PHD-ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Leképezési és képrekonstrukciós hibák vizsgálata és korrekciója a nagyfeloldású lokalizációs mikroszkópiában

Szerző:

Sinkó József

Témavezetők:

Dr. Erdélyi Miklós

egyetemi adjunktus

Prof. Dr. Szabó Gábor

egyetemi tanár

Fizika Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék

2014

Szeged

1. 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 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 kifejlesztéséért 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.

2. Tudományos előzmények

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 ~ 200-250 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 képalkotási technika során. 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. 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 jelöléseknek 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 irányítják. 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.

3. Célkitűzések

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.

Pontokban szedve a célkitűzéseim a következők voltak:

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 hátteret 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.**

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.**

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.**

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 elvégzem.**

4. Új tudományos eredmények

A célkitűzésekben szereplő egyes pontokban a következő eredményeket értem el:

Kivilágítási technikákat vizsgáltam OSLO nyalábkövető, optikai modellező szoftver segítségével. A minta mozgatásával történő pozícionálás után, a különböző mélységben elhelyezkedő fókuszsík leképezéséhez különböző kivilágítási technikák az optimálisak. Egyik legfontosabb cél a fókuszsíkon 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 decentrálttá válhat, ami egy plusz tükörforgatással korrigálható. A mintában mélyebben elhelyezkedő fókuszsík esetében megvizsgáltam a VAEM és a HILO kivilágításokat. A HILO kivilágításhoz kalibrációs metódust 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 pozícionálást objektív mozgatásával elvégezve, a kivilágítás elmozdul a ROI közepéhez képest és így az nem lesz tökéletesen kivilágítva. A további korrekcióhoz kalibrációs eljárást mutattam be.

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 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 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.

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 bleachelt (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-egy alkalmazást mutattam be: artifaktum elemzést vagy optimalizálást. Csillag alakú minta esetén vizsgáltam a feloldás és a kontraszt axiális irányú függését. A fókuszsíkot elhagyva kontrasztvesztés következik be az egyre nagyobb számú elutasított vagy meg nem talált lokalizáció miatt, melyek oka a defókusz következtében kiszélesedő molekulaképek átfedése. Rács minta esetén vizsgáltam a kétdimenziós projekció hatását gömb alakú mintára. Fonalak minta segítségével tanulmányoztam, hogy miért jelennek meg nagy festési sűrűségek esetén a vonalak végeinél intenzívebb foltok. Vezikulum mintával vizsgáltam a vezikulumok között fellépő híd formájú artifaktumokat.

Az eredmények alapján a következő tézispontokat fogalmaztam meg:

1. **Különböző ferdeszögű kivilágítási technikák vizsgálatát végeztem el nyalábkövető optikai szimulációs szoftverrel, modellezett mikroszkóprendszerben. [T1]**

   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 vezetettem be.

2. **A kromatikus hiba hatását vizsgáltam többszínű lokalizációs elven működő mikroszkópban és korrekciójára módszert dolgoztam ki. [T2]**

   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 mikroszkópiai elven működő mikroszkóp képalkotásának modellezésére. [T3]**

   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 random 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. [T3]**

   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.

5. Publikációk

A tézispontokhoz kapcsolódó referált folyóiratcikkek:

[T1] József Sinkó, Gábor Szabó, and Miklós Erdélyi, "Ray tracing analysis of inclined illumination techniques," Opt. Express **22**, 18940-18948 (2014)
http://www.opticsinfobase.org/oe/abstract.cfm?URI=oe-22-16-18940

[T2] Miklos Erdelyi, Eric Rees, Daniel Metcalf, Gabriele S. Kaminski Schierle, Laszlo Dudas, Jozsef Sinko, Alex E. Knight, and Clemens F. Kaminski, "Correcting chromatic offset in multicolor super-resolution localization microscopy," Opt. Express **21**, 10978-10988 (2013)
http://www.opticsinfobase.org/oe/abstract.cfm?URI=oe-21-9-10978

[T3] József Sinkó, Róbert Kákonyi, Eric Rees, Daniel Metcalf, Alex E. Knight, Clemens F. Kaminski, Gábor Szabó, and Miklós Erdélyi, "TestSTORM: Simulator for optimizing sample labeling and image acquisition in localization based super-resolution microscopy," Biomed. Opt. Express **5**, 778-787 (2014)
http://www.opticsinfobase.org/boe/abstract.cfm?URI=boe-5-3-778

További publikációk:

1. József Sinkó, László Dudás, Gábor Gajdátsy, Miklós Erdélyi, and Gábor Szabó, "Map-free line-scanning tomographic optical microscope," Opt. Lett. **36**, 4011-4013 (2011)
2. László Dudás, Gábor Gajdátsy, József Sinkó, Miklós Erdélyi, and Gábor Szabó, "Correction of error motion in a line-scanning tomographic optical microscope," Appl. Opt. **51**, 6319-6324 (2012)
3. László Dudás, József Sinkó, Miklós Erdélyi, and Gábor Szabó, "Confocal line-scanning microscope with modified illumination," Opt. Lett. **37**, 4293-4295 (2012)
4. Erdélyi Miklós, Sinkó József: Optikai pointillizmus: a lokalizációs optikai mikroszkópia, Fizikai Szemle, 2014. május, http://wwwold.kfki.hu/fszemle/archivum/fsz1405/ErdelyiM_SinkoJ.pdf

Konferencia előadások, poszterek:

5. Laszlo Dudas, Miklos Erdelyi, Jozsef Sinko, Gabor Gajdatsy and Gabor Szabo, „Line-scanning optical tomographic microscope”, 11th annual meeting of the European Light Microscopy Initiative (ELMI), Alexandroupolis, Greece, (2011. 06. 07-10.), Session VII.
6. L. Dudás, M. Erdélyi, J. Sinkó, G. Gajdátsy, G. Szabó: "Line-scanning tomographic optical microscope" poszter prezentáció, Focus on Microscopy (FOM2012) konferencia, 2012. április 1-4, Szingapúr
7. L. Dudás, J. Sinkó, M. Erdélyi, G. Szabó: "Line-scanning tomographic optical microscope" poszter prezentáció, 12th International ELMI meeting on Advanced Light Microscopy (ELMI2012), 2012. június 5-8 Leuven, Belgium
8. Jozsef Sinko, Eric Rees, Daniel Metcalf, Gabriele S Kaminski Schierle, Laszlo Dudas, Alex E Knight, Clemens F Kaminski and Miklos Erdelyi, „Correcting chromatic offset in multicolor super-resolution localization microscopy”, Poster presentation, Frontiers in BioImaging, 3. July 2013- 4. July 2013., London, UK
9. József Sinkó, Róbert Kákonyi, Eric Rees, Daniel Metcalf, Alex E. Knight, Clemens F. Kaminski, Gábor Szabó, and Miklós Erdélyi, "TestSTORM: Simulator for optimizing sample labeling and image acquisition in localization based super-resolution microscopy,", Poster presentation, 14th International Advanced Light Microscopy meeting (ELMI 2014), 2014. május 20-23., Oslo, Norvégia