TIRF kivilágítás

Ahogy az ábrán is látható az átmenet során az INCL tükör forgatásával a kezdetben tökéletesen kollimált nyaláb enyhén divergenssé válik. Ennek az az oka, hogy a sugarak az objektív lencserendszerében az optikai tengelytől meglehetősen távol eső, azzal nagy szöget bezáró optikai utakat tesznek meg és a valóságban nem tökéletes lencseként viselkedő objektív leképezési hibái szignifikánsan megjelennek. Az enyhe divergenciát jelzi az is, hogy az átmenet teljes reflexióba nem pillanatszerűen következik be, hanem fokozatos. Ideális esetben a tökéletesen kollimált nyaláb minden sugara egyszerre érne el a kritikus szöget a fedőlemez és a minta határán. Valójában azonban ez az átmenet $\sim 0,3862^\circ$ INCL szögnél kezdődik és $0,3868^\circ$ -ig tart. Az egyes sugarak beesési szöge a fedőlemez-minta határfelületen nem azonos a divergenssé váló nyalábban. Geometria optikai megfontolások alapján meghatározható a kritikus szöghöz tartozó INCL szög. A Snellius-Descartes törvény alapján számolt kritikus beesési szög $\theta_c = 61,73^\circ$. A nagyítást figyelembe véve, ami esetünkben $100\times$, illetve a tükörforgatásnál az eltéréstől fellépő $2\times$ faktort, akkor az elméleti kritikus szöghöz tartozó INCL szög:

$$\frac{\theta_c}{2 \times \text{Nagyítás}} = 0,3087^\circ \quad (10)$$

Ez az érték eltér a szimuláció sorozatban megállapított $0,3868^\circ$ -tól. Ennek az oka szintén az objektív tökéletlensége, vagyis, hogy a forgatás ilyen nagy nagyítás esetén nem tökéletes. A 31. ábra mutatja az összefüggést az INCL szög és a fedőlemez-minta határon a beesési szög között. Már kis szögértékek esetén sem követi az ideális esetet, amelyet a nagyítást és a tükörforgatás miatti $2\times$ faktort figyelembe véve állapítottam meg.



31. ábra: A fedőlemez-minta határon a beesési szög értékének függése az INCL szögtől

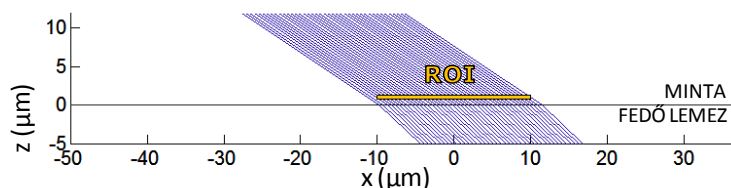
Az INCL szögtartomány, amely alatt az egész nyaláb eléri a teljes visszaverődést $6\times 10^{-4}^\circ$. Egy kereskedelmi forgalomban kapható dönthető tükörtartó tipikus érzékenysége $\sim 6\text{-}10\times 10^{-4}^\circ$ [99], tehát a TIRF kivilágítás elérése közben elképzelhető, hogy az átmeneti tartományba lesz állítva az INCL tükör és nem lesz tökéletes a TIRF kivilágítás, hanem maradnak olyan sugarak, amelyek bejutnak a minta mélyebb rétegeibe, amelyek növelhetik a háttérjelet.

A nem tökéletes nyalábforgatás következménye az is, hogy a kivilágított régió a fókuszsíkból laterális irányban decentrált lesz. Ez azt eredményezi, hogy a ROI nem lesz tökéletesen kivilágítva, mint ahogy az látható a 30. ábra (d) részén. A ROI laterális méreteihez képest nagy átmérőjű nyaláb esetén ez nem túl kritikus, de ahogy azt már korábban említettem, ilyen nyaláb használata nem minden esetben kivitelezhető. A laterális irányban elmozdult, kivilágított régiót a CORR tükör forgatásával lehet újra centrálni. A CORR tükör forgatása a hátsó fókusz sík konjugált síkjában, a fókusz síkban translációt idéz elő. A 30. ábra (e) részén látható, hogy $0,05^\circ$ CORR szög esetén a ROI újra centráltnak van kivilágítva.

A következő esetben, a mintában egy $1\text{ }\mu\text{m}$ mélyen levő réteg lehetséges kivilágítási módjait vizsgáltam meg. Ebben az esetben a TIRF kivilágítás már nem használható, mivel az evanescens

hullám már nem éri el ezt a tartományt. Természetesen ilyen mélységben is használható a hagyományos EPI kivilágítás. A fókuszon kívüli jel csökkentésére javasolt a VAEM vagy a HILO kivilágítás. A VAEM kivilágításnál az INCL tükör forgatásával hozzuk létre a ROI ferde kivilágítását. A cél, hogy minél élesebb szögből legyen megvilágítva a minta és így minél keskenyebb réteg legyen kivilágítva. A modellezett rendszerben megvalósított VAEM kivilágítás látható a 32. ábrán.

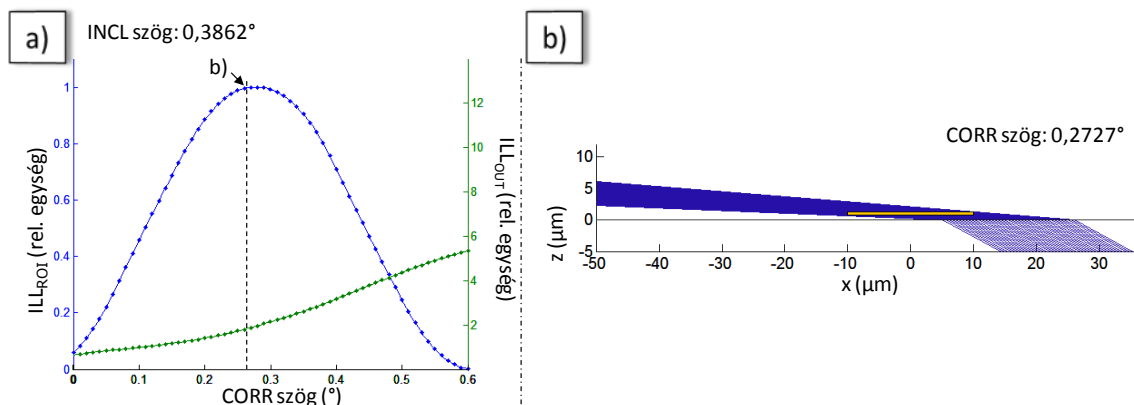
Fókusz sík: $1\ \mu\text{m}$, INCL szög: 0.32205°



32. ábra: VAEM kivilágítás a mintában $1\ \mu\text{m}$ mélyen található rétegben

A maximálisan megengedhető INCL szög $0,32205^\circ$. Ekkor a ROI még teljes mértékben ki van világítva és a háttér a lehető legkisebb. A korábban bevezetett mennyiségek ebben az esetben: ILL_{ROI} értéke 1 és az ILL_{OUT} pedig 14,384. Ezen szög felett a ROI már nem lesz teljesen kivilágítva.

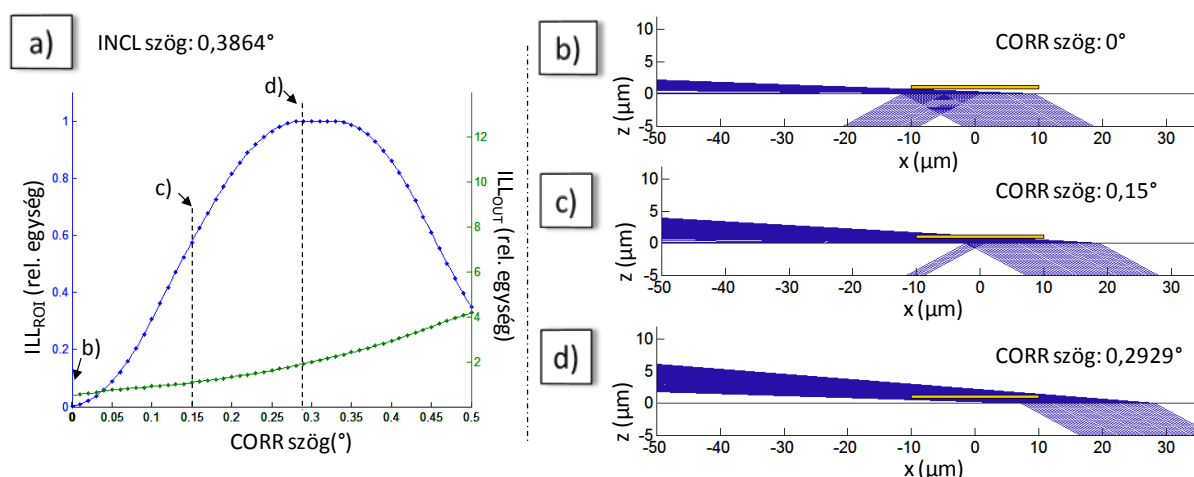
Nagyobb fókuszon kívüli jelcsökkentést kínál a HILO kivilágítás, ugyanis a CORR tükör forgatásával megvalósított korrekció nagyobb INCL szögeket és így élesebb szögből történő kivilágítást is megenged, mint a VAEM kivilágítás. A CORR tükör forgatásával tartható a ROI centrált, tökéletes kivilágítása. Az adott INCL szöghöz (a következőkben vizsgált esetben: $0,3862^\circ$) tartozó CORR szög megállapításához egy kalibrációs folyamatot végeztem el: az ILL_{ROI} és ILL_{OUT} értékeket figyelembe véve változtattam adott INCL szög mellett a CORR szöget (33. ábra (a) része). Spline görbe illesztés után azt a CORR szögértéket fogadtam el optimálisnak, ahol az ILL_{ROI} értéke maximális (=1) és az ILL_{OUT} értéke pedig a lehető legkisebb. A megállapított optimális CORR szög $0,2727^\circ$ ebben az esetben.



33. ábra (a): Kalibrációs görbék az optimális CORR szög megállapításához, (b): optimális CORR szög esetén megvalósított HILO kivilágítás

Az optimális CORR szögnél megvalósított kivilágítás a 33. ábra (b) részén látható.

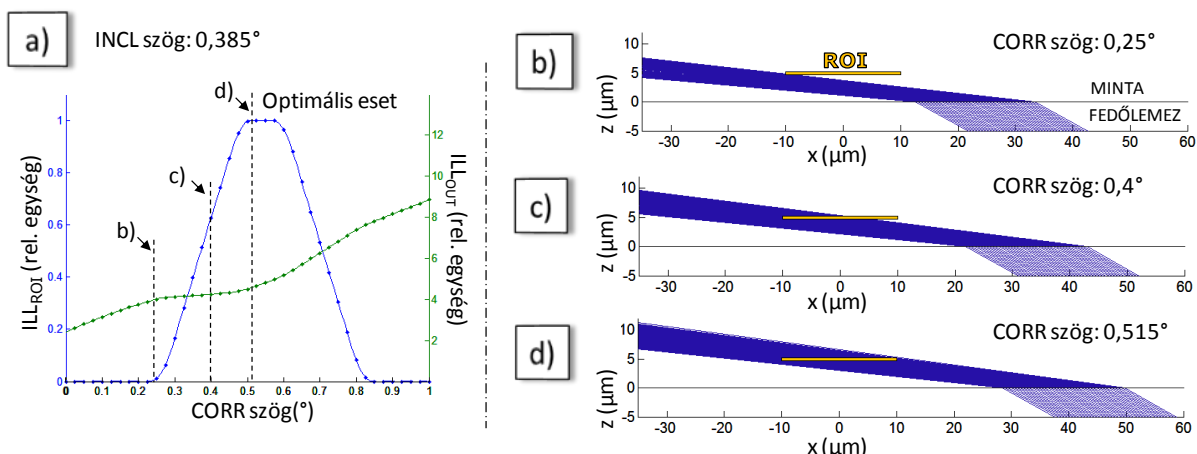
Nagyobb INCL szöget választva, az előbbieken említett TIRF átmenet már elkezdődik, azonban a CORR tükör forgatásával a korrekció mellett a teljes visszaverődést szenvedett sugarak újra törést fognak elszenvedni, mint ahogy ez látható a 34. ábrán. Ez annak a következménye, hogy a CORR tükör valójában nem csak tisztán transzlációt vezet be a fókusz síkban, hanem némi elfordulást is. Ennek köszönhetően kis mértékben változik a beérkező sugarak beesési szöge és így előfordulhat, hogy a kezdetben kritikus szög felett beérkező nyalábok újra a kritikus szög alá kerülnek és törést fognak elszenvedni a fedőlemez-minta határán.



34. ábra (a): Kalibrációs görbék az optimális CORR szög megállapításához 0,3864° INCL szög mellett, (b)-(d): különböző CORR szögértékek esetén megvalósított HILO kivilágítás

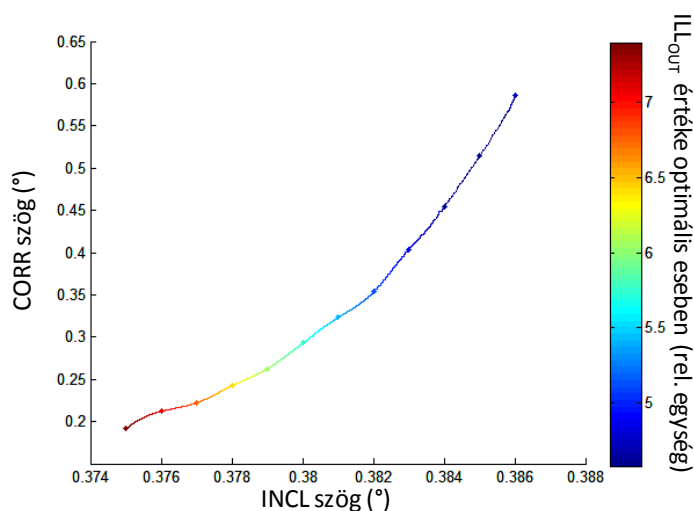
A 34. ábra (a) részén látható a 0,3864° INCL szög mellett elvégzett kalibrációs folyamat eredménye, amit az előbbi esetben is elvégeztem az optimális CORR szög megtalálására. Az ábra (b)-(d) részben a különböző CORR szögértékek mellett megvalósított HILO kivilágítások láthatóak. Látható a folyamat, amely során a sugarak visszatérnek a teljes visszaverődésből és az optimális CORR szögértéknél (0,2929°) már minden sugár törést szenved és a mintába jut.

Utoljára egy, a mintában 5 μm mélyen elhelyezkedő réteg lehetséges kivilágítását vizsgáltam. Ebben az esetben a VAEM kivilágítás csak kis mértékben csökkenti a fókusz síkon kívüli jel erősségét a hagyományos EPI kivilágításhoz képest. Ennek az az oka, hogy a tökéletlen nyalábforgatás miatt a decentralizáció az INCL szög növelésével hamar szignifikánssá válik és a ROI kivilágítása nem lesz tökéletes. Feltétlenül szükséges a HILO kivilágítás által kínált korrekció. 0,385° INCL szög mellett végeztem el a kalibrációs módszert az optimális CORR szög értékére, amelynek eredménye a 35. ábrán látható.



35. ábra (a): Kalibrációs görbék az optimális CORR szög megállapításához 0,385° INCL szög mellett, (b)-(d): különböző CORR szögtértek esetén megvalósított HILO kivilágítás

A CORR tükör forgatásának hatása látható a 35. ábra (b)-(d) részén. Az optimális eset 0,515° CORR szögtértnél található. A fókuszszíkon kívüli jel értéke tovább csökkenthető nagyobb INCL szögtértek esetén. Ekkor a szükséges CORR szögtérték is növekszik. A fentebb leírt kalibrációs folyamatot különböző INCL szögtértekre elvégezve spline görbe illesztéssel egy olyan kalibrációs görbe kapható, amely adott INCL szöghöz hozzárendeli a megfelelő optimális esethez tartozó CORR szöget. A 36. ábrán látható ez a kalibrációs görbe, színkóddal ábrázolva az egyes esetekhez tartozó ILL_{OUT} értékeket. Az ILL_{ROI} mindvégig maximális (=1) volt.



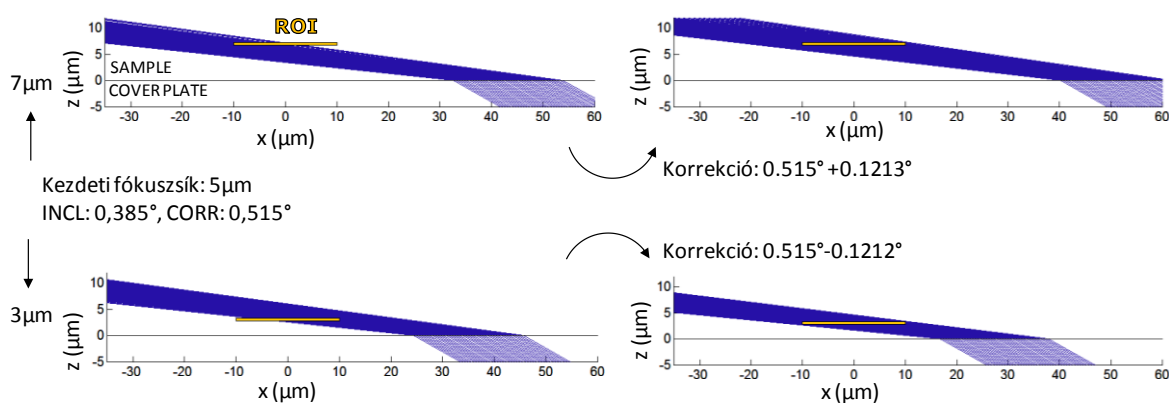
36. ábra: Kalibrációs görbe az optimális CORR szög megállapításához különböző INCL szög mellett figyelembe véve az ILL_{OUT} értékeket

Látható, hogy nagyobb INCL szögek esetén egyre nagyobb CORR szögeket kell alkalmazni, az ILL_{OUT} értéke egy darabig csökken, majd stagnáló jelleget mutat. 0,386° INCL szög felett a CORR tükör forgatásának hatására sem térnek vissza a nyalábok a teljes visszaverődésből és a ROI nem lesz teljes mértékben kivilágítva.

1.2 Objektív mozgásával megvalósított különböző mélységű kivilágítások

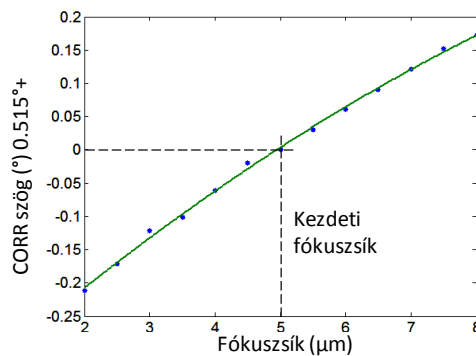
Ebben a fejezetben azt az esetet modelleztem, amikor a minta pozíciója állandó, a fókuszszík pozicionálása az objektív mozgásával valósítható meg. Ez a valóságban akkor fordul elő, amikor nem áll rendelkezésre olyan mintatartó eszköz, amelyben található z -irányú pozicionálási lehetőség. Ekkor a mikroszkóp testében elhelyezkedő objektív mozgásával végezhető el a fókuszszík z irányú beállítása. Az objektívet elmozdítva kezdeti pozíciójából, a nyalábot az objektív hátsó fókuszszíkjába fókuszáló lencse fókuszszíkjára és az objektív hátsó fókuszszíkjára már nem fog egy síkba esni és így a 4f rendszer szétesik. Ha a kezdeti mélységhez képest más mélységekben is szeretnénk képet készíteni, akkor a fókuszszíkok szétválása miatt korrekciókat kell bevezetni.

Vizsgáltam azt az esetet, amikor a kezdeti fókuszszík $5\text{ }\mu\text{m}$ mélyen helyezkedik el a mintában. Az alkalmazott INCL szög $0,385^\circ$. Az előzőekben ehhez a szöghöz megállapított, optimális esethez tartozó CORR szög: $0,515^\circ$. Az objektívet úgy mozdítottam ki kezdeti helyéről, hogy a fókuszszíkjára 3 majd $7\text{ }\mu\text{m}$ mélyre kerüljön a mintában. Ennek következtében a kezdetben optimális kivilágítás már nem világítja ki tökéletesen a ROI-t (37. ábra első oszlopa). Korrekcióra van szükség, amelyet a CORR tükör újabb, további forgatásával lehet elvégezni, amely újra centrálja a ROI kivilágítását azáltal, hogy a fókuszszíkokban transzlációt vezet be. A megfelelő korrekciós szög meghatározásához a korábbiakhoz hasonlatos kalibrációt végeztem. 3 és $7\text{ }\mu\text{m}$ mélyen elhelyezkedő ROI-hoz $-0,1212^\circ$ és $+0,1213^\circ$ -os további CORR tükörforgatás szükséges. A korrigált kivilágítás a 37. ábra második oszlopában látható.



37. ábra: 3 és $7\text{ }\mu\text{m}$ mélyen elhelyezkedő ROI HILO kivilágítása és a szükséges korrekció hatása

Különböző mélységű síkokra elvégezve a kalibrációt, kapható egy olyan kalibrációs görbe, amely megmutatja, hogy mekkora további CORR tükörforgatás szükséges az optimális kivilágítás újbóli eléréséhez. Ennek a számolásnak az eredménye látható a 38. ábrán.



38. ábra: Különböző mélységekben elhelyezkedő fókuszszíkok esetén szükséges korrekció nagysága a CORR szögben

Ebben a fejezetben bemutatott eredmények fontos szerepet játszanak egy mikroszkóprendszer kivilágítási módjainak tervezésében és építésében (például a megfelelő érzékenyséű dönthető tükrortató kiválasztásában vagy a szükséges kalibrációk nagyságrendjének megállapításában) illetve a fellépő jelenségek értelmezésében (például a képminőség csökkentésének értelmezésében és okainak megkeresésében).

2. A kromatikus hiba és korrekciója többszínű lokalizációs elven működő mikroszkóp képészítése során

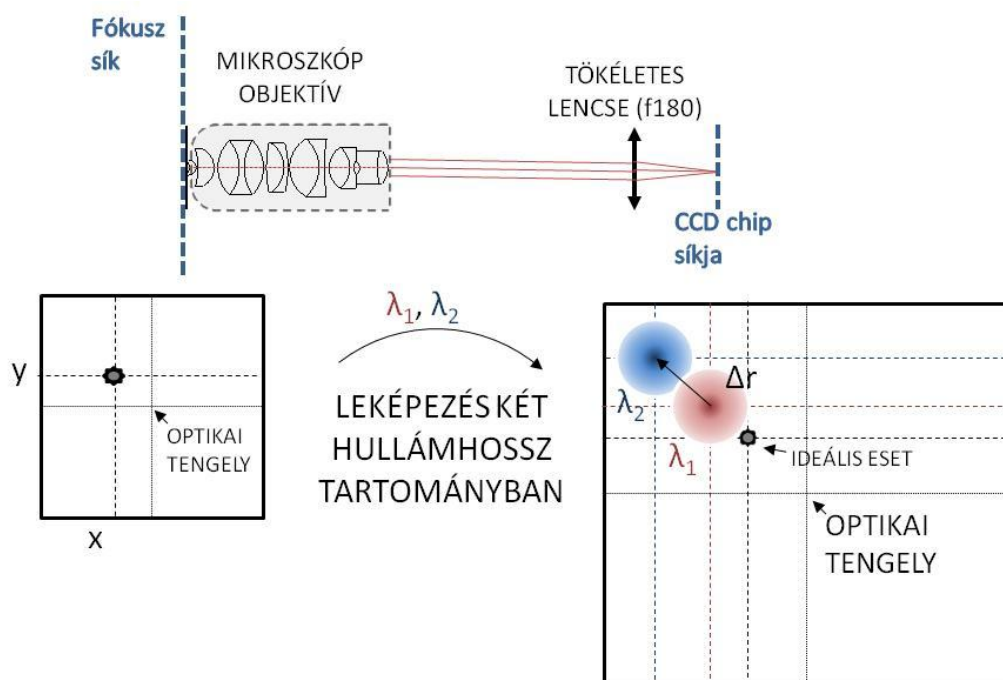
A többszínű mikroszkópia lehetővé teszi, hogy ugyanazon mintában, a minta különböző összetevőiről (pl. különböző fehérjék, sejtalkotók) a specifikus jelölésnek köszönhetően külön képeket készítsünk többszínű gerjesztés révén. Kritikus kérdés azonban, hogy a különböző színben felvett képek összeegyeztethetők legyenek, azaz a képek regisztrálva legyenek. A leképező rendszer hullámhossz függő hibái miatt azonban az elkészült képek egymáshoz képest torzultak, így nem összeegyeztethetők. Egy olyan módszert dolgoztam ki egysatornás, többszínű lokalizációs mikroszkóphoz, amely lehetővé teszi egy előzetes kalibráció után a különböző színű képek regisztrációját. Egy leképező rendszerhez egyszer szükséges a kalibrációt elvégezni, utána ez alapján a rendszerrel készült összes többszínű kép regisztrálható. Szimulációval megvizsgáltam a hullámhosszfüggő hiba forrását, majd gyakorlatban, többszínű méréseknél alkalmaztam a kidolgozott módszert.

1.1 A leképező rendszerben fellépő kromatikus hiba vizsgálata szimulációval

OSLO optikai szimulációs szoftverrel vizsgáltam egy nagy numerikus apertúrájú objektívet tartalmazó leképező rendszer képalkotását különböző hullámhosszak esetén.

A modellezett optikai rendszer a következő elemekből épült fel. A korábbiakban említett 1,41 numerikus apertúrájú, 100× nagyítású mikroszkóp objektív szabadalmát [96] felhasználva elkészítettem az objektív modelljét. A tubuslencse egy 180 mm fókusztávolságú tökéletes lencse

volt. A mikroszkópban használatos dichroikus tükröt és emissziós filtert is modelleztem és vizsgáltam a hatásaikat a leképezésre. A dichroikus tükröt modellje egy 1,1 mm vastag, 45°-ban döntött üveg, az emissziós szűrő pedig egy 3,5 mm vastag üveg volt, melynek törésmutatója 1,4548 illetve Abbé-száma 67,82 [100]. Feltételeztem, hogy a pontszerű fluoreszcens objektum a fedőlemez felületén helyezkedik el. Mivel a fluoreszcens fény nem monokromatikus az OSLO beépített polikromatikus PSF számoló algoritmusát használtam. Vettem a különböző laterális pozíciókban elhelyezett, adott hullámhossztartományban emittáló, pontszerű objektumokhoz tartozó PSF-ek maximumának helyeit. Ezeket az adatokat az OSLO beépített rutinja szolgáltatja. A kiértékelést több hullámhossztartományban is elvégeztem. Ideális, aberrációtól mentes leképezés esetében, ha egy pontszerű emittáló objektumot elhelyezünk a fókusz síkban az optikai tengelytől adott távolságban, akkor a leképezés után (a kamera chip síkjában) a kapott kép középpontjának optikai tengelytől mért távolsága a rendszer nagyításával skálázódik, függetlenül az alkalmazott hullámhossztól. Tehát például egy 100× nagyítású rendszert feltételezve, a fókusz síkban az optikai tengelytől 5 μm távolságban elhelyezett emittáló objektum képének középpontja a leképezés után 0,5 mm távolságban van. A valóságban azonban egyszínű leképezés esetén is a kép torzulást szenved, de ezt nem tudjuk közvetlenül mérni, mivel a mintában elhelyezkedő festékmolekulák pontos pozícióit nem ismerjük. Csak a különböző hullámhossztartományok közötti relatív eltérést tudjuk detektálni többszínű leképezés esetében. A 39. ábrán látható egy, a fókusz síkban x,y pontban elhelyezett emittáló objektum két hullámhossztartományban felvett képe. A képek nem egybevágóak a fellépő kromatikus hiba miatt. Továbbá mindkét kép pozíciója eltér az ideális, aberrációtól mentes leképezéshez képest.



39. ábra: Leképezés két hullámhossztartományban és a fellépő kromatikus hiba

Azt a távolságot, amely egyenlő a fókusz síkban x, y pontban emittáló objektum két különböző hullámhossztartományban felvett képének középpontjának relatív távolságával kromatikus offsetnek nevezzük (11).

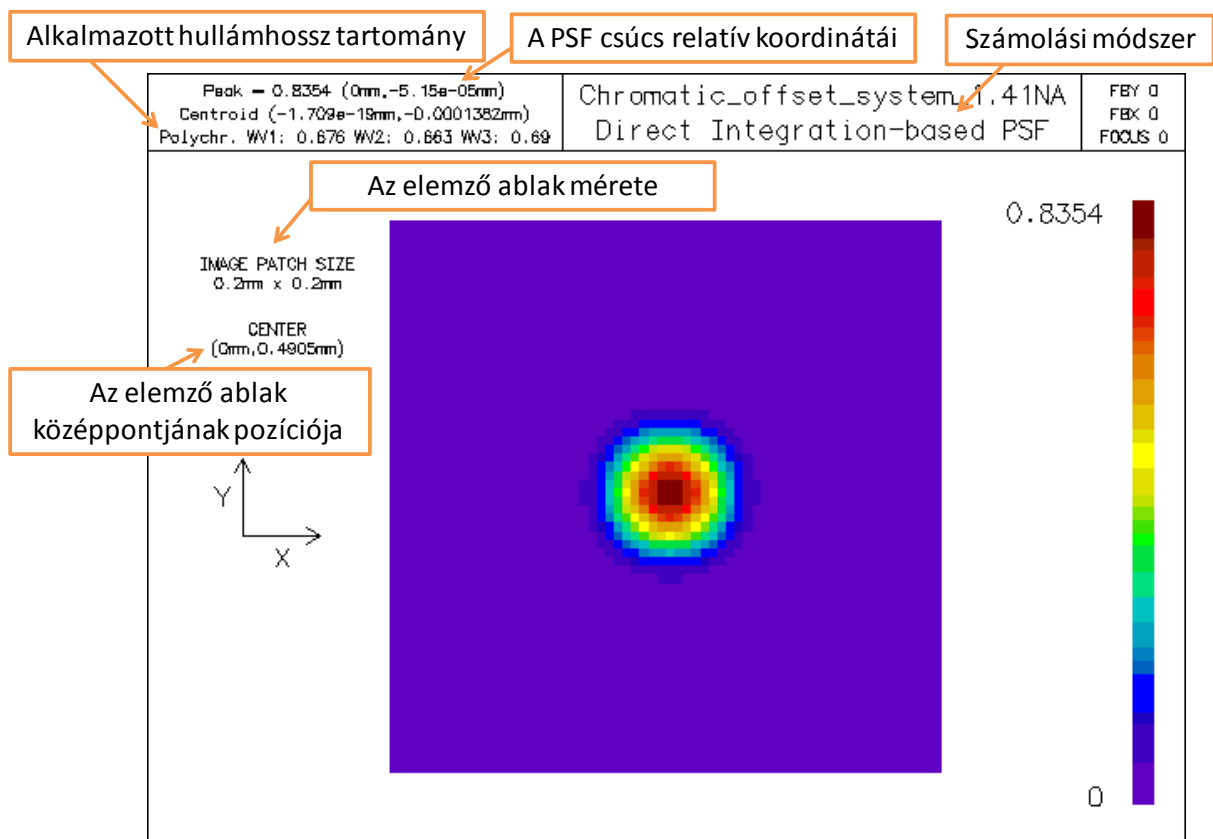
$$\Delta \mathbf{r}_{\text{offset}}(x, y, \lambda_{1,2}) = \mathbf{r}(x, y, \lambda_1) - \mathbf{r}(x, y, \lambda_2) \quad (11)$$

A szimulációk során a többszínű PSF számoláshoz szükséges hullámhossztartományok beállításához egy, a többszínű mikroszkópiában gyakran használt dichroikus tükör és emissziós szűrő áteresztési adatait használtam [100]. Minden tartományt három hullámhosszal adtam meg: a központi hullámhossz és a két határ hullámhossz. Az alkalmazott tartományok a 2. táblázatban láthatóak. A gerjesztő hullámhosszak a mérések során gerjesztésre használt lézerek hullámhosszai. Ezek nem minden esetben esnek tökéletesen egybe a festék abszorpciós csúcsával, mivel vagy a technológia nem teszi lehetővé ilyen lézerek gyártását vagy pedig költségesek. A rendszert a 676 nm-es központi emissziós hullámhossznál optimalizáltam (az objektívet elhagyó nyaláb itt kollimált).

2. táblázat: A szimulációk során az OSLO-ban alkalmazott hullámhossztartományok

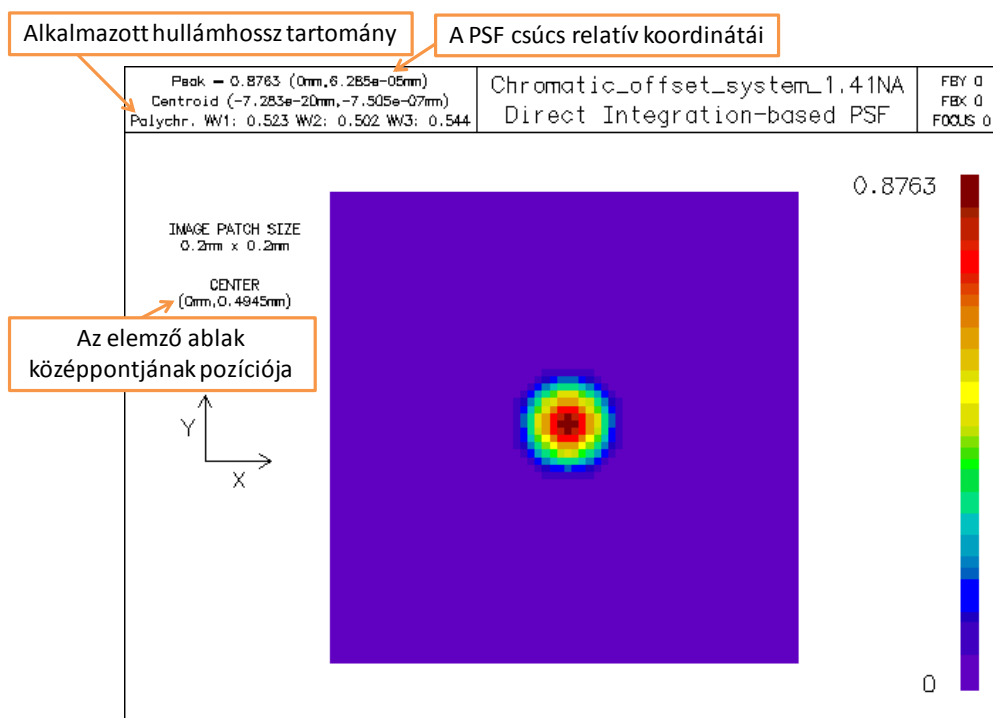
Gerjesztő hullámhossz	Emissziós szűrő transzmissziós ablaka ($T_{\text{avg}} > 90\%$)	OSLO-ban alkalmazott hullámhosszak		
		λ_1	λ_2	λ_3
491 nm	502 nm – 544 nm	523 nm	502 nm	544 nm
561 nm	582 nm – 617 nm	600 nm	582 nm	617 nm
640 nm	663 nm – 690 nm	676 nm	663 nm	690 nm

Az optikai offset értékeinek megállapításához a polikromatikus PSF számoló rutint használtam. Az elemzést Direct Integration Method módban végeztem (a PSF-et meghatározó diffrakciós integrált numerikus módszerrel számolja), 0,78 μm térbeli feloldással. Az ablak nagysága, ahol az OSLO elkészíti a PSF-et 0,2 mm \times 0,2 mm volt. A PSF maximumának helyét az elemző ablak középpontjának pozíciójának és a PSF csúcsának pozíciójának (relatív érték, az elemző ablakhoz viszonyítva) az összege adja. A két adatot az OSLO automatikusan számolja a polikromatikus PSF számolás során. A 40. ábrán látható egy PSF analízis eredménye. A pontszerű emittáló objektum a fókusz síkban y irányban 5 μm -re volt elhelyezve az optikai tengelyhez képest. A hullámhossztartomány központi hullámhossza 676 nm volt. A leképező optikai rendszer a modellezett objektívból és a tökéletes lencséből állt.



40. ábra: Polikromatikus PSF elemzés eredménye OSLO-ban

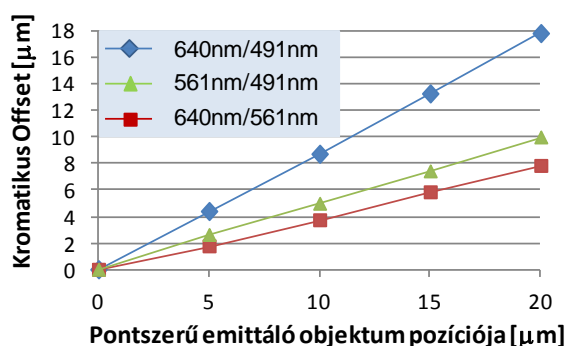
Az előbb leírt módszerrel a polikromatikus PSF középpontjának helye: $0,4905 \text{ mm} - 5,15 \times 10^{-5} \text{ mm}$
 $= 0,4904485 \text{ mm} = 490,4485 \text{ }\mu\text{m}$. Az ideális, aberrációtól mentes esetben az érték $100\times$ nagyítást feltételezve $500 \text{ }\mu\text{m}$ lenne. Ugyanez az elemzés az 523 nm központi hullámhosszú tartományon elvégezve a 41. ábrán látható.



41. ábra: 523 nm központi hullámhosszú tartományon elvégzett polikromatikus PSF elemzés eredménye OSLO-ban

Erre az esetre a polikromatikus PSF középpontjának helye: $0,4945 \text{ mm} + 6,285 \times 10^{-5} \text{ mm} = 0,4945563 \text{ mm} = 494,5563 \text{ }\mu\text{m}$. A két hullámhossztartományra nézve, ebben az esetben a kromatikus offset mértéke a két kapott érték különbsége: $4,1078 \text{ }\mu\text{m}$.

Elvégezve ezeket az elemzések a fókusz síkban (tárgytérben), az y irányban $5 \text{ }\mu\text{m}$ -enként elhelyezett pontszerű emittáló objektumra, a különböző hullámhossztartományokra vonatkoztatva a kromatikus offset (kamera síkjában) az y irányra a 42. ábrán látható módon alakul.

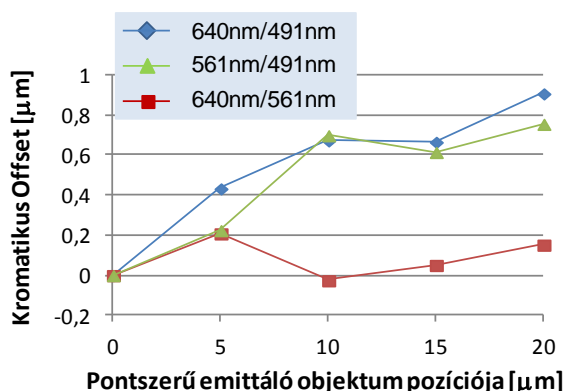


42. ábra: Az objektív által bevezetett kromatikus offset nagyságának függése a pontszerű emittáló objektum pozíciójától

Látható, hogy a hiba mértéke elérheti a kamera pixel nagyságát ($\sim 16 \text{ }\mu\text{m}$) is. Ekkora hiba a hagyományos, többszínű leképezésen alapuló fluoreszcens mikroszkópiában tipikusan nem okoz

számottevő hibát a feloldási kritérium miatt. Azonban a lokalizációs mikroszkópiában, ahol az ígért feloldás lényegesen jobb, ez szignifikáns érték.

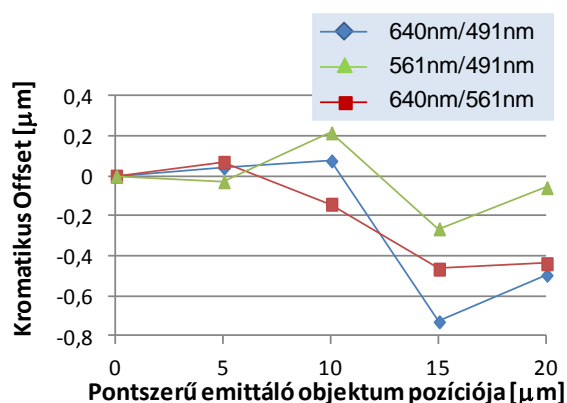
Az előbb bemutatott eredmény csupán az objektív által bevezetett kromatikus offset-et mutatja. Megvizsgáltam, hogy további optikai elemek, illetve azok hibái milyen hatással vannak a kromatikus hibára. A modellezett rendszerbe helyeztem egy 45°-ban kidöntött üveglemezt, ami a dichroikus tükröt hivatott modellezni. Kidöntött optikai elemek aszimmetrikus hibákat okozhatnak, mint például kóma vagy asztigmia. A polichromatikus PSF analíziseket újra elvégeztem a különböző hullámhossz tartományokra és tekintettem csupán az új optikai elem által okozott hibát (43. ábra).



43. ábra: A dichroikus tükör által bevezetett kromatikus offset nagyságának függése a pontszerű emittáló objektum pozíciójától

A dichroikus tükör által okozott hiba lényegesen kisebb, mint az előző esetben. Az adatok szórásának oka numerikus eredetű.

Az emissziós szűrő hatását is modelleztem. Az emissziós szűrő modelljét merőlegesen helyeztem el a rendszerbe és feltételeztem, hogy kissé ék alakú. A gyártó által megadott adatok alapján a maximális megengedett ékesség $0,08^\circ$ [100]. A szimulációk eredményei a különböző hullámhossz tartományokra a 44. ábrán láthatóak.



44. ábra: Ék alakú emissziós szűrő által bevezetett kromatikus offset nagyságának függése a pontszerű emittáló objektum pozíciójától

A bevezetett hiba nagysága szintén körülbelül egy nagyságrenddel kisebb, mint az objektív által bevezetett. Más szavakkal megfogalmazva: a kromatikus hiba fellépésének legfőbb forrása az objektív, illetve, hogy az objektív leképezése nem tökéletes az összes hullámhosszra.

Az OSLO-ban lehetőség van az optikai rendszerben fellépő aberrációkat illetve összetevőit vizsgálni. A beépített rutin eredményül kiadja a harmadrendű (Seidel) aberrációs koefficienseket, amelyek megmutatják, hogy milyen aberrációk milyen mértékben vannak jelen a rendszerben (3. táblázat).

3. táblázat: Harmadrendű (Seidel) aberrációs koefficiensek a tárgyalt, csak az objektívet tartalmazó leképező optikai rendszerben

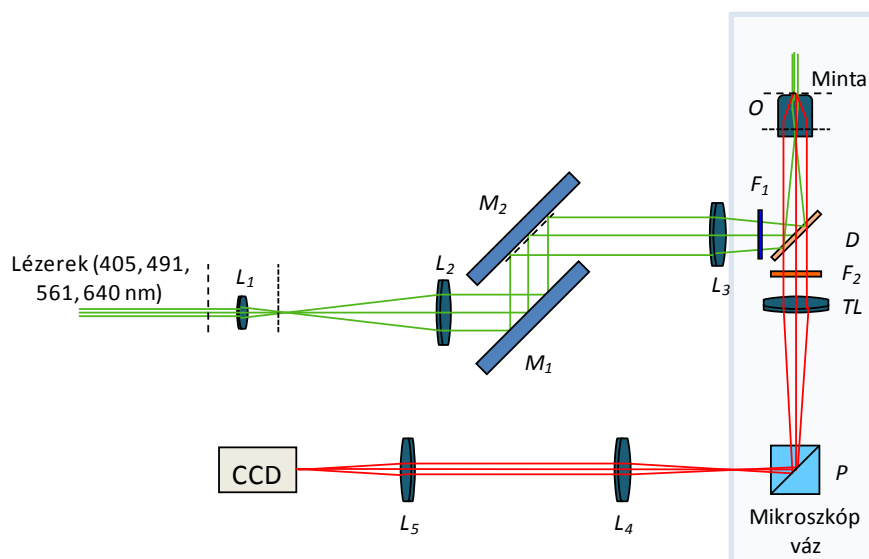
Központi emissziós hullámhossz: 523 nm				
SA3	CMA3	AST3	PTZ3	DIS3
0,073504	$9,3320 \times 10^{-24}$	1.1848×10^{-45}	-3.4075×10^{-52}	1.5368×10^{-67}
Központi emissziós hullámhossz: 600 nm				
SA3	CMA3	AST3	PTZ3	DIS3
0,028920	$-9,1391 \times 10^{-23}$	$2,8881 \times 10^{-43}$	$7,4741 \times 10^{-52}$	-9.1263×10^{-64}
Központi emissziós hullámhossz: 676 nm				
SA3	CMA3	AST3	PTZ3	DIS3
0,004028	$2,4810 \times 10^{-27}$	$4,1768 \times 10^{-52}$	$7,5473 \times 10^{-52}$	$2,3383 \times 10^{-77}$

Az objektív által okozott kromatikus offset legfőbb oka, a Seidel aberrációs koefficiensek alapján a kromatikus aberráció mellett, a fellépő szférikus hiba (SA3), amely egyre inkább növekszik, ahogy távolodunk a 676 nm-es központi hullámhosszú tartománytól, amelyre a rendszer optimalizálva van. A többi Seidel aberráció (kóma, CMA3, asztigmia, AST3, Petzval hiba, PTZ3 és torzítás, DIS3) nagysága elhanyagolható ehhez képest.

1.2 A kromatikus offset kimérése és korrekciója leképező rendszerekben

A kromatikus offset mérése leképező rendszer feloldásánál kisebb átmérőjű, többszínű fluoreszcens golyók segítségével lehetséges. Ezek a mesterséges golyók több fajta festéket is tartalmaznak, így több színben gerjeszthetők és több színben emittálnak, átmérőjük ugyanakkor kicsi, így a leképezés szempontjából pontszerűeknek tekinthetők. A mérés menete a következő: többszínű fluoreszcens golyókat oszlatunk el egy fedőlemez felszínén. Felületi sűrűségüknek megfelelőnek kell lennie ahhoz, hogy lokalizálhatóak legyenek a képük alapján. Egymás után különböző színekben gerjesztve és leképezve őket, a képük alapján a golyók helyzete lokalizálható a különböző hullámhossz tartományokban. A lokalizált pozíciók koordinátáit összevetve a különböző színek esetén a kromatikus offset térbeli eloszlása kimérhető. Ezeket az adatokat felhasználva kalibráció készíthető, ami tulajdonképpen egy koordináta transzformáció, ami a későbbi biológiai mintával készült képek esetén alkalmazható. Fontos megjegyezni, hogy a lokalizációk változását mechanikai elmozdulások (driftek) is okozhatják. A bemutatott módszer előnye, hogy a kalibráció gyors folyamat, ezért ezek az elmozdulások elhanyagolhatóak, mint ahogy ez a mérésekből látszódní fog.

A méréseket témavezetőm a londoni National Physical Laboratory Biophysics and Diagnostics laborjában illetve a cambridge-i egyetem (University of Cambridge) Laser Analytics kutatócsoport laborjában végezte, elemzésüket én készítettem el. A 45. ábrán látható a mikroszkóp sematikus rajza. Egy invertált mikroszkópvázhoz (Nikon TE300 frame) épített dSTORM elven működő lokalizációs mikroszkópban történtek a mérések.



45. ábra: A kísérleti elrendezés sematikus rajza

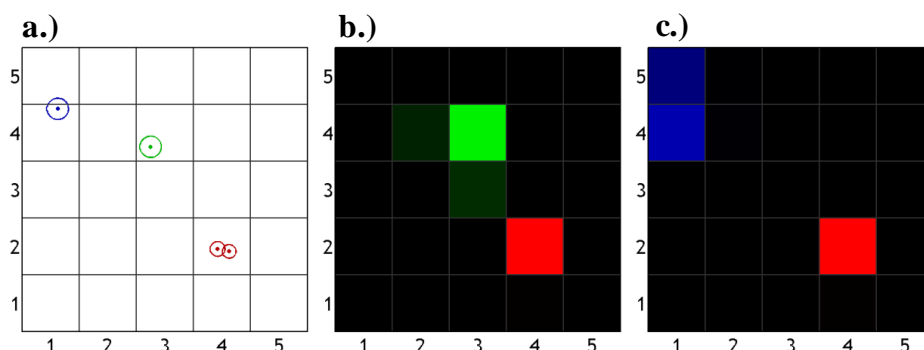
Négy hullámhosszon van lehetőség a minta gerjesztésére: 405 nm (Mitsubishi Electric Corp. ML320G2-11), 491 nm (Cobolt Calypso), 561 nm (Oxxius SLIM-561) és 640 nm (Toptica, iBeam

smart). A kollimált lézernyalábok egy tengelyre vannak felfűzve dichroikus tükrök segítségével (az ábrán nem szerepel). Egy teleszkóp (L_1 és L_2 achromát lencsék; Thorlabs, AC254-150-A) segítségével a nyaláb ki van szélesítve azért, hogy az objektív fókusz síkjában megfelelően széles terület legyen kivilágítva (ROI). Két periszkóp tükör (M_1 és M_2) segítségével a nyaláb a mikroszkópvázba van vezetve, ahol egy achromát lencse (L_3 ; Thorlabs, AC508-250-A) az objektív (O) hátsó fókusz síkjába fókuszálja. Az objektív egy 1,49 numerikus apertúrájú, $100\times$ nagyítású, Nikon TIRF objektív volt. Az M_2 tükör a hátsó fókusz sík konjugált síkjában helyezkedik el, így forgatásával a különböző kivilágítási módok között váltani lehet (EPI, VAEM és TIRF). Egy többsávós szűrő és dichroikus tükör csomag (F_1 , F_2 , D) biztosítja a hullámhosszak szétválasztását és kiszűrését (BrightLine LF405/488/561/635-A-000, Semrock). A tubuslencse (TL) után egy $1\times$ teleszkóp (L_4 és L_5 ; Thorlabs, AC254-100-A) segítségével jut el a detektálandó fluoreszcens nyaláb a detektor felületére. A detektor egy nagy érzékenységű EMCCD (EMCCD DU-897E, Andor) kamera volt, amelynek CCD pixelmérete $16\ \mu\text{m}$. A rendszer $100\times$ nagyítását figyelembe véve, ez $160\ \text{nm}$ -es pixelméretet jelent az objektív fókusz síkjában tekintve. A rendszerben tipikusan ~ 10 -szeres feloldásjavulást lehet elérni a hagyományos fluoreszcens mikroszkópiai technikához képest dSTORM lokalizációs technikával. A szuperfeloldású képek $16\ \text{nm}$ -es pixelmérettel készültek.

Kalibrációs mintaként egy fedőlemez felületére (Thermo Fisher Scientific, Lab-Tek chamber, 155411) felvitt $100\ \text{nm}$ átmérőjű, többszínű fluoreszcens golyók (multicolored fluorescence bead, Invitrogen Molecular Probes, T7279) szolgáltak. A felületi sűrűsége a golyóknak olyan nagyságú volt, hogy képeik ne fedjenek át, de a képteret kitöltsék, és pontos lokalizációt lehessen végezni a különálló golyók képein.

A különböző színű mérések során $200-200$ képből álló képköteg készült a fluoreszcens golyókat tartalmazó mintáról. Az alkalmazott gerjesztés hullámhosszai egymás után, sorrendben a következők voltak: 640 , 561 , 491 és újra $640\ \text{nm}$. Az első és utolsó hullámhosszhoz tartozó mérések összevetéséből meg lehet állapítani, hogy mechanikai okokból történt-e elmozdulás. Ha a két mérés jó közelítéssel egybevágó, akkor a különböző hullámhosszakon történt mérésekből tisztán a kromatikus offset térbeli eloszlása megállapítható. Összesen 800 kép készült a mintáról, $100\ \text{ms}$ -os expozíciós idővel. A teljes mérési idő így $80\ \text{s}$. Ennyi idő alatt a mechanikai okokból történő elmozdulás mértéke meglehetősen kicsi, mint ahogy azt a mérések is igazolják. A 46. ábra (a) részén látható ugyanazon fluoreszcens golyó lokalizált helyzete különböző gerjesztési hullámhosszakon. Thompson-által meghatározott formula (5) alapján a lokalizációs pontosság (hiba) meghatározható az egyes hullámhosszakra. Ez $640\ \text{nm}$ -es esetben $<3\ \text{nm}$, 491 és $561\ \text{nm}$ -es esetre pedig $<4\ \text{nm}$ volt. A kiváló lokalizációs pontosság elsősorban a fényes fluoreszcens golyóknak (magas fotonszám) köszönhető, ami lehetővé teszi a kalibrációt a $10-30\ \text{nm}$ -es pontossággal működő többszínű lokalizációs mikroszkóp számára úgy, hogy lényeges feloldásromlást nem okoz. Az ábrán pont jelzi a lokalizált pozíciót $640\ \text{nm}$ (piros), $561\ \text{nm}$ (zöld)

és 491 nm (kék) hullámhossz esetén; a körülötte levő körök pedig a pontosságot (hibát). Látható, hogy az első és utolsó mérés (a két piros pont) közel helyezkedik el egymáshoz, tehát mechanikai elmozdulás miatt bevezetett hiba mértéke minimális.

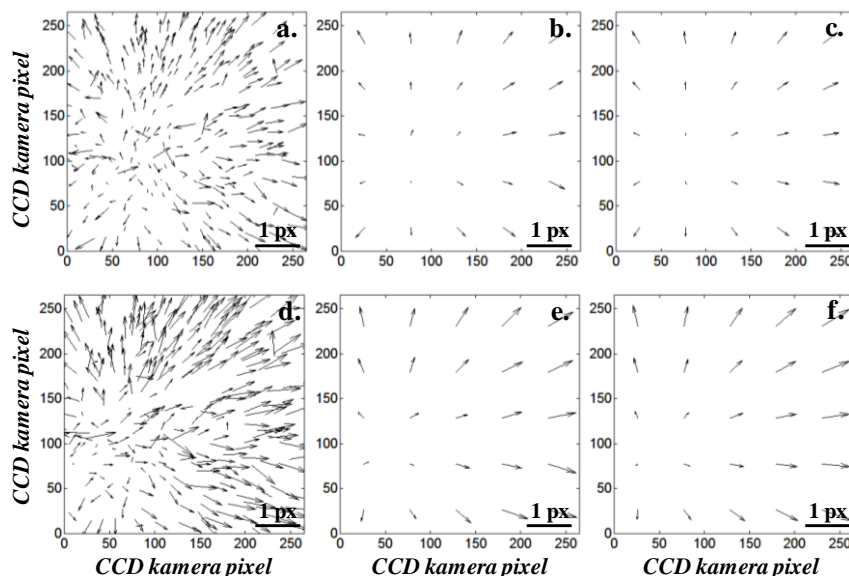


46. ábra (a): Ugyanazon fluoreszcens golyó lokalizált pozíciója különböző gerjesztési hullámhosszak mellett, (b) közös képen ábrázolva a kromatikus hiba 640 nm (piros)/ 561 nm (zöld) hullámhosszpár esetén, (c) közös képen ábrázolva a kromatikus hiba 640 nm (piros)/ 491 nm (kék) hullámhosszpár esetén, pixelméret: 16 nm × 16 nm

Az ábra (b) és (c) részén közös képen tüntettem fel a fluoreszcens golyó képeit egy-egy hullámhosszpár esetén. Ideális esetben ezek tökéletesen átfednének, azonban a kromatikus hiba miatt a képek elkülönülnek a különböző hullámhosszakon. Az optikai offset mértéke ebben az esetben (11) szerint kiszámolható a hullámhosszpárookra: $\Delta r_{\text{offset}}(\lambda_{640,561}) \approx 2$ és $\Delta r_{\text{offset}}(\lambda_{640,491}) \approx 3$ pixel, ami 30-45 nm-nek felel meg. Ez kritikus lehet bizonyos biológiai mintákban, ahol a minta alkotóelemeinek dimenziói ebbe a tartományba esnek (pl. vezikulumok esetén az átmérő ilyen nagyságrendű is lehet).

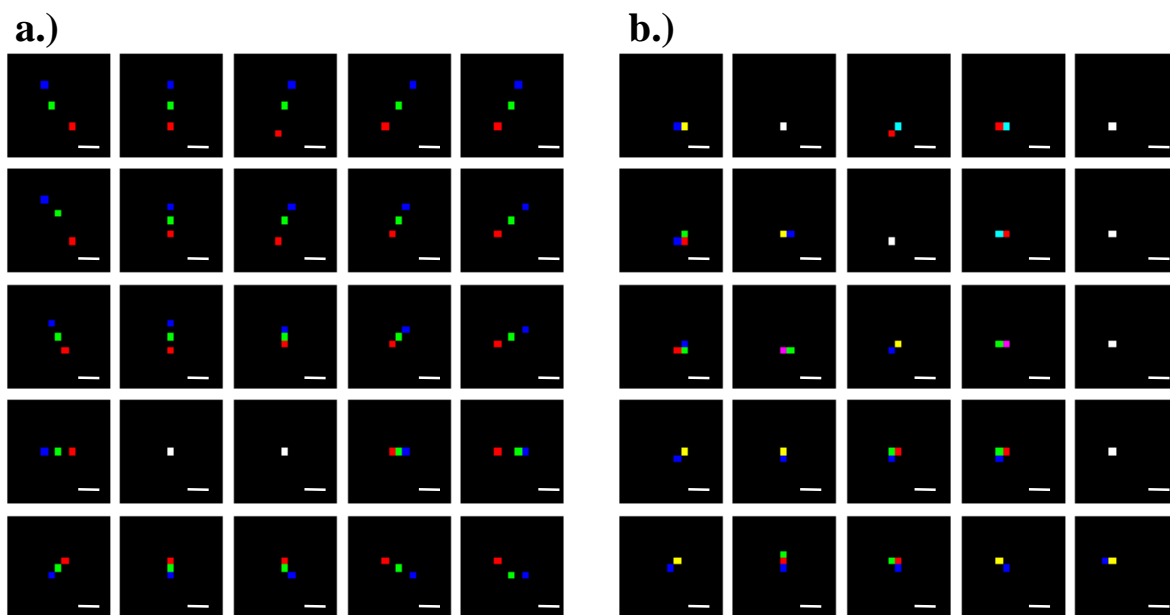
Általános, térbeli eloszlást leíró kalibrációs függvényhez nagy mennyiségű fluoreszcens golyó képeinek ilyen jellegű elemzésével lehet eljutni egy viszonylag nagy FOV-ot (41 μm × 41 μm) használva. A hullámhosszpárok esetében a teljes FOV-ban az összetartozó pozíciók a 47. ábra (a) (640/561 nm) és (d) (640/491 nm) részein láthatóak. Az összes algoritmus MATLAB környezetben készült. A lokalizáció után, a különböző színű képeken a legközelebb elhelyezkedő pozíciópárokat kapcsoltam össze és feltételeztem, hogy ugyanahhoz a fluoreszcens golyóhoz tartoznak. Azért, hogy a trendek jobban láthatóak legyenek a FOV-ot 5 × 5 régióra bontottam fel és az offset értékeket a régiókra kiátlagoltam. Ez látható az ábra (b) és (e) részén. Ahogy az elméleti megfontolásokból következik, a kromatikus hiba hengerszimmetrikus. A központja a képeken bal alsó irányba csúszott, valószínűleg azért, mert a FOV és a rendszer optikai tengelye (és így a hiba szimmetriatengelye) nem voltak tökéletesen centrálva. Az offset adatokra másodrendű polinomot illesztve (MATLAB cp2tform rutinját használva) egy olyan kalibráció kapható, amely megmondja a FOV minden egyes pontjában a fellépő kromatikus offset mértékét és ez felhasználható valós, többszínű mérések korrigálására. A FOV 5 × 5 régiójának középpontjában az illesztett polinomból

a kromatikus offset nagysága és iránya az ábra (c) és (f) részén látható a különböző hullámhosszpárok esetén. A nyilak nagyságának skálája minden kép jobb alsó sarkában látható CCD pixel méretben ($16\ \mu\text{m}$). A FOV széle felé haladva az offset mértéke elérheti az 1 pixeles nagyságot ($16\ \mu\text{m}$), ami jó egyezésben van a szimulációk során kapott eredményekkel.



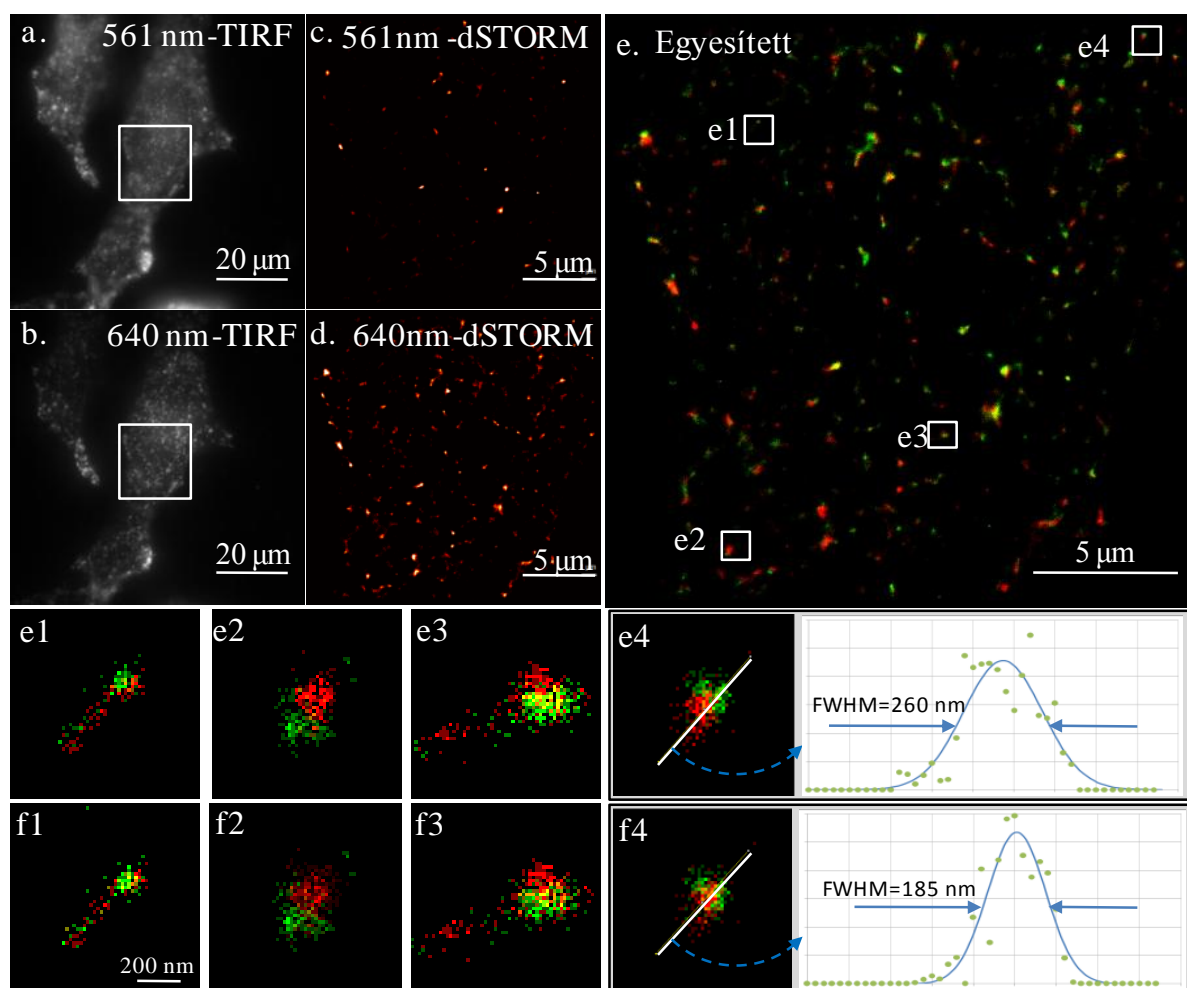
47. ábra: Kísérleti meghatározása a kromatikus hiba térbeli eloszlásának, (a, d): összetartozó pozíciók 640/561 nm és 640/491 nm hullámhosszpárok esetén, (b, e): a FOV 5×5 régiójában kiátlagolt eltérés a két hullámhosszpár esetén, (c, f): illesztett másodrendű polinom értéke a FOV 5×5 régiójának középpontjában. A nyilakhoz rendelt pixelméret (px) $16\ \mu\text{m}$

A kalibrációs eljárást elvégezve, a kalibrációs görbét felhasználva a lokalizált pozíciók korrigálhatóak. Ezt hivatott bemutatni a 48. ábra. A FOV-on belül egy-egy régióban kiválasztottam egy-egy fluoreszcens golyónak a lokalizált pozícióját a különböző gerjesztési hullámhosszokon, és közös képen ábrázoltam. A kép szuperfeloldású, pixelmérete $16\ \text{nm}$. A fehér skálák hossza: $50\ \text{nm}$. Ezekből a régiókból felépítve a FOV-ot (48. ábra (a) része) a kromatikus hiba térbeli eloszlása egyértelműen kirajzolódik. A pozíciók koordinátáinak korrekciója utáni állapotot mutatja a 48. ábra (b) része. Látszik, hogy az összetartozó lokalizált pozíciók nagy része fedésbe vagy lényegesen közelebb került a szuperfeloldású pixelhálón ábrázolva.



48. ábra (a): Fluoreszcens golyók lokalizált pozíciói a FOV egyes régióiban különböző gerjesztési hullámhosszokon
és (b): a korrekció hatása a lokalizált pozíciókra

A kifejlesztett kalibrációs módszer egy reprezentatív biológiai mérésnél alkalmazásra került HeLa sejt felületén levő fehérjék klaszterizációjának vizsgálatánál, amelyek részt vesznek az endocitózisban. A transferrin fehérje klaszterizációját és az azt követő vezikulum-formálódást követték figyelemmel az NPL laboratóriumában. Alexa Fluor 568 és Alexa Fluor 647 festékekkel megfestett transferrin fehérjét oszlattak el egy HeLa sejtet tartalmazó kultúrában 37 °C-on 10 percre. A fehérje a sejt membránján található megfelelő receptorhoz kötődött és a klaszterizáció során vezikulummá fejlődött és eljutott az endoszómába az endocitózis során. Így a mintában a két festékekkel azonos arányban festett vezikulumok voltak találhatóak. A 45. ábrán bemutatott rendszert használva diffrakció-limitált TIRF és szuperfeloldású dSTORM képek készültek. A dSTORM képek esetén először pirosban, 640 nm-en az Alexa 647, majd zöldben 561 nm-en, az Alexa 568 festék gerjesztése történt egymást követően. 20 ms-os expozíciós idővel mindkét esetben 10 000 képet tartalmazó képköteg készült. A két színben felvett diffrakció-limitált TIRF képek láthatóak a 49. ábra (a) és (b) részén.



49. ábra (a),(b): 561 és 640 nm-es gerjesztési hullámhosszon felvett diffrakció-limitált TIRF képek, (c), (d): 561 és 640 nm-es gerjesztési hullámhosszon felvett dSTORM képek a fehér négyzettel jelölt régiókról, (e): összesített képen megjelenített dSTORM képek, korrekció előtti alrégiók (e1-e4) és korrekció utáni alrégiók (f1-f4) és keresztmetszetek

A két különböző festékkel jelölt transferrin megfestette a membránt. A két festékre a festési sűrűség közel azonos. A diffrakció-limitált képek nem tudják megmutatni a klaszterizációt és a vezikulum képződés eredményét a feloldási limit miatt, szemben a dSTORM képekkel (49. ábra (c) és (d) része). A két dSTORM kép között kis eltérés látható, ennek oka, hogy a két különböző festék két különböző dinamikával rendelkezik. A mérés az Alexa 647 festékre volt optimalizálva (fókuszálás, pixelméret, puffer oldat, stb.), ezért a lokalizációs képkészítés az Alexa 568 festékkel nem a legoptimálisabb ebben az esetben. Az ábra (e) részén látható az egyesített dSTORM kép két színben. A kromatikus hiba jelenléte látható a nagyobb klasztereknél, mint ahogy ez a kiemelt régiókon (e1-e4) látható is. Az átfedés nem tökéletes, habár ugyanarról az objektumról van szó. Korrekciót elvégezve, az egyes régiókban a klaszterek már átfednek (f1-f4). A korrekció hatását még jobban kiemelve az e4 és f4 régió keresztmetszeteket készítettem és függvényillesztéssel

meghatároztam a félértékszélességet (FWHM), ami a kalibrációnak köszönhetően lecsökken, tehát a klaszterek jobban fedésbe kerülnek.

Tehát egy olyan kalibrációs-korrektíós módszert sikerült kifejleszteni, amely kompenzálja a többszínű lokalizációs mikroszkópiában fellépő kromatikus hibát. Ehhez mindössze egy adott rendszer esetén, az alkalmazandó hullámhosszakra, egyetlen kalibrációs mérést kell elvégezni egy olyan mintán, amely fényes, az alkalmazandó hullámhosszhoz megfelelő festékeket tartalmazó fluoreszcens golyókat tartalmaz, egyenletesen szétosztva a FOV-on. A kalibrációs képek elemzéséből kapott korrektíós transzformáció segítségével a rendszerrel készült későbbi, többszínű felvételek már korrigálhatóak. Ez a korrektíós metódus beépült a rainSTORM lokalizációs szoftverbe is.

3. Tesztminta generáló szimulációs program lokalizációs mikroszkópiai vizsgálatokhoz

A lokalizáción alapuló mikroszkópiai technikában nagy hangsúly van a megfelelő minta-előkészítésen (festési sűrűség megválasztása, festékdinamikai paraméterek figyelembevétele...) és képkészítési paraméterek beállításán (képkészítési frekvencia, pixelméret...), különben a képfeldolgozás során artifaktumok léphetnek fel, amelyek a mérések hibás értelmezéséhez vezethetnek. Egy olyan szimulációs program, amely modellezi a teljes képkészítési procedúrát és ahol a kritikus paraméterek bemeneti változók, segítség lehet a fent említett problémák kezelésében (paraméter optimalizáció és artifaktum vizsgálat). Ebben a fejezetben egy ilyen szimulációs programot (TestSTORM) mutatok be, amely különböző mintastruktúrák esetén modellezi a lokalizációs mikroszkópiai képképzést. A program felhasználási lehetőségeit a következő fejezetben ismertetem.

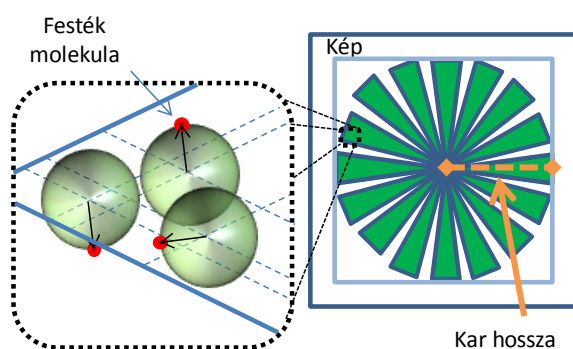
A TestSTORM szimulációs program három fő részből épül fel: (i) Egy részalgoritmus legenerálja a szimulált mintában elhelyezkedő molekulák pozícióit a beállított mintastruktúra alapján, (ii) A molekulák időbeli viselkedését, dinamikáját leíró háromállapotú modell alapján minden molekulához egy véletlenszerű, időbeli trajektória kapcsolódik és (iii) a beállított, modellezett rendszerparaméterek alapján (képkészítési frekvencia, pixelméret, stb.) elkészül a szimulált képköteg, figyelembe véve az előbbi két részalgoritmus által generált adatokat. Az elkészült képkötegek egy lokalizációs szoftver (rainSTORM, rapidSTORM, quickPALM...) segítségével rekonstruálhatóak, a kapott eredmények tovább analizálhatóak.

3.1 A modellezett minta struktúrája

A TestSTORM négy, előre definiált, háromdimenziós mintastruktúrát tartalmaz: „csillag” („star”), „rács” („array”), „vezikulumok” („vesicles”) és „fonalak” („lines”). Az első két geometria mesterséges mintastruktúrák, a mikroszkóp egyes paramétereit lehet velük tesztelni, míg az utolsó

kettő biológiai objektumok modelljei. Az összes mintastruktúrában közös a fluoreszcens festés modellje. A feltételezett pontszerű festékmolekulák egy úgynevezett linker segítségével kötődnek a mintához. A modellben a linkerek pozíciói véletlenszerű módon változnak az egyes molekulák esetén, a szimulált mérés során azonban fixek maradnak. A linkerhossz egy bemeneti paramétere a programnak. Egy valós, immunhisztokémiai fluoreszcens jelölést tekintve, a linker tulajdonképpen az antitestet vagy antitestek láncolatát (többszörös festés esetén) hivatott modellezni. Ha a fluoreszcens molekula méretét is figyelembe akarjuk venni, akkor linkerhosszként az adott festési eljárásban a minta és a festékmolekula közötti kapcsoló elem és a molekula karakterisztikus sugarának összegét kell megadni.

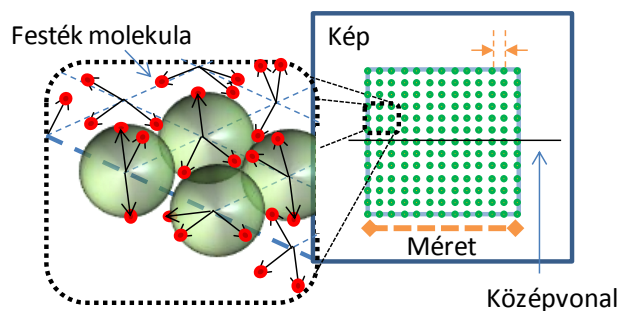
A „csillag” minta egy 16 ágból felépülő, csillag alakú minta, amelynek középpontja a kép középpontjával egybeesik (50. ábra).



50. ábra: A „csillag” minta struktúrája

A linkerek bekötési pontjai a csillag karjainak felületén helyezkednek el véletlenszerű módon, egyenletes valószínűségi eloszlás szerint. A zöld gömb jelöli a linker véletlenszerű elhelyezkedéséből következő lehetséges molekula pozíciókat. A csillag karjainak hossza illetve a karokon elhelyezkedő molekulák száma változtatható paraméter. A minta z irányú pozíciója a fókuszsíkhöz képest (defókusz) szintén a felhasználó által megválasztható. Ez a mintastruktúra egy klasszikus minta a mikroszkópiában a mikroszkóp feloldásának meghatározásához. A geometriából adóan a csillag közepéhez viszonyítva koncentrikus köröket véve, a körvonalak mentén a középpont felé haladva a moduláció változik, periódusának hossza csökken, vagyis egyre finomodik a feloldandó struktúra. Adott feloldóképességű rendszer esetén a csillagot leképezve létezik egy sugár, amelyen belül a struktúra már nem feloldható, a moduláció eltűnik.

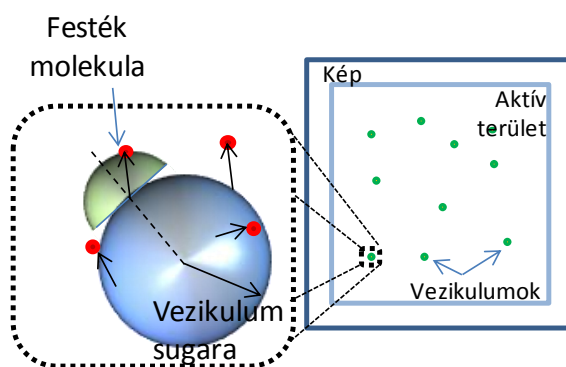
A „rács” minta szintén egy mesterséges minta modellje, amelynek struktúrája az 51. ábrán látható.



51. ábra: A „rács” minta felépítése

A mintában a linkerek bekötési pontjai egy rács pontjai. A pontokhoz bekötő linkerek és így a molekulák számát a felhasználó állíthatja be. A zöld gömbök jelzik egy-egy ponthoz tartozó lehetséges molekula pozíciókat. A rácsot jellemző paraméterek, a rácspontok távolsága és a rács mérete szintén változtatható. A minta térbeli elhelyezkedése a következő: meg kell adni a minta középvonalának z irányú pozícióját, illetve változtatható a minta síkja és a fókusz sík által bezárt szög is. Ezzel a mintával szintén vizsgálható a mikroszkóp feloldása.

A „vezikulumok” minta a sejtbiológiában előforduló, fluoreszcensen jelölt vezikulumok lokalizációs mikroszkóppal történő leképezését hivatott modellezni. A festett vezikulumok modellje egy gömb, amelynek felületéhez kapcsolódnak a linkerek és így a molekulák (52. ábra). A kapcsolódási pontok valószínűségi eloszlása egyenletes a gömb felületén.

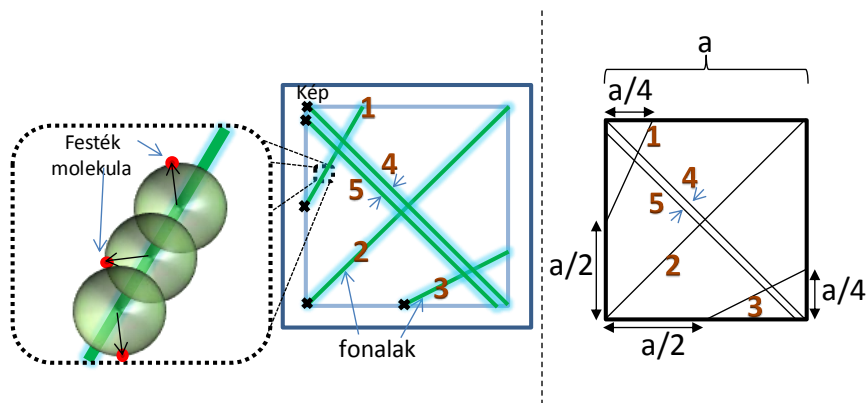


52. ábra: A „vezikulumok” minta felépítése

Ebben az esetben a linkerek lehetséges pozíciói és így a molekulák lehetséges helyei egy félgömböt alkotnak (zöld félgömb a mintán). A vezikulumok pozícióit kétféleképpen lehet megadni: a felhasználó által definiált módon és véletlenszerű módon. A felhasználó által definiált esetben a megadandó paraméterek: az egyes vezikulumok középpontjának x , y és z koordinátái, sugara és az egyes vezikulumokhoz kötött molekulák száma. A véletlenszerű esetben definiálni kell egy úgynevezett aktív, négyzet alakú területet, amelyen belül a vezikulumok elhelyezkedhetnek. Megadandó a vezikulumok száma, átlagos sugara, sugaruknak szórása (normál eloszlást követ), az

átlagos molekulaszám és a molekulaszám szórása (szintén normál eloszlást követ). A vezikulumok térbeli elhelyezkedése is véletlenszerű, csak a fókuszsíktól való maximális eltérést kell definiálni.

A „fonalak” minta öt fix pozíciójú egyenes fonalból épül fel. Ez a minta a festett filamentumok, aktinszálak leképezésének vizsgálatára készült. Vonalakhoz csatlakoznak a festékmolekulák, melyek lehetséges pozíciói körülölelik azt (53. ábra). A vonalak keresztmetszete pontszerű, a linkerek csatlakozási pontjai a vonal mentén véletlenszerű módon helyezkednek el, valószínűségi eloszlásuk egyenletes.



53. ábra: A „fonalak” minta struktúrája

Az egyes vonalakhoz meg kell adni az egy mikrométerre eső csatlakozó molekulák számát (vonalsűrűsége a molekuláknak), a kezdő pontjuknak z irányú koordinátáit illetve a vonalak emelkedési szögét (vonala és a fókusz sík által bezárt szög). A kezdőpontok az ábrán fekete „x”-szel vannak jelölve. Az egész minta mérete szintén változtatható paraméter. A 4. és 5. vonal közötti távolságot a felhasználó állíthatja be. Két közel eső vonal szétválaszthatóságát lehet ennek a paraméternek a változtatásával vizsgálni a mikroszkópban. A fonalak hossza az ábra bal oldali része alapján a minta méretéből (a) számolható.

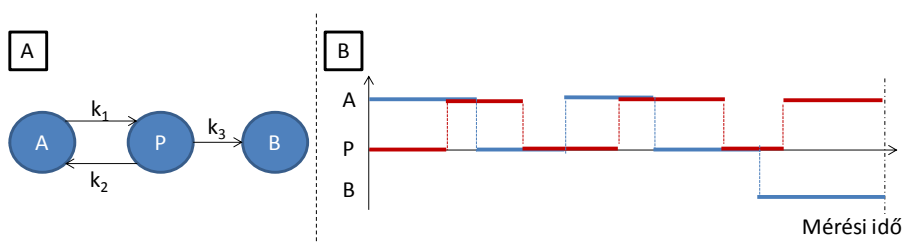
3.2 A modellezett fluoreszcens festék időbeli dinamikája

A mintában elhelyezkedő molekulák időbeli viselkedését, dinamikáját a háromállapotú modell írja le (54. ábra (a) része). Fix térbeli pozíciójukban a következő állapotokban lehetnek a molekulák: aktív (A), passzív (P) és bleachelt (B). Aktív állapotban fluoreszcenciára képesek, passzívban viszont egy olyan meta-stabil állapotba kerülnek, amiben nem bocsájtanak ki fluoreszcens fényt. Bleachelt állapotban a festék szétesik. Az állapotok között lehetséges átmenet: az aktív és a passzív állapot között oda-vissza történő állapotváltás. A passzív állapotból bleachelt állapotba került molekulák viszont már nem térnek vissza. Tekintsük most csupán az aktívból passzív állapotba történő átmenetet és feltételezzük, hogy minden molekula aktív állapotban van. Az aktív állapotban levő molekulák számának időbeli változása (csökkenése) arányos azzal, hogy hány darab molekula van az aktív állapotban (most nem tekintjük a passzív állapotból visszatérő molekulákat) (12). Az

arányossági tényező az átmenet hatáskeresztmetszete (k_1), mértékegysége 1/s. Ez az átmenet „sebességét” írja le.

$$\frac{dn_a}{dt} = -k_1 n_a \quad (12)$$

A hatáskeresztmetszet reciproka az átmenet karakterisztikus ideje ($\tau_1 = 1/k_1$). A (12) egyenlet megoldása egy csökkenő exponenciális függvény, ahol τ_1 időtartam alatt a kezdeti molekulaszám e-ad részére csökken. Ezt az aktív állapot élettartamának nevezzük. Egy molekulát tekintve az átmenet sztochasztikus folyamat. Egy molekula által, az aktív állapotban eltöltött idő valószínűségi eloszlása exponenciális, melynek várható értéke az aktív állapot élettartama. A passzív állapotból a molekulák bleachelt vagy aktív állapotba juthatnak. Hogy melyik átmenet valósul meg, azt az átmenetekhez tartozó hatáskeresztmetszetek határozzák meg. Annak az esélye, hogy a molekula bleachelt állapotba jut $k_3/(k_2 + k_3)$, hogy aktív állapotba jut pedig $k_2/(k_2 + k_3)$. Az egyes átmenetekhez lehet karakterisztikus időket definiálni ($\tau_2 = \frac{1}{k_2}$ és $\tau_3 = \frac{1}{k_3}$). Az effektív hatáskeresztmetszet $k_2 + k_3$, aminek a reciproka a passzív állapot élettartama ($\tau_{passzív} = \frac{1}{1/\tau_2 + 1/\tau_3}$). Mivel a bleachelt állapotba való átmenet valószínűsége jelentősen kisebb, mint az aktív állapotba való átmenet, ezért $\tau_{passzív} \approx \tau_2$.



54. ábra (a): A háromállapotú modell és az állapotok közti lehetséges átmenetek, (b) egy molekulához tartozó véletlenszerű időbeli trajektória

A szimulált mérés során minden egyes molekulához egy véletlenszerű időbeli trajektória adódik a háromállapotú rendszer alapján. A karakterisztikus időbeli konstansok bemeneti paraméterek. Annak meghatározása, hogy egy molekula egy adott állapotban milyen hosszú ideig marad, véletlenszerű módon történik, az időtartam valószínűségi eloszlása exponenciális.

Két lehetséges időbeli trajektóriát ábrázol az 54. ábra (b) része. A piros trajektóriájú molekula a szimulált mérés alatt nem bomlott el, mindvégig az aktív és passzív állapotok között mozgott. A másik (kék trajektória) molekula a szimulált mérés során két aktív fázis után bleachelt állapotba került, így többé nem volt fluoreszcenciára képes. A fluoreszcens festéket jellemző, a programban bemeneti paraméter a fotonfluxus, vagyis, hogy egy molekula hány darab fluoreszcens fotont képes kibocsájtani másodpercenként aktív állapotban (foton/s). A fluxus és az aktuális aktív állapot

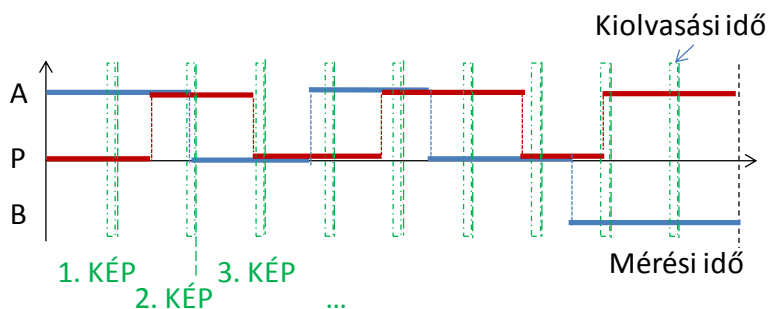
időtartamából lehet meghatározni az aktuális emittált fotonszámot, ami a leképezés során játszik szerepet. Az emisszió hullámhosszát szintén a felhasználó határozza meg.

3.3 A képkészítés modellezése

A képkészítés modellezése során figyelembe kell venni a leképező rendszer jellemzőit, a detektor (kamera) sajátosságait illetve a mérést terhelő zajt. A program a képcsomag generálása során egy pontszerű molekula képét (PSF) helyezi el a pozíció és az időbeli trajektória alapján a megfelelő sorszámú kép megfelelő helyére. A program háromdimenziós Gauss-modellt használ a PSF elkészítése során. A polarizációs állapotot és a dipólok orientációját a jelenlegi verzió nem veszi figyelembe.

A rendszert jellemző bemeneti paraméterek a PSF félértékszélessége (FWHM, Full Width at Half Maximum) nanométerben az objektív fókuszsjkjában mérve és a minta törésmutatója, amely a háromdimenziós Gauss-modell számolásában játszik szerepet (általában a víz törésmutatójához közeli $\sim 1,33$). Az optikai fotongyűjtési hatékonyság megadja, hogy a leképező rendszer az emittált fotonok mekkora részét képes begyűjteni és a kamera felületére juttatni. Ennek meghatározásában szerepet játszik a mikroszkóp objektív numerikus apertúrája és a rendszer teljes transzmissziója. Nagy numerikus apertúrájú, olajimmerziós objektívet tartalmazó rendszer esetén tipikus értéke $\sim 0,3-0,4$. Az alacsony érték legfőbb oka, hogy a festékmolekulák a tér minden irányában bocsájthatnak ki fotont, ebből egy mikroszkóp objektív maximum csak a felét tudja begyűjteni.

A kamerát és képkészítését jellemző paraméterek: a képkészítési frekvencia, a képcsomagban szereplő képek száma és a képméret CCD pixelszámban megadva. A szimulált mérés időtartama a képszámból és a képkészítési frekvenciából meghatározható. Az expozíciós idő szintén bemeneti paraméter. Egy kép elkészültéhez szükséges időt a képkészítési frekvencia reciproka adja. A két idő közötti különbség oka, hogy szükséges egy rövid időtartam az információk kiolvasására a pixelekből, ami alatt nincs mérés. Ezt az időtartamot kiolvasási időnek nevezzük. Hatását és a képkészítés mintavételezését az 55. ábra szemlélteti az előbbi véletlenszerű időbeli trajektóriák esetén.



55. ábra: A kiolvasási idő és a mintavételezés az előző időbeli trajektóriák esetén

A kiolvasási idő miatt nem kerül felhasználásra az összes begyűjtött foton. A pixelméretet a felhasználó határozza meg, nanométerben megadva, az objektív fókuszsíkjára visszavetítve. Ez kiszámolható a CCD pixel nagyságából és a leképező rendszer nagyításából: $\text{pixelméret} = \text{CCD pixelméret} / \text{nagyítás}$. A begyűjtött fotonokat az EMCCD kamera előbb elektronokká konvertálja, majd az elektronokat sokszorozza és végül egy számértéket ad meg. A kamerák használati útmutatóiban [50] és kalibrációs adataiban megtalálhatóak a modellezéshez szükséges adatok: az előerősítés mértéke, az elektronszám/számérték konverziója, az elektronsokszorosítás mértéke és a kvantumhatásfok. A beérkező foton/számérték konverziója a következőképpen számolható: a beérkező fotonszám, a kvantumhatásfok, az előerősítés mértékének és az elektronsokszorosítás mértékének a szorzata adja az elektronok végső számát, amit elosztva az elektron/számérték konverziós értékével a beütésszám megkapható.

A program Poisson zajmodellt használ, amelyhez szükséges az átlagos háttérzaj mértéke, mint bemeneti paraméter.

A képkészítés tehát egy háromdimenziós mintáról készül egy két dimenzióba való leképezéssel.

3.4 A TestSTORM használata

A TestSTORM rendelkezik egy grafikus felülettel (Graphical User Interface, GUI) az egyszerű kezelhetőség érdekében. A program és a használati útmutató ingyenesen letölthető a kutatócsoport honlapjáról [101], és MATLAB 2011a vagy újabb verzió alatt futtatható. EXE fájlként is letölthető és futtatható. A grafikus felülete az 56. ábrán látható.

56. ábra: A TestSTORM grafikus felülete

Külön paneleken jelennek meg a paramétercsoportok, amelyeket az előzőekben tárgyaltam. A minta kiválasztásával (Pattern Selection panel), a mintatípushoz tartozó dinamikus panelek

jelennek meg (57. ábra). A „vezikulumok” minta esetén további választható lehetőség a felhasználó által definiált (fixed) vagy véletlenszerű minta.

The image shows the TestSTORM GUI with several panels and red arrows indicating connections:

- Pattern Selection** (top center):
 - ☒ Star pattern
 - ☐ Array pattern
 - ☐ Vesicles pattern
 - ☐ Lines pattern
- Star pattern parameters** (top left):
 - N of molecules in each arm: 200
 - Z plane (nm): 0
 - Length of arms (nm): 3200
- Array pattern parameters** (bottom left):
 - N of molecules in each point: 3
 - Angle of elevation (deg): 0
 - Size of the pattern (nm): 8000
 - Distance between the points (nm): 320
- Vesicles pattern parameters** (bottom center, split into two):
 - Left side (fixed):
 - Parameters of single vesicles (x,y,z and R in nm):

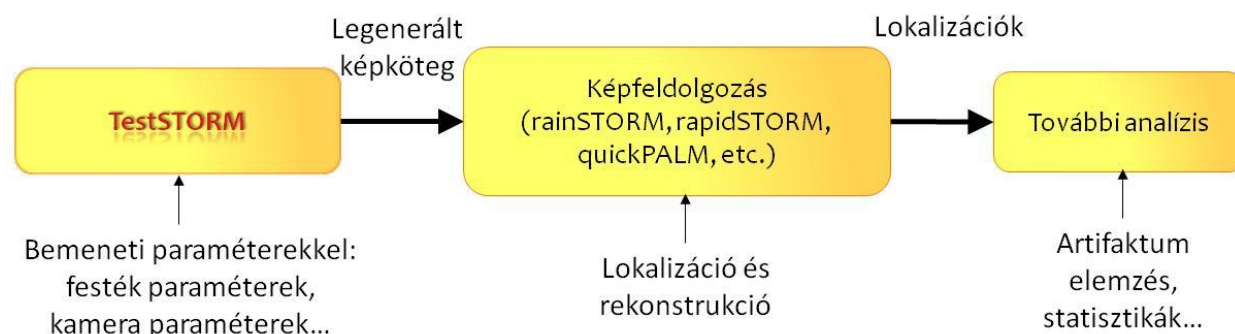
x	5000	5200	5000	5200
y	5000	5000	5300	5500
z	0	-200	150	360
Rad	30	30	30	30
N	200	200	200	200
 - Right side (random):
 - Size of active area (nm): 8000
 - N of vesicles: 15
 - Maximum dz (nm): 300
 - Av. rad. of vesicles (nm): 39.5
 - Sigma of radius (nm): 5.1
 - Av. N of molecules: 50
 - Sigma of N of molecules: 20
- Lines pattern parameters** (top right):
 - N of molecules/um in the lines (5): 2000 2000 2000 2000 2000
 - Z position (5) (nm): 0 0 0 0 0
 - Angle of lines (5) (deg): 0 0 0 0 0
 - Distance of 4. & 5. lines (nm): 160
 - Size of pattern (nm): 2000

57. ábra: A TestSTORM grafikus felületén a különböző mintákhoz tartozó minta specifikus paraméterek

A generált képcsomagot TIF vagy RAW formátumban lehet elmenteni és később ez a mentett fájl szolgál bemeneti fájlként a lokalizációt végző szoftvernek. A kutatócsoport által használt és ajánlott lokalizációs szoftver a rainSTORM [59].

A TestSTORM moduláris szerkezetű, tehát könnyen bővíthető új mintastruktúrákkal vagy új PSF modellekkel, például asztigmatikus vagy más 3D STORM mikroszkóp leképezésének modelljével.

A TestSTORM tehát egy olyan felhasználóbarát szimulációs szoftver, amely modellezi a képkészítést egy lokalizációs elven működő, fluoreszcens mikroszkópban, különböző mintastruktúrák esetén. Négy fajta beépített minta geometriát tartalmaz: kettő mesterséges (csillag és rács) és kettő biológiából vett (vezikulumok és fonalak) modellt. A program által generált szimulált képcsomagok elmenthetőek és egy lokalizációs szoftver segítségével rekonstruálhatóak és tovább elemezhetőek (58. ábra).



58. ábra: Folyamatábra a TestSTORM alkalmazásáról

4. Paraméterek optimalizációja és artifaktumok elemzése a lokalizációs mikroszkópiában

Az előző fejezetben bemutatott TestSTORM szimulációs program lehetőséget nyújt arra, hogy a képkészítést vagy a mintát jellemző paramétereket optimalizáljuk. Segítségével feltérképezhető a paramétertér, az egyes változók hatásai a végső, rekonstruált képre. Elemezhető, hogy adott beállításnál milyen artifaktumok léphetnek fel. Illetve megfordítva a gondolatmenetet, ha már rendelkezünk egy rekonstruált képpel, amin szerepel olyan struktúra, ami akár artifaktum is lehet, a minta struktúrájának ismeretében ellenőrizhető az objektum artifaktum mivolta. Mind a négy fajta beépített mintatípus esetén bemutatok egy-egy optimalizációt vagy artifaktum vizsgálatot.

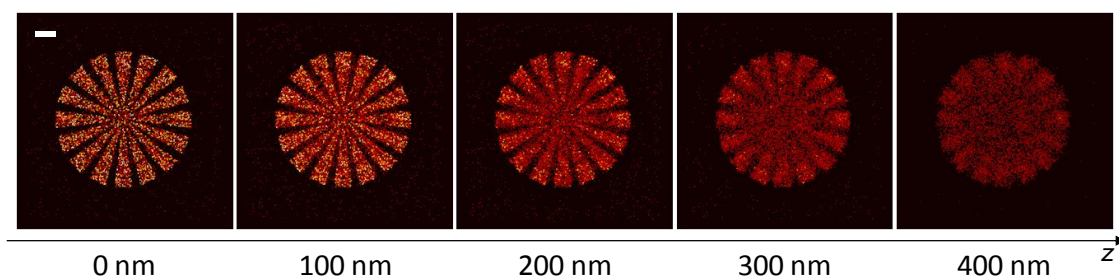
A szimulációk során használt, közös paramétereket a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: Az artifaktum vizsgálat és az optimalizáció során használt közös paraméterek

Festék paraméterek		Képkészítési paraméterek			
Karakterisztikus idő (aktív→passzív)	0,05 s	Képszám	3000	Elektron/be-ütés	21,5
Karakterisztikus idő (passzív→aktív)	50 s	Minta törésmutatója	1,33	Előerősítés	2,5
Karakterisztikus idő (passzív→bleached)	50000 s	Pixelméret	160 nm	Elektron sokszorozási tényező	90
Emissziós hullámhossz	668 nm	PSF méret	260 nm	Kvantum-hatásfok	0,9
Emittált foton/s	100000	Átlagos háttér	200 beütés	Optikai fotongyűjtési hatékonyság	0,4

A szimulációk különböző képkészítési frekvenciák mellett készültek, amikből az expozíciós időt mindig 5 ms-os kiolvasási időt feltételezve számítottam. A linker hossza szintén változott a szimulációk során. A táblázatban jelölt paraméterek úgy lettek megválasztva, hogy valós mérési szituációkat kövessenek. A festék paraméterei a lokalizációs mikroszkópiában széleskörűen alkalmazott Alexa Fluor 647 festék paraméterei, aminek emissziós csúcsa ~668 nm. A kamera paraméterei pedig egy Andor iXon DV887 EMCCD kamera adataival egyeznek meg [50]. A mikroszkóp nagyítása 100× volt. A feltételezett leképező rendszer a cambridge-i egyetem Laser Analytics Group dSTORM mikroszkóp rendszerét modellezi. A rekonstrukcióhoz minden esetben a rainSTORM lokalizációs szoftvert használtam alapértelmezett beállításokkal.

Elsőként a „csillag” minta segítségével végeztem szimulációkat. A defókuszt hatását vizsgáltam a rekonstruált kép minőségére. A minta z irányú pozícióját változtattam. 0 nm-ről (fókusz sík) indulva 100 nm-enként 400 nm-ig készítettem szimulált képcsomagokat, amiket rainSTORM segítségével rekonstruáltam (59. ábra). A teljes DOF a 660 nm-es emissziós hullámhosszon 549 nm, tehát a fókusz síktól mérve $\pm 274,5$ nm-es tartomány. A szimulációban minden egyes karban 500 molekula helyezkedett el, amelyek egy 7 nm hosszúságú linker segítségével voltak a felülethez kötve. A karok hossza 3200 nm volt. A képeket 20 kép/s képkészítési frekvenciával készítettem.

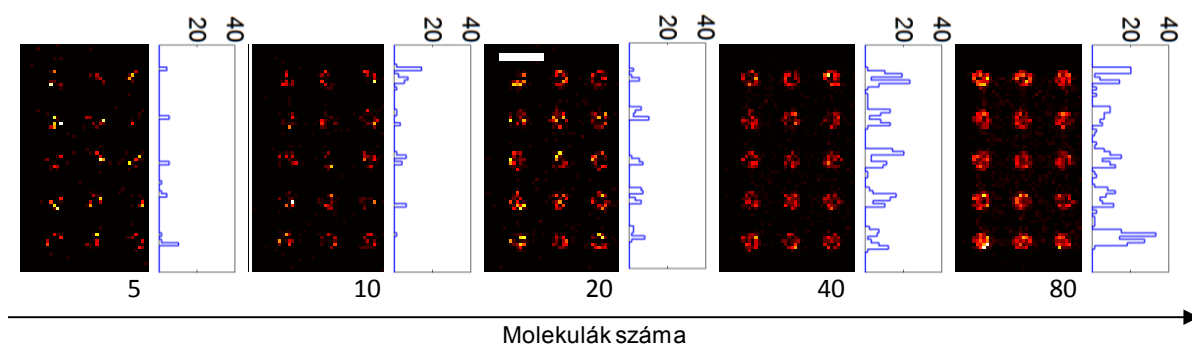


59. ábra: A különböző z irányú síkokban rekonstruált csillag minta, a skálahossz 1 μm , a szín skálája azonos minden képen

A fókusz síkban a csillag karjai tökéletesen kirajzolódnak a kontraszt magas, míg távolodva a fókusz síktól a csillag közepe és élei egyre inkább elmosódnak és a kontraszt értéke is esik. Ennek három fő oka van. Egyrészt a fókusz síkon kívüli leképezés esetén a lokalizációs pontosság rosszabb, mivel a fotonszám alacsonyabb az egyes pixeleken (nagyobb területen oszlik el közel annyi foton, mint fókusz síkbeli leképezésnél, a zaj mértéke pedig nem változik). Másrészt a lokalizációs programba épített szűrő a túl pontatlan lokalizációkat kiszűrheti. Harmadrészt pedig a részben átfedő molekulaképek miatt a lokalizáció nem lesz helyes. Az átfedés valószínűsége a defókuszt mértékével egyre növekszik, hiszen a PSF is egyre szélesedik. Két átfedő molekulát tekintve a lokalizáló algoritmus könnyen a kettő közé teszi a lokalizált pozíciót. Ennek köszönhetően a csillag közepe felé az élek elmosódnak és hamis lokalizációk jelennek meg. Ez a jelenség már a DOF tartományán belül is feltűnik. Csökkenteni lehet a szűrési feltételek

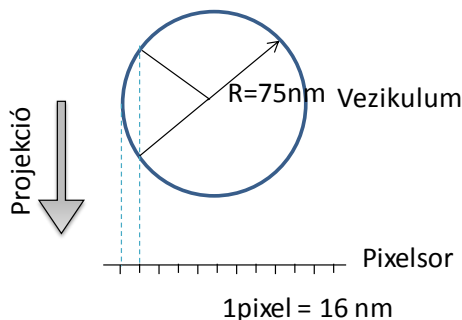
szigorításával (például elfogadott PSF szélességi tartományának csökkentésével), de ezzel könnyen előfordulhat, hogy olyan lokalizációk vesznek el, amelyek helyesek és így a kontraszt értéke is leesik.

A „rács” minta segítségével a fluoreszcens festési módszer által bevezetett artifaktumot vizsgáltam annak a szempontjából, hogy hogyan befolyásolja a minta struktúrájának leképezését. A rekonstruált minta struktúrája változik a három dimenzióból két dimenzióba való leképezés miatt is. A rács pontjaihoz különböző számú molekulát kötöttem 75 nm-es linkerhossz mellett (60. ábra). A pontok közötti távolság 400 nm volt. A képek 20 kép/s képkészítési frekvenciával készültek. A képek minden esetben automatikus színskálával vannak ábrázolva.



60. ábra: Rekonstruált „rács” minták különböző számú csatolt molekulaszám esetén és egy-egy keresztmetszetük, skála hossza: 500 nm, színskálázás automatikus

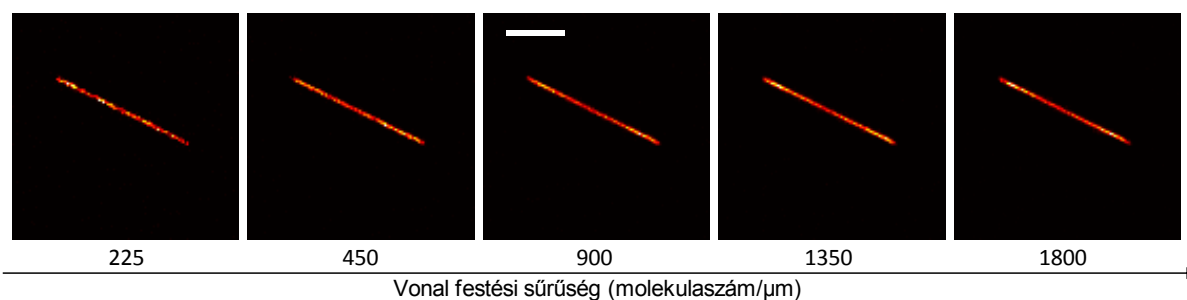
Alacsony molekulaszám esetén a periodikus rács struktúra még nem igazán rajzolódik ki, növelve a molekulaszámot a rács előtűnik, a pontjaiban pedig egyre tisztában kivehetőek a gyűrű formák. A gyűrű oka a projekció. A molekulák egy gömb felületén helyezkedhetnek el a modellben. Ha ezt a gömböt egy kétdimenziós síkra vetítjük, akkor a molekulásűrűség nem lesz egyenletes egy korongon belül, hanem a korong peremén a sűrűség nagyobb lesz. Ha 75 nm-es gömböt feltételezünk, melynek felülete egyenletesen van festve és egy 16 nm szuperfeloldású pixelhálóra vetítjük (61. ábra), akkor meg lehet mutatni, hogy a molekulák ~35%-a a legszélső pixelre fog esni. A számolás során a pixel által kihasított gömb felszint kell meghatározni.



61. ábra: Vezikulum projekciója pixelhálóra

A gyűrű struktúra nem élesedik tovább ~20 csatolt molekula felett, hanem kezd elmosódni illetve kis mértékben a háttér is megnő. Ezeknél a szimulációknál még nem jelentős azon hamis lokalizációk száma, amelyek egy rácsponthoz tartozó, de egyszerre felvillanó molekulák átfedő képeinek lokalizációjából származnak. Viszont a szomszédos rácspontokban, egyszerre felvillanó molekulák hatása megjelenik. Az átfedő PSF-ek miatt hamis lokalizációk jelennek meg, a gyűrű közepe elkezd feltöltődni és a gyűrűk közötti térrészben is jelennek meg hamis lokalizációk. A keresztmetszeteken látszódik, hogy megnövekszik a lokalizációk száma a molekulaszám növelésével és ezzel együtt a háttér mértéke illetve a gyűrűk elkezdnek feltöltődni. Szintén látszik a keresztmetszeteken, hogy alacsony molekulaszám és így lokalizáció miatt a minta struktúrája nem kivehető, az 5 csomópont nem jelenik meg egyértelműen.

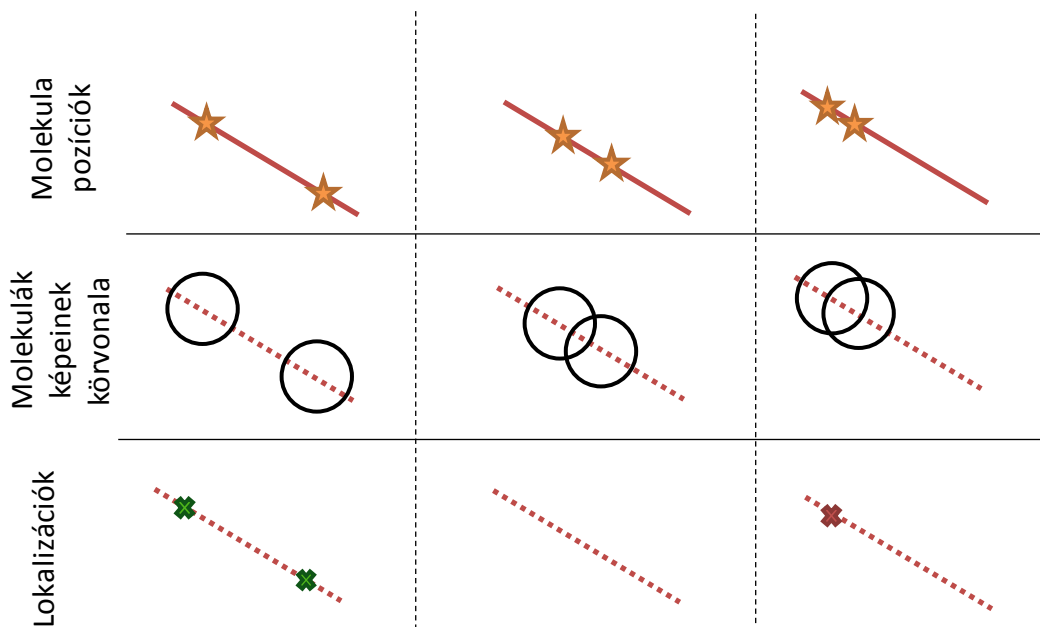
A lokalizációs mikroszkópia egyik biológiai felhasználási területe az idegtudomány, ahol többek között fluoreszcensen festett aktinszálak leképezésénél használják. A festés során festett phalloidin toxin köt az aktinszálakhoz [102]. Ilyen mintageometria esetén vonalirányban igen magas festési sűrűség érhető el, aminek következtében a rekonstrukció során artifaktum jelentkezik, a filamentumok végei felé intenzívebb foltok jelennek meg. Ezt vizsgáltam meg a TestSTORM „fonalak” mintamodelljével (62. ábra). A fonal hossza a szimulációban 2200 nm volt, a linkerhossz pedig 7 nm. A képek 20 kép/s képkészítési frekvenciával készültek. A számolások során a vonal festési sűrűségét változtattam 225 és 1800 molekula/ μm között. Ez a gyakorlatban úgy valósítható meg, hogy a fluoreszcens festési folyamat során a festett és nem festett phalloidinek arányát változtatjuk. A minta a fókusz síkban helyezkedett el. A képek minden esetben automatikus színskálával vannak ábrázolva.



62. ábra: Rekonstruált „fonal” minták különböző vonal festési sűrűség mellett, skálahossz: 1 μm , színskálázás automatikus

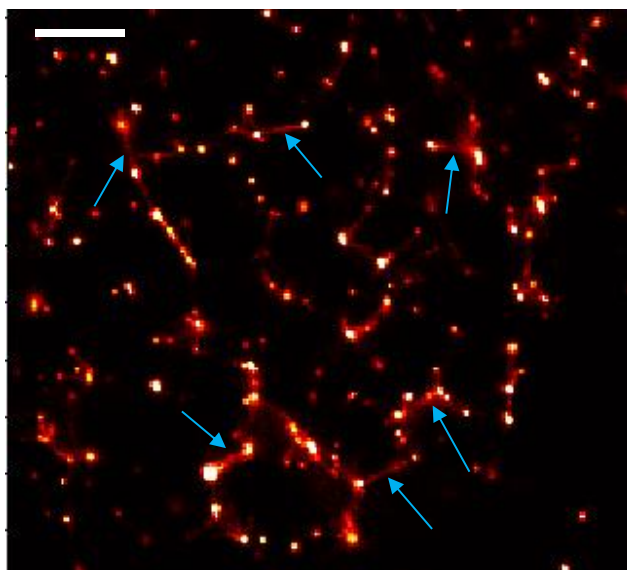
Alacsonyabb festési sűrűség mellett, mint ahogy az várható, a lokalizációk egyenletesen oszlanak el a vonal mentén. Egy határ felett (450 molekula/ μm) azonban a vonal két végénél intenzívebb foltok kezdenek el kialakulni. Ennek oka, hogy annak az esélye, hogy két molekula képe átfedjen és emiatt a lokalizációs szoftver elvesse a lokalizációt, nagyobb a vonal belsejében elhelyezkedő molekulák esetében (63. ábra). Emiatt a lokalizációk száma csökken a vonal belsejében (63. ábra második oszlop). Ha a vonal két szélén helyezkedik el az egy időben felvillanó két molekula, akkor

PSF-jük már nem fed át, megfelelően szeparáltak és lokalizálhatóak (63. ábra első oszlop). Ha két felvillanó molekula elég közel van egymáshoz, akkor a lokalizációs szoftver nem szűri ki és egy olyan hamis lokalizációval tér vissza, amely a két molekula között helyezkedik el (63. ábra harmadik oszlop). Ha ez a két molekula a vonal végei felé helyezkedik el, akkor a lokalizáció mindig a vonal közepe felé csúszik el. Ez magyarázza azt, hogy a fényesebb folt nem a vonal két végén helyezkedik el, hanem csak a közelében. Az ilyen jellegű eltolt hamis lokalizációk, nagy festési sűrűségek esetén akár a vonal hosszának rövidülését is okozhatják.



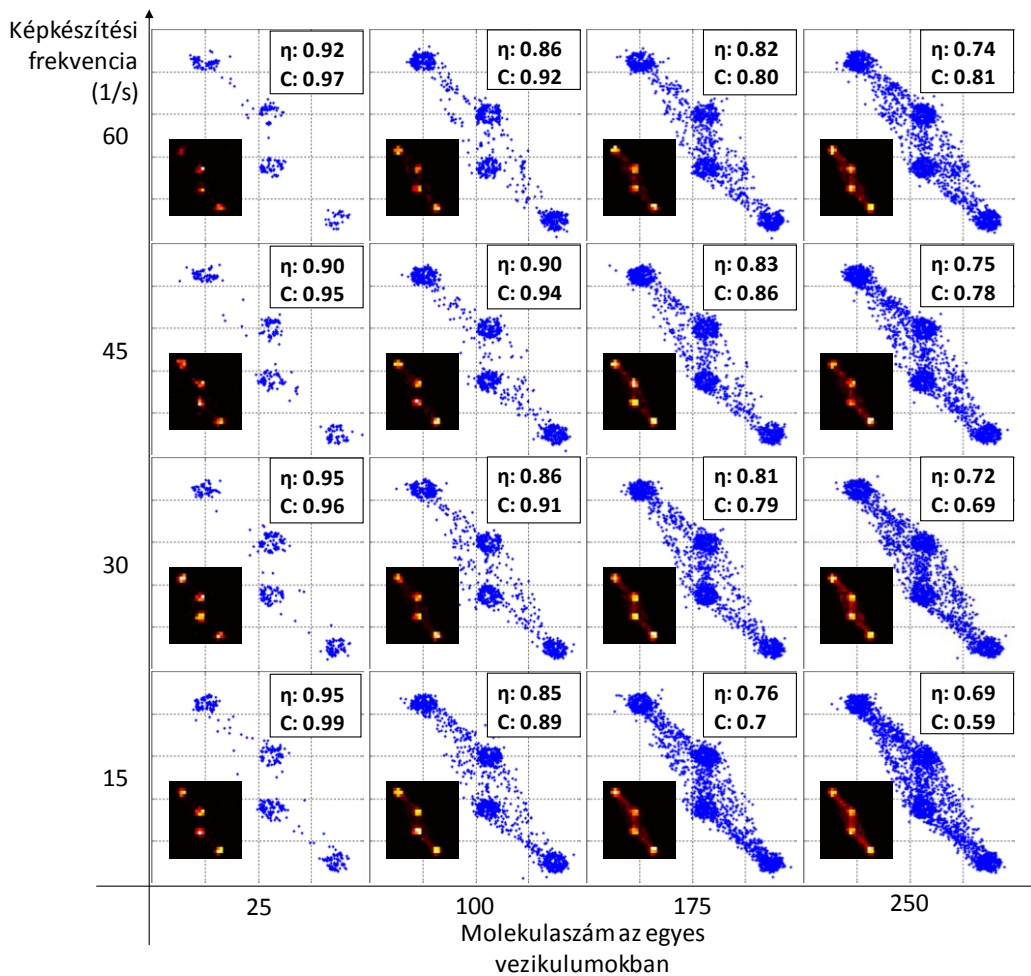
64. ábra: Vonal mentén elhelyezkedő molekulák lokalizálása (oszloponként: valós, elutasított, hamis)

Vezikulumokat tartalmazó minták esetén fellépő lehetséges artifaktumot vizsgáltam a TestSTOM „vezikulumok” mintája segítségével. A londoni National Physical Laboratory (NPL) kutatóintézetben felvett valós, kísérleti minták rekonstruálása és kiértékelése után, az egyes vezikulumok között híd formációk jelentek meg (65. ábra). AlexaFluor 647 fluoreszcens festékkel jelölt epidermális növekedési faktort (Epidermal Growth Factor, EGF) juttattak el élő HeLa sejtbe. A fluoreszcens EGF bekötött a sejten elhelyezkedő EGF receptorokhoz. Ezután elkezdődött a klaszterizáció és a vezikulum képződés, majd a vezikulumok eljutottak a sejt belsejébe a klatrin függő endocitózis során. A sejt fixálása után dSTORM rendszerrel készültek felvételek. A rekonstrukció és az ábrázolás rainSTORM lokalizációs szoftverrel készült.



65. ábra: Rekonstruált, szuperfeloldású kép fluoreszcensen festett vezikulumokról és a közöttük előttűnő hidakról, skálahossz: 5 μ m

Lényeges kérdés, hogy a megjelenő hidak vajon valós kapcsolatot jelentenek-e a vezikulumok között, amelyek például az endocitózis során alakulnak ki, vagy csupán a lokalizációs szoftver tökéletlenségéből fakadó artifaktumok. A TestSTROM „vezikulum” mintamodell segítségével lehetőség van különböző paraméterekkel rendelkező mérések szimulációjára. Négy darab fixált pozíciójú modell-vezikulum leképezését vizsgáltam. A vezikulumok középpontjának relatív pozíciói a következők voltak: (0,0), (200,200), (200,400) és (400,600). A vezikulumok sugara 30 nm, a linkerhossz 7 nm volt. A fluoreszcens molekulák számát 25 és 250 között változtattam. A másik változó paraméter a képkészítési frekvencia volt. A szimulált képcsomagok rekonstrukciója után a méréshez hasonlóan, bizonyos esetekben megjelentek a hidak a vezikulumok között (66. ábra). A képek kék pontokkal ábrázolják a lokalizált pozíciókat, a hozzájuk tartozó betétábrák pedig a szuperfeloldású, rekonstruált képek (kétdimenziós hisztografikus ábrázolás).



66. ábra: Különböző molekulaszámú vezikulumokról különböző képkészítési frekvenciával készült szimulációk, 1 pixel 160 nm, a betétábrákon 16 nm

A szimulációk kiértékeléséből egyértelműen látszik, hogy a hidak megjelenése nem biológiai eredetű, hanem egy artifaktum. Oka az átfedő PSF-ek esetén fellépő lokalizációs hiba. Ha két szomszédos vezikulumhoz tartozó molekula egyszerre lesz aktív, akkor, ha a távolságuk elegendően kicsi, a képeik át fognak fedni és a lokalizáció után a talált pozíció a két molekula és így a két vezikulum között fog elhelyezkedni. Ez okozza a híd formációk megjelenését közelebb eső vezikulumok esetén. Nagyobb festési sűrűség esetén a PSF-ek átfedési valószínűsége megnő. Kisebb képkészítési frekvenciák esetén az expozíciós idő nagyobb és ezalatt több molekula is aktiválódhat, amelyek PSF-e szintén át fog fedni.

Két mértéket vezettem be az artifaktum elemzésére: a lokalizációs hatékonyság (η) és a hidak kontrasztértéke (C). A lokalizációs hatékonyság a valós (helyes) és az összes lokalizáció arány, míg a hidak kontrasztértéke pedig a középső két vezikulum esetén a hidakat alkotó lokalizációk és a vezikulumokat alkotó lokalizációk számát alapul véve (13) szerint adódik:

$$C = (M_{vez} - M_{híd})/M_{vez} \quad (13)$$

ahol M_{vez} az átlagos lokalizációs szám a vezikulumokon belül, M_{hid} pedig a hamis lokalizációs szám a hídban. Növekvő molekulaszám mellett a két mérték értéke csökken, ami az átfedő molekulaképekre történő illesztés hibájának következménye. A végső kép minőségének megállapításánál további szempontok is szerepet játszanak. Tekintve az alacsony molekulaszámú eseteket, habár a kontraszt és a hatékonyság értéke magas, az alacsony lokalizációs szám miatt a minta struktúrája elveszhet. Magasabb molekulaszámnál 45 kép/s-os képkészítési frekvenciánál egy optimum mutatkozik, ami szubjektív módon, vizuálisan is látszik.

Az eddig említett és még további artifaktumokat összegyűjtöttem egy táblázatba (5. táblázat). A különböző paraméterek hatásait rendszereztem aszerint, hogy az egyes mintastruktúrák esetében milyen hatással vannak a képkészítésre. Egy külön oszlop foglalkozik a lehetséges megoldási javaslatokkal.

5. táblázat: Lehetséges artifaktumok különböző mintastruktúrák esetében különböző paramétertartományok mellett

	Csillag	Rács	Vezikulumok	Fonalak	Megoldási javaslatok
Magas festési sűrűség	<ul style="list-style-type: none"> •Magas számú elutasított lokalizáció •Csomósodás 	Hamis struktúra kialakulása	Híd formációk a vezikulumok között	<ul style="list-style-type: none"> •Alacsony kontrasztú keresztezések •Nagy intenzitású végek •Hamis vonalak 	<ul style="list-style-type: none"> •Koncentráció csökkentése •Nem jelölt további antitestek használata •Egyszeres jelölés •Képkészítési frekvencia növelése
Alacsony festési sűrűség	Alacsony kontrasztú kép	Hiányos struktúra	Alulmintavételezés miatt hamis méretbecslés	Nem egyenletes az intenzitáseloszlás a vonalak mentén	<ul style="list-style-type: none"> •Koncentráció növelése •Több kép készítése
Defókuszt	Elmosódott élek	Alacsony laterális feloldás	Alacsony kontrasztú elmosódott kép	Elmosódott kép	Autofókusz rendszer használata
Nagy linkerhossz	Nincsenek éles élek	Hamis vagy eltűnt struktúrák	Hamis méretbecslés	Kettős vonalak	<ul style="list-style-type: none"> •Nanobody használata •Direkt jelölés

TestSTORM szimulációs program segítségével lehetőség van különböző mintastruktúrák esetén fellépő lehetséges artifaktumok egyszerű vizsgálatára. Feltérképezhető az a paramétertartomány, ahol még elhanyagolható vagy nem lép föl ilyen jellegű hiba és ez az elemzés segítségével szolgál későbbi, lokalizációs mikroszkópiai mérések tervezésénél.

Konklúziók

A célkitűzésekben kitűzött célok alapján, az új tudományos eredmények tükrében, ebben a fejezetben megfogalmazom tézispontjaimat, röviden levonom a konklúziókat és bemutatom a továbblépési lehetőségeket.

Az elért eredmények alapján a következő tézispontokat fogalmazom meg:

1. Különböző ferdeszögű kivilágítási technikák vizsgálatát végeztem el nyalábkövető optikai szimulációs szoftverrel, modellezett mikroszkóprendszerben.

OSLO optikai szimulációs programban elkészítettem egy ferdeszögű kivilágításokat létrehozó mikroszkóprendszer modelljét és vizsgáltam a mintában elhelyezkedő leképezendő tartomány (ROI) megvilágítását. Megvizsgáltam különböző mélységekben elhelyezkedő tartományok lehetséges kivilágítását. A minősítéshez mérőszámokat vezettem be.

2. A kromatikus hiba hatását vizsgáltam többszínű lokalizációs elven működő mikroszkópban és korrekciójára módszert dolgoztam ki.

OSLO optikai szimulációs programban egy modellezett mikroszkóprendszerben vizsgáltam különböző hullámhossztartományokban a rendszer pontátviteli függvényét, vagyis egy pontszerű emittáló objektum képét. A hullámhossztartományokat a mérések során használatos fluoreszcens festékek és szűrők paraméterei alapján választottam ki. A különböző színekben számolt PSF-ek pozíciói alapján a kromatikus hiba térbeli függése megállapítható. Optikai elemek modelljei alapján vizsgáltam, hogy az egyes elemek milyen mértékben járulnak hozzá a hibához. Egy kalibrációs mintát használó mérés alapján kalibrációt készítettem és a további mérések során a korrekciót ezen adatok alapján végeztem el.

3. Tesztminta generáló szimulációs szoftvert készítettem lokalizációs mikroszkópai elven működő mikroszkóp képalkotásának modellezésére.

A szimulációs program (TestSTORM) előre definiált mintastruktúrákat tartalmaz, amelyek között van mesterséges tesztminta és biológiai objektum modellje is. A modellezett fluoreszcensen festett mintában minden egyes molekulához tartozik egy véletlenszerű módon, a háromállapotú modell alapján generált időbeli viselkedés (trajektória). Ezeket az adatokat és a leképező rendszer adatait (kamera paraméterek, PSF méret...) figyelembe véve az algoritmus elkészíti a szimulált képcsomagot, amit TIF vagy RAW formátumba lehet elmenteni.

4. Artifaktumok elemzését és paraméterek optimalizálását végeztem el TestSTORM szimulációs programmal, különböző mintastruktúrák esetén.

A TestSTORM-ba beépített négyfajta mintageometria esetén egy-egy lehetséges artifaktum részletes elemzését mutattam be. Feltérképeztem, hogy az egyes artifaktumok megjelenését hogyan befolyásolják a minta vagy a rendszer paraméterek.

Az egyes tézispontokhoz tartozó konklúziókat és a továbblépési lehetőségeket tárgyalom a továbbiakban.

1. Kivilágítási technikákat vizsgáltam OSLO nyalábkövető, optikai modellező szoftver segítségével. A minta mozgatásával történő pozicionálás után, a különböző mélységben elhelyezkedő fókuszszík leképezéséhez különböző kivilágítási technikák az optimálisak. Egyik legfontosabb cél a fókuszszíkon kívülről érkező jel csökkentése. Erre kínálnak megoldást a ferdeszögű kivilágítási technikák (VAEM, HILO, TIRF). Egy lehetséges optikai elrendezés modelljén mutattam be ezen kivilágítások megvalósítását és az optikai elemek nem ideális volta miatt fellépő jelenségeket. Elsősorban a lokalizációs mikroszkópiában fellépő potenciális problémákra helyeztem a hangsúlyt. A rendszer kivilágítási optikai útjában megfelelő helyeken, tükrökkel forgatásokat bevezetve, a ferdeszögű kivilágítások megvalósíthatóak. Megmutattam, hogy a hagyományosnak tekinthető EPI kivilágításból TIRF kivilágításba való átmenetkor, az átmenet teljes reflexióba folyamatos, nem egyszerre következik be a nyalábot alkotó összes sugár esetében. Továbbá kis ROI-t használva a kivilágítás decentrálttá válhat, ami egy plusz tükrörforgatással korrigálható. A mintában mélyebben elhelyezkedő fókuszszík esetében megvizsgáltam a VAEM és a HILO kivilágításokat. A HILO kivilágításhoz kalibrációs metódust alkottam, amely később egy lokalizációs mikroszkóp megépítésénél szolgálhat segítségül. Bemutattam, hogy a korrekció során a már teljes visszaverődést szenvedett sugarak újra törést szenvedhetnek és visszatérhetnek a mintába. A pozicionálást objektív mozgatásával elvégezve, a kivilágítás elmozdul a ROI közepéhez képest és így az nem lesz tökéletesen kivilágítva. A további korrekcióhoz kalibrációs eljárást mutattam be. Az elvégzett szimulációk a majdan Szegeden megépülő lokalizációs mikroszkóp kivilágítási nyalábútjának tervezésekor segítségül szolgálnak a megfelelő optikai elemek kiválasztásánál, a beállítási pontossággal szembeni elvárásoknál. Irányt mutathatnak a mérések során a hibás kivilágításból fakadó problémák okainak felderítésében és megoldásában. Tervek között szerepel egy olyan valós minta elkészítése, amely rétegelt struktúrájú. Bizonyos távolságokban fluoreszcensen festett, DOF vastagságú rétegek találhatók benne. A ferdeszögű kivilágítások egy ilyen minta segítségével kalibrálhatóak minden egyes rendszerben. Másik fontos fejlesztési terület a többszínű mikroszkópiában a különböző hullámhosszú kivilágítások esetén fellépő jelenségek vizsgálata. Ez különösen kritikus ferdeszögű megvilágítások esetén. Mivel a rendszer egy hullámhosszra van optimalizálva (kollimálva, kalibrálva) más hullámhosszak esetén kromatikus hiba lép fel és a nyalábot nagyon divergensé

teszi, a ROI kivilágítását pedig lerontja. A probléma kezeléséhez további korrekciók szükségesek, amelyek vizsgálhatóak nyalábkövető szoftverrel. A ferdeszögű kivilágítások más optikai elrendezésben is megvalósíthatóak, például lencsék tranzverzális irányú mozgatásával. Egy ilyen elrendezés vizsgálata szintén fontos eredményekkel szolgálhat, tekintve a valós lencsék leképezési hibáit. A leképező lencsékkel kapcsolatban a számolások alapján elvárásokat lehetne megfogalmazni.

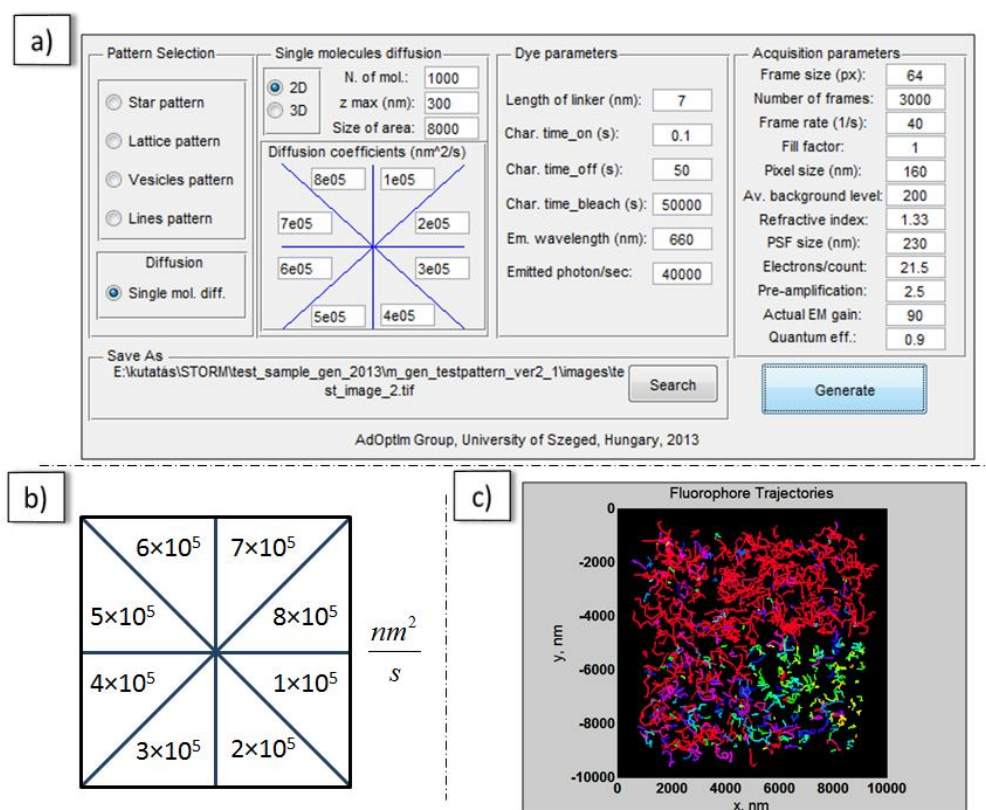
2. Többszínű lokalizációs mikroszkópiában gyakran használt elrendezés az egycsatornás leképezés. Ebben az esetben a különböző hullámhosszú képcsomagokat egymás után veszik fel. Az optikai elemek kromatikus hibája miatt a különböző színekben készült képek nem összeilleszthetőek. Tekintve két ugyanazon a helyen elhelyezkedő, két különböző hullámhosszon emittáló fluoreszcens pontszerű forrást, képük nem ugyanazon a helyen helyezkedik el a két hullámhossz esetén (távolságuk a kromatikus offset). Megállapítottam az OSLO-ban elvégzett szimulációk alapján, hogy a hiba fő oka a kromatikus aberráció, amelyet elsősorban az objektív vezet be. A szimulációkból kapott mértéke a kísérletekben mért értékekkel (~1-2 CCD pixel) jó közelítéssel megegyezik. Ahhoz, hogy a különböző színben készült képek összeegyeztethetőek legyenek egy kalibrációs módszert dolgoztam ki. A kalibrációs minta fedőlemezre felvitt pontszerűnek tekinthető, fluoreszcens golyókból állt, amelyek több hullámhosszban emittáló fluoreszcens festéket tartalmaztak. A különböző színű képeket elemezve megállapítható egy koordináta transzformáció, amely kapcsolatot teremt a különböző színű képek között. Ezután az adott rendszerrel végzett bármilyen mérés kromatikus hibája korrigálható. Valós, mért adatokon is kipróbáltam a módszert: HeLa sejtben két típusú festékkel jelölt, transferrint kötő receptorokról készült többszínű dSTORM képeken végeztem el a korrekciót. A korrekció után a képek jó átfedést mutattak. Továblépési lehetőség annak a vizsgálata, hogy a háromdimenziós, többszínű lokalizációs technikában a fellépő kromatikus hiba milyen deformításokat vezet be és van-e lehetőség ezeket korrigálni. Gyakran a többszínű mikroszkópiában a festékek megválasztásakor az infravörös tartomány felé mozdulnak el, mert ebben az esetben, a kisebb hullámhosszakkal szemben, a minta autofluoreszcenciája kisebb. Már léteznek olyan festékek, amelyek ebben a közeli infravörös tartományban működnek. Érdekes tehát ezekre a hullámhosszakra is elvégezni a vizsgálatokat.

3. Deformításokat a rekonstruált képen nem csak az optikai rendszer hibái vezethetnek be, hanem a rekonstrukciós algoritmus tökéletlensége is. A képkészítés és a minta paramétereinek optimális megválasztásával ezek az artifaktumok kiküszöbölhetőek vagy intenzitásuk elfogadható szintre mérsékelhető. Egy olyan szimulációs programot (TestSTORM) készítettem el, amely modellezi a lokalizációs mikroszkópiában a nagyfeloldású rekonstruált képhez szükséges képcsomag elkészítését. A képcsomag egy lokalizációs szoftverrel rekonstruálható és a lokalizációs algoritmus által bevezetett artifaktumok a végső kép és a TestSTORM adatai alapján megfigyelhetőek és

elemezhetőek. Az elkészült szoftver négy előre definiált mintastruktúrát tartalmaz: „csillag”, „rács”, „vezikulumok” és „fonalak”. Az első kettő mesterséges minta, az utolsó kettő pedig fluoreszcensen festett biológiai objektumokat modellez. A molekulák időbeli viselkedését egy háromállapotú modell írja le. Minden egyes molekulához külön időbeli trajektória tartozik. A szoftver figyelembe veszi a detektor (EMCCD) sajátosságait is. A képcsomagot TIF vagy RAW formátumban lehet elmenteni. A program grafikus felülettel is rendelkezik, hogy minél egyszerűbben lehessen használni. A szoftver potenciális felhasználási területei az artifaktum elemzések, a festési és optikai rendszer paraméterek optimalizálása, lokalizációs algoritmusok hatékonyságának összehasonlítása. Érdekes kérdés, hogy meglévő mérések alapján lehet-e következtetni a festék paramétereire (aktív, passzív állapot időtartama) a molekulák időbeli viselkedése alapján egy adott mintában. A módszert lehet tesztelni a TestSTORM segítségével: ismert paraméterekkel legenerált képekből következtetünk a festékparaméterekre és összevetjük a bemeneti értékekkel.

4. Külön fejezetben bemutatam minden mintatípus esetén egy-egy alkalmazást: artifaktum elemzést vagy optimalizálást. A disszertációban a program első verziója lett bemutatva, amely letölthető a kutatócsoport honlapjáról. A következő verziókban további funkciókkal fog a TestSTORM bővülni. Tervben van egy olyan kiegészítő program elkészítése, amely statisztikai kiértékelésekkel segíti a munkát. Minden mintageometria esetén, más és más függvénnyel lehet leírni a rekonstruált kép minőségét. Minden esetben a lokalizációkat veszi figyelembe és veti össze az eredeti molekula koordinátákkal. Másik továbblépési lehetőség egy, a valósághoz közelebb álló PSF modell használata. Ezért tervezem a TestSTORM és az OSLO kombinációját. A TestSTORM-ban történne a háromdimenziós minta struktúrájának megalkotása (molekulák koordinátái) és az időbeli viselkedés modellezése. Ezután az adatok alapján az OSLO elkészítené a molekulák képeit egy modellezett rendszerben adott hullámhossztartományon. Ezzel lehetővé válna különböző optikai rendszerekben a lokalizációs mikroszkópai képalkotás vizsgálata. Az OSLO-ban egyszerűen lehet az optikai elemeket modellezni és változtatni. Összevethetőek lennének a különböző háromdimenziós lokalizációs eljárások modelljei (asztigmatikus rendszer, többsíkú leképezés). További mikroszkópai technikák fejlesztésében is szerepet játszana az új verziójú TestSTORM program. Az OSLO-ban lehetőség van polarizáció érzékeny nyalábkövetésre. Ennek segítségével modellezhető egy olyan mikroszkóp, amely egymolekula szinten képes anizotrópiát vizsgálni (lokalizációs elven működő, polarizáció érzékeny detektálással rendelkező mikroszkóp). A lokalizációs mikroszkópiához tartozó, rohamosan fejlődő terület az egymolekula követésen alapuló diffúziómérés. Lényege, hogy az egymást követő képeken ugyanaz a molekula világíthat. A két kép elkészítéséhez szükséges idő alatt a molekulák elegendően nagy diffúzió esetén elmozdulhatnak (térbeli trajektóriát írnak le). Az egymást követő képek elemzésével az egyes molekulák elmozdulásait figyelve (térbeli trajektóriák elemzése) diffúziós térkép készíthető.

A Cambridge-ben dolgozó kutatócsoport egyik kutatási területe ez. Az együttműködés során egy kezdeti verziója elkészült a TestSTORM továbbfejlesztésének, amely tartalmazza a diffúzió modelljét. A kép területe csillag alakban van felosztva és az egyes karokban állítható a diffúziós koefficiens mértéke (67. ábra (a) része). Választható, hogy háromdimenziós vagy lamináris (kétdimenziós) legyen a diffúzió. Az ábra (b) és (c) része egy előzetes szimulációt mutat be. A (b) részen a beállított diffúziós koefficiens struktúra látható, míg a (c) részen a rainSTORM által megtalált térbeli trajektóriák. A kék trajektóriák a kisebb diffúziót jelzik, míg a pirosak a nagyobbat. A diffúziós térkép megjelenítését végző és kiértékelő program elkészítése még folyamatban van a cambridge-i kutatócsoportnál. A szimulációk alapján vizsgálni lehet a következő jellemzőket: Milyen hatékonysággal képes az elemző szoftver a térbeli trajektóriákat megtalálni. Milyen a feloldással mérhető a lokális diffúzió? Mekkora az a legkisebb változás a diffúzióban, amely még detektálható molekulák elmozdulásának követésével? Melyek a diffúziós koefficiens határai, ahol a módszer még működik? Milyen paraméterek mellett optimális a térbeli trajektória illesztés?

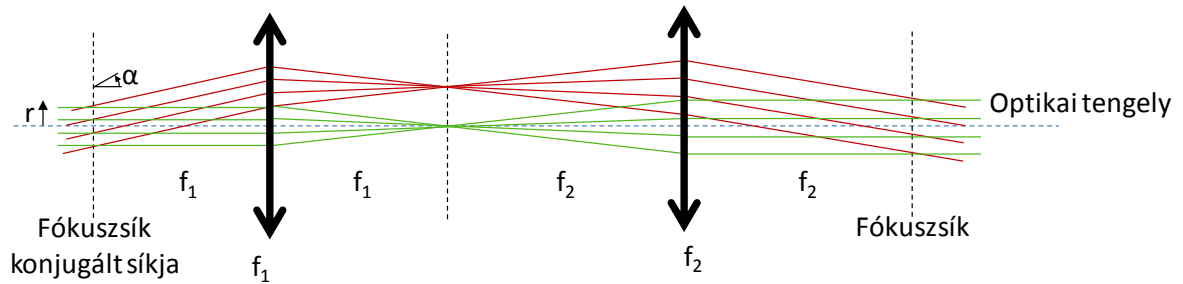


67. ábra (a): diffúzió modelljét is tartalmazó TestSTORM verzió grafikus felülete, (b) Egy szimuláció beállított diffúziós koefficiensei, (c) a rainSTORM által megtalált térbeli trajektóriák

A TestSTORM program nagy előnye, hogy az említett fejlesztések könnyen beleépíthetőek, mivel felépítése moduláris szerkezetű, könnyen lehet tovább bővíteni.

Appendix 1

Tekintsük a következő optikai rendszert, amelyet 4f rendszernek vagy relay rendszernek hívunk.



68. ábra: 4f rendszer sematikus ábrája

Mátrixoptikai számolások alapján [3] a rendszer átmeneti mátrixa az $\begin{pmatrix} r \\ \alpha \end{pmatrix}$ bázisban:

$$\begin{pmatrix} -\frac{f_2}{f_1} & 0 \\ 0 & -\frac{f_1}{f_2} \end{pmatrix} \quad (14)$$

Előáll egy f_1 rétegben szabad terjedés, egy f_1 fókusztávolságú lencse, egy f_1+f_2 rétegben szabad terjedés, egy f_2 fókusztávolságú lencse és egy f_2 rétegben szabad terjedés átviteli mátrixának szorzataként.

Az átviteli mátrix alapján látható, hogy a konjugált síkban bevezetett transláció a fókusz síkban is translációt idéz elő, míg a forgatás a fókusz síkban is forgatást eredményez. Mindkettő a fókusztávolságok arányában (nagyítás és szőgnagyítás) történik.

Ilyen rendszerek segítségével lehet az objektív fókusz síkjában vagy hátsó fókusz síkjában szükséges változtatásokat bevezetni. A 4f rendszerrel tulajdonképpen „transzportálni” lehet a fókusz síkot és a bevezetett manipulációt.

Appendix 2

Az OSLO-ban lehetőség van karakteres felületen ccl programozási nyelven rutinokat készíteni és azokat futtatni. Így lehet egyedi szimulációkat végezni, adatokat kimenteni. Egy ilyen rutin látható a 69. ábrán.

```
cmd ray_tr_hilo_xz(char fn[])
{
// e:\kutatás\STORM\hilo_oslo_2013\
// get the coordinates of intersection points of rays in the ims surface
// the initial points of rays are distributed equally along x
// input: file name

int out;
double idxray=0;
double xin;
double yin;

textwin_reset;          //reset text window
stp outp off;           //turn off text output

out=fopen(fn,"w");      //open file

    for (idxray=-1; idxray<=1; idxray=idxray+0.05)
    {
        xin=idxray;
        yin=0;
        sbr; //buffer reset

        tra std glo srf usr xin yin ims ims n 1;

        fprintf(out,"%F\t", a1); //store in the file inter x coord
        fprintf(out,"%F\t", b1); //store in the file inter y coord
        fprintf(out,"%F\t", c1); //store in the file inter z coord

        fprintf(out,"\n");

    }

    stp outp on;          //turn on text output
    printf("Saved!\n");    //print "Saved!" on text output
    fclose(out); //close file
}
```

69. ábra : Nyalábkövetés eredményét fájlba kiíró ccl program

A program az OSLO beépített nyalábkövető **tra** rutinját használja, amely *a1*, *b1* és *c1* változóiban adja vissza a megadott kezdőkoordinátájú belépő sugár, megadott síkban vett metszési pontjait. A kezdőkoordinátákat a belépő apertúrán, relatív egységekben kell megadni. Az általam írt program a belépő apertúra *x* tengelye mentén, egyenletes távolságban elindított sugarak metszéspontjait adja meg globális koordinátákban, a képsíkban, ami az utolsó felület (*img*) a modellben. Az adatokat egy megadott fájlba menti el.

A disszertáció összefoglalója

Az optikai mikroszkópok szinte már a felfedezésüktől fogva a tudományos megismerés egyik hasznos eszközei voltak. A korábban a szem által nem látható organizmusok, folyamatok láthatóvá tételével nagyban hozzájárultak a biológiai és orvosi kutatásokhoz. A fejlesztés egyik húzóága mindig is a feloldás javítása (nagyítás növelése) volt. Ahogy egyre finomabb struktúrákat oldottak fel optikai mikroszkóp segítségével újabb és újabb mikrovilágok - manapság pedig már nanovilágok - tárulnak fel. Az utóbbi évek egyik nagy mikroszkópiai technikai fejlesztése a szuperrezolúciós (szuperfeloldású) fluoreszcens optikai mikroszkópiai technikák megjelenése volt. 2014-ben a kémiai Nobel-díjat e technikák felfedezéséért osztották ki. Ezek a mikroszkópok látható tartományban üzemelnek és akár pár tíz nanométeres feloldást is képesek elérni. Nagy előnyük, hogy a hagyományos fluoreszcens mikroszkópiai technikákhoz képest nem igényelnek bonyolultabb minta előkészítést vagy komplexebb optikai rendszereket. Doktori disszertációm témája is egy szuperrezolúciós technika, a lokalizáción alapuló mikroszkópiai technika mélyebb vizsgálata. Amikor egy-egy új mikroszkópiai módszer megjelenik, rögtön elindul a részletes, mélyreható vizsgálata, határainak megkeresése (a lehetséges alkalmazási területek kutatása mellett). Dolgozatom ebbe a sorba illik bele: leképezési hibák hatásait vizsgálom a lokalizációs mikroszkópiai képkészítés során, illetve keresem, hogy milyen paraméterek mellett optimális a képkészítés, hogyan küszöbölhetőek ki az elkészült képen a képkészítés művi melléktermékei, az artifaktumok.

Egy mikroszkóp egyik legfontosabb értékmérője a feloldás. A feloldásnak definiálására és a feloldás határának megállapítására az idők során több definíció is született, ezek közül a Rayleigh és a Sparrow kritérium a legelterjedtebb. Mindkét esetben egy kritikus távolság (CD, Critical Distance) kerül meghatározásra, amelynél kisebb távolságra elhelyezkedő pontszerű objektumok már nem tekinthetők feloldhatónak képeik alapján. A látható hullámhossz tartományban, a kereskedelmi forgalomban elérhető legnagyobb numerikus apertúrát tekintve, a feloldásnál laterális irányban $\sim 200\text{-}250$ nm-nél, axiális irányban pedig ~ 500 nm-nél egy határ húzódik, melyet a diffrakció limitál. Ez a határ megkerülhető, minden esetben valamilyen trükköt alkalmazva a képképzési technika során. Tehát elérhetőek a kritériumok által meghatározott feloldások alatti feloldásértékek. A diffrakció természetesen továbbra is fellép és meghatározó szerepet játszik a képképzésben. A hagyományos feloldási határokat átlépő, azoknál jobb feloldást ígérő technikákat, szuperfeloldású mikroszkópiai technikáknak hívjuk. Egy ilyen technika a lokalizációs mikroszkópia.

A hagyományos fluoreszcenciás technikák esetén a gerjesztett tartományban elhelyezkedő molekulák mindegyike aktív állapotban van, azaz gerjeszthető. A lokalizációs mikroszkópia során

fotokémiai folyamatok révén érjük el azt, hogy egy időben a leképezendő tartományban csak kevés számú molekula legyen aktív állapotban, így az egyes molekulák diffrakciós foltjainak leképezését időben szétválasztjuk. Tulajdonképpen egy videót (képcsomagot) készítünk a mintáról, amelynek egyes képkockáin az adott időpontban aktív molekulák képei láthatóak, tehát a video a fluoreszcens molekulák villódzásából áll. Az egyes képkockákat külön-külön kielemezve, a molekulák képeire függvényt illesztve, a molekulák pontos pozíciói meghatározhatóak. A képcsomag összes képére elvégezve az elemzést, fel lehet térképezni azt, hogy hol találhatóak fluoreszcens molekulák a mintában. Különböző technikák léteznek a festékmolekulák kapcsolási mechanizmusának kivitelezésére és vezérlésére: PALM, PhotoActivated Localization Microscopy, STORM, Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, FPALM, Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy, dSTORM, (directSTORM), GSDIM, (ground state depletion microscopy followed by individual molecule return). Disszertációmban a dSTORM technikát tanulmányoztam.

A többszínű mikroszkópia lehetővé teszi, hogy különböző biológiai objektumokat szeparáltan figyelhessünk meg. Mindez a fluoreszcens festési módszer során kialakuló specifikus jelölésnek köszönhető. Két megközelítés létezik: A szimultán, többcsatornás módszer esetén, több hullámhosszon egyszerre történik a gerjesztés és a detektor karban egy dichroikus tükör segítségével választhatóak szét a különböző színű fluoreszcens képek, amelyeket különálló kamerákkal rögzítenek, vagy pedig a képeket egyetlen kamera, különböző területeire irányítja. A szekvenciális, egycsatornás rendszerben mindig egy hullámhosszon történik a gerjesztés. A különböző színű képeket egymás után veszik fel. Lokalizációs elven működő mikroszkóppal is lehetséges többszínű leképezést készíteni.

A lokalizációs mikroszkópiában, hasonlóan a többi optikai mikroszkóphoz, fellépnek a leképezési hibák. Ezek hatása a nagy feloldás miatt még inkább szignifikáns. Mindezek mellett a képfeldolgozás során felléphetnek képrekonstrukciós hibák is, amelyek a végső képen művi melléktermékek (artifaktumok) megjelenését okozhatják. Dolgozatomban a lokalizációs elven működő mikroszkópiában leképezési és képfeldolgozási hibák által okozott effektusok mélyebb vizsgálatát végeztem el, hogy a technika mélyebb megértéséhez hozzájáruljak. Különböző effektusokat fogok vizsgálni a lokalizációs mikroszkóp teljes képalkotása folyamán: a mikroszkóp kivilágításában, többszínű leképezésében és a képrekonstrukció során. Korrekciós metódusokat is kidolgozok.

Célkitűzéseim a következők voltak:

1. A mikroszkóp kivilágításánál hagyományosnak tekinthető az epifluoreszcens technika. Ekkor a teljes ROI ki van világítva és a fókusz síkon kívülről érkező fluoreszcens jel jelentős. A kutatók olyan ferdeszögű kivilágítási metódusokat fejlesztettek ki, amelyek ezt

a fajta háttérrel hatékonyan csökkentik. Ezek a kivilágítások egyre nagyobb népszerűségnek örvendenek, de mélyreható, a lokalizációs mikroszkópiához szükséges precizitás szintjén történő elemzésük ez idáig nem történt meg. Az optikai rendszerekben elkerülhetetlen leképezési hibák jelentősen befolyásolják a különböző kivilágítások megvalósítását. Egy olyan elemzés, amely konkrét, modellezett optikai rendszerben elvégzett számolásokon alapul, a kivilágítási technikák megvalósítása, a mikroszkóprendszer építése során segítségül szolgál. A megállapított trendek segítik a leképezés során a kivilágítás szerepének megértését. **Ezek alapján elsőként egy ilyen, a különböző kivilágítási technikák mélyreható, nyalábkövetésen alapuló elemzését tűzöm ki. [93]**

2. Nem csak a kivilágítás során, hanem a mikroszkóp detektáló nyalábútjában elhelyezkedő optikai elemek is jelentős aberrációt vezethetnek be, melyek rontják az elkészült kép minőségét. A lokalizációs mikroszkópiában a többszínű detektálás hatékony módszer különböző biológiai objektumok feltérképezésére a specifikus fluoreszcens jelölésnek köszönhetően. A többszínű detektálás esetén kulcskérdés a különböző hullámhosszakhoz tartozó rekonstruált képek összeillesztése, regisztrálása. Az optikai elemek diszperziója miatt azonban kromatikus hiba lép fel a leképezés során. A gyártók megpróbálják ezt korrigálni, kiküszöbölni. Így a hagyományos fluoreszcens mikroszkópok esetében a kromatikus hiba hatása nem jelentős. Azonban a lokalizációs mikroszkópiában a feloldás a pár tíz nanométeres tartományba esik és a gyártók által optimalizált optikai elemek (elsősorban mikroszkóp objektívek, szűrők) esetén a hiba érezteti hatását a feloldáshoz képest. Ezért szükséges a hiba eredetét felderíteni, mértékét megállapítani és egy kalibrációs módszert kidolgozni a korrigáláshoz. **Ezért második célkitűzésként a kromatikus hiba részletes analízisének elvégzését és egy korrekciós módszer kidolgozását tűzöm ki. [94]**
3. Az elkészült kép minőségét nem csak az optikai elemek által bevezetett aberrációk, hanem a lokalizációs mikroszkópiában kulcsszerepet játszó lokalizációt végző rekonstrukciós algoritmusok is befolyásolják. A képkészítés paraméterei, mint például a pixelméret vagy a képkészítési frekvencia szintén kritikus paraméterek, amelyek optimalizálásra szorulnak. Ehhez szükség van egy olyan szimulációs szoftvercsomagra, amely modellezi a teljes képkészítést a lokalizációs mikroszkópiában. Legenerálja a minta geometriája alapján a fluoreszcens festékmolekulák koordinátáit és modellezi időbeli viselkedésüket. A leképező rendszer paramétereit figyelembe véve elkészíti a szimulált képcsomagot, amely bármilyen elérhető lokalizációs rekonstrukciós algoritmus bemeneteként szolgál. **Harmadik pontként egy ilyen tesztminta generáló, szimulációs szoftver elkészítését tűzöm ki célul. [95]**
4. A rekonstruált képen a lokalizációs, rekonstrukciós algoritmus tökéletlensége okán képrekonstrukciós hibák, artifaktumok jelennek meg. Ezek az artifaktumok nagyban

függnek a minta geometriájától és festési paramétereitől (festési sűrűség), illetve a leképező rendszer paramétereitől. Megjelenésük legfőbb oka, hogy az átfedő molekulaképek esetén a lokalizáció pontatlan és hamis molekulapozíciókat állapít meg a lokalizációs algoritmus. Az optimalizálási folyamat célja, hogy olyan paramétereket állapítson meg, amelyek mellett a molekulaképek átfedési valószínűsége alacsony.

Negyedik célkitűzésem, hogy a TestSTORM program segítségével különböző geometriájú minták esetén lehetséges artifaktumok elemzését elvégezzem. [95]

Az egyes pontokban a következő eredményeket értem el:

Kivilágítási technikákat vizsgáltam OSLO nyalábkövető, optikai modellező szoftver segítségével. A minta mozgatásával történő pozicionálás után, a különböző mélységben elhelyezkedő fókuszszík leképezéséhez különböző kivilágítási technikák az optimálisak. Egyik legfontosabb cél a fókuszszíkon kívülről érkező jel csökkentése. Erre kínálnak megoldást a ferdeszögű kivilágítási technikák (VAEM, Variable Angle Epifluorescence Microscopy, HILO, Highly Inclined and Laminated Optical sheet microscopy, TIRF, Total Internal Reflection Fluorescence microscopy). Egy lehetséges optikai elrendezés modelljén mutattam be ezen kivilágítások megvalósítását és az optikai elemek nem ideális volta miatt fellépő jelenségeket. Elsősorban a lokalizációs mikroszkópiában fellépő potenciális problémákra helyeztem a hangsúlyt. A rendszer kivilágítási optikai útjában megfelelő helyeken, tükrökkel forgatásokat bevezetve, a ferdeszögű kivilágítások megvalósíthatóak. Megmutattam, hogy a hagyományosnak tekinthető EPI kivilágításból TIRF kivilágításba való átmenetkor, az átmenet teljes reflexióba folyamatos, nem egyszerre következik be a nyalábot alkotó összes sugár esetében. Továbbá kis ROI-t használva a kivilágítás decentralálttá válhat, ami egy plusz tükrörforgatással korrigálható. A mintában mélyebben elhelyezkedő fókuszszík esetében megvizsgáltam a VAEM és a HILO kivilágításokat. A HILO kivilágításhoz kalibrációs módszert alkottam, amely később egy lokalizációs mikroszkóp megépítésénél szolgál segítségül. Bemutattam, hogy a korrekció során a már teljes visszaverődést szenvedett sugarak újra törést szenvedhetnek és visszatérhetnek a mintába. A pozicionálást objektív mozgatásával elvégezve, a kivilágítás elmozdul a ROI középhez képest és így az nem lesz tökéletesen kivilágítva. A további korrekcióhoz kalibrációs eljárást mutattam be.

Többszínű lokalizációs mikroszkópiában gyakran használt elrendezés az egysatornás leképezés. Ebben az esetben a különböző hullámhosszú képcsomagokat egymás után veszik fel. Az optikai elemek kromatikus hibája miatt a különböző színekben készült képek nem összeilleszthetőek. Tekintve két ugyanazon a helyen elhelyezkedő, két különböző hullámhosszon emittáló fluoreszcens pontszerű forrást, képük nem ugyanazon a helyen helyezkedik el a két hullámhossz esetén (távolságuk a kromatikus offset). Megállapítottam az OSLO-ban elvégzett szimulációk alapján, hogy a hiba fő oka a kromatikus aberráció mellett a szférikus aberráció, amelyet

elsősorban az objektív vezet be. A szimulációkból kapott mértéke a kísérletekben mért értékekkel (~1-2 CCD pixel) jó közelítéssel megegyezik. Ahhoz, hogy a különböző színben készült képek összeegyeztethetők legyenek egy kalibrációs módszert dolgoztam ki. A kalibrációs minta fedőlemezre felvitt pontszerűnek tekinthető, fluoreszcens golyókból állt, amelyek több hullámhosszban emittáló fluoreszcens festéket tartalmaztak. A különböző színű képeket elemezve megállapítható egy koordináta transzformáció, amely kapcsolatot teremt a különböző színű képek között. Ezután az adott rendszerrel végzett bármilyen mérés kromatikus hibája korrigálható. Valós, mért adatokon is kipróbáltam a módszert: HeLa sejtben két típusú festékkel jelölt, transferrint kötő receptorokról készült többszínű dSTORM képeken végeztem el a korrekciót. A korrekció után a képek jó átfedést mutattak.

Deformitásokat a rekonstruált képen nem csak az optikai rendszer hibái vezethetnek be, hanem a rekonstrukciós algoritmus tökéletlensége is. A képkészítés és a minta paramétereinek optimális megválasztásával ezek az artifaktumok kiküszöbölhetőek vagy intenzitásuk elfogadható szintre mérsékelhető. Egy olyan szimulációs programot (TestSTORM) készítettem el, amely modellezi a lokalizációs mikroszkópiában a nagyfeloldású rekonstruált képhez szükséges képcsomag elkészítését. A képcsomag egy lokalizációs szoftverrel rekonstruálható és a lokalizációs algoritmus által bevezetett artifaktumok a végső kép és a TestSTORM adatai alapján megfigyelhetőek és elemezhetőek. Az elkészült szoftver négy előre definiált mintastruktúrát tartalmaz: „csillag”, „rács”, „vezikulumok” és „fonalak”. Az első kettő mesterséges minta, az utolsó kettő pedig fluoreszcensen festett biológiai objektumokat modellez. A molekulák időbeli viselkedését egy háromállapotú modell írja le (aktív, passzív és bleached (kiégett) állapot). Minden egyes molekulához külön időbeli trajektória tartozik. A szoftver figyelembe veszi a detektor (EMCCD) sajátosságait is. A képcsomagot TIF vagy RAW formátumban lehet elmenteni. A program grafikus felülettel is rendelkezik, hogy minél egyszerűbben lehessen használni. A szoftver potenciális felhasználási területei az artifaktum elemzések, a festési és optikai rendszer paraméterek optimalizálása, lokalizációs algoritmusok hatékonyságának összehasonlítása. Érdekes kérdés, hogy meglévő mérések alapján lehet-e következtetni a festék paramétereire (aktív, passzív állapot időtartama) a molekulák időbeli viselkedése alapján egy adott mintában. A módszert lehet tesztelni a TestSTORM segítségével: ismert paraméterekkel legenerált képekből következtetünk a festékparaméterekre és összevetjük azokat a bemeneti értékekkel. Minden mintatípus esetén egy alkalmazást mutattam be: artifaktum elemzést vagy optimalizálást.

Summary

Introduction

Optical microscope is an effective tool in the biological and biomedical research to investigate samples in non-invasive way. A main direction in the development of microscopes is to improve their resolution (to achieve larger magnification) and therefore resolve finer structures in the sample and acquire more detailed images. In the last few years, the evolvement of the so-called superresolution fluorescent microscopy techniques was the most highlighted discovery in the microscopy. In 2014 the Nobel Prize in Chemistry was awarded for the development of super-resolved fluorescence microscopy. This kind of microscopes operates in the optical wavelength range and with resolution at few tens of nanometer. One of their advantages is that they do not need more complex sample preparation or optical imaging system than the conventional fluorescent microscopy technique. The main topic of my thesis is to study particularly one type of these new superresolution microscopy techniques, the so called localization based superresolution microscopy technique. The effects of optical aberrations and artifacts emerged during the image processing were analyzed. The sources of the errors appeared in the imaging were investigated and in all cases a correction or optimization method was suggested and realized.

Theoretical background

To quantify a microscope, resolution is a great measure. Several concepts were emerged to define the resolution and determine the limit of that. Widely used ones are the Rayleigh and the Sparrow criterion for the resolution limit. These criterions define a Critical Distance (CD), where two point-like objects are placed at this distance and below that these two points are not distinguishable after the imaging. Typically ~200 nm and ~ 500 nm resolutions can be achieved in lateral and axial direction, respectively, in the optical wavelength range and by using commercially available microscope objectives with high numerical aperture (~1.49). The resolution is limited by the diffraction of the light. However, the above mentioned limits can be exceeded using a trick during the imaging. The diffraction plays key rule in these superresolution techniques too, but does not limit the resolution. One type of these techniques is the localization based superresolution microscopy technique. In the conventional fluorescence microscopy all of the fluorescent dye molecules placed in the excited area in the sample emit fluorescent photons in contrast to the localization based techniques where only a few molecules are in active state in the Region Of Interest (ROI) due to photochemical processes. These individual molecules are imaged by means of a high magnification imaging system and an ultrasensitive camera (EMCCD, Electron multiplying CCD). The images of the molecules are fitted and the central positions (which are the positions of the molecules in the sample) are localized. Repeating this procedure by switching on new

molecules and switching off the currently active ones, a map about the dye molecules can be achieved. This is a superresolved image about the sample with a few tens of nanometer resolution. The localization based techniques are: PALM, PhotoActivated Localization Microscopy [38], STORM, Stochastic Optical Reconstruction Microscopy [39], FPALM, Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy [40], dSTORM, directSTORM [41], GSDIM, ground state depletion microscopy followed by individual molecule return [42]. These differ from each other in the way of photoswitching.

Multi-color microscopy serves as an effective tool to observe separately several biological objects due to the specific fluorescent labeling. Two approaches to multi-color imaging can be distinguished. The sequential approach captures the two (or more) images at different times and uses the full size of the CCD chip. In the simultaneous approaches, the image is split into two spectral channels and then imaged onto different regions of the CCD chip. I favored the sequential (single channel) method in the thesis.

Objectives

The quality of the superresolved image can be degraded by errors occurring during the imaging or in the image processing. In my thesis errors and artifacts were analyzed in localization based microscopy, which are caused by optical aberrations and the imperfectness of image reconstruction. These errors are rooted in the imperfectness of optical elements in the illumination or detection path and in the imperfect localization process, respectively. My aims were the following collected into points:

1. The epifluorescent illumination is a conventional illumination in the wide-field fluorescence microscopy. In this case the whole region of interest is illuminated and the out of focus signal is significant and can be disturbing for the imaging and degrade the quality of the final image. To reduce the out of focus signal, new illumination methods were invented, which illuminate the sample obliquely. These inclined illuminations have growing popularity but their practical implementation into the microscope systems is still challenging and that has yet to be studied in detail taking into consideration the effects of optical aberrations. **I modeled the various types of wide field illuminations in a realistic microscope system model by means of ray tracing method. [93]**
2. Not only the optical elements placed in the illumination path can introduce significant aberrations but ones placed in the detector path too. One and the most significant of these optical aberrations is the chromatic aberration. This affects significantly the multicolor imaging which is an effective tool in the microscopy to detect separately different biological objects due to the multicolor labeling. In the multicolor detection an essential

question is the co-registration of the images captured at different wavelengths. Because of the presence of the chromatic aberration a chromatic error emerges in the imaging: the image of a point-like object takes different place in the image plane depending on the emission wavelength. In the conventional microscopy techniques this error is corrected and eliminated well at that range of resolution (~200nm). But at the level of resolution of localization microscopy (~10-20nm) it is still significant and can lead misconception in the measurements. **Therefore a correction method is required to co-register the different color image channels at nanometers level. I provided both experimental and theoretical result to assess the effects of chromatic error and demonstrate a performance for co-registration. [94]**

3. Localization-based super-resolution microscopy image quality depends on further factors as well, such as dye choice and labeling strategy, microscope quality and user-defined parameters such as frame rate and number as well as the image processing algorithm. The imperfect imaging parameters can lead to appearance of artifacts on the final image. To eliminate or minimize these, an optimization is required for the parameters. Experimental optimization of these parameters can be time-consuming and expensive. **Therefore I created a software (TestSTORM) which models the whole imaging process in the localization based microscopy. [95]**
4. The significance and quality of artifacts depends on the sample geometry and the imaging parameter such as labeling density, frame rate or pixel size. The overlapping molecule images cause mis-localizations and that is the main reason of the appearance of the artifacts. The aim is to reduce the probability of the overlapping. **Therefore I studied how possible artifacts can occur and how an optimization can perform to determine an optimal process window in the parameter space for imaging in case of four types of sample geometry. [95]**

New scientific results

In the following I shortly present the new scientific results according to the pointed aims described above.

I demonstrated an analysis of optimal illuminations applied in wide-field microscopy, especially focusing on localization based microscopy issues arising because of the imperfect optical elements. I studied the possible illumination methods of region of interest (ROI) at several depths in the sample. I used a modeled microscope system in OSLO optical design software. An essential question is to reduce the out of focus signal. This can be achieved with the inclined illumination techniques such as VAEM (Variable Angle Epifluorescence Microscopy), HILO (Highly Inclined and Laminated Optical sheet microscopy) or with TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)

illumination instead of conventional EPI (epifluorescence) illumination. I found that a correction was required after the EPI-TIRF transition for centered illumination in the TIRF mode. In case of deeper placed ROI illumination a calibration curve was added for the correction in case of HILO illumination. I investigated the effect of the positioning process of ROI in the sample by moving the objective. Due to focus dislocation, the ROI was not illuminated entirely, therefore additional correction was needed. A calibration curve was given for this additional correction too.

I presented a method to assess the effect of chromatic error in multicolor localization based microscopy. Chromatic error causes image distortion on the sub-wavelength scale even for highly corrected microscope optics. I showed that in the single channel approach the most critical source of this error is the lateral chromatic aberration introduced by the microscope objective. The distortion is a slowly varying function of optical aperture coordinates and is temporally invariant. I have presented a method for measuring chromatic offsets in practical microscope systems and compared the results with ray-tracing calculations. It showed good qualitative agreement. I presented a correction method also: co-ordinates from different color channels can be effectively mapped onto one another yielding co-localization precisions of the order of one super-resolved pixel or less. I demonstrated the effectiveness of the method in case of a measurement of real biological sample through observation of membrane protein clustering and vesicle formation.

Deformities can be caused by the imperfect localization procedure and non-optimized imaging parameters too. To study this question, I developed a program (TestSTORM) for modeling the whole imaging process in a localization based fluorescence microscope. Four types of sample are provided with different geometry: star, array, vesicles and lines. The algorithm creates the structure of the sample, generates a temporal trajectory of photoswitching fluorescent states to each dye molecule according to the three-state model (active, passive and bleached states) and simulates the image acquisition process. The output of the software is a frame stack which can be reconstructed and analyzed further with localization algorithms such as rainSTORM or rapidSTORM.

I demonstrated the effectiveness of the program for analyzing and exploring artifacts in localization microscopy. The z-dependent resolution, the effect of the labeling density on a structure, the high intensity ends and the bridge formations were analyzed with the star, array, lines and vesicles pattern, respectively.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőim mindennemű támogatását, segítségét és legfőképpen türelmét, amelyre a legnagyobb szükségük volt doktori tanulmányaim során.

Köszönetet mondok az Advanced Optical Imaging (AdOptIm) kutatócsoport valamennyi jelenlegi és korábbi tagjának, amiért kellemes légkörben, jó hangulatban tudtam munkámat végezni és mindig a segítségemre siettek, ha problémám adódott.

Hálás vagyok az Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék valamennyi munkatársának, hogy befogadtak és segítségemre voltak apró-csetlő pillanataimban.

Köszönettel tartozom a cambridge-i Laser Analytics illetve a londoni National Physical Laboratory, Biophysics and Diagnostics kutatócsoportnak a termékeny együttműködésért.

És most következik a hátszág:

Leginkább szüleimnek és közvetlen családomnak vagyok hálás a biztos alapokért, a stabil tetőért a fejem felett, de leginkább türelmükért. Köszönöm, hogy mindig meghallgattak, még ha nem is voltam mindig követhető vagy érthető és persze, hogy nem beszéltünk sokat a munkáról és hogy mindvégig magukban tartották a kérdést: „Kire ütött ez a gyerek?”. A jövőben is számítok rájuk...

Köszönetet mondok barátaimnak és ismerőseimnek, hogy viszonylag kevésszer került elő a kérdés: „Mivel is foglalkozol tulajdonképpen?” és ha véletlenül előjött, akkor is megelégedtek a válasszal: „Optikával, mikroszkópiával.”

Köszönetem fejezem ki minden embernek, aki nem csak a doktori dolgozatomat, de még a köszönetnyilvánítást is elolvasta.

Te Deum laudamus!

Doktori tanulmányaim során a munkám a következő pályázati források támogatták: TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0060, TÁMOP-4.2.2.C-11/1/KONV-2012-0010, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0012, OTKA-NKTH CNK 78549, Nemzeti Agykutató Program (KTIA_13_NAP-AI/14), Apáczai Csere János Doktoranduszi Ösztöndíj (Nemzeti Kiválóság Program, TÁMOP-4.2.4.A/ 2-11/1-2012-0001), Campus Hungary Ösztöndíj (TÁMOP-4.2.4B/2-11/1- 2012-0001). Az OSLO optikai szimulációs programot a Lambda Research Corporation bocsájtotta rendelkezésre.

Irodalomjegyzék

1. M. Born and E. Wolf, *Principles of Optics* (Pergamon Press, New York, 1965) Chapter 8.
2. B.D. Guenther, *Diffraction*, in Encyclopedia of Modern Optics, edited by B.D. Guenther, Editor in Chief, vol. 2 (2005).
3. R. D. Guenther, *Modern Optics* (Wiley, New York, 1990) Chapter 9-11.
4. Airy, G. B., "On the Diffraction of an Object-glass with Circular Aperture," Transactions of the Cambridge Philosophical Society **5**, 283-291 (1835).
5. L. Novotny and B. Hecht, *Principles of Nano-Optics* (Cambridge University Press, New York, 2006)
6. E. Wolf, "Electromagnetic diffraction in optical systems, I. An integral representation of the image field," Proc.R. Soc. London Ser. A **253**, 349–357 (1959).
7. B. Richards, E. Wolf, "Electromagnetic diffraction in optical systems, II. Structure of the image field in an aplanatic system," Proc. R. Soc. London Ser. A **253**, 358–379 (1959).
8. K. Youngworth and T. Brown, "Focusing of high numerical aperture cylindrical-vector beams," Opt. Express **7**, 77-87 (2000).
9. S. Guha and G. Gillen, "Description of light propagation through a circular aperture using nonparaxial vector diffraction theory," Opt. Express **13**, 1424-1447 (2005).
10. J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3rd, (Springer, New York, 2006)
11. Sheppard C.J.R. and Choudhury A., "Image formation in the scanning microscope", Optica **24**, 1051., (1977).
12. Minsky M., "Microscopy apparatus", US Patent 3013467, (1961)
13. A. Diaspro, *Confocal and Two-Photon Microscopy: foundations, references and advances*, Chapter 3, (Wiley-Liss Inc., 2002)
14. G. S. Kino, and T. R. Corle, „Confocal scanning optical microscopy”, Physics Today **42**, 55-62 (1989).
15. M. Petran, M. Hadravsky, M. D. Egger, and R. Galambos, "Tandem-Scanning Reflected-Light Microscope," J. Opt. Soc. Am. **58**, 661-664 (1968).
16. H. Osterberg and J. E. Wilkins, Jr., "The Resolving Power of a Coated Objective," J. Opt. Soc. Am. **39**, 553-557 (1949).
17. L. R. Qiu, X. Ding, and J. Liu, "Confocal measurement approach for enhancing lateral resolution using a phase-only pupil," J. Phys. Conf. Ser. **13**, 422–425 (2005).
18. M. Martinez-Corral, P. Andres, C. J. Zapata-Rodriguez, and M. Kowalczyk, "Three dimensional superresolution by annular binary filters," Opt. Commun. **165**, 267–278 (1999).
19. Min Gu, C.J. R. Sheppard, "Three-dimensional Imaging in Confocal Fluorescent Microscopy with Annular Lenses," Journal of Modern Optics **38**(11) (1991).

20. M. A. A. Neil, R. Juskaitis, T. Wilson, Z. J. Laczik and V. Sarafis, "Optimized pupilplane filters for confocal microscope point-spread function engineering," *Opt. Lett.* **25**, 245-247 (2000)
21. B. R. Boruah, "Lateral resolution enhancement in confocal microscopy by vectorial aperture engineering," *Appl. Opt.* **49**, 701 -707 (2010).
22. S. Hell and E. H. K. Stelzer, "Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope," *J. Opt. Soc. Am. A* **9**, 2159-2166 (1992).
23. E. H. K. Stelzer, S. Lindek "Fundamental reduction of the observation volume in farfield light-microscopy by detection orthogonal to the illumination axis - confocal theta microscopy", *Opt. Commun.* **111**, 536-547 (1994).
24. S. W. Hell, S. Lindek, C. Cremer, E. H. K. Stelzer, "Measurement of the 4Pi-confocal point spread function proves 75 nm axial resolution," *Appl. Phys. Lett.* **64**, 1335-1337 (1994).
25. J. B. Pawley, *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3rd, (Springer, New York, 2006) Chapter 30.
26. S. W. Hell, "Far-field optical nanoscopy," *Science* **316**(5828), 1153–1158 (2007).
27. S. W. Hell and J. Wichmann, "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated emission-depletion fluorescence microscopy," *Opt. Lett.* **19**(11), 780–782 (1994).
28. K. I. Willig, B. Harke, R. Medda, and S. W. Hell, "STED microscopy with continuous wave beams," *Nat. Methods* **4**(11), 915–918 (2007).
29. <http://www.laserfocusworld.com/articles/print/volume-48/issue-01/features/super-resolution-sted-microscopy-advances-with-yellow-cw-opsl.html>, (2014. november 15.)
30. B. Hein, K. I. Willig; S. W. Hell, "Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105** (38): 14271–14276 (2008)
31. D. Wildanger, R. Medda, L. Kastrup, and S. W. Hell, "A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution," *J. Microsc.* **236**(1), 35–43 (2009).
32. F. Göttfert, C. A. Wurm, V. Mueller, S. Berning, V. C. Cordes, A. Honigmann, and S. W. Hell, "Coaligned Dual-Channel STED Nanoscopy and Molecular Diffusion Analysis at 20 nm Resolution," *Biophys. J.* **105**(1), L01–L03 (2013).
33. P. Bingen, M. Reuss, J. Engelhardt, and S. W. Hell, "Parallelized STED fluorescence nanoscopy," *Opt. Express* **19**, 23716-23726 (2011).
34. M. G. L. Gustafsson, "Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy," *J. Microsc.* **198**(2), 82–87 (2000).
35. T. Lang, and S. Rizzoli, „Membrane protein clusters at nanoscale resolution: more than pretty pictures", *Physiology (Bethesda)* **25**, 116-124 (2010).
36. <http://www.npl.co.uk/upload/pdf/Correlative%20super%20resolution%20using%20dSTORM%20and%20SIM.pdf>, (2014. november 15.)

37. M. G. L. Gustafsson "Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution in Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America" 13081-13086 (2005).
38. SE. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess, "Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution," *Science* **313**(5793), 1642–1645 (2006).
39. M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)," *Nat. Methods* **3**(10), 793–796 (2006).
40. S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, and M. D. Mason, "Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy," *Biophys. J.* **91**(11), 4258–4272 (2006).
41. M. Heilemann, S. van de Linde, A. Mukherjee, and M. Sauer, "Super-resolution imaging with small organic fluorophores," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**(37), 6903–6908 (2009).
42. J. Fölling, M. Bossi, H. Bock, R. Medda, C. A. Wurm, B. Hein, S. Jakobs, C. Eggeling, and S. W. Hell, "Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return," *Nat. Methods* **5**(11), 943–945 (2008).
43. H. Shroff, C. G. Galbraith, J. A. Galbraith, and E. Betzig, "Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics," *Nat. Methods* **5**(5), 417–423 (2008).
44. S-H. Shim, C. Xia, G. Zhong, H.P. Babcock, J.C. Vaughan, B. Huang, X. Wang, C. Xu, G-Q. Bi, X. Zhuang "Super-resolution Fluorescence Imaging of Organelles in Live Cells with Photoswitchable Membrane Probes", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 13978-13983 (2012).
45. S. van de Linde, A. Löschberger, T. Klein, M. Heidbreder, S. Wolter, M. Heilemann, and M. Sauer, "Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes," *Nat. Protoc.* **6**(7), 991–1009 (2011)
46. <http://www.emccd.com/>, (2014. november 15.)
47. <http://www.scmos.com/>, (2014. november 15.)
48. <http://www.andor.com/>, (2014. november 15.)
49. H. T. Beier, B. L. Ibey, „Experimental comparison of the high-speed imaging performance of an em-ccd and scmos camera in a dynamic live-cell imaging test case”, *PloS one* **9**, e84614 (2014).
50. <http://www.andor.com/scientific-cameras/ixon-emccd-camera-series>, (2014. november 15.)
51. S. van de Linde and M. Sauer, "How to switch a fluorophore: From undesired blinking to controlled photoswitching," *Chem. Soc. Rev.* **43**(4), 1076–1087 (2014).
52. S. Wolter, M. Schüttelz, M. Tscherepanow, S. Van De Linde, M. Heilemann, and M. Sauer, "Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images," *J. Microsc.* **237**(1), 12–22 (2010).
53. S. J. Holden, S. Uphoff, A. N. Kapanidis, „DAOSTORM: an algorithm for high- density super-resolution microscopy”, *Nat. Methods* **8**, 279–280 (2011).

54. L. Zhu, W. Zhang, D. Elnatan, B. Huang, „Faster STORM using compressed sensing”, *Nat. Methods* **9**, 721–723 (2012).
55. Y.S. Hu, X. Nan, P. Sengupta, J. Lippincott-Schwartz, H. Cang, „Accelerating 3B single-molecule super-resolution microscopy with cloud computing”, *Nat. Methods* **10**, 96–97 (2013).
56. E. A. Mukamel, H. Babcock, X. Zhuang, „Statistical deconvolution for superresolution fluorescence microscopy”, *Biophys. J.* **102**, 2391–2400 (2012).
57. Y. Wang, T. Quan, S. Zeng, Z.-L. Huang, „PALMER: a method capable of parallel localization of multiple emitters for high-density localization microscopy,” *Opt. Express* **20**, 16039–16049 (2012).
58. E. J. Rees, M. Erdelyi, D. Pinotsi, A. Knight, D. Metcalf, and C. F. Kaminski, “Blind assessment of localization microscopy image resolution,” *Opt. Nanoscopy* **1**(1), 12 (2012).
59. <http://laser.cheng.cam.ac.uk/wiki/index.php/Resources>, (2014. november 15.)
60. E. W. Weisstein, "Nonlinear Least Squares Fitting." From MathWorld--A Wolfram Web Resource. <http://mathworld.wolfram.com/NonlinearLeastSquaresFitting.html>, (2014. november 15.)
61. E. W. Weisstein, "Levenberg-Marquardt Method." From MathWorld--A Wolfram Web Resource. <http://mathworld.wolfram.com/Levenberg-MarquardtMethod.html>, (2014. november 15.)
62. E. W. Weisstein, "Maximum Likelihood." From MathWorld--A Wolfram Web Resource. <http://mathworld.wolfram.com/MaximumLikelihood.html>, (2014. november 15.)
63. F. Huang, S. L. Schwartz, J. M. Byars, and K. A. Lidke, “Simultaneous multiple-emitter fitting for single molecule super-resolution imaging,” *Biomed. Opt. Express* **2**(5), 1377–1393 (2011).
64. Erdélyi Miklós, Sinkó József: *Optikai pointillizmus: a lokalizációs optikai mikroszkópia*, Fizikai Szemle, 2014. május
65. S. Stallinga and B. Rieger, “Accuracy of the Gaussian point spread function model in 2D localization microscopy,” *Opt. Express* **18**(24), 24461–24476 (2010).
66. M. J. Mlodzianoski, M. F. Juetten, G. L. Beane, and J. Bewersdorf, "Experimental characterization of 3D localization techniques for particle-tracking and super-resolution microscopy," *Opt. Express* **17**, 8264-8277 (2009).
67. A. Small, and S. Stahlheber, "Fluorophore localization algorithms for super-resolution microscopy", *Nat Meth* **11**, 267-279 (2014).
68. R. E. Thompson, D. R. Larson, and W. W. Webb, “Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes,” *Biophys. J.* **82**(5), 2775–2783 (2002).
69. N. Banterle, K. H. Bui, E. A. Lemke, and M. Beck, “Fourier ring correlation as a resolution criterion for super-resolution microscopy,” *J. Struct. Biol.* **183**(3), 363–367 (2013).

70. K. I. Mortensen, L. S. Churchman, J. A. Spudich, and H. Flyvbjerg, "Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy," *Nat. Methods* **7**(5), 377–381 (2010).
71. H. Deschout, F. Zanicchi, M. Mlodzianoski, A. Diaspro, J. Bewersdorf, S. Hess, and K. Braeckmans, "Precisely and accurately localizing single emitters in fluorescence microscopy," *Nat. Methods* **11**, 253–266 (2014).
72. B. Huang, W. O. Wang, M. Bates, M. and X. W. Zhuang, "Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy," *Science* **319**, 810–813 (2008).
73. M. F. Juetten *et al.*, "Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples," *Nat. Methods* **5**, 527–529 (2008).
74. G. Shtengel *et al.*, "Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 3125–3130 (2009).
75. S. R. P. Pavani and R. Piestun, "Three dimensional tracking of fluorescent microparticles using a photon-limited double-helix response system," *Opt. Express* **16**, 22048–22057 (2008).
76. J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, and E. H. K. Stelzer, "Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy," *Science* **305**(5686), 1007–1009 (2004).
77. J. Huisken, J. Swoger, S. Lindek, and E. H. K. Stelzer, "Selective Plane Illumination Microscopy," in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, J. B. Pawley, ed. (Springer, 2006), pp. 672–679.
78. J. Huisken and D. Y. R. Stainier, "Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology," *Development* **136**(12), 1963–1975 (2009).
79. D. Axelrod, "Total internal reflection fluorescence microscopy," in *Optical Imaging and Microscopy*, Vol. 87 of *Springer Series in Optical Sciences*, P. Torok and F. J. Kao, eds. (Springer Verlag, 2007), Chap. 8.
80. C. A. Konopka and S. Y. Bednarek, "Variable-angle epifluorescence microscopy: a new way to look at protein dynamics in the plant cell cortex," *Plant J.* **53**(1), 186–196 (2008).
81. M. Tokunaga, N. Imamoto, and K. Sakata-Sogawa, "Highly inclined thin illumination enables clear singlemolecule imaging in cells," *Nat. Methods* **5**(2), 159–161 (2008).
82. M. Bates, G. T. Dempsey, K. H. Chen, and X. Zhuang, "Multicolor super-resolution fluorescence imaging via multi-parameter fluorophore detection," *ChemPhysChem* **13**(1), 99–107 (2012).
83. I. Testa, C. A. Wurm, R. Medda, E. Rothermel, C. von Middendorf, J. Fölling, S. Jakobs, A. Schönle, S. W. Hell, and C. Eggeling, "Multicolor fluorescence nanoscopy in fixed and living cells by exciting conventional fluorophores with a single wavelength," *Biophys. J.* **99**(8), 2686–2694 (2010).

84. D. Baddeley, D. Crossman, S. Rossberger, J. E. Cheyne, J. M. Montgomery, I. D. Jayasinghe, C. Cremer, M. B. Cannell, and C. Soeller, "4D super-resolution microscopy with conventional fluorophores and single wavelength excitation in optically thick cells and tissues," *PLoS ONE* **6**(5), e20645 (2011).
85. A. Pertsinidis, Y. Zhang, and S. Chu, "Subnanometre single-molecule localization, registration and distance measurements," *Nature* **466**(7306), 647–651 (2010).
86. A. Löschberger, S. van de Linde, M. C. Dabauvalle, B. Rieger, M. Heilemann, G. Krohne, and M. Sauer, "Superresolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution," *J. Cell Sci.* **125**(3), 570–575 (2012).
87. M. Born and E. Wolf, *Principles of Optics* (Pergamon Press, New York, 1965) Chapter 5.
88. http://en.wikipedia.org/wiki/Optical_aberration, (2014. november 15.)
89. <http://toothwalker.org/optics/chromatic.html>, (2014. november 15.)
90. <https://www.zemax.com>, (2014. november 15.)
91. <http://www.lambdaresearch.com/oslo>, (2014. november 15.)
92. Lambda Research Corp., OSLO optics software, optics reference ver. 6.1.
93. J. Sinkó, G. Szabó, and M. Erdélyi, "Ray tracing analysis of inclined illumination techniques," *Opt. Express* **22**, 18940–18948 (2014).
94. M. Erdelyi, E. Rees, D. Metcalf, G. S. Kaminski Schierle, L. Dudas, J. Sinko, A. E. Knight, and C. F. Kaminski, "Correcting chromatic offset in multicolor super-resolution localization microscopy," *Opt. Express* **21**, 10978–10988 (2013)
95. J. Sinkó, R. Kákonyi, E. Rees, D. Metcalf, A. E. Knight, C. F. Kaminski, G. Szabó, and M. Erdélyi, "TestSTORM: Simulator for optimizing sample labeling and image acquisition in localization based super-resolution microscopy," *Biomed. Opt. Express* **5**, 778–787 (2014)
96. M. Mandai and K. Yamaguchi, "Immersion microscope objective lens", US patent US 7,046,451 B2 (2006).
97. O. Zhernovaya, O. Sydoruk, V. Tuchin, and A. Douplik, "The refractive index of human hemoglobin in the visible range," *Phys. Med. Biol.* **56**(13), 4013–4021 (2011).
98. <http://www.lifetechnologies.com/hu/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/alexa-fluor-647.html>, (2014. november 15.)
99. <http://www.newport.com/Gimbal-Mirror-Mounts/1025182/1033/info.aspx>, (2014. november 15.)
100. <http://www.semrock.com/FilterDetails.aspx?id=Di01-R405/488/561/635-25x36>, (2014. november 15.)
101. <http://titan.physx.u-szeged.hu/~adoptim/>, (2014. november 15.)

102. G. M. Cooper, The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Structure and Organization of Actin Filaments. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9908>, (2014. november 15.)