

Lokalizációs mikroszkópai modalitások szimulációs és kísérleti vizsgálata

Doktori Értekezés

Szerző:
Novák Tibor

Témavezető:
Dr. Erdélyi Miklós



Fizikai Doktori Iskola
Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék
Szegedi Tudományegyetem

2022
Szeged

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	5
2. Bevezetés	6
3. Tudományos előzmények	7
3.1. Mikroszkópiai bevezetés	7
3.2. Lokalizációs mikroszkópia	9
3.2.1. Lokalizálás	10
3.2.2. Képmínőség	14
3.2.3. Háttér levonás	18
3.2.4. Mérési idő	20
3.2.5. Modalitások	22
3.3. PSF modellek	27
3.3.1. Skáláris PSF	28
3.3.2. Vektoriális PSF	29
4. Célkitűzés	32
5. Eredmények	33
5.1. TestSTORM 2.0	33
5.2. Szimulációs eredmények	49
5.2.1. Skáláris PSF	49
5.2.2. Vektoriális PSF	51
5.2.3. Polarizáció érzékeny szimuláció	57
5.2.4. Kétszínű szimuláció	60
5.2.5. Asztigmias 3D szimuláció	62
5.3. Arany nanorudak dSTORM vizsgálata	66
5.3.1. Minta	67
5.3.2. Mérés	69
5.3.3. Kiértékelés	70
5.3.4. Eredmények	79
6. Összefoglaló	82
6.1. Bevezetés	82
6.2. Célok és kutatási módszerek	83
6.3. Új tudományos eredmények	84
7. Summary	86
7.1. Introduction	86
7.2. Objectives and methods	87
7.3. New scientific results	88
8. Köszönetnyilvánítás	90

9. Publikációs lista	90
10. Függelék	92
10.1. Forgási szabadsággal rendelkező dipólus PSF-je	92
10.2. Trajektória detektálási hossz	93
Hivatkozások	96

1. Rövidítések jegyzéke

DBSCAN: Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise, klaszterizáló algoritmus

DIC: Differential Interference Contrast, transzmissziós optikai mikroszkópai technika

(d)STORM: (direct) Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, nagyfeloldású lokalizációs mikroszkópai technika

EMCCD: Electron-Multiplying Charge-Coupled Device, egyedi molekula detektálásra alkalmas kamera típus

(f)PALM: (fluorescence) Photoactivated Localization Microscopy, nagyfeloldású lokalizációs mikroszkópai technika

FRC: Fourier Ring Correlation, a feloldás kísérleti meghatározására szolgáló algoritmus

FRET: Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfer, közeli fluorofórok között fellépő jelenség

NPC: Nuclear Pore Complex, magpórus komplexei, fehérje szerkezetek a sejtmembránban

OPD: Optical Path Difference, optikai úthossz különbség

PAH: Poly(Allylamine Hydrochloride), polielektrolit

PAINT: Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography, nagyfeloldású lokalizációs mikroszkópai technika

PSF: Point Spread Function, az optikai rendszer pontátviteli függvénye, pontforrás képe

TIR: Total Internal Reflection, teljes belső visszaverődést kihasználó megvilágítás

TIRF: Total Internal Reflection Fluorescence, fluoreszcens mikroszkópai technika

SMLM: Single Molecule Localisation Microscopy, az egyedi molekula lokalizációs mikroszkópai technikák gyűjtőneve

STED: Stimulated Emission Depletion, nagyfeloldású pásztázó mikroszkópai technika

2. Bevezetés

Az optikai mikroszkópiát már a XVII. század óta használják a mikrovilág tanulmányozására. Segítségével a szemünk képességein túllépve a számunkra parányi dolgokról is gazdag információkat szerezhetünk. A feltalálása óta nagyban hozzájárult a világról szerzett ismereteink bővítésében, és az arról kialakított szemlélet formálásában. Ez idő alatt a képminőség és a feloldóképesség, vagyis hogy mennyire parányi dolgokról milyen mennyiségű és minőségű információt tudunk szerezni, jelentős fejlődésen ment keresztül. A közelmúltban a nagyfeloldású mikroszkópiai módszerek megjelenése adott nagy lendületet az optikai mikroszkópiának e téren, és váltak mára bevett eszközzé, elsősorban sejtbiológiai kutatásokban. A terület számtalan módszert foglal magába, az előnyeikkel és hátrányaikkal együtt, amik viszont behatárolják az alkalmazási lehetőségeiket. Azonban mindegyikről elmondható, hogy vagy szofisztikált kísérleti elrendezést, vagy összetett mérési adatfeldolgozást igényelnek. Így, annak ellenére, hogy a feltalálásuk óta az elmúlt másfél-két évtized alatt gyorsan látványos fejlődésen mentek keresztül, a terület a mai napig kínál megoldandó problémákat a vállalkozó szellemű kutatók számára.

Doktori tanulmányaim során lehetőségem volt bekapcsolódni az AdOptIm csoport keretein belül folyó kutatásokba, és megismerkedni a kutatói munka különböző aspektusaival. Az itt töltött idő alatt részt vettem szoftver- és algoritmusfejlesztésben, méréseket terveztem meg, és hajtottam végre, illetve a kísérleti munkában elengedhetetlen adat elemzést, és az eredmények értelmezését végeztem. Megoldandó problémák keresése és saját projektek mellett a terület multidiszciplináris jellege következtében más kutatócsoportokkal történő együttműködésekben is bekapcsolódtam, akár mérések végzésével, akár adatok kiértékelésével.

Értekezésemben kitérek az új, nagyfeloldású mikroszkópiai módszerekre, különös tekintettel az egyedi molekula lokalizációs technikára. Kifejtem a lokalizálás folyamatát, áttekintem a képminőséget befolyásoló tényezőket, és ismertetem a technikán belüli különböző mérési modalitásokat. Ezt követően bemutatom a disszertáció témájával kapcsolatban végzett munkámat, az elért tudományos eredményeimet, és megfogalmazom a tézispontjaimat.

3. Tudományos előzmények

3.1. Mikroszkópiai bevezetés

Az optikai mikroszkópiában az egyik leglényegesebb értékmérő a feloldóképesség. E tekintetben azonban az optikai rendszer és az alkalmazott fény hullámhossza egy jól meghatározott küszöböt állít. Egy pontszerű forrásról képet alkotva nem egy pontot, hanem egy kicsiny elmosódott foltot kapunk, még leképzési hibáktól mentes optikai elemeket alkalmazva is. Ezt a foltot hívjuk a leképző rendszer pontátviteli függvényének, rövidítve PSF-nek. Az elérhető feloldás tekintetében megemlítendő két gyakran használt feltétel, az inkoherens fényesség eloszlásra alkalmazható félempirikus Rayleigh kritérium, valamint a koherens esetre vonatkozó Abbe kritérium. Ma már a leképzési hibákra jól korrigált, nagy numerikus apertúrájú olaj immerziós objektívekkel 200 – 250 nm-es foltméret érhető el, megközelítve az említett feltételek által szabott értékeket.

A kép minőség javítása érdekében a feloldás mellett a kontraszt növelésére is számos technikát kifejlesztettek. Az optikai mikroszkópokkal sok esetben biológiai mintákat vizsgálnak, amik többnyire áttetszőek, így azokat átvilágítva a minta csak halványan vehető ki a háttérből. A sötét látóterű technika az átvilágító fény kiszűrésén, és a szóródó fény begyűjtésén alapul, így minimális háttér mellett láthatjuk magát a vizsgált mintát. Továbbá a fény hullám természetéből fakadó interferencia jelensége is felhasználható a kontraszt növelésére. A fázis kontraszt technikánál a szóródó fényt interferáltatjuk az átmenő fénnel. A differenciális interferencia kontraszt (DIC) technikánál az átvilágító fényt ketté bontva és egymáshoz képest eltolva, majd újra egyesítve kapunk kontrasztos képet. Az optikai módszereken túl a fluoreszcencia jelenségét is felhasználhatjuk a kontraszt növelésére. A fluoreszcencia során a megfelelő hullámhosszú fénnel megvilágítva, úgymond gerjesztve a fluorofórt, az más színű, tipikusan a spektrumban vörös irányba eltolódott hullámhosszú fényt bocsát ki. Ezt kihasználva a megfelelő spektrális szűrőkkel a fluoreszcens fény leválasztható a gerjesztő fénytől, így megszabadulhatunk a megvilágítás háttérétől. Így ennek köszönhetően a fluoreszcensen megjelölt minta határozottan kivehetővé válik. A fluoreszcens mikroszkópia napjainkra már bevett eszközzé vált, elsősorban a biológusok körében. Segítségével az egyes sejt összetevők, a megfelelő minta előkészítést követően, jó specificitással jelölhetőek és vizsgálhatóak. Fluorofórként leg-

többször fluoreszcens fehérjéket, illetve szerves festékeket alkalmaznak, de ezek mellett kvantumpöttyöket [1], vagy alkanidákat is gyakran használnak [2].

Sokáig a fluoreszcens mikroszkópia csak a fluorofórok sokaságának vizsgálatával volt lehetséges. A detektor technika fejlődésére egészen 1989-ig kellett várni, hogy kondenzált közegben egyedi molekulák fluoreszcens jelét is lehessen látni [3]. Ezt követően számos módon vizsgálták és felhasználták az egyedi molekulák fluoreszcenciáját. Az egyik első széles alkalmazási területté az egyedi molekula követés és az egyedi molekula FRET fejlődött. Az előbbi hasznos eszköznek bizonyult a diffúziós együttható mérésére, többek között a sejtek membránján az anomáliás diffúzió tanulmányozására [4], az utóbbi segítségével pedig fehérjék konformáció változását lehet vizsgálni [5]. Ezeknél a méréseknél fontos volt, hogy az alkalmazott festék nagy fotostabilitással rendelkezzen, vagyis ne villogjon, és ne égjen ki gyorsan. Erre a célra különböző kiégést gátló összetevőket használtak. A Cy5 szerves festékhez használt egyik triplet állapot kvencser esetén észrevették, hogy a kiégés gátlása mellett, nagy mértékű fluoreszcens jel ingadozást ún. fotovillogást idéz elő [6]. Erre kezdetben még hátrányos, kiküszöbölendő tulajdonságként tekintettek, viszont ez a felismerés segítette elő később az egyik nagyfeloldású technika, az egyedi molekula lokalizációs módszer kifejlesztését.

A nagyfeloldású mikroszkópai technikák lehetővé teszik, hogy a fluorofórokról jóval a diffrakciós foltméretüknél finomabb részletekben alkossunk képet. Ezeknek a módszereknek a koncepcióit az 1990-es években alkották meg [7, 8], azonban a megvalósításukra csak az ezredfordulót követően került sor [9–11]. Ez után a területet nagy lendületet nyert, és azóta ezen módszereknek nagyon sok változatát dolgozták ki. A fluoreszcens jel kiolvasása szempontjából alapvetően két nagy csoportra, a "célzott kiolvasású" és a "sztohasztikus kiolvasású" módszerekre lehet osztani ezeket a technikákat [12].

A "célzott kiolvasású" technikák esetén valamilyen megvilágítás mintázattal érik el, hogy a fluorofórok csak egy térbelileg jól behatárolt csoportja szolgáltatson fluoreszcens jelet egyidejűleg. Ilyen technikáknak tekinthetőek a hagyományos pásztázó konfokális mikroszkópia újabb változatai [13, 14] és a struktúrált megvilágítású mikroszkópia [15]. Ezekkel a technikákkal viszont rendre csak egy $\sim \sqrt{2}$ -szeres, illetve ~ 2 -szeres feloldás növekedést lehet nyerni a hagyományos, diffrakció limitált mikroszkópiához képest. Ellenben vannak olyan módszerek, amik a fluorofórok valamilyen féle nemlineáris viselkedését

használják ki, és így már az elérhető feloldás növekedés nincs a diffrakciós küszöbhez kötve. Ilyen technikák léteznek mind pásztázó [9, 16], mind széles látóterű elrendezésben [17, 18]. Példaként a pásztázó STED mikroszkópiánál [9] a fluorofórok gerjesztését követően egy fánk alakú, stimulált emissziót kikényszerítő nyalábbal érik el a diffrakció limitnél lényegesen kisebb méretű gerjesztő foltot, amin belül bekövetkezik a fluorofórok detektálható spontán emissziója.

A másik nagy család a "sztohasztikus kiolvasás", aminél a fluorofórok véletlenszerű fotovillogása teszi lehetővé a megnövekedett feloldás elérését, aminek szintén nem szabhatárt a diffrakciós küszöb. Ezen nagy feloldású mikroszkópiai technikák alkalmazásához szükséges a fluorofórok megfelelő fotovillogását előidézni, amit azok fotofizikájának és -kémiajának jobb megértése tett lehetővé [19, 20]. Ezen belül is egy nagy csoportot alkotnak a lokalizációs mikroszkópiai technikák. Ezen módszerek sajátossága, hogy egyedi molekulákból származó információhoz jutunk, de nem közvetlenül, hanem ezt a mérési adatok utólagos feldolgozása teszi lehetővé. Mindehhez szükséges, hogy a fluoreszcens molekulák jeleiből egymástól elkülönítve alkossunk képet, ami azok a véletlenszerű fotovillogását kihasználva érhető el. Így a felvételeken a (nagy valószínűséggel) különálló molekula képeknek már egyesével meg lehet határozni a középpontjaikat és esetleg egyéb vizsgálandó tulajdonságaikat. A fluorofórok véletlenszerű, egymástól független fotovillogását kihasználva lokalizálás nélkül is elérhető megnövekedett feloldás. Ez a kamera képpont fényességértékek időbeli ingadozásának statisztikus elemzésével tehető meg [21, 22]. Ilyen módokon az effektív PSF méret lecsökkenthető, illetve a szomszédos források közötti átfedő rész elnyomható. Viszont ezek a módszerek torzítják a megalkotott képen a fényességeket, illetve a források PSF-jeit, így kvantitatív elemzésre csak nehezen használhatóak.

Az utóbbi években a két megközelítést, a "célzott" és "stohasztikus" kiolvasást is kombinálták, mind pásztázó [23], mind széles látóterű elrendezésben [24, 25], még jobban megnövekedett feloldást ígérve.

3.2. Lokalizációs mikroszkópia

A lokalizációs mikroszkópiában egyedi fluorofórok PSF képeiből határozzuk meg azok pozícióit, jelentősen nagyobb pontossággal, mint magának a PSF intenzitás eloszlásának

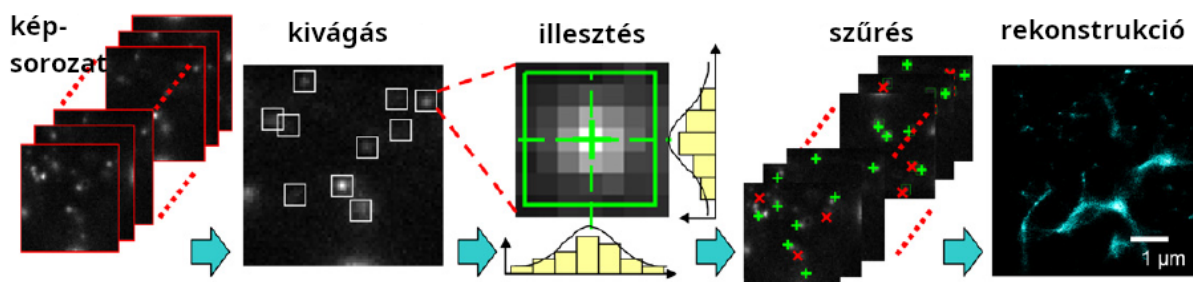
a szélessége. 2006-ban publikálták az első két egyedi molekula lokalizációs módszert, a(z) (f)PALM-ot [11, 26] és a STORM-ot [10]. Ezek még a gerjesztő lézer mellett egy alacsonyabb hullámhosszú lézert is használtak fotoaktiváláshoz, vagyis a fluorofórok fluoreszcens állapotba juttatásához. Azóta a fotovillogást számtalan módon elérték, és ennek megfelelően számos elnevezéssel látták el a különféle lokalizációs technikákat [27–34].

Ezek közül a dSTORM [28] technikánál a megfelelő festékekkel jelölt mintát egy speciális puffertartályba, ún. "switching" puffertartályba helyezve elérhető, hogy egy kezdeti megvilágítás hatására a festékek nagy része fluoreszcensen kikapcsolt állapotba kerüljön. Ebből a nem fluoreszcens, "kikapcsolt" (*OFF*) állapotból a festékek véletlenszerűen, lassan visszakerülnek a fluoreszcens, "bekapcsolt" (*ON*) állapotban, vagy önmaguktól, vagy normál fluoreszcens gerjesztésnél magasabb fotonenergiájú megvilágítás hatására. Ezután egészen addig detektálhatóak, míg ki nem égnek, vagy vissza nem kerülnek a sötét, "kikapcsolt" állapotba.

A lokalizációs módszereknél fotovillogtatással érjük el, hogy a fluoreszcens jelölések csak egy kis hányadát detektáljuk egy időben. Ez lehetővé teszi, hogy a jelölésekről úgy lehessen képet felvenni, hogy azok (jó eséllyel) elkülönüljenek a felvételen. Ez akkor válsul meg, hogyha a jelölések nagyságrendekkel hosszabb időt töltsenek az "kikapcsolt" állapotban, mint fluoreszcensen. Ekkor több felvételt, egy képsorozatot készítve a mintáról az egyedi, elkülönített jelölések nagy részéről tudunk képet alkotni. A felvillanásokat beazonosítva a felvételeken, azok középpontjai már néhány 10 nm-es pontossággal meghatározhatóak. A detektált jelölések pozíciójának feldolgozásával az eredmények értelmezhetőek és vizuális céllal nagyfeloldású, rekonstrukciós képet készíthetünk. A különböző lépéseket az 1. ábra szemlélteti.

3.2.1. Lokalizálás

A lokalizációs módszerek gyökerei még a nagy feloldású mikroszkópia megjelenése előttre tehetőek vissza, példaként fluoreszcens részecske nyomkövetésre [36] vagy asztronómiai felvételeken csillagok azonosítására [37] használták őket. Az első ilyen algoritmusok közül több a középpontot még a képpont (pixel) pozíciók beütésszámmal súlyozott átlagaként, "tömegközéppont" számolással határozta meg [36]. Ennek során a detektált fluorofór körül kivágásra kerül néhány képpont nagyságú terület, amin belül, a háttér eltávolítása után,



1. ábra. A lokalizációs képalkotás teljes folyamata: a felvétel sorozat készítése, a felvillanások megkeresése, a felvillanások lokalizálása, a lokalizációs adatok szűrése és a nagyfeloldású kép megalkotása. [35]

a pixel pozíciók beütésszámmal súlyozott átlaga szolgáltatja a fluorofór becsült pozícióját. A pozíció ilyen módon történő számolása igen érzékeny a háttér levonás módjára, és különböző mértékű szisztematikus hibával bír attól függően, hogy a forrás valódi pozíciója a kamera pixelen belül hova esik [38]. A felvillanások középpontjait meghatározó algoritmusok később többnyire már függvény illesztésen alapultak [39, 40]. Ez a módszer nem vezeti be a fent említett szisztematikus hibát, és a jel/zaj arányra is kevésbé érzékeny [38]. Ezen algoritmusok többsége haranggörbét (Gauss függvényt) illeszt a PSF-re a forrás lokalizálásához. Bár a Gauss alakú PSF függvény nem fizikai megfontolásokon alapul, de a rögzítetlen, szabadon forgó fluorofórok esetén jól leírja a valós PSF-et [41], jobban, mint az egyszerűsített elméleti leírások által származtatott, és gyakran használt Airy mintázat, és emellett a számításigénye is mérsékelt az összetettebb PSF modellekhez képest. A függvény illesztés többféle iteratív módon történhet, mint például a súlyozott vagy súlyozatlan legkisebb négyzetek módszerével, vagy a legnagyobb valószínűség módszerrel (maximum-likelihood) [42, 43]. Az utóbbi megoldás szolgáltatja az elérhető legkisebb mértékű bizonytalanságot az illesztett függvény paramétereire [44], viszont ehhez a detektor zaj modelljének és a PSF függvénynek a pontos ismeretét igényli.

A függvény illesztéssel történő pozíció meghatározás bizonytalanságát nevezzük lokalizációs precizitásnak, ami azt adja meg, hogy adott az folt méret, jel erősség és zajszint mellett mekkora a középpont koordináták meghatározásának statisztikai értelemben vett várható hibája. A lokalizációs módszerek többségénél a képsíkbeli, laterális precizitásról beszélünk, de a 3D módszerek esetén az axiális precizitás is értelmezhető.

A precizitás meghatározható kísérletileg, ha egy adott fluorofórt sok kamera felvételen

keresztül lokalizálunk [10, 28, 43], azonban a legtöbb mérésnél nem tudjuk egyértelműen hozzárendelni a lokalizációkat fluorofórokhoz. Ekkor az egymást követő felvételeken lévő lokalizációk közötti legközelebbi szomszéd távolságok alapján tudunk egy becsült precizitás értéket mondani [45]. Azonban a kísérleti meghatározás sokszor körülményes, emiatt általában számolás útján történik rá vonatkozó becslés. Több szerző is megvizsgálta, hogy a különböző függvény illesztési módok és PSF függvények esetén ez hogyan tehető meg [43, 44, 46–49]. Gauss PSF függvény illesztés esetén léteznek egyszerű, könnyen felhasználható formulák a precizitás meghatározásra [43, 47, 48, 50], amik csak az illesztett függvény paramétereit igénylik a számításhoz. Példaként a Thompson által levezetett formula az alábbi módon írható fel [47]:

$$\sigma = \sqrt{\frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2}}, \quad (1)$$

ahol σ a lokalizációs precizitás, s a Gauss PSF függvény szórása, a a pixelméret, b a háttér zaj értéke fotonszámban, N pedig a felvételen begyűjtött fotonszám.

A jó precizitás eléréséhez elengedhetetlen a magas begyűjtött fotonszám, amittől az $1/\sqrt{N}$ -es függést mutat. Továbbá a háttér zaj, ami származhat fluoreszcens jel háttérből vagy a detektor kiolvasási zajából, rontja a precizitást. Ezeken felül a kamera képpontok véges mérete ún. pixelizálási zajt vezet be, ami a foton detektálásnak a pozícióbeli bizonytalanságából adódik. Ez utóbbi miatt önmagában megérné a pixel méretet kicsire választani, azonban a detektor kiolvasási zaját is figyelembe véve ennek is van egy optimális értéke. Így tárgysíkbeli pixel méretet érdemes PSF méretéhez kötni, annak a szórásával megegyező, vagy valamivel kisebb méretűre választva. Ekkora képpontméret már elegendő a pontos függvény illesztéshez, de emiatt a PSF alakjának finom részletei nem kivehetőek. Megjegyzendő, hogy egyedi molekula detektáláshoz gyakran elektron sokszorozó kamerát (EMCCD) használnak, ami a fotoelektronok sokszorozása révén a kiolvasási zajt elnyomja, ami előnyös gyenge jelek detektálásánál. Viszont ez a fajta jel erősítés egy újabb zajforrást is jelent, aminek a jelfüggő zaj szempontjából olyan a hatása, mintha a ténylegeshez képest fele annyi fotont gyűjtöttünk volna be [51], és ezáltal erősebb jeleknél akár még hátrányos is lehet [52]. Ennek megfelelően a precizitás számolásakor a detektor típusát is érdemes figyelembe venni a zaj megbecsléséhez.

A laterális precizitás mellett megbecsülhető az axiális precizitás is a különböző 3D

módszerek esetén. Egyrészt, kalibrálással és a laterális precizitás ismeretében hibaterjedéssel is számolható az axiális precizitás [53]. Továbbá, amennyiben rendelkezünk pontos PSF és zaj modellel, információ elmélet alapján az axiális pozícióra is tehető alsó becslés [54–57]

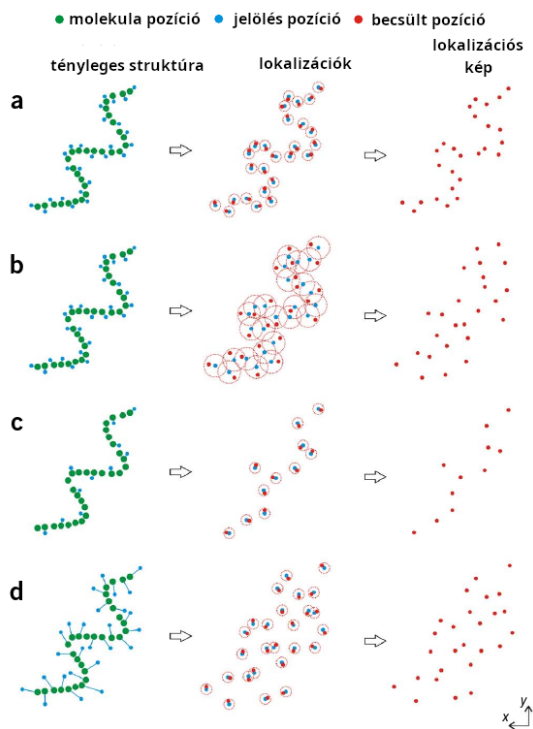
A lokalizációs precizitás nagy jelentőséggel bír az elérhető feloldásra, egy alsó határt szabva rá [58–61]. Emiatt sokszor küszöbértéket állítanak be rá vonatkozóan, a rossz értékkel rendelkező lokalizációkat figyelmen kívül hagyva, a rekonstruált kép minőség javítása céljából [35]. Ezzel a halvány, rossz precizitású felvillanások vagy a háttérre illesztett téves lokalizációk mellett az átfedő felvillanások lokalizációinak egy részét is kiszűrhetjük.

A lokalizálás hibáját azonban nem lehet egyedül a precizitással jellemezni, ehhez szükség van a lokalizációs pontosságra is [62]. Ez a mennyiség arról ad számot, hogy a pozíció meghatározás várható értéke mennyire tér el a keresett pozíciótól. Például forgásokban korlátozott fluorofórok esetén kell ezzel számolni, mivel ekkor dipólus forrásokról alkotunk képet irányítottság átlagolás nélkül [63], ami aszimmetrikussá teheti a PSF-et. Ez a hiba igen erőteljesen függ a defókuszáltságtól [64, 65], és az egyéb fázisaberrációktól [41]. Amennyiben a fluorofór nem rögzített, hanem rendelkezik forgási szabadsággal, annak növekedésével a pozíció meghatározás pontossága is javul [64, 65]. Ez a fajta lokalizációs hiba csökkenthető radiális vagy azimutális polarizáció szűréssel, azonban ez speciális maszkot igényel, és detektált jel fényességét is csökkenti [66–68]. Ezek a hátrányok kiküszöbölhetőek a dipólus orientációt figyelembe vevő, számolás igényes vektoriális PSF modell illesztésével [69].

Továbbá, a kísérleti tényezők, mint a struktúrált háttér, a leképzési hibák jelenléte, vagy a detektor képpontjainak eltérő válasza is pontatlanságot vezethet be a pozíció meghatározásban. Azt sem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy fluorofórokat a vizsgálandó struktúrához hozzákötő köztes kapcsoló elem sem elhanyagolható méretű. Ez utóbbi példaként a biológiai struktúráknál elterjedten használt antitestek jelöléseknél akár precizitással összemérhető, ~ 10 nm-es nagyságrendű is lehet [70]. Ezeken felül, a leképző rendszer és a minta instabilitása időben folyamatos pozíció eltolódást, ún. driftet okozhat, ami bár részben korrigálható a kiértékelés során, szintén rontja a pozíció meghatározás pontosságát, elsősorban a hosszú időtartamú mérések esetén.

3.2.2. Képmínőség

A felvétel sorozat lokalizálása során kapott adatsort az esetek nagy részében a minta struktúrális információjának kinyerésére, mint a kötőhely eloszlás megbecslése, használják fel, amihez a lokalizációk koordinátáira van szükség. Azt, hogy milyen részletes információt tudunk belőle kinyerni, több tényező is befolyásolja (2. ábra).



2. ábra. Különböző paramétereknek a hatása a rekonstruált kép hűségére. A zöld körök jelölik a vizsgálandó molekula pozíciókat, a kék körök a fluorofór pozíciókat, a piros körök pedig a lokalizációs helyet. (a) Jó lokalizációs precizitással, kis kötőelem hosszal és sűrű jelöléssel készült rekonstrukció, (b) a rossz lokalizációs precizitás hatása, a (c) csökkentett jelölési sűrűség szerepe, (d) megnövelt kötőelem hossz hatása a rekonstruált struktúra hűségére. [62]

Az egyik tényező a lokalizációs precizitás és a pontosság, amik a fluoreszcens jelölések pozíció meghatározásának a hibáját jellemzik. Ez fontos szerepet játszik, amikor két közeli pontszerű alakzatot akarunk szétválasztani [10]. Kiterjedt alakzatoknál emellett azonban más szempontokat is figyelembe kell venni. Egy ilyen tényező a fluoreszcens jelölés sűrűsége. Hogyha jó feloldású képet szeretnénk, akkor a magas lokalizációs pontosság mellett nagy sűrűségben is meg kell jelölnünk a mintát [58, 71]. Azonban ebben korlátot szab az alkalmazott fluorofór fotovilloglásának az időbeli dinamikája, mivel az

átfedő felvillanások gyakoriságát szükséges alacsonyan tartani [72]. Ennek következtében a véges mérési idő felső határt állít az elérhető lokalizáció, és ezzel együtt az alkalmazható jelölés sűrűsége. Továbbá azon módszereknél, amiknél a fluorofórok villogásának dinamikája nem, vagy csak korlátozottan szabályozható, mint a dSTORM esetén, a sötét és fényes állapotokhoz tartozó időállandók aránya egy további felső korlátot határoz meg e tekintetben. A Nyquist feltétel értelmében a lokalizációs pontok sűrűsége meghatározza, hogy milyen feloldást érhetünk el [71]. Azonban a lokalizációs mikroszkópiában a mintavételezést jelentő lokalizációs pontok nem egyenközüek, a mérési módszerből adódóan a sűrűségük térben jelentősen változik, így az említett feltétel alkalmazása nem egyértelmű [58]. Ebből adódóan önmagában sem a lokalizációs precizitás, sem a Nyquist kritérium direkt alkalmazása a képminőség megállapítására nem alkalmas [59]. A probléma megoldására kidolgozásra kerültek általánosabb, mindkét tényezőt magába foglaló elméletek [59, 73]. Ezek becslésméletre építkeznek és a kép frekvenciabeli leírását használják.

A nagyfeloldású kép minőségére vonatkozó elméleti leírásoknál szükséges, hogy ismerjük a struktúrát, ugyanakkor a méréseknél pont ennek a meghatározása a cél. Emiatt a gyakorlatba nehezen ültethetőek át, valamint ezek sem képesek számot adni a mérés és a kiértékelés minden folyamatáról. Azonban léteznek olyan eljárások, amikkel közvetlen a mérési adatokból származó nagyfeloldású kép minőségéről lehet állításokat tenni. Az egyik ilyen technika a Fourier gyűrű korreláció (FRC) [60, 61]. Ehhez a lokalizációs adatsort két részre kell osztani, az algoritmus pedig az ezekből származó két kép frekvenciabeli transzformáltjain végez kereszt korrelációt. Arról, hogy milyen finom részleteket lehet feloldani a korreláció lecsengése szolgáltat információt. A módszer előnye, hogy képes számot adni mind a lokalizációs precizitás, mind a lokalizáció sűrűség szerepéről. Viszont egy fluorofór egynél több lokalizációt is eredményezhet a mérés időtartama alatt, ami a valósánál jobb feloldás értéket eredményezhet. Ezt a fluorofór várható felvillanásainak a számával lehetséges korrigálni. Ezek a módszerek sem adnak számot a lokalizációs algoritmus által bevezetett egyéb jellegű hibákról, műtermékekről. Ennek a vizsgálatára lehetőség van, hogyha a kiértékelt lokalizációs adatsort összehasonlítjuk a nyers, diffrakció limitált adatsorral [74]. Ezzel a megközelítéssel az algoritmus által bevezetett, helyi hibák láthatóvá tehetőek, de a teljes adatsor hibája is számolható.

A kép minőségét a lokalizációs folyamat egyéb lépései is befolyásolják. Még ugyanazon

fluorofórok és homogén megvilágítás esetén is a lokalizációs precizitás széles tartományon változhat, mivel az idő, amivel a felvillanás kitölti az adott felvételt, véletlenszerű. Nem elhanyagolható, hogy a lokalizációs algoritmusok sem működnek minden körülmény közt hibátlanul. Az algoritmusok a felvételen nem feltétlenül azonosítanak minden felvillanást, illetve tévesen is azonosíthatnak és lokalizálhatnak másokat [75], például a háttér fluoreszcens jelen. Emellett a nagy sűrűségű esetben előfordulhat, hogy kettő vagy több átfedő felvillanás kerül egy felvillanásként azonosításra tévesen, hibás középponttal. Ezek azt eredményezhetik, hogy a rekonstruált képen lévő struktúra jellegileg is eltér a valós alakzattól, ezeket hívjuk lokalizációs műtermékeknek [35, 72, 76, 77]. Ebben az esetben alkalmazhatunk szűrést a lokalizált adatsorra, hogy a kép minőségen számottevően rontó adatoktól részben megszabaduljunk. Ezt elérhetjük, ha valamilyen illesztési paraméterre, vagy ezekből számolt mennyiségre szűrünk [35, 70, 78]. Ezen felül a felvillanások mért foltjait is elemezhetjük, ezt perturbálva, és a lokalizálást újból elvégezve számszerűleg jellemezhető, hogy az algoritmus által illesztett PSF milyen bizonyossággal írja le a mérést [79].

A mérési eredmények értelmezésénél szintén lényeges kérdés az is, hogy a lokalizációs adatsorra illesztett struktúra modell paraméterei mennyire megbízhatóak. Ennek számszerűsítésére lehetőség van statisztikai modell segítségével az illesztett paraméterek precizitásának a számolásával [80], vagy statisztikai bootstrap módszer [81] alkalmazásával. Ez utóbbi esetben a lokalizációs adatsort több, váltakozó méretű részre felosztjuk véletlenszerűen, és vizsgáljuk, hogy az illesztett paraméterek fluktuációja miként konvergál az adatsor méretének növelésével.

A lokalizációs mikroszkópiában a felvételek feldolgozását követően eredményként hagyományos, képpontokból álló kép helyett egy koordináta pontokból álló adatsort kapunk, amit a lokalizációk középpontjai, és emellett esetleg egyéb paraméterei, alkotnak. Bár ezeket a koordinátákat algoritmusokkal fel lehet dolgozni, a vizsgálatot végző személy számára önmagukban nehezen értelmezhetőek. Ezért a mérési eredmény információinak, ami legtöbbször a lokalizáció sűrűség eloszlása, vizuális átadása céljából hagyományos, képpontokból álló képet készítenek a lokalizációs adatokból. Az ilyen pixelizált nagyfeloldású kép megalkotására számos megközelítés létezik a maguk előnyével és hátrányával együtt [82].

Azonban vannak olyan tényezők, amiket nehéz pusztán elméleti leírással vagy a mért adatsor elemzésével figyelembe venni. Ilyen például a lokalizációs műtermékek, vagy a lokalizációs adatsor szűrése. Az utóbbihoz szűrési küszöbértékeket kell szabni, amik beállítása nem egyértelmű. Annak érdekében, hogy ezeket a problémákat meg lehessen vizsgálni, sokszor szimulált felvételsorozatot készítenek. Ennek előnye, hogy ekkor pontosan ismert a vizsgálandó struktúra, így egyértelműen meg lehet vizsgálni a lokalizációs algoritmusok teljesítményét [75]. Továbbá könnyen folytathatóak vizsgálatok a különböző paraméterek hatásaira vonatkozóan. A különböző csoportok egy-egy speciális probléma vizsgálatára sokszor írnak saját felhasználású szimulációs kódot. Általános célú szimulációs szoftverekből, amikkel többféle mintázat típuson is lehet vizsgálni, csak kevés létezik [76, 83].

TestSTORM 1.0 A szimulációs szoftver első verzióját [76] az AdOptIm csoport fejlesztette ki MATLAB [84] programnyelven. A program nyílt forráskódú, és szabadon hozzáférhető a tudományos közösség számára. A szoftver a teljes képalkotási folyamatot modellezi, a fluoreszcens jelölések elhelyezésétől, azok időbeli dinamikáján keresztül egészen a kamera felvétel elkészítéséig. A szoftver ezen verziója egyedül csak a 2D képalkotási folyamatot tudja modellezni, nincs benne egyéb mérési modalitás szimulálására lehetőség. A kezelőfelületen a felhasználó két mesterséges és két biológiai ihletésű előre definiált mintázat közül választhat. A mesterséges mintázatok, a Siemens "csillag" és az axiálisan döntött "rács", a képalkotási paraméterek vizsgálatára, és a feloldás kiértékelésére hasznosak. A "vonat" és a "vezikula" mintázatok pedig rendre az aktin filamentumokat és a vezikulumokat modellezzik, biológiaiailag releváns szimulációk végezhetőek velük. A pontátviteli függvény kiszámolásához a Gauss PSF modell volt implementálva.

A program a festék villogás dinamikájához a három állapotú modellt használja fel, ami szerint a festék molekula az *ON*, az *OFF* vagy a *kiégett* állapotban létezhet, ezek rendre a fluoreszcens, a sötét és kiégett állapotoknak felelnek meg [20]. Az *ON* és az *OFF* állapotok élettartamai exponenciális eloszlást követnek, a felhasználó által beállított karakterisztikus időállandókkal. A molekula csak az *ON* állapotban eredményez képet a felvételen, és egy véletlen hosszúságú (az exponenciális eloszlásból származó) időtartam után lép át az *OFF* állapotba. Az *OFF* állapotban lévő festékek nem észlelhetőek, in-

nen egy véletlen hosszágú időtartam után bizonyos valószínűséggel visszakerülnek vagy az *ON* állapotba, vagy a *kiégett* állapotba lépnek át. A *kiégett* állapot szintén sötét állapot, amiben a festék nem észlelhető, és innen már nem tud visszakerülni semelyik másik állapotba. Az algoritmus a festékek pozíciói és az *ON* állapot idejeik alapján létrehozza a kamera felvételeken a molekulák pontátviteli függvényeit. A felvillanásokat tartalmazó felvétel sorozathoz még hozzáadja a háttér értékét, ami a háttérzaj beállítására szolgál. Ezt követően a felvételek pixelértékeire Poisson eloszlás alapján véletlenszerű foton zajt rak, végül lementi a megalkotott felvétel sorozatot.

A TestSTORM a szimuláció eredményéül egy *tiff* formátumú képsorozatot és egy szöveges adatfájlt készít, az utóbbi a felvillanások paramétereit tartalmazza. A képsorozat tetszőleges lokalizációs szoftverrel kiértékelhető, és az így kapott kiértékelte adatok összehasonlíthatók a TestSTORM által kiadott tényleges felvillanás értékekkel.

A szoftver ezen változatával a következő paraméterek voltak vizsgálhatóak: festési sűrűség, defókusztávolság, kötőelem hossz, expozíciós idő. A szoftver használatával Dr. Sinkó József megvizsgálta a feloldás defókusztávolságtól való függését, a jelölési sűrűség hatását pontszerű és vonalszerű struktúrákon, valamint az egymás közelében lévő struktúrák szétválaszthatóságát a jelölési sűrűség és a felvételi ráta függvényében.

3.2.3. Háttér levonás

A lokalizációs mikroszkópiai mérések során az egyedi molekulák fluoreszcens jelére sokszor ráakódik egy nem elhanyagolható mértékű háttér jel is. Ennek a fluoreszcens háttérnek a forrása példaként lehet a sejtek bizonyos összetevőinek [85, 86] vagy fém nanorészecskének [87, 88] az autofluoreszcenciája, illetve okozhatják gyengén gerjesztődő, inaktivált [11], fókuszon kívüli [86] vagy szabadon diffundáló [33] fluoreszcens jelölések is. A fluoreszcens háttér negatívan befolyásolja a lokalizálás folyamatát. Egyfelől, a háttér az általa bevezetett foton zaj miatt rontja a felvillanások lokalizálásának a precizitását, főleg a gyenge fényességű felvillanások esetén [50]. Másfelől, a háttér sokszor nem egyenletes, hanem valamilyen képsíkbeli struktúrával rendelkezik. Ilyen struktúrált háttér jelenléte eltolja a felvillanásokra illesztett PSF-ek középpontjait a háttér adott lokális maximuma felé, illetve téves lokalizációkat is eredményezhet [77, 86, 89, 90]. Ez utóbbi hatásokat a háttérnek a felvételtől történő levonásával lehet kiküszöbölni, amire az irodalomban

többféle eljárást is alkalmaztak.

Talán a legegyszerűbb megközelítés, hogy az egyedi felvillanások detektálását követően, azok vizsgálata során becsüljük meg a háttérét. Ezt megtehetjük, hogyha a PSF illesztésbe befoglalunk egy konstans vagy lineárisan változó háttér illesztést is, vagy pedig az illesztéshez kivágott felvétel részlet szélén lévő képpontok értékeiből következtetünk rá [91]. Ezzel azonban a fluorofór környékén lévő, a képsíkban lassan változó háttérre tudunk csak becslést adni, általános struktúrált háttér meghatározására ez a módszer nem alkalmas. Egy másik megközelítés lehet, hogy felül áteresztő képsíkbeli frekvencia szűrést alkalmazunk, figyelembe véve a PSF méretet [92], azonban a háttér kis méretű, PSF-fel összemérhető méretű struktúráit így sem tudjuk kiszűrni.

Jobb eredményt kaphatunk, ha a fluoreszcens jel időbeli változását elemezzük [86, 89], kihasználva, hogy míg a felvillanások gyors dinamikát követnek, addig a háttér időben lassan változik csak. Ilyen háttér eltávolítást lehet megvalósítani ún. lineáris szűréssel, mint a képpontok időbeli adatsoraira vonatkozó mozgó átlag [93] vagy közvetlen az időbeli jel Fourier transzformáltján végzett frekvencia szűrés [86]. Alternatívaként, a háttér jel képsíkbeli eloszlásának változatlanságát kihasználva, a teljes felvétel sorozatot átlagolhatjuk időben, és az átlagolt képet az egyes felvételekből, azok teljes fényességével skálázva, megkapjuk a háttér aktuális értékét [94]. Egy további, egyszerű lehetőség, hogyha az egymás utáni kamera felvételeket kivonjuk egymásból, így megkapjuk a fluoreszcens jel felvételtől felvételre történő változását [95, 96], amit a felvillanások idéznek elő. Az ilyen szűrések megoldják a háttér struktúráinak téves lokalizálását és általa bevezetett lokalizáció eltolódást, azonban a felvillanások fényességét torzítva adják vissza, mivel a háttér számolásába a felvillanások értékei is beleszólnak kisebb-nagyobb mértékben, ami elsősorban a nagy felvillanás sűrűségű esetben okozhat gondot.

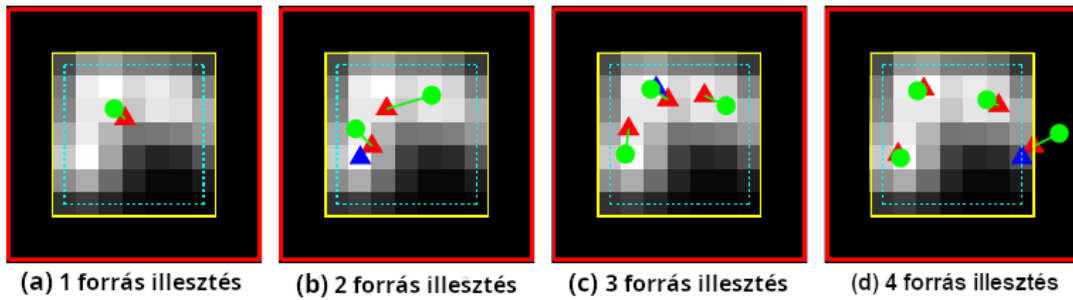
Ez a probléma csökkenthető, ha olyan módszert alkalmazunk, ami kevésbé érzékeny a felvillanások által eredményezett kiugró kamera képpont jel értékekre. Ez történhet medián szűrés alkalmazásával, akár egy mozgó ablakon belül számolt medián értékkel [89], akár iteratíván közelítve, és időben folyamatosan módosítva azt [97]. A medián az átlagoshoz képest kevésbé érzékeny a kiugró adatokra, így várható tőle, hogy a felvillanások jelenléte kevésbé befolyásolja a meghatározott háttér értéket [89, 91], azonban a medián értéke nem feltétlenül egyezik a háttér várható értékével [90, 91]. Másik meg-

oldásként kihasználhatjuk, hogy a fluoreszcens jelölések felvillanásai csak növelni tudják a mért fluoreszcens jel értékét, így egy időablakon belül megkeresve a minimális értékű időbeli adatokat, szintén megbecsülhető a háttér [98]. Ez önmagában alacsonyabb értéket eredményezne a valós háttérnél, így emellett szükség van statisztikai elemzésre is a háttér várható értékének megbecsléséhez.

A tényleges, torzítatlan háttér érték meghatározására egy további megközelítés, hogy valamilyen módon kiválasztjuk azokat a felvételeket a sorozatból, amelyeken nem történt más felvillanás egy kiválasztott felvillanás körüli adott régióban. Ezt követően az adott régióban a háttér értéke képkockánként megbecsülhető, az azokhoz időben közel lévő, felvillanást nem tartalmazó képkockák átlagaként [90, 99]. Ezáltal szisztematikus hiba nélkül vonhatjuk le a háttér, és határozhatjuk meg a felvillanások fényességét és pozícióját. Ehhez azonban még a háttér levonás és a lokalizálás előtt meg kell keresni, hogy mely képkockákon, és azokon belül milyen pozícióba történhettek felvillanások. Ez megtehető statisztikai elemzéssel [99], vagy például egy lineáris háttér levonást követő lokalizálással [90].

3.2.4. Mérési idő

A lokalizációs mikroszkópai mérések széles látóterű mérések, vagyis velük a teljes látótér-ről egyidejűleg veszünk fel képet. Ennek ellenére egyetlen méréshez szükséges idő gyakran igen hosszú, tipikusan a nagyjából tíz perctől a néhány óráig terjed az időtartama [70]. Ez annak a következménye, hogy a fluorofór felvillanásokat időben szét kell választani, és sok egymást követő felvételt kell készíteni ugyanarról a vizsgálandó területről. A mérési időt erősen befolyásolja a minta kiterjedésének jellege (dimenzionalitása) is, vagyis hogy pontszerű, vonalszerű, kiterjedt síkbeli vagy térbeli alakzatról készítünk-e képet. Ugyanolyan átfedési valószínűség mellett minden egyes dimenzionalitás növekedés hozzávetőlegesen egy nagyságrenddel növeli a struktúra feloldásához szükséges mérési időt [100, 101]. Azonban vannak olyan alkalmazások, amik időbeli folyamatokat vizsgálnak és a rövid mérési idő szükséges, példaként ilyenek az élő sejteken történő mérések [71]. A mérési idő jelentősen függ az alkalmazott fluorofór fotovilllogásának a dinamikájától. A dinamika fluorofór fajtánként jelentősen változó időskálán mozog [102], de a gerjesztő intenzitásával és puffer összetételével is hangolható bizonyos határok között [72, 77].



3. ábra. Több PSF illesztése három átfedő folt képére, az illesztett PSF-ek számát növelve több egymást követő lépésben (a, b, c, d). A piros háromszög jelöli a kezdeti becsült pozíciókat pozíciót, a zöld kör az illesztés által eredményezett pozíciót, a kék háromszög pedig az előző illesztési lépés után megmaradt legmagasabb kiugró képpont helyét. [104]

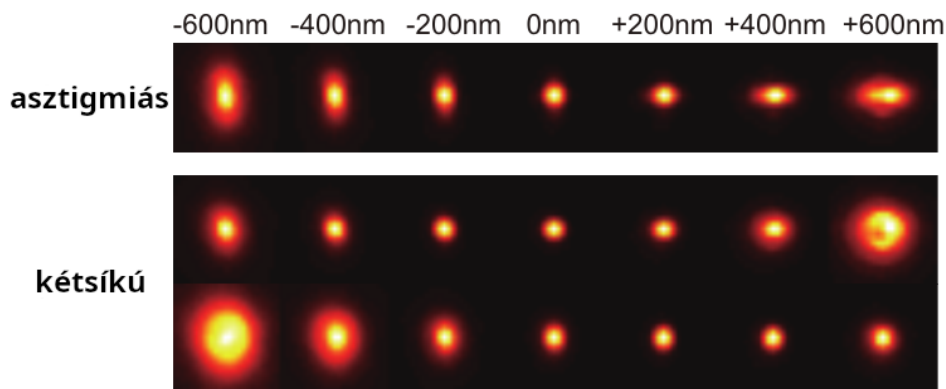
A mérési idő csökkentésének másik módja a felvillanások sűrűségének növelése. Ez azonban maga után vonja, hogy az átfedő felvillanások aránya is megnő. Ekkor a szokásos lokalizációs eljárás, hogy jól elkülönített felvillanások PSF-jeinek az algoritmus egyesével határozza meg a középpontjait, csak magas hibaarányal működik. És még hogyha létezik olyan lokalizáló algoritmus, ami az átfedő felvillanásokat nagy magabiztossággal azonosítja, és figyelmen kívül hagyja, a sűrűségnek ekkor is van egy véges optimális értéke a mérési idő szempontjából [78]. A probléma megoldására kifejlesztettek az átfedő felvillanásokat kezelni képes algoritmusokat. Egy népszerű megközelítés a több PSF, elsősorban Gauss függvény illesztése a felvételen lévő foltokra, viszont ehhez valamilyen módon meg kell határozni, hogy hány PSF függvény illesztése történjen. Ez sokszor csak a folton belüli lokális fényesség maximumok alapján kerül megállapításra [35, 103], vagy pedig iteratív módon, az illesztés hibája alapján [104–108] vagy bayezianus következtetés [109–111] által kerül lépésről lépésre frissítésre. Ilyen algoritmusok működését szemlélteti a 3. ábra. Ezen felül a sűrű minta lokalizálását meg lehet segíteni a felvételek előfeldolgozásával, ami jelentheti a felvétel sorozat kinyújtását megfelelő transzformációval [112], dekonvolúciót [98], vagy az aktív emitterekre vonatkozóan ritkasági feltételt kihasználva, a források pozícióinak a megbecslését tömörített érzékeléssel [113]. Az említett dekonvolúciót vagy tömörített érzékelést alkalmazó algoritmusok egy része a lokalizálás helyett közvetlenül egy nagyobb feloldású képet származtat a felvétel sorozatból [114–116].

3.2.5. Modalitások

A laterális pozíció mellett egyéb információk kinyerésére is lehetőség van a lokalizációs mikroszkópiában [117]. Ezek közül a 3D, a spektrális, a dipól orientáció és az elektrodinamikai kölcsönhatásra vonatkozó információ kinyerésének lehetőségeit fogom tárgyalni a továbbiakban.

Az egyik ilyen információ a 3D rekonstrukcióhoz szükséges axiális pozíció [118]. Habár ez meghatározható a PSF szélességéből (defókuszáltaságából), pl.: fotometria segítségével [119], ilyen módon a bizonytalanság nagy a fókuszsík körül, valamint annak a két oldala között nem tudunk különbséget tenni [120]. Ez a probléma megoldható, hogyha egyszerre két felvételi csatornában két különböző fókusz beállítással vesszük fel a felvételeket ugyanarról a területről, akár nyalábosztással [121], vagy két objektíves rendszerrel [117, 122]. Így egy adott forráshoz tartozó két folt mérete egyértelműen meghatározza annak axiális pozícióját (4. ábra). Azonban a két felvételi csatorna alkalmazásának kikerülése és az optikai elrendezés egyszerűbbé tétele érdekében, sok esetben valamilyen PSF módosítással kódolják az axiális információt a felvillanások foltjaiba. Talán a legegyszerűbb és a legelterjedtebb ilyen megközelítés az asztigmias 3D módszer [120, 123–126]. Ebben a esetben hengerlencsével vezetnek be asztigmat, aminek a következtében a fókuszsík két oldalán két, egymásra merőleges tengely mentén lesz elnyúlt a PSF, ezt a 4. ábra szemlélteti. Ekkor a PSF megilleszthető elliptikus Gauss függvényvel, és kalibrálást követően a PSF két mért szélesség értékéből egyértelműen visszaszámolható az axiális pozíció a mélység-élesség tartományán belül. Az asztigmias 3D-n kívül számos más egyéb PSF módosítás létezik, aminél különféle fázismaszkokat használnak, hogy axiális pozíciótól erősen alakfüggésű PSF-et kapjanak [127–131].

Az axiális pozíció meghatározására a fedőlemez-minta határfelület közelsége is kihasználható, amennyiben a minta közegének törésmutatója kisebb, mint a fedőlemezé és az immerziós közegé. Az emissziós oldalon a szuperkritikus szögű fluoreszcencia jelensége alkalmazható erre a célra [132, 133]. A fedőlemez közelében lévő fluorofórról a teljes belső visszaverődéshez tartozó kritikus szög felett is gyűjthető fluoreszcencia jel, aminek a mértéke erősen függ a felülettől való távolságtól. Mérve a kritikus szög feletti és alatti fluoreszcencia jelek arányát, a fedőlemeztől való távolság kinyerhető. Az említett fényességarányok helyett közvetlen fotometriai úton is meghatározható a fedőlemeztől való

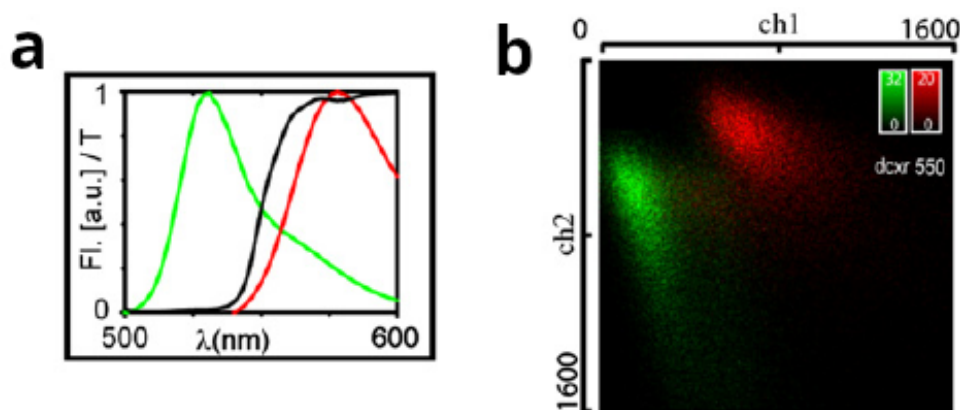


4. ábra. A kétsíkú és az asztigmias 3D módszereknél a PSF defókuszáltságtól való függése. [113]

távolság, viszont ekkor célszerű a pontosabb axiális pozíció meghatározás érdekében teljes belső visszaverődés megvilágítást (TIR) alkalmazni [134]. Ilyen módokon nagy pontosságú, de csak a fedőlemezről a hullámhossznál kisebb távolságon belül történő pozíció meghatározásra van lehetőség. Komplikált, két objektíves interferometrikus elrendezés is lehetőséget nyújt az axiális pozíció precíz megállapítására [135, 136]. Ilyenkor a fluorofór emisszióját axiálisan két ellentétes irányból begyűjtve, és önmagával interferáltatva több eltérő fázistolással, az eredendő intenzitás értékekből az axiális pozíció visszanyerhető.

A fluorofórok emissziós jeléből spektrális információhoz is juthatunk. Egyrészt a fluorofórok spektrális tulajdonsága függ a lokális kémiai környezettől, így a spektrum térbeli változása által ez is vizsgálható [137]. Másrészt több eltérő spektrális tulajdonságú fluorofórral jelölve a mintát ún. többszínű mérést is végezhetünk, gazdagabb struktúrális információt nyerve egyazon mintáról [138]. Például különböző fehérjék térbeli elhelyezkedése alapján a közöttük lévő kölcsönhatásokra lehet következtetni [139]. A spektrális információ kinyerhető, ha a PSF-et hullámhossz függő módon módosítjuk például spektrális bontóelemmel [137, 140, 141] vagy hullámhossz függő fázismaszkkal [142], ekkor a PSF eltolódásába vagy alakjába van belekódolva a spektrális információ. A többszínű mérés esetén egy másik, talán elterjedtebb megközelítés, hogyha több színcsatorna alkalmazásával, a csatornában begyűjtött fotonszámok alapján, fotometriai úton választjuk szét a fluorofórokat. Ez történhet akár a különböző fluorofórok szelektív gerjesztésével a megfelelő hullámhosszúságú lézereket alkalmazva [138, 143, 144], vagy az emissziós jel spektrális szétválasztásával dikroikus tükrök és szűrők segítségével [117, 144, 145]. Ez

utóbbi esetben a több színcsatorna felvétele végezhető egyidejűleg is. Tipikusan két színcsatornát alkalmaznak erre a célra, amikkel akár kettőnél több fluorofórt is meg lehet különböztetni [144, 146]. Azonban ennek a technikának is megvannak a nehézségei. A több színcsatornával történő méréseknél, a fluorofórok abszorpciós és emissziós spektrumainak a szeparációjától és szélességeitől függően, egy fluorofór egynél több csatornában is szolgáltathat nem elhanyagolható jelet. Ekkor a csatornák közti jel arányokból állapítjuk meg, hogy a felvillanás melyik fluorofórhoz tartozhat [144, 145]. Ezt a 5. ábra szemlélteti. A módszernél cél a minél kisebb áthallás elérése, vagyis az, hogy minél megbízhatóbban tudjuk megállapítani a felvillanásokról, hogy azok melyik fajta fluorofórhoz tartozhatnak. A többszínű méréshez a fluorofórokat nemcsak a spektrális tulajdonságuk alapján kell megválasztani, hanem azt is figyelembe kell venni, hogy ugyanolyan környezetben, ugyanazzal a pufferral lehessen velük egyedi molekula detektálást végezni [146]. Valamint a jelölés sűrűségére különösen oda kell figyelni, főleg, hogyha valamelyik fluorofór jele több színcsatornában is megjelenik. Ezen felül a mérés végeztével a különböző színcsatornákhöz tartozó nagy feloldású képeket össze is kell igazítani, ami különböző megközelítést igényelhet attól függően, hogy a színcsatornák felvételei egyidejűleg, vagy egymást követően készültek. Ezen felül képtérbeli pozíciótól függő kromatikus hiba is lehet az optikai rendszerben, amit kalibrálással lehet korrigálni [147].



5. ábra. Kétszínű mérést bemutató ábra, (a) a két fluorofór (TMR (vörös) és Citrine (zöld)) spektrumai és a spektrális osztás mértéke a két színcsatornára (fekete), (b) a két fluorofór mérhető jel erősségei a két színcsatornában. [148]

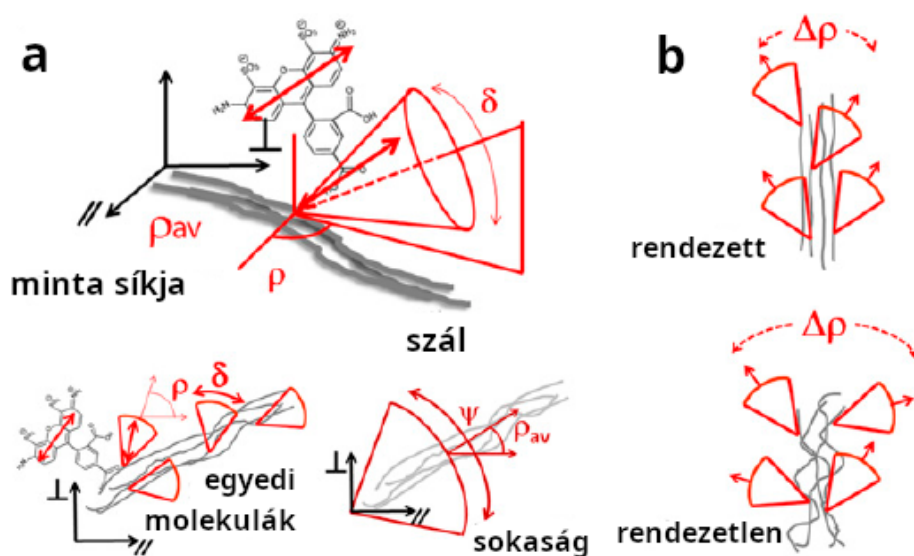
A fluorofórok irányultságáról is van lehetőség információkat szerezni. Az egyedi molekula detektálásra alkalmazott fluorofórok általában nem tekinthetők izotróp emitterek-

nek, kevés kivételtől eltekintve, egyetlen dipólus momentummal írhatóak le. Az emittált fény térerősség eloszlása és a polarizációja is ennek megfelelően függ a fluorofór irányultságától. Ez az orientáció függés azonban a legtöbb esetben nem figyelhető meg, mivel a fluorofórok sokszor egy szabad forgást lehetővé tevő kötőelemen keresztül kapcsolódnak a mintához, így azok irányultsága kiátlagolódik a kamera expozíciós ideje alatt. Viszont vannak minták, amibe a fluorofór jobban beágyazódik, vagy akár közvetlen módon köt hozzá, ilyen esetekben a forgása korlátozott, illetve az orientációja rögzített. Ekkor az orientációt mérve, a minta molekuláris elrendeződéséről nyerhetünk információkat [69, 149–153]. A rögzített fluorofórok irányultságának információja kinyerhető a PSF alakjából is, amennyiben a felvillanásokra a szokásos Gauss helyett vektoriális PSF modellt illesztünk [43]. Azonban az orientáció meghatározás pontossága javítható defókuszálással [154, 155], vagy valamilyen fázismaszk alkalmazásával [69, 130, 156, 157]. Egy másik elterjedt megközelítés, hogyha az emittált fényt a polarizációs állapota szerint két részre osztjuk, és két külön csatornában detektáljuk a felvillanások képeit. Ekkor a PSF alak helyett a két csatornában begyűjtött fotonszám viszonyaiból határozhatjuk meg az emisszió polarizációját [158, 159]. A két polarizációs csatorna azonban önmagában nem elég a teljes orientáció és a forgási szabadság kinyerésére. Ezekre azáltal következtethetünk, ha moduláljuk gerjesztés polarizációját [160], előismeretekkel rendelkezünk a mintáról [161], vektoriális PSF modellt illesztünk a két polarizációs csatorna jeleire [152] vagy hogyha négy polarizációs csatornát alkalmazunk [162].

Az emisszió szögeloszlása miatt az alkalmazott objektív numerikus apertúrája is jelentőséggel bír, az nem csak a PSF szélességét és fényességét, hanem az alakját is befolyásolja [41, 63]. Továbbá a numerikus apertúra hatását érdemes figyelembe venni a két polarizációs komponens fényesség mérése szempontjából is. A nagy numerikus apertúra "összekeveri" az orientációból adódó polarizációs komponenseket, kis mértékben csökkentve a mérhető polarizáció fokot az adott orientáció esetén [163]. Így erre is érdemes korrigálni a polarizációs csatornák adott polarizációs komponensre vonatkozó transzmissziója mellett [161]

A fluorofór korlátozott forgása jól modellezhető a dipólus vektornak egy gömbsüvegen felületén belüli szabad forgásával [164] (6. ábra). A modell szerint a fluorofór az orientált-ságának várható iránya körüli α félnyílás szöggel jellemezhető gömbsüveget egyenletesen

bejárja a felvétel ideje alatt. Ekkor még megkülönböztetünk két határesetet. Az egyik határesetben a forgási diffúziós időállandó sokkal rövidebb, mint a fluorofór fluoreszcencia élettartama, a másik esetben pedig fordítva [160]. Az előbbi közelítésben az átlagos emissziós intenzitás eloszlást nem befolyásolja a gerjesztés polarizációja, az utóbbinál pedig igen. Az általános eset, amikor egyik időállandó sem hanyagolható el, jó közelítéssel számolható a két határeset súlyozott átlagaként.



6. ábra. A korlátozott forgással rendelkező festékekre alkalmazott modell szemléltetése szálas minta esetén, (a) a festék dipólus orientációját a piros nyíl jelöli, az általa bejárható orientáltságokat pedig a δ félnyílásszögű piros gömbsüveg. A gömbsüveg maga is egy ρ szögben helyezkedik el a szálak tengelyéhez képest. A struktúra rendezettségének szerepe a mérhető egyedi molekula orientációk szórására (b). [161]

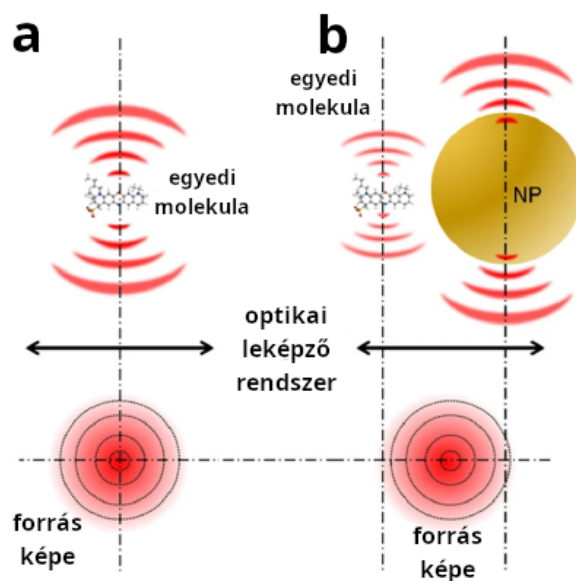
A fluorofórok elektrodinamikai kölcsönhatásba is léphetnek a környezetükkel [165, 166], ami szintén vizsgálható egyedi molekula detektálással [167, 168]. Ilyen kölcsönhatás elsősorban a fém, plazmonikus nanostruktúrák közelében jelentkezik erőteljesen, de félvezető nanorészecskék esetén is számottevő lehet [169]. Maga a kölcsönhatás két elkülönülő módon nyilvánul meg. Egyrészt a plazmonikus nanostruktúra kölcsönhat a gerjesztő térerősséggel, lokális térerősséget kialakítva maga körül, ennek következtében a fluorofór megváltozott gerjesztést érzékel. Másrészt a nanostruktúra antennaként rásegít az emisszióra új sugárzásos és sugárzás nélküli relaxációs útvonalakat vezetve be a fluoreszcenciába, ami következtében megváltozik a kvantum hatásfok és a fluoreszcencia élettartam. Továbbá módosul az emisszió szögeloszlása [170], spektruma [171] és po-

larizációja [172] is. Ezek a jelenségek erősen függenek a fluorofór-nanorészecske relatív pozíciójától, irányultságától és távolságától, a mérések tervezése és kiértékelése során ezt figyelembe kell venni. Az említett jelenségek legközvetlenebbül, az egyedi molekula lokalizálás módszer tekintetében, talán a fluorofórok fényesség változásában jelennek meg. Összehasonlítva a nanorészecske közelében lévő, és az attól független fluorofórok fényességét, a kölcsönhatás mértékére lehet következtetni [97, 173–175]. Ezáltal egyedi molekula detektálással lehetőség van a plazmonikus nanostruktúrák tulajdonságait is vizsgálni nagy feloldásban, megtartva az előnyt, hogy a sokaságból származó átlagolt információ helyett egyedi eseményekből származó statisztikai információt kapunk.

Ilyen méréseknél egy nehézség, hogy az emisszió szögeloszlásának módosulása a PSF torzulását eredményezi, és megnehezíti a pozíció kiértékelést. Ilyen torzult PSF esetén annak a középpontja már nem felel meg a fluorofór pozíciójának, hanem szisztematikus hibával van terhelve, így általános esetben a nanostruktúra alakja és mérete sem térképezhető fel hűen lokalizációs módszerrel [170, 176, 177]. Ez többnyire abban jelenik meg, hogy a lokalizációk a nanorészecske középpontja felé tolódnak el a fluorofór pozícióhoz képest [178, 179] (7. ábra). Ez az eltolódás néhány, megfelelő szimmetriájú struktúra esetén elméleti modellezés segítségével korrigálható [180]. Továbbá spektrálisan kellő mértékben lehangolva a fluorofór emisszióját a plazmonikus struktúra rezonanciájáról elérhető, hogy az emisszió során a fluorofór-nanostruktúra kölcsönhatás csak minimális legyen, és ekkor a pozíció feltérképezés pontossága is megmarad [175, 181, 182].

3.3. PSF modellek

A lokalizációs mikroszkópiában a legelterjedtebben a Gauss PSF modellt használják. Ezt egyrészt a modell kis számításigénye indokolja, másrészt a legtöbb esetben jó közelítéssel leírja a mikroszkóp rendszerek valós PSF-jeit. Stallinga és munkatársai megmutatták [41], hogy amennyiben a dipól forrás szabad forgást végezhet, fókuszált esetben a vektoriális modellel számolt PSF-re jól illeszkedik a Gauss függvény. Azonban vannak olyan körülmények, amikor nem használhatjuk a Gauss PSF modellt, mint példaként erős defókuszáltság mellett, vagy rögzített vagy korlátozott dipól orientációk esetén. Az előbbi eset kezelhető a skaláris modellel, viszont az utóbbi esetben a vektoriális modellt kell alkalmazni.



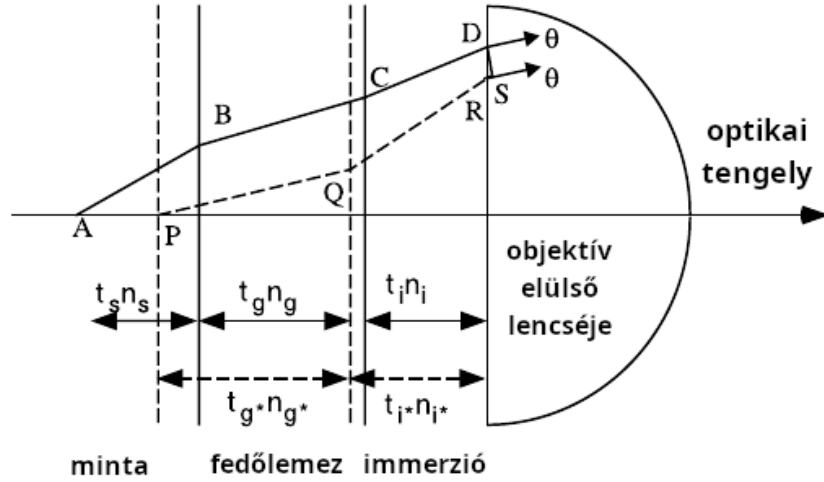
7. ábra. Plazmonikus nanorészecskével történő kölcsönhatás következtében történő PSF középpont eltolódás (b) szemléltetése a kölcsönhatás nélküli, "szabad" esethez képest (a). [168]

3.3.1. Skaláris PSF

Skaláris PSF modellként elterjedten használják a Gibson és Lanni által felállított modellt [183]. A modell izotróp pontforrás képét írja le a skaláris Kirchhoff diffrakciós formulán alapulva, és figyelembe veszi a rétegzett közeg által okozott fázisfront aberrációt. A modell feltételezi, hogy a mikroszkóp objektív az Abbe-féle szinusz feltételnek eleget tesz, így az objektív belső felépítését nem használja ki, hanem csak azt, hogy a kísérleti körülmények mennyire térnek el az ideális körülményektől.

A minták immerziós objektívvel történő vizsgálata során a forrás, és az objektív elülső oldali lencséje között sík rétegzett közegek helyezkednek el (immerziós olaj, fedőlemez, minta közege), míg az objektívek arra az esetre vannak tervezve, amikor a forrás közvetlen a fedőlemezen helyezkedik el. Viszont a mérések során ezen közegeknek mind törésmutatói, mind a vastagságai eltérhetnek az ideális körülményektől (8. ábra).

A modell geometriai optikai megfontolásokat kihasználva vezeti le, hogy mekkora optikai úthossz különbséget vezet be az ideálistól való eltérés a sugár optikai tengellyel bezárt szögének függvényében. Majd a szinusz feltételt kihasználva a sugár szögét kifejezi a numerikus apertúrával, és a sugárnak az apertúrán vett radiális távolságával:



8. ábra. A rétegzett közegen keresztül történő leképzést leíró Lanni-Gibson fázisaberráció [183]. Az s , g és az i indexek jelölik rendre a minta, a fedőlemez és az immerziós közegeket.

$$OPD \approx n_s t_s \sqrt{1 - \frac{NA\rho}{n_s}} + n_g t_g \sqrt{1 - \frac{NA\rho}{n_g}} - n_g^* t_g^* \sqrt{1 - \frac{NA\rho}{n_g^*}} + n_i t_i \sqrt{1 - \frac{NA\rho}{n_i}} - n_i^* t_i^* \sqrt{1 - \frac{NA\rho}{n_i^*}}, \quad (2)$$

ahol OPD a Lanni-Gibson fázisaberrációért felelős optikai úthosszkülönbség, az NA az objektív numerikus apertúrája, ρ a sugár apertúráján vett radiális pozíciója, a közegek jelölési pedig megegyeznek a 8. ábrán alkalmazott jelölésekkel.

3.3.2. Vektoriális PSF

Richards-Wolf PSF modellt [184, 185] széles körben alkalmazzák vektoriális PSF számolásokhoz. A modell integrál reprezentációval fejezi ki a képtérben kialakuló elektromos térerősség vektort. A modell a valós fizikai problémának a közelítése abban az esetben, amikor mind az apertúra lineáris mérete, mind a képpont apertúrától való távolsága nagy a fény hullámhosszához képest (a modell figyelmen kívül hagyja a határfeltételeket). A Huyges-Fresnel elv analógiájaként, és hasonlóan a skaláris Debye modellhez, elemi sík

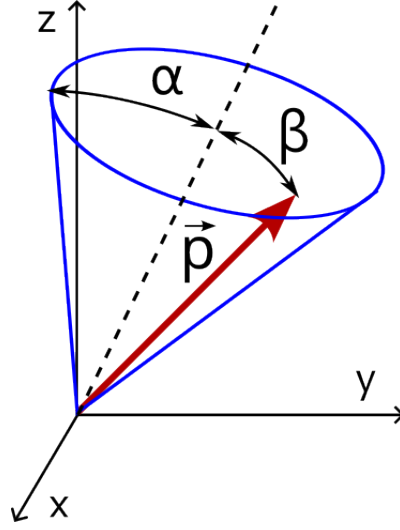
hullámokkal fejezi ki a kilépő apertúra mögött kialakuló térerősséget. Ennek megfelelően lehetőség van tetszőleges orientációjú, rögzített dipólus forrás képét kiszámolni. Ehhez szükség van a kilépő apertúrán kialakuló elektromos térerősség vektor ismeretére, ami kifejezhető azáltal, hogy a dipólus által kibocsájtott távolteret optikai sugarak segítségével propagáltatjuk:

$$\vec{\varepsilon}(\rho, \phi) \sim \{[\vec{p}\vec{e}_p^m(\rho, \phi)]\vec{e}_p^{ap}(\rho, \phi)t_p(\rho) + [\vec{p}\vec{e}_s(\rho, \phi)]\vec{e}_s(\rho)t_s(\rho)\}a(\rho)e^{ikOPD(\rho)}, \quad (3)$$

ahol $\vec{\varepsilon}$ a leképző rendszer apertúráján megjelenő térerősség, amire a diffrakciós integrál alkalmazandó, ρ az apertúrán vett radiális pozíció, ϕ a sugár azimutális szöge, $\vec{p}$ fejezi ki a dipólus orientációját, $\vec{e}_p^m$ és $\vec{e}_p^{ap}$ a sugár beesési síkkal párhuzamos, a sugárra merőleges (a térerősség p komponensével párhuzamos) egységvektorok a minta közege belül s az apertúránál, $\vec{e}_s$ a sugár beesési síkjára merőleges (a térerősség s komponensével párhuzamos) egységvektor, a az apodizálást leíró tag, k a hullámszám. Az összefüggésből magában foglalja, hogy míg az s komponens irányítottsága nem változik a rétegeken való áthaladáskor, a p komponensé igen.

Vektoriális PSF modellek segítségével le lehet írni azt az esetet is, amikor a dipólus nem rögzített, hanem bizonyos korlátok között változtathatja az orientációját, a kamera expozíciós idejénél gyorsabban, kiátlagolódva alatta. Ez az irodalomban tipikusan azzal a közelítéssel van modellezve, hogy a dipólus vektora szabadon foroghat egy gömbsüveg felületén belül (9. ábra), azt egyenletesen bejárva [164].

Ebben az esetben figyelembe kell venni, hogy a fluoreszcencia emisszió során dipólus orientációja nem feltétlenül egyezik meg a gerjesztődés időpillanatában felvett orientációval. Ilyenkor megkülönböztethetünk két határesetet. A "lassú forgású" esetben a dipólus elfordulása elhanyagolható az idő alatt, amíg a gerjesztődéstől számítva kibocsájtja a foton, vagyis az abszorpciós és emissziós dipól orientációk megegyeznek. Míg a másik, a "gyors forgású" határesetben a dipólus forgása jóval rövidebb időskálán történik, mint foton kibocsájtás, így az emissziós és abszorpciós dipól orientációk egymástól függetlennek tekinthetők. Az általános esetet leíró összefüggés bonyolult, viszont jól közelíthető a két határeset és a hozzájuk tartozó karakterisztikus idők súlyozott átlagával [160]:



9. ábra. A $\vec{p}$ dipól momentum (piros nyíl) orientációja a modell szerint korlátozott, egy α félnyílásszögű gömbsüvegen (kék vonalak) belül vehet csak fel értékeket (szabadon), és annak a tengelyével (szaggatott vonal) $\beta < \alpha$ szöget zárva csak be.

$$PSF_{\text{általános}} = \frac{\tau_r}{\tau_r + \tau_f} PSF_{\text{lassú}} + \frac{\tau_f}{\tau_r + \tau_f} PSF_{\text{gyors}} , \quad (4)$$

ahol τ_r és τ_f a rotációs korrelációs időállandó és a fluoreszcencia élettartam, $PSF_{\text{lassú}}$ és a PSF_{gyors} pedig a "gyorsan" és "lassan" forgó dipól momentumok által létrehozott PSF-ek.

A két határesetnél a PSF a dipól orientációkra vett átlagolással a következőképpen írható fel:

$$\begin{aligned} PSF_{\text{gyors}} &= \int PSF(\vec{p}) P(\vec{p}) |\vec{E}_{\text{gerjesztő}} \vec{p}|^2 d\vec{p} \\ PSF_{\text{lassú}} &= \int PSF(\vec{p}) P(\vec{p}) d\vec{p} \int |\vec{E}_{\text{gerjesztő}} \vec{p}|^2 d\vec{p} \end{aligned} \quad (5)$$

$$P(\vec{p}) = \begin{cases} \frac{1}{2\pi(1-\cos(\alpha))} & \text{ha } \beta < \alpha \\ 0 & \text{különben,} \end{cases} \quad (6)$$

ahol $PSF(\vec{p})$ az adott orientációjú $\vec{p}$ dipól által létrehozott a PSF-et, $P(\vec{p})$ pedig a dipól orientációk valószínűségi sűrűségét, a $\vec{E}_{\text{gerjesztő}}$ pedig a gerjesztő térerősséget jelöli.

4. Célkitűzés

A lokalizációs mikroszkópia előnye, a nagy feloldás mellett, hogy az egyedi molekulák detektálásából fakadóan sokrétű információ kinyerését teszi lehetővé. Az általa nyújtott lehetőségeket teljes magabiztossággal kiaknázni viszont csak akkor lehet, hogyha tisztában vagyunk a képalkotási folyamat korlátaival, és fel tudjuk ismerni az eközben bevezetett hibákat.

Célul tűztem ki, hogy az egyedi molekula lokalizációs mérések szimulálására szolgáló TestSTORM szoftver eszköztárát kibővítssem, és ezáltal többféle lokalizációs mérés szimulációs vizsgálatát tegyem lehetővé, mindezt minél inkább valósághűen. Erről tovább lépve megvizsgálom, hogy a valósághű felvillanás pontátviteli függvények és a különböző mérési modalitások esetén milyen jellegű lokalizációs műtermékek várhatóak. Ezen felül eljárást dolgozok ki, amivel az egyedi molekula jelekből kinyerhető a felvillanások fényességeinek információja.

A kitűzött célok elérésére az alábbi feladatokat terveztem megvalósítani:

- A TestSTORM szimulációs szoftverben lehetővé teszem a skaláris és vektoriális PSF modellek alkalmazását, polarizáció érzékeny, kétszínű és asztigmias 3D mérések szimulálását, valamint egyéb funkciókkal is ellátom a szoftvert, mint a drift, a struktúrált háttér vagy a kötőelem irányítottság figyelembe vétele.
- Megvizsgálom a skaláris PSF modell defókuszáltság aszimmetriájának hatását a rekonstruált struktúrára. A vektoriális PSF modellel pedig a fotoszelekció és a torzult PSF-et szerepét tanulmányozom rögzített dipólus momentummal rendelkező források esetén.
- A szimulációs modalitásokat alkalmazva a 3D asztigmias módnál megvizsgálom a struktúrált háttér hatását, a polarizáció érzékeny szimuláció segítségével értelmezem a csoport egy korábbi mérési eredményét, a kétszínű modalitás esetén pedig a lokalizáció fényesség alapú szűrés hatékonyságát vizsgálom meg az áthallásra vonatkozóan.
- A felvillanás fényesség információ kinyerésére kidolgozok egy adatkiértékelési eljárást, és ezt plazmonikus nanorudakon végzett dSTORM mérések elemzésére felhasználom.

5. Eredmények

Kutatási eredményeimet három alfejezetben tárgyalom, amelyekre három tézispont építek. Az alábbiakban erre térek ki részletesen.

5.1. TestSTORM 2.0

A PhD munkám részeként a TestSTORM elnevezésű, dSTORM mérések szimulálására szolgáló szoftver fejlesztését végeztem. Az SMLM technikáknál, mint például a dSTORM, a lokalizált koordinátákból alkotott kép értelmezése gyakran nem egyértelmű (lásd: 3.2.2). Ideális esetben a lokalizált kép hasonló struktúrát alkot, mint a minta kötőhelyeinek síkbeli vetülete, egyedül a festékek kikötéséhez használt kötőelem hossza (tipikusan 20 nm alatti), és a lokalizációs precizitás (tipikusan 10 – 20 nm) okoz kis, véletlenszerű hibát a rekonstruált képen. Amennyiben a mérési feltételek eltérnek az ideálistól (ritka, nem átfedő felvillanások, szabadon forgó festék molekulák, kis háttér, rögzített minta pozíció, stb.) a lokalizált kép eltérést mutathat a vizsgálandó, nem ismert struktúrától. Így annak vizsgálata és megértése, hogy a különböző minta jelölési és mérési paraméterek mennyiben befolyásolják a megalkotott lokalizált kép minőségét és megbízhatóságát, szükségszerű. A témakörben létező szimulációs szoftverek többsége a különböző kutató csoportok saját célra fejlesztett speciális szoftverei, amiket általában nem tesznek mások számára hozzáférhetővé. Csak kevés szabadon elérhető, általános célú szimulációs szoftver létezik ezen a területen [83]. Az egyik ilyen szoftver a TestSTORM. Ennek alkalmazásával lehetőség nyílik ismert, jól definiált mintázaton történő mérés szimulálására, így a kiértékelt lokalizációs kép összevethető a tényleges struktúrával. Mivel a szimuláció során pontosan ismerjük a jelölt struktúrát és a festékek pozícióit, így könnyen vizsgálható, hogy a minta különböző paraméterei hogyan befolyásolják a végleges lokalizált képet, esetleg milyen műtermékeket vezethet az be, ha ideálistól eltérő paraméterekkel végezzük a mérést. Továbbá alkalmazása segíthet valós mérési eredmények értelmezésében, azok helyessége megerősíthető vele.

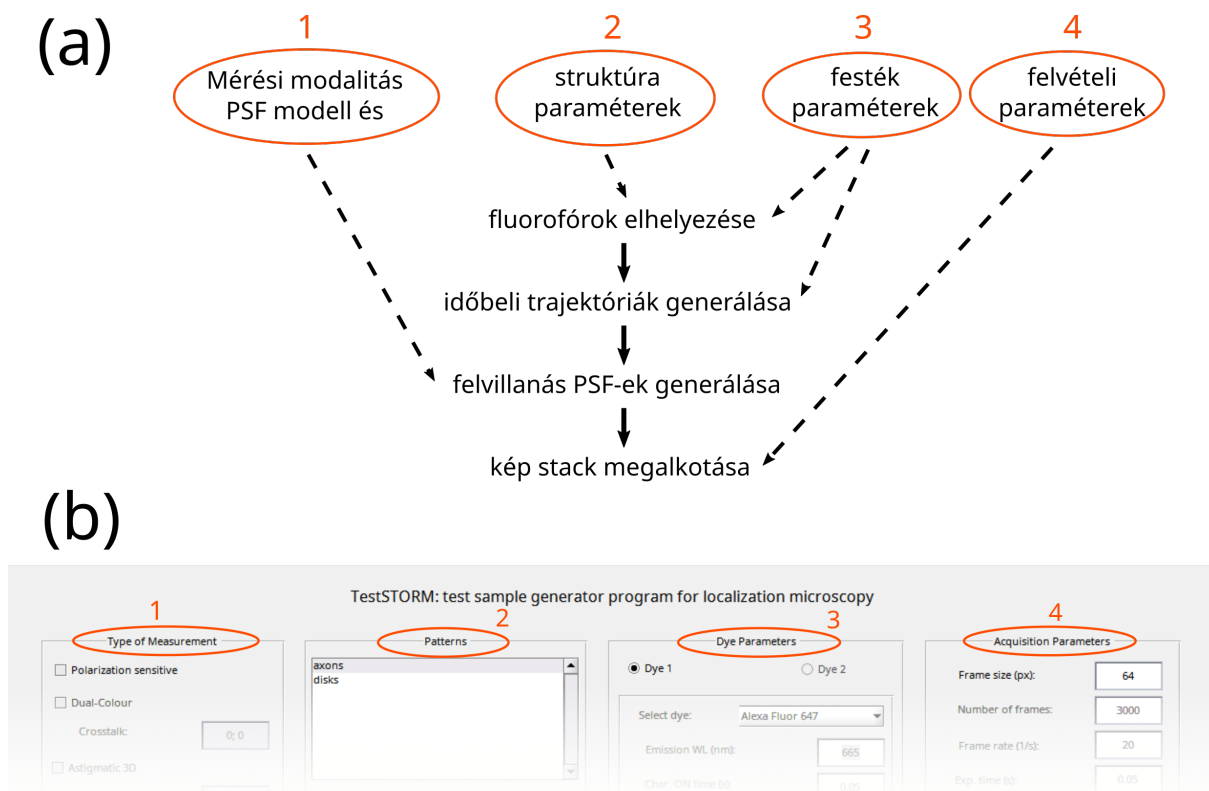
A TestSTORM első változat funkcióinak kibővítését végeztem annak érdekében, hogy valóságosabb és több fajta mérési szimulációt lehessen vele végezni. Egyrészt kibővítettem a szimulálható biológiai struktúrák körét, másrészt realisztikusabb, fizikai megfon-

tolásokon alapuló PSF modellek alkalmazását és különböző mérési módok szimulálását tettem lehetővé. Ezek mellett a szoftver olyan kiegészítő funkciókkal is bővült mint a drift, a struktúrált háttér vagy a kötőelem irányítottság.

A szimuláció menete A szimuláció összeállításához a felhasználónak négy paraméter csoportban lévő értékeket kell beállítani (10. ábra). Az első paraméter csoport a szimulált mérési modalitást és az alkalmazott PSF modelleket tartalmazza. A mérési modalitás szabja meg, hogy a laterális pozíción kívül még milyen információ kinyerésére van lehetőség a felvillanások jeleiből. Ezek mind valamilyen PSF módosításon alapulnak, legyen az fázis torzítás, spektrális vagy polarizáció szerinti szétválasztás. Ezen kívül itt kell megadni a megfelelő PSF modell kiválasztását is. A második csoport a vizsgálandó mintázat geometriáját és jelölését írja le. Ide tartozik a mintázat típus kiválasztása, a méretének és elhelyezkedésének beállítása, valamint a jelölési sűrűséget és a fluorofórok kikötését meghatározó paraméterek. A harmadik paraméter csoport a festékek tulajdonságait öleli fel, mint a fényesség és az időbeli viselkedést (villogást) leíró karakterisztikus. A negyedik csoport a kamera felvételi beállításait foglalja magába, mint a kép mérete, expozíciós idő hossza és a foton-kamera jel átváltási tényezők.

Ezen paraméterek beállítása után el lehet indítani a szimulált felvétel generálását. A felvétel sorozat készítés alapvetően hasonlóan történik, mint a TestSTORM 1.0-ás verziójában (3.2.2), de több lépés is módosításra szorult a bővült funkcióknak köszönhetően. Első lépésben a szoftver elhelyezi a struktúrákon a kötőhelyeket, majd hozzájuk kapcsolja a Poisson-eloszlást követő, véletlenszerű számosságú festéket, gömbfelületen értelmezett Gauss-eloszlás által leírt véletlenszerű helyzetben. A festékek kezdeti pozícióinak meghatározása után figyelembe veszi a minta elmozdulását ("drift"), és minden egyes felvillanáskor frissíti a festék pozícióját. A kiválasztott PSF modell alkalmazásával kiszámolja a felvillanások képeit, és hozzáadja őket a felvétel sorozatot. Majd meghatározza a struktúrált hátteret, amit szintén hozzáad a felvételhez.

Új előre definiált struktúrák A TestSTORM-ba beépítettem négy előre definiált, biológiailag releváns struktúrát (11. ábra), módosítottam a vonal alakzatot, hogy rendelkezzen vastagsággal, és megadtam a felhasználók által külső programban megalkotható struktúrák beolvasására lehetőséget.

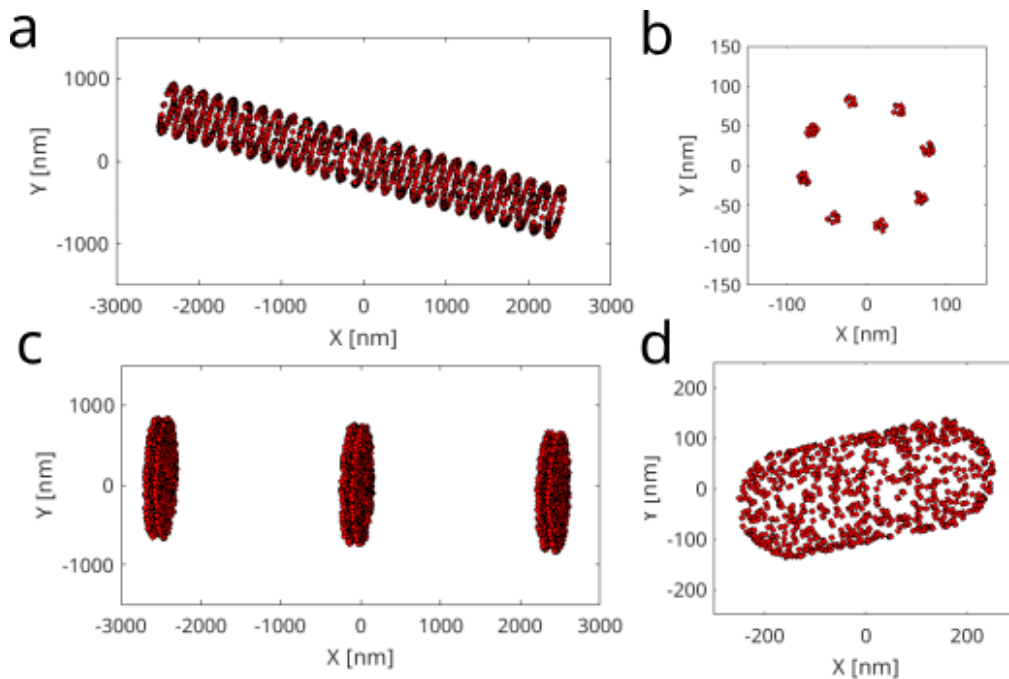


10. ábra. A szimuláció lépéseinek szemléltetése, (a) a szimuláció folyamatábrája és annak a jelölése, hogy a négy paraméter csoport mely lépésekre van hatással, (b) a TestSTORM grafikus kezelőfelületén az említett négy csoport.

- Az "axon" struktúra az axon iniciális szegmenseken (AIS) lévő aktin gyűrűket hivatott modellezni. Ezek az aktin gyűrűk a membrán belső oldalán helyezkednek el, egymással párhuzamosan, ~ 190 nm periodicitással. Pontos felépítésüket először dSTORM méréssel határozták meg [138].
- A "vonat" struktúra a mikrotubulusok modellezésére szolgál, amin a kötőhelyek a egy állítható sugarú hengeralakzat felületén helyezkednek el. A felhasználónak az előre definiált alakzat mellett lehetősége van tetszőleges tört vonal alakzatot is berakni a szimulációba, aminek a megrajzolására a JFilaments ImageJ kiegészítővel [186] van lehetőség.
- A "nyolcszög" struktúrát a sejtmembrán magpórus komplexei (NPC) ihlették, ennél kötőhelyek szabályos nyolcszög csúcaiban helyezkednek el. A struktúra nagy fokú szabályossága, és jól ismert méretei miatt gyakran használják a kísérleti lokalizációs

pontosság ellenőrzésére.

- A "korong" struktúrák egy tengelyre felfűzött, periodikusan ismétlődő kettős korongokból állnak. Példaként hasonló struktúrákat alkot a szarkomerekben a számos fehérje az I-sávban, mint pl.: az alfa-aktin, a kettin vagy projectin, valamint a H-zóbánan a tropomodulin vagy SALS.
- A "rúd" struktúra a végükön félgömbökkel lezárt hengerpalástok. Bizonyos baktériumok sejtfaala alkot ezzel leírható alakzatot.
- Egyedi struktúrák megalkotása céljából lehetőség van tetszőleges, háromszögekből megalkotható felületet beolvasni, ami a festékek kötőhelyéül szolgál.



11. ábra. A TestSTORM 2.0 által szimulálható alakzatok, (a) döntött "axon", (b) "nyolcszög", (c) döntött "korong" és (d) "rúd" struktúrák. A piros pöttyök a szoftver által generált fluorofórok helyeit jelölik.

PSF modellek A TestSTORM új verziójába a Gauss PSF modell mellé bekerült még a skaláris Lanni-Gibson PSF modell [183], valamint a vektoriális Richards-Wolf PSF modell is [184].

Habár a skaláris PSF modell a valós esettől eltérően nem dipólus momentumok (vektoriális) térerősségének a diffrakcióját modellezi (csak kis numerikus apertúra közelítésben írja le ezt a problémát), a Gauss PSF modellen több szempontból is túl mutat: figyelembe tudja venni a fázisfront aberrációt, és számot tud adni a PSF intenzitás eloszlásának a gyűrűsödéséről. Fázisfront aberrációk hiányában, fókuszált esetben és kis numerikus apertúrák esetén a modell a jól ismert Airy korongnak megfelelő intenzitás eloszlást eredményez. Az Airy korong esetén a központi folt körül a radiális távolsággal egyre halványodó gyűrűk helyezkednek el koncentrikusan. A gyűrűsödés viszonylag kis mértékű, a gyűrűk a fényteljesítmény 16,1%-át tartalmazzák [187]. Defókuszálás hatására a PSF jellege megváltozik, a gyűrűk jelentősebbé válnak a központi fothoz képest, sőt az optikai tengelyen az intenzitás maximum helyett intenzitás minimum is kialakulhat. A gyűrűsödés a defókuszáltság mértékével változik, viszont a PSF a fókuszpont körül jó közelítéssel axiálisan szimmetrikus marad (Debye közelítés), vagyis hogyha a fókuszsíktól eltávolodunk egy adott mértékben negatív és pozitív irányba, akkor egyező intenzitás mintázatokat kapunk. Viszont a rétegezett közeg által bevezetett fázisaberráció megbontja ezt a szimmetriát. A tipikus mérési elrendezésnél ezek a rétegezett közegeket határoló síkok merőlegesek az optikai tengelyre, és a közegeken belül a törésmutató homogén és izotróp. A TestSTORM-ba az említett PSF modellek azzal az egyszerűsítéssel lettek implementálva, hogy az immerziós közeg és a fedőlemez törésmutatója megegyezik, és csak a forrása mintában vett mélysége fog hozzájárulni a fázisfront aberrációhoz. Ennek megfelelően a fázisaberráció, és a létrejövő PSF is megtartja hengerszimmetriáját.

A fázisaberráció a normált apertúra sugár szerint sorba fejthető:

$$\begin{aligned} \Delta\phi(\rho) &\approx \frac{n_s t_s}{\lambda} \sqrt{1 - \frac{NA\rho}{n_s}} + \frac{n_i(t_i - t_i^*)}{\lambda} \sqrt{1 - \frac{NA\rho}{n_i}} \\ &= \frac{n_s t_s + n_i(t_i - t_i^*)}{\lambda} - \frac{1}{2} \left(\frac{n_s t_s}{\lambda} \frac{NA^2}{n_s^2} + \frac{n_i(t_i - t_i^*)}{\lambda} \frac{NA^2}{n_i^2} \right) \rho^2 - \\ &\quad \frac{1}{8} \left(\frac{n_s t_s}{\lambda} \frac{NA^4}{n_s^4} + \frac{n_i(t_i - t_i^*)}{\lambda} \frac{NA^4}{n_i^4} \right) \rho^4 - \mathcal{O}(\rho^6), \quad (7) \end{aligned}$$

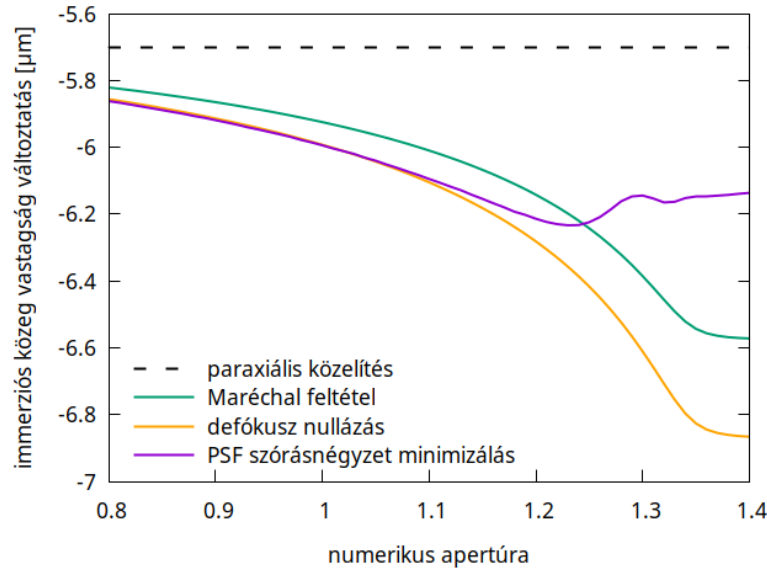
ahol ρ jelöli a normált apertúra radiális pozíciót, NA a marginális sugár numerikus apertúráját, t a közeg vastagságát, az i és s indexek pedig rendre az immerziós és a minta

közgeknek felelnek meg.

Ezen aberrációs tagok jelenléte azt eredményezi, hogy az axiális pozíció, ahol a "leginkább fókuszált" a PSF, nem abban a síkban lesz, mint aberráció mentes esetben lenne (a paraxiális közelítésnek megfelelő sík). Ekkor csak a forrás axiális pozíciója vezetne be defókuszáltságnak megfelelő ρ^2 -es tagot. Ebben az esetben az objektív axiális pozíciójának állításával (fókuszálás) a fázisaberráció egyszerűen kiküszöbölhető, viszont a rétegezett közeg fázisaberrációjánál a defókuszáltság és a magasabb rendű tagok egyszerre nem szüntethetőek meg. Amit el lehet érni, hogy az objektív pozíciójának módosításával, vagyis az immerziós közeg vastagságának változtatásával úgy állítjuk be a fázisaberrációt, hogy annak hatása a "legkevésbé" befolyásolja a PSF-et. Az, hogy mit tekintünk "leginkább fókuszált" PSF-nek, nem egyértelmű, mivel az optikai tengelyen mért intenzitás nem feltétlenül abban a pozícióban maximális, ahol a legkisebb a PSF szélessége.

A szimulációkhoz szükséges beállítani a fókuszt a $z = 0$ pozícióra, amire több megközelítést is megvizsgáltam (12. ábra). Kis numerikus apertúrájú objektívek esetén alkalmazhatjuk a geometriai optikai megközelítésen belül a paraxiális közelítést, viszont ez a nagy numerikus apertúrájú objektívek esetén nem vezet célra. A hullámoptikai megközelítések a hullámfront aberráció vizsgálatán alapulnak. A Maréchal-feltétel figyelembe veszi a magasabb rendű tagokat is, eszerint az optikai tengelyen akkor lesz maximális az intenzitás, amikor a fázisaberráció eloszlás szórásnégyzete minimális. Másik megközelítésként a fázisaberrációt kifejthetjük Zernike-polinomokkal, és a defókuszáltságnak megfelelő tagot eltüntethetjük az objektív pozíció állításával (fókuszálással). Ezek a módszerek azonban csak a fázisaberrációt veszik figyelembe, és a nagy numerikus apertúránál jelentős apodizálással és a közegek reflexiós tényezőivel nem számolnak. Így nagy numerikus apertúrák esetén nem szolgáltatnak megfelelő fókuszáltságot. A probléma megoldására egy numerikus iterációt írtam. Az iteráció az immerziós olaj vastagságát változtatva, a Lanni-Gibson PSF-et kiszámolja (az apodizálást és a reflexiós tényezőket közelítve), és megkeresi azt az immerziós olaj vastagságot, ahol a PSF-nek, mint eloszlásnak a szórásnégyzete minimális. Ez annak felel meg, mintha mérés közben az objektívvel fókuszálnánk a mintára, és megkeresnénk, hogy mely pozícióban látjuk a legélesebbnek a felvillanások képeit.

Miután megtörtént az immerziós közeg rétegvastagságának beállítása, a szoftver kiszámolja egyesével a felvillanások PSF-jeit. A fluorofór laterális és axiális pozíciója alapján



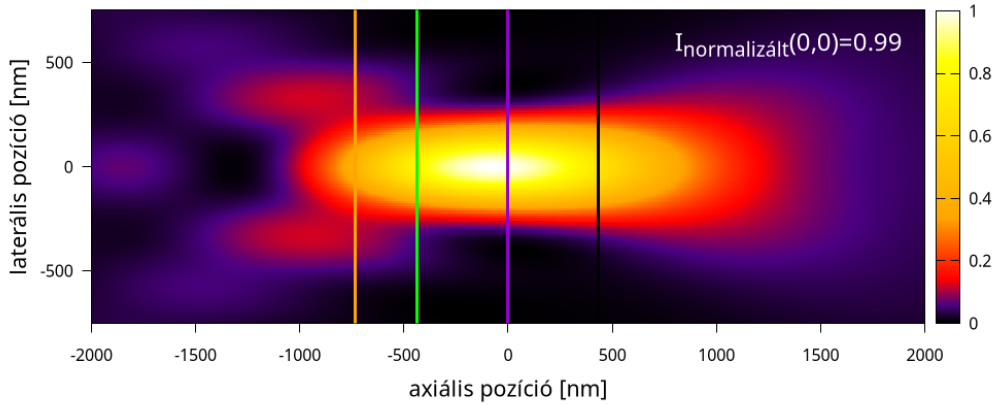
12. ábra. Az objektív pozíció változása a különböző fókusz beállítási megközelítések esetén a numerikus apertúra függvényében. A számolás során a numerikus apertúra $NA = 1,4$ volt, a forrás $d = 5 \mu\text{m}$ mélyen helyezkedett el víz közegű ($n = 1,33$) mintában, és $\lambda_{em} = 665 \text{ nm}$ -es monokromatikus emissziót alkalmaztam.

meghatározza, hogy mekkora területen ad még érdemi jelet a felvillanás, aminek becsléséhez a Gaussos modellt használja fel. Végül a laterális pozíció és a defókuszáltság figyelembe vételét fázisfront módosítással végzi el, amihez a Zernike polinomokat használja fel. Az így kiszámolt fázisfronthoz hozzáadja a korábban meghatározott Lanni-Gibson aberrációt. A kamerán megjelenő PSF képét a komplex apertúra függvény Fourier transzformációjával kapja meg. A számolási igény alacsonyan tartásához 128×128 pontra végzi el a Fourier transzformációt. Ez már elegendő arra, hogy a numerikus hibák jóval a tipikus foton zaj érték alatt legyenek.

Érdemes megjegyezni, hogy a szimuláció nem ad valós eredményt, hogyha fedőlemez közelébe, a hullámhossznál kisebb távolságra helyezett festékekkel szeretnénk azt végezni, mivel a számolás csak a dipólus sugárzás távolterét leíró tagját propagáltatja geometriai optikai módon. Ekkor a dipólus sugárzás közelterét leíró tagnak is van a távolterben megjelenő járuléka, amit figyelembe kell venni, valamint a reflexiók tényezőik sugarakra történő számolása sem ad helyes eredményt ilyenkor.

Skaláris PSF modellként a Lanni-Gibson modellt implementáltam (lásd: 3.3), módosításokat alkalmazva hozzá. Az irodalomban a modell hátrányaként említik [188], hogy

nem foglalja magába a nagy numerikus apertúráknál jelentős apodizálást és a felületek reflexiós tényezőit. Az előbbire létezik módosított PSF modell [189], ami ezt figyelembe veszi, az utóbbit pedig közelítésként a p és az s polarizációs komponensekre vonatkozó reflexiós együtthatók számtani közepeként vettem figyelembe a számolásban, nem polarizált emissziót feltételezve. A PSF a rétegezett közeg által bevezetett fázisaberráció következtében továbbra is hengersizmetrikus marad az optikai tengely körül, de elveszti a szimmetriáját a fókuszáltság tekintetében, ahogy az 13. ábrán látszik.



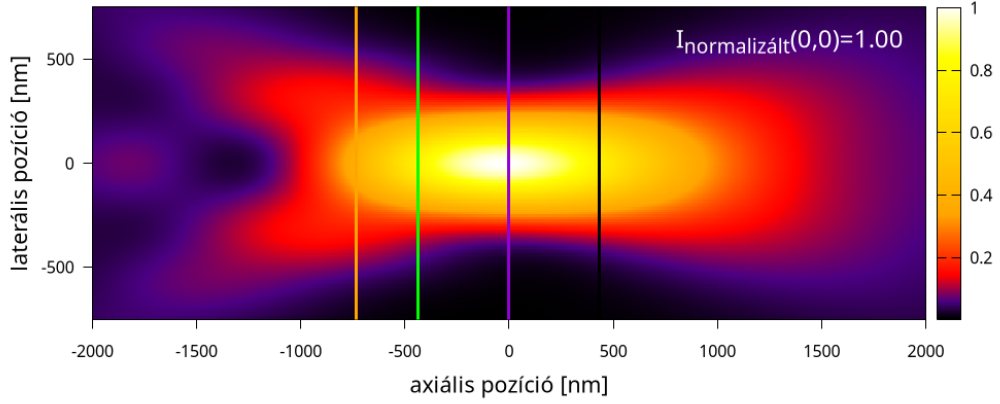
13. ábra. A skaláris PSF intenzitás eloszlásának x - z metszetei a defókuszáltság változtatásával ($NA = 1,4$, $d = 5\ \mu\text{m}$, $n = 1,33$) és $\lambda_{em} = 665\ \text{nm}$). A vonalak a különböző módszerekkel beállított fókuszszíkoknak felelnek meg. A vonalak színkódolása megegyezik az 12. ábrán alkalmazottal.

A TestSTORM-ba beépített vektoriális PSF modell a Richards-Wolf modellen alapul. A modellel ki lehet számolni tetszőleges orientációjú, statikus dipólus emitter képét. A modell magába foglalja a nagy numerikus apertúra esetben lényeges apodizálást és a rétegezett közegek által bevezetett fázisaberrációt, valamint a felületek reflexiós tényezőit is. A modell a PSF térerősség eloszlásának mindkét komponensét (x és y) leírja, így polarizáció érzékeny szimulációkhoz is felhasználható. Ennek következtében a skaláris PSF modellhez képest ~ 2 -szeres a számolási igénye.

A vektoriális PSF modellt felhasználva kiszámolható a források képe abban az esetben is, amikor a dipólus emitter nem statikus, hanem rendelkezik forgási szabadsággal. Ilyenkor 6 tagot kell felhasználni, különböző együtthatókkal. A tagok közti együtthatókba van belekódolva a dipólus átlagos orientációja, a gömbsüveg szöge, a fluoreszcens és

diffúziós relaxációs idők arányai. Az együtthatók a gömbsüvegre vett átlagolással, a 15. egyenletben szereplő $C_{i,j}^{lassú}$ és $C_{i,j}^{gyors}$ tagok numerikus számolásával határozhatóak meg. Ennek megfelelően a dipólus forgási szabadsággal rendelkező vektoriális modell esetén az PSF intenzitás eloszlása felírható hat független tag lineáris kombinációjaként, amik 6 db diffrakciós integrállal történő térerősség számolásból kaphatóak meg. Ennek következtében a dipólus forgási szabadsággal rendelkező PSF modell számolásigénye ~ 6 -szorosa a skaláris modellhez képest.

A modell felhasználható teljes forgási szabadsággal rendelkező források képének valószínűbb számolására is (14. ábra). A így számolt PSF-et összevetve a skaláris modellel származtatottal (13. ábra), megállapítható, hogy ahhoz képest szélesebb PSF-et eredményez. Ez amiatt van, mivel az optikai tengelyre nem merőleges dipólusok képei eltolódtak vagy szélesebbek lehetnek a merőleges esethez képest (20. ábra), és az átlagolásban ezek is megjelennek. Azonban látható, hogy a két PSF modell a defókuszáltság tekintetében hasonló viselkedést mutat.



14. ábra. A vektoriális PSF intenzitás eloszlásának $x - z$ metszetei a defókuszáltság változtatásával ($NA = 1,4$, $d = 5\mu\text{m}$, $n = 1,33$) és $\lambda_{em} = 665\text{nm}$). A vonalak a különböző módszerekkel beállított fókuszsíkoknak felelnek meg. A vonalak színkódolása megegyezik az 12. ábrán alkalmazottal.

Szimulációs modalitások A lokalizációs technikákkal lehetőség van a laterális pozícióról túl más egyéb információk kinyerésére is különböző mérési modalitásokkal.

Az axiális pozíció meghatározása céljából általában fázisfront módosítással megváltoztatják a PSF alakját, úgy, hogy az axiális pozíció függő legyen. Ezen módszerek közül

a legelterjedtebb, és talán a legegyszerűbb a henger (asztigmias) lencsével történő PSF torzítás. Ebben az esetben attól függően, hogy a forrás a fókusz sík melyik oldalán helyezkedik el, a forrás PSF-je vagy az x vagy az y laterális irányban lesz elnyúlt. A kiértékelő algoritmusok az illesztett PSF x és y szélességeik értékéből, a kalibrálást felhasználva, vissza tudják számolni a fluorofór axiális pozícióját. A TestSTORM a 3D asztigmias szimulációnál a Gauss PSF modell esetén a két fókusz sík és forrás helyzetéből számolja ki az elliptikus Gauss két szélesség paraméterét, míg a skaláris és vektoriális PSF modelleknél a megfelelő Zernike polinom alkalmazásával vezet be fázistorzulást.

Egyes biológiai rendszereknél lehet alkalmazni olyan jelölést, aminél a fluorofór rögzített vagy korlátozott orientációjú. Ilyen rendszerek például a DNS vagy az amiloid szálak, amikbe bizonyos festékek direkt módon kötnek be, vagy pedig az aktin szálak falloidin konjugátum jelöléssel. Ilyen minták esetén az emisszió polarizációs állapotának mérése ismerettel szolgál a minta irányultságáról és szerkezetéről. A polarizációs állapot meghatározása tipikusan polarizációs nyalábosztó kockával, vagy kettősen törő ékkel szokott történni, ezek segítségével bontják az emissziót kettő, néha még több komponensre. A TestSTORM-ban is van lehetőség a két lineáris polarizációs állapot szerint ketté bontani a PSF-eket, és azokat külön kép fájlba elmenteni. Ilyen polarizáció érzékeny mérés szimulálására csak a vektoriális PSF modell alkalmazásával van lehetőség.

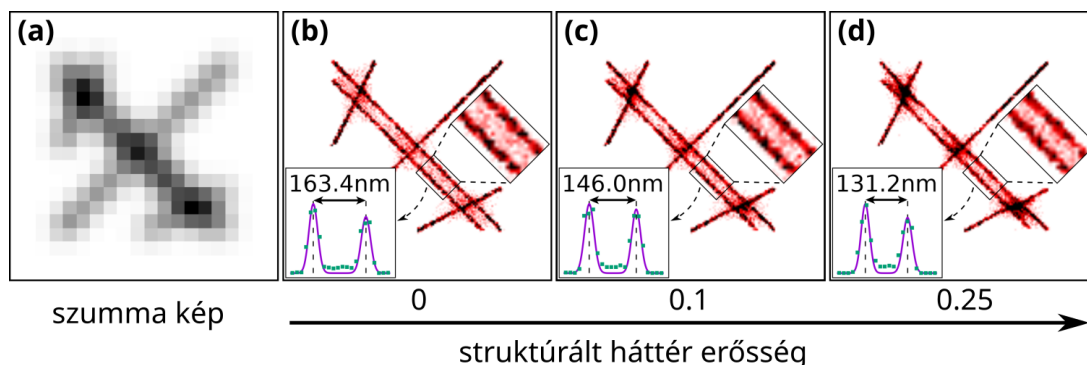
A TestSTORM-t alkalmassá tettem kétszínű mérések szimulálására is. Fluoreszcens méréseknél gyakran jelölik a mintát spektrálisan jól elkülönülő festékekkel, amiknek az emisszióit dikroikus tükrökkel és emissziós szűrőkkel külön lehet választani, ezáltal lehetőség nyílik eltérő biológiai struktúrák egyidejű vizsgálatára. Ez a mérési modalitás elsősorban akkor hasznos, amikor fontos, hogy egyazon mintán vizsgáljuk a különböző fajta struktúrák elhelyezkedését, például azok relatív pozícióik meghatározására. Ezeket a méréseket korlátozza az emissziós és a gerjesztési spektrumok átfedése, ami áthalláshoz vezet a különböző színcsatornában. Az áthallások mértékét a TestSTORM-ban is be lehet állítani a realisztikusabb szimulációk érdekében.

Egyéb funkciók A szimulációs szoftverbe a kötőelem hosszának beállítása mellett lehetőséget teremtettem az irányítottságuk bekorlátozására is. A kötőelem hossz megadja, hogy a szimuláció során a festékek a kötőhely körül mekkora sugarú gömbfelületen helyez-

kednek el. Az irányítottság korlátozással pedig el lehet érni, hogy ezen a gömbfelületen értelmezett, adott standard deviációjú Gauss eloszlás határozza meg a fluorofór pozíció valószínűség eloszlását. Hasonló eset gyakran előfordul valós minták jelölésénél is, amikor a fluorofórt tartalmazó jelölő elem (pl.: antitest) nem véletlenszerű irányítottsággal kapcsolódik a kötőhelyhez. Ennek egyrészt azért van jelentősége, mert a kötőelem hossz sok esetben összevethető méretű a lokalizációs pontossággal, így az jelentősen befolyásolhatja a lokalizált képet, és megnehezítheti a következtetést, hogy a festékek hogyan helyezkednek el a tényleges struktúrához képest. Továbbá az irányítottság az anizotrópiás szimulációk során is szerephez jut. Az ilyen szimulációknál a fluorofór dipól orientációja számít, és az egyszerűbb paraméterezhetőség kedvéért a szimulációban dipólus átlagos orientációja megegyezik azon kötőelem irányítottságával, amihez az adott fluorofór van kötve. Ennek egyedül a dipólus forgási szabadsággal rendelkező vektoriális PSF számolás során van jelentősége.

A konstans háttér mellett, lehetővé tettem a struktúrált háttér hozzáadását a szimulált felvételekhez (15. ábra). A mérések során a villogások sokszor olyan háttéren történnek, ami nem tekinthető homogénnek. Ilyen háttér a mérések során tipikusan akkor fordul elő, amikor fluoreszcens jelölések mellett maga a vizsgált minta is rendelkezik saját fluoreszcenciával. Az ilyen jellegű háttér jelentősen megnöveli a felvillanásokra ráakódó háttérzajt, a PSF illesztések során eltolja a lokalizációk pozícióit, valamint téves, nem a felvillanásokra megillesztett lokalizációkkal is szolgálhat. Míg az utóbbi két probléma kezelhető olyan algoritmusokkal, amik elvégzik a konstans vagy lassan változó eltávolítását, addig az előbbi probléma nem. A TestSTORM ezen funkciója ezeknek a problémáknak a szimulációs vizsgálatára nyújt lehetőséget. A szoftver a struktúrált háttérrel a felvillanások eredő képéből alkotja meg, annak az erősségét, és időbeli lefutását paraméterekkel lehet állítani.

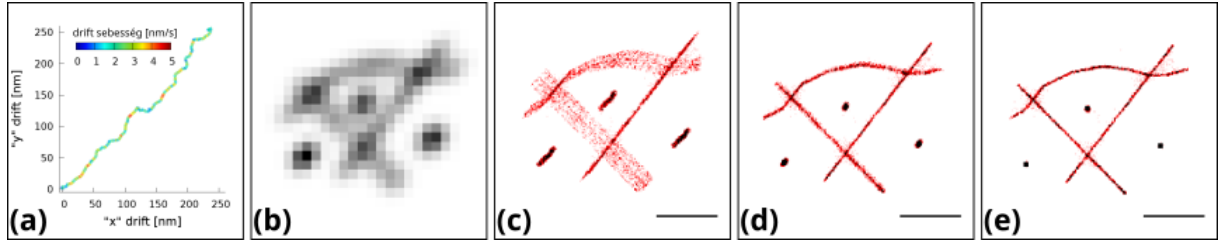
A TestSTORM-ba további funkcióként beraktam a drift szimulálását (16. ábra). Ekkor a szoftver a felvillanások képet az idő függvényében bizonyos mértékben eltolja a kezdeti pozícióhoz képest. Annak ellenére, hogy a SMLM mikroszkóp rendszerek tipikusan rendelkeznek fókusz tartó aparátussal, addig a minta lassan el tud mozdulni laterális irányban. Ezért a nagy feloldású, és hosszú idejű SMLM méréseknél kulcsfontosságú a drift hatékony korrigálása. Erre alapvetően kétféle megközelítés létezik. Az egyik módszer



15. ábra. A struktúrált háttér hatása párhuzamos és keresztező vonalszerű alakzatok képére. A vonalak diffrakció limitált képe (a), amiből a struktúrált háttér származtatva van. A struktúrált háttér hatása a lokalizált képre (b-d), annak maximumát változtatva a jelölések fényességéhez képest. [A1]

szerint a mintára rá kell juttatni megfelelő sűrűségben stabil, nagy fényességű fluoreszcens részecskéket, pl.: fluoreszcens gyöngyöket, és ezeknek a pályáját végig követve meghatározható a minta időbeli elmozdulása. A másik megközelítés a lokalizált pontok időbeli "átlagos" elmozdulásán alapul. Ezt az "átlagos" elmozdulás tipikusan úgy kerül meghatározásra, hogy a lokalizált adatsort időbeli szeletekre bontják, és az ezekből képzett sűrűségeloszlásokat korreláltatják egymással. Ennek a megközelítésnek a nagy előnye, hogy csak azokat a fluorofórokat használja fel, amelyekkel az egyedi molekula mérés is történik, és a mintát nem kell külön megjelölni csak a drift korrigálás céljából. Hátrányként érdemes megemlíteni, hogy az eredményessége algoritmus és minta függő. Ezért lényeges annak ellenőrzése, hogy a különböző drift korrigáló algoritmusok milyen körülmények között működnek jól. A TestSTORM drift szimulációja ezt teszi lehetővé. A szoftverben a drift egy áramló közegben Brown mozgást végző részecske pályájaként van modellezve. A drift trajektória milyenségének jobb állíthatósága miatt lehetőség van a sebességtől négyzetesen függő csillapítási tag megadására is.

A 16. ábrán látható, hogy míg a drift a diffrakció limitált képen csak kis mértékű elnyúlást eredményezett, addig a nagyfeloldású lokalizációs képen lévő struktúrák jelentősen eltérnek a várttól. A rainSTORM korreláción alapuló drift korrekciója jelentős mértékben képes volt korrigálni a drift hatását, közel azonossá téve a lokalizált képet a drift nélküli szimulációhoz.



16. ábra. A drift hatása pont- és vonalszerű alakzatokra. A drift nyomvonala (a), ahol a színskála az aktuális sebességet jelöli, (b) a minta diffrakció limitált képe, (c) a minta lokalizációs képe a drift hatásával együtt, (d) a lokalizációs kép drift korrekciót követően, (e) a lokalizációs kép drift nélkül. A skála $1\ \mu\text{m}$ méretű. [A1]

A TestSTORM egyéb felhasználása A TestSTORM-ot a dolgozat írásáig öt külső publikáció elkészítéséhez használták fel, és az AdOptIm csoporton belül több probléma vizsgálatára alkalmaztuk:

- Sehayek és munkatársai autokorreláción alapuló módszert fejlesztettek a festékek fotovillogási és bleachelődési időállandóinak meghatározására [190]. A módszer szimulációs tesztelésére saját szimulációjuk mellett felhasználták a TestSTORM-ot. A szimulációkat végeztek mind az Alexa Fluor 647, mind a gyorsabb dinamikájú Alexa Fluor 568 festékekkel. A szimulációhoz a Siemens csillag mintázatot választották, valamint realisztikusabb szimuláció érdekében driftet is beállítottak. A csillag mintázaton a karokon belül homogén a festés, viszont a karok közötti üres rész inhomogénné teszi a mintázat egészét. A teljes mintázatra lefuttatva a kiértékelést, az az *OFF* időkre kisebb értéket eredményezett a beállított értéknél. Viszont A ROI-t csökkentve, és a mintázat közepét vizsgálva annak inhomogenitása is csökkent, és így már a mérési hibán belül vissza bírták kapni a beállított időállandókat. Valamint megvizsgálták a jelölés homogenitásának hatását azáltal is, hogy egy köthelyre több festéket is ráhelyeztek. Ebben az esetben a $k = k_{on} + k_{off}$ időállandók összegét jól vissza bírták kapni, viszont külön-külön magukat az időállandó értékeket nem. Továbbá, azt tapasztalták, hogy $k_{off} \gg k_{on}$ esetben az időállandók meghatározása rosszabb pontosságú. Ez a saját szimulációikban nem jött elő, mivel azokban kevésbé eltérő k_{off} és k_{on} értékeket állítottak be.
- Manton és munkatársai az ELM (ellipsoid localization microscopy) módszert fejlesztették, és annak megbízhatóságát vizsgálták meg [191]. A módszer hagyományos

fluoreszcens széles látóterű felvételeken, nem egyedi molekula detektáláson alapszik. Az eljárás lényege, hogy egy adott alakzatra kiszámolják, hogy a képalkotó rendszer milyen képet kell, hogy eredményezzen annak a méretének függvényében. Az így kiszámolt elméleti függvényt illesztik a mért intenzitás eloszlásra, az alakzat méretét változtatva. A szerzők kérésére a TestSTORM szimulációs szoftvert alkalmassá tettem a gömbi alakzat mellett rúd és ellipszoid alakú struktúrák szimulálására is. Így a TestSTORM szimuláció segítségével lehetőség nyílt ismert méretű alakzatokon kipróbálni az ELM módszert. Különböző méretű gömbi alakzatokat szimulálva megmutatták, hogy a gömbi intenzitás eloszlást illesztve jelentősen pontosabban visszkapják a gömbök tényleges sugarát ahhoz képest, mint amikor azt az intenzitás maximumok alapján határozzák meg. Ezek felül az előbbi módszernél a sugár meghatározásának hibája sokkal inkább független a gömb méretétől, míg az utóbbi esetben erősen függ tőle. Valamint az ellipszoid modell segítségével az illesztett struktúrák méretét $\sim 14nm$ -es becsült hibával, és $\sim 5nm$ -es szórással vissza bírták kapni.

- Diederich és munkatársai egy kiválasztott kommersziális mobiltelefon kamera alkalmazhatóságát vizsgálták meg dSTORM mérések detektoraként [192]. Azt találták, hogy videófelvétel üzemmódban nincs lehetőség kinyerni a szenzor nyers adatait. A felvételhez csak különböző képfeldolgozási lépések után lehetett csak hozzáférni, mint például a videó tömörítés. Ennek a pontosan nem ismert képfeldolgozásnak a kiküszöbölésére neurális hálózatot alkalmaztak. Többek között TestSTORM szimulációt is alkalmaztak a neurális hálózat betanítására. A vonal és vezikula alakzatokat felhasználva legenerálták a képsorozatot, azt még zajjal terhelték, és tömörítették a kameránál is alkalmazott H.264 kodekkel. A tömörített felvétel és a felvillanások ismert pozíciói szolgáltatották az adatsort a neurális hálózat betanítására.
- Öfverstedt és munkatársai a képanalizálásra gyakran használt távolság transzformáció zajra egy érzéketlenebb változatát fejlesztették ki [193]. Egy terület, ahol a képelemző eljárásuk alkalmazható lehet, az a lokalizációs mikroszkópia. A lokalizált képek erősen zajjal terheltek. A zaj részben abból származik, hogy a nagy feloldású képek viszonylag kevés, véletlenszerű lokalizált pontokból vannak megal-

kotva, részben pedig a nem specifikus jelölések a vizsgálni kívánt struktúrán felül is eredményeznek lokalizációkat. A módszer ezen területen való alkalmazhatóságának vizsgálatához TestSTORM-mal végeztek szimulációkat, amikhez a szoftver vonal alakzatát használták fel. A szuper rezolúciós képet megalkotva azt még plusz zajjal terhelték, és ezt kiértékelve azt tapasztalták, hogy a módszerük a zajjal terhelten képhez viszonyítva jelentősen kisebb hibával végezte a távolság transzformációt, mint alternatív távolság metrikákat alkalmazva.

- Hersko és munkatársai gépi tanulós eljárás fejlesztettek a SMLM felvételeken az eltérő spektrális tulajdonságú fluorofórokhoz tartozó felvillanások különválasztására [142]. A céljuk, hogy lehetővé tegyék többszínű lokalizációs méréseket végzését mindenféle spektrális bontóelem nélkül. A módszer SMLM felvételeken történő alkalmazhatóságát, egy mérés mellett, a TestSTORM kétszínű szimulációs módjával vizsgálták meg. Betanítást követően a Siemens csillag struktúrát felhasználva két térbelileg szeparált struktúrán vizsgálták az Alexa Fluor 647 és az Alexa Fluor 568 emitterek beazonosításának hatékonyságát. Kihasználva, hogy a szimuláció során ismert volt felvillanások száma és pozíciója, a beazonosítás hatékonyságát könnyen lehetett számszerűsíteni. A klasszifikálási küszöbértékek beállítása után azt találták, hogy a beazonosítás hatékonysága rendre 91% és 86%. Ezt követően pedig a módszerüket megvizsgálták átfedő struktúrákon is.
- Az AdOptIm csoporton belül Varga és munkatársai eukarióta sejtekben a DNS kettős törés javító mechanizmusát tanulmányozták dSTORM lokalizációs technikával [194]. A károsodás körül ún. fókusz alakul ki, ami fluoreszcensen is jelölhető. Ezeknek a fókuszoknak a lineáris mérete tipikusan fél mikron körül van, viszont ennek a finomszerkezete 20–60nm-es nanofókuszokból tevődik össze, amiknek vizsgálatához szuper-rezolúciós technikákra van szükség. Továbbá a dSTORM technika alkalmazásával lehetőség nyílt a fókuszok kvantitatív kiértékelésére. A kiértékelésük 2D dSTORM felvételeken alapszik, viszont a valós javítási fókusz 3D szerkezetű. Annak vizsgálatára, hogy a 2D kiértékelés mennyire lehet megbízható, a TestSTORM 2D és 3D szimulációs módját használták fel. Ehhez a döntött rács struktúrát és a skaláris PSF modellt alkalmazták. Megvizsgálták, hogy a defókuszáltság mértéké-

nek függvényében a kiértékelő eljárásuk mennyire hatékonyan tudja beazonosítani a klasztereket, és meghatározni azok elemszámát. Azt találták, hogy a 3D módszerrel valamivel kevesebb klasztert bírtak beazonosítani, mint a 2D módszerrel, de a klaszterek beazonosítása a $\sim 1\mu m$ -es mélységélesség tartományon belül hatékonyan működött. Továbbá a klaszterek elemszáma magasabb volt a 2D esetben, valamint a beazonosított elemek száma kis mértékű függést mutatott a defókuszáltságtól. A mérési adatok kiértékelése során ezt a függést elhanyagolták. Ezek alapján megállapítható, hogy a 2D kiértékelés hatékony a klaszterek számának, és azok elemszámának meghatározásában.

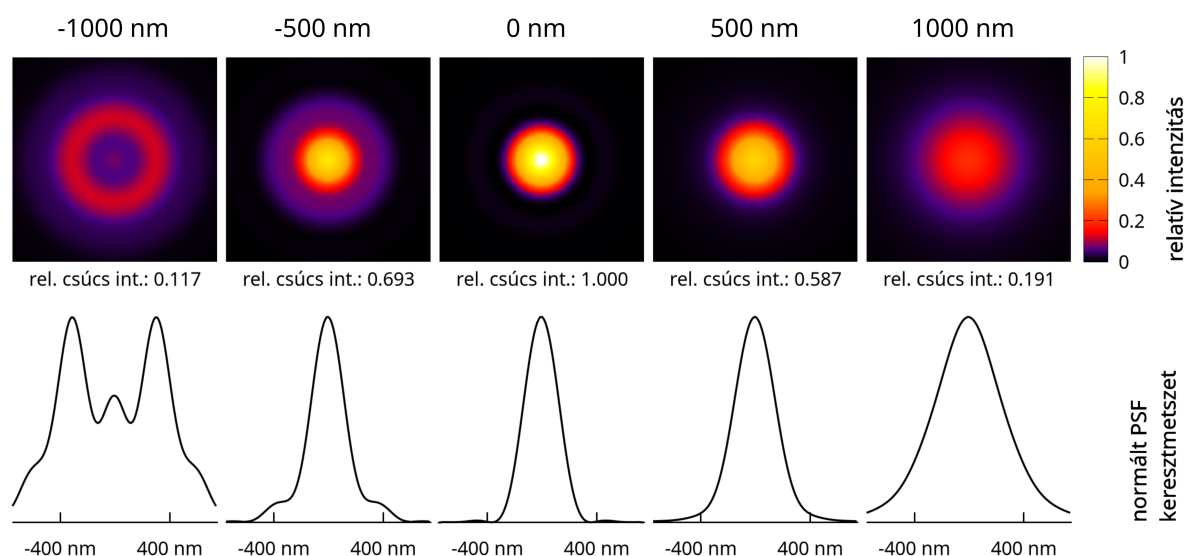
- A TestSTORM-ot az AdOptIm csoporton belül Gajdos Tamás munkájához is felhasználtuk [117]. Tamás kettős objektíves rendszert épített multimodális mikroszkóp megalkotásához. Az elrendezésben az "elsődleges" objektív változatlanul hozza létre a képet, míg a "másodlagos" objektív fényútjába elhelyezhetőek a plusz optikai elemek. Az utóbbi objektív nyalábfordító prizma segítségével juttatja az emittált fényt a kamerára. Tamás kísérletileg is demonstrálta az asztigmias és kétsíkú 3D módszereket, valamint a kétszínű mérési módot. Az asztigmias 3D méréshez szarkomer minta megfestett H-zónáját képezte le. Maga a szarkomer hengeres szerkezetű, viszont a megfestett fehérjék periodikusan ismétlődő, két egymáshoz közeli, vékony térrészekben helyezkednek el. Ezeknek a vetületei a 2D képen ismétlődő kettős vonalakat eredményeznek. A TestSTORM alkalmazásával megvizsgáltuk, hogy azok axiális orientáltság milyen mértékben befolyásolja a kettős vonal struktúra láthatóságát a rekonstruált képen. A szarkomer minta modellezéséhez a TestSTORM "korong" struktúráját használtuk fel, és 3D asztigmias szimulációs módot alkalmaztunk. A szimulációk alapján a döntöttséggel fokozatosan összemósodik a kettős vonal struktúra, és $\sim 6^\circ$ fölötti axiális döntöttség esetén már nem lehet szétválasztani a két vonalat. A 3D rekonstrukcióhoz használt ellipticitás értékre történő szűréssel lehetett javítani a kettős vonal struktúra láthatóságán, de ez a 3D rekonstrukció axiális tartományának a lekorlátozásával is jár.

5.2. Szimulációs eredmények

5.2.1. Skaláris PSF

A skaláris PSF modell segítségével megvizsgáltam, hogy a defókuszáltságnak, és ehhez kapcsolódóan a lokalizációs adat szűréseknek milyen hatása van a rekonstruált képre.

A rétegzett közeg fázisaberrációjának legszembetűnőbb hatása, hogy a PSF a defókuszáltsággal nem szimmetrikusan változik a fókusz sík körül. Abban az esetben, amikor immerziós objektívvel vizsgálunk víz közegben lévő mintát, és ha a forrás pozíciójánál mélyebbre fókuszálunk, akkor a PSF gyűrűsödése fokozódik, míg ha kevésbé mélyre fókuszálunk, akkor a gyűrűsödés mérséklődik az aberráció mentes esethez képest. Ezt a viselkedést a 17. ábra szemlélteti.



17. ábra. A skaláris PSF intenzitás eloszlásának defókuszáltság függése. A felső sorban a PSF-ek képei vannak, míg az alsó sorban a PSF-ek metszetei. A sorok közötti számértékek a PSF-ek maximumainak arányát mutatják a fókuszált esethez képest. [A1]

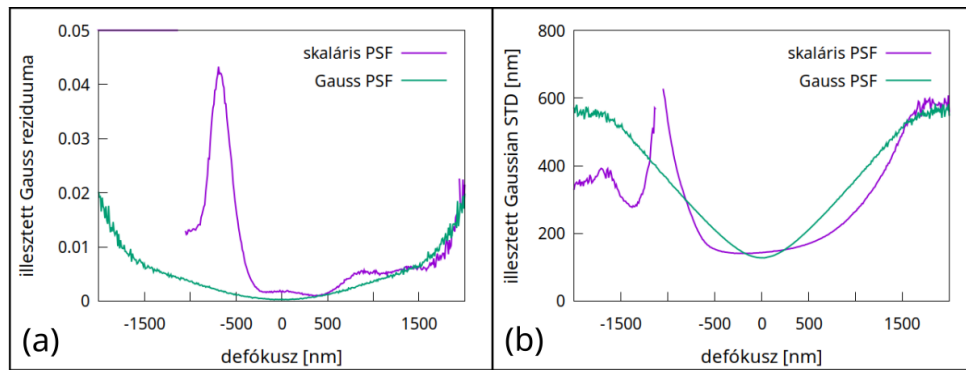
A PSF torzítás hatása a fázisaberráció mértékétől függ, vagyis a használt objektív numerikus apertúrájától (minél nagyobb a numerikus apertúra, annál jelentősebb), a forrás mélységétől a mintában, a minta törésmutatójától, valamint attól, hogy az immerziós olaj és a fedőlemez tulajdonságai mennyire térnek el az objektívhez tervezett értékektől. A rétegzett közeg által bevezetett fázisfront aberrációban a magasabb rendű tagok a defókuszáltsághoz képest nőnek a numerikus apertúra értékének növekedésével. Így nagy

numerikus apertúrájú objektívet használva, ugyanolyan mértékű defókuszáltság mellett nagyobb PSF torzulást várhatunk.

A mikroszkópiában használt olaj immerziós, nagy numerikus apertúrájú objektívek mélységélessége igen kicsi, tipikusan $0,5\ \mu\text{m}$ körül van [195], a fázisfront aberráció torzító hatása már ilyen axiális távolság tartományon számottevő lehet. Továbbá, fényes fluorofórok esetén a lokalizációs algoritmusok erősen defókuszált, a mélységélességen túli felvillanásokat is képesek megtalálni, és megilleszteni. Számos biológia struktúra van, aminek a mérete ezzel összevethető, vagy ennél nagyobb. Mindezek következtében, a nagy numerikus apertúrájú immerziós objektívek esetén a rétegezett közeg által bevetett fázisfront aberráció PSF torzító hatása számottevő lehet tipikus mérések esetén is. Így a kiértékeléseknél a PSF fókuszszík körüli aszimmetriájának a hatását figyelembe kell venni. Megjegyzendő, hogy bizonyos objektívek rendelkeznek korrekciós kollárral, amivel a szférikus hibát lehet kiküszöbölni. Ez alkalmas a rétegezett közeg által bevezetett fázisaberráció csökkentésére is. Viszont nem mindegyik objektív rendelkezik kollárral, valamint ennek az állítása körülményes folyamat, nem praktikus ennek beállítása minden egyes felvétel előtt.

A PSF aszimmetria azt eredményezi, hogy a fókuszszík alatt és felett történő, azonos mértékben defókuszált felvillanásokat eltérő illesztett szélességgel és illesztés "jósággal" tudjuk lokalizálni (18. ábra). Ebből következően a lokalizáló algoritmus eltérő valószínűséggel detektálja és eltérő precizitással lokalizálja őket. Eredményképpen, a fókuszszík két oldalán ugyanolyan vastagságú szeletet eltérő minőségben látunk a mintából.

Az ábráról látszódik, hogyha a fázisaberrációval rendelkező skaláris PSF-re az elterjedten használt Gauss PSF-et illesztjük, akkor az illesztett PSF mérete, is és az illesztés reziduuma is aszimmetrikus lesz axiálisan. Az illesztett PSF szélességek a két modell esetén közel azonosak a fókuszszík közvetlen környékén. A fókuszszíktól jobban eltávolodva a skaláris PSF modell kisebb illesztett szélességet jósol, de a PSF gyűrűsödés tartományában a defókuszáltsággal gyorsan megugrik az illesztett Gauss szélessége. Az illesztés reziduuma várható módon a skaláris PSF modellnek nagyobb minden, nem extrém defókuszáltság mellett. A skaláris PSF gyűrűsödésének tartományában a reziduum is ugrás-szerűen megnő. Ez egyrészt azt eredményezi, hogy a fókuszszík két oldalán eltérő lesz a defókuszált felvillanások lokalizációs pontossága. Valamint a lokalizációs algoritmusok a



18. ábra. A skaláris és a Gauss PSF modellekre a legkisebb négyzetek módszerével történő Gauss illesztés (a) átlagos reziduuma és (b) az illesztett Gauss standard deviációk. A skaláris PSF esetén a rainSTORM lokalizáló algoritmus nem bírta megilleszteni a PSF-et ~ -1000 nm környékén. [A1]

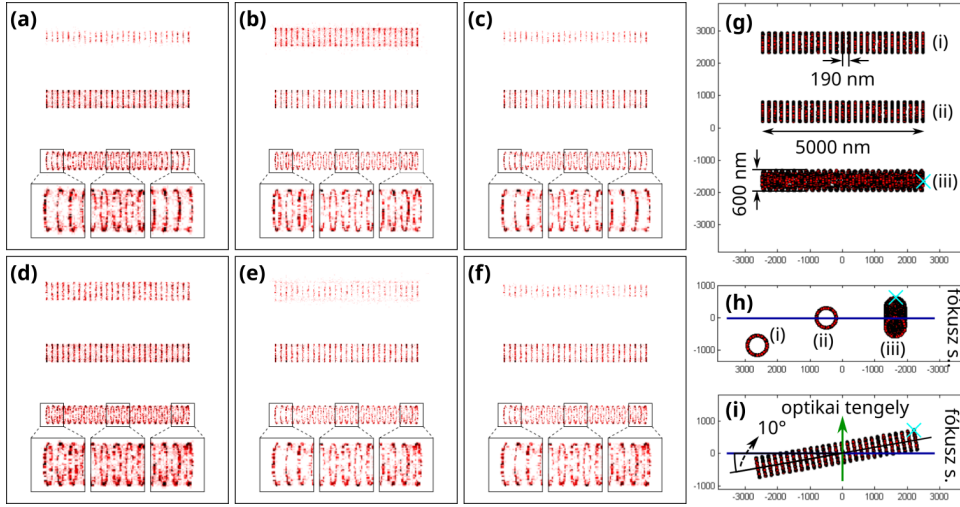
téves lokalizációk eltávolítására gyakran alkalmaznak valamilyen szűrést, ami általában az illesztett Gauss függvény valamelyik paraméterének küszöbölését jelenti. Ebben az esetben a szűrés alkalmazása is eltérően fogja érinteni a fókuszsík két oldalán történő felvillanások lokalizációit.

Az aszimmetrikus PSF vizsgálatához fókuszon kívül helyezett axon struktúrákat használtam (19. ábra). Három különböző axon struktúrán végeztem a szimulációt, egyiket fókuszon kívülre helyeztem "negatív" irányba 800 nm-rel, a másikat a fókusz síkba helyeztem, a harmadikat pedig 10° -osan megdöntöttem, így a végei 440 nm-rel kerültek ki a fókusz síkból. A gyűrűk sugara 300 nm volt, távolságuk pedig 190 nm. A szimulációkat elvégeztem a Gauss és a skaláris PSF modellekkel is, és megvizsgáltam az illesztett standard deviáció és az illesztés reziduumára történő szűrés hatását.

Az 19 ábráról kivehető, hogy a skalár PSF modell kevésbé volt érzékeny a "negatív" irányú defókuszálásra, mint a Gauss modell. Viszont a skaláris modell érzékenyebb volt a reziduum alapú szűrésre. A két szűrés együttes alkalmazásával hasonló eredményt lehetett elérni a defókuszált axon struktúrán. A döntött axon struktúrát a reziduumra történő szűrés aszimmetrikusan érintette.

5.2.2. Vektoriális PSF

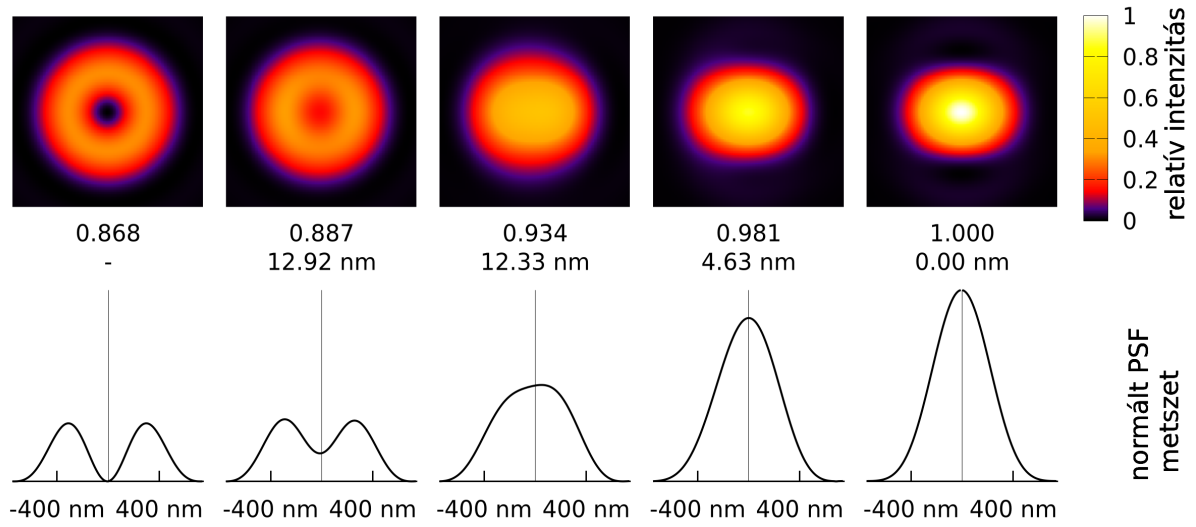
A vektoriális PSF modell segítségével megvizsgáltam rögzített dipól orientációval rendelkező jelölések hatását a rekonstruált képre vonatkozóan.



19. ábra. Az axon struktúrák képe (a, b, c) Gauss PSF modellt, illetve (d, e, f) skaláris PSF modellt alkalmazva. A rekonstruált képekre rendre (a, d) standard deviáció alapú, (b, e) reziduum alapú szűrés volt alkalmazva, illetve ezek együttesen (c, f). [A1]

Rögzített dipólus momentumok esetén a PSF alak jelentősen eltér attól, amit a skaláris modell alapján várnánk, erősen orientáció függő lesz. A Gauss és skaláris modellekkel szemben a vektoriális modellben a PSF elveszti a hengersizimetriáját, és az intenzitás eloszlás súlypontja nem feltétlenül a forrás pozíciójának fog megfelelni. Stallinga és munkatársai eredményei alapján, ez ~ 40 nm-es hibát is bevezethet a lokalizált pozícióba [41]. A vektoriális PSF egyedül akkor rendelkezik hengersizimetriával, amikor dipólus forrás orientáltsága az optikai tengellyel párhuzamos, viszont ekkor középen intenzitás minimum van, ami a Gauss illesztés hatékonyságát rontja. Döntött orientációk esetén a PSF súlypontja eltolódik egyik oldal fele, ami hibát vezet be a lokalizálásba. Optikai tengellyel merőleges polarizáció esetén a PSF kissé elnyúlt alakú lesz, viszont a súlypontja megfelel a forrás pozíciójának, valamint a foton begyűjtési hatékonyság is ekkor a legjobb. Ezt a viselkedést mutatja a 20. ábra.

Az ábrán látszódik, hogy az optikai tengellyel közel merőlegesen álló dipól momentum képe kissé elnyúlt, de egyetlen, jól meghatározott csúccsal rendelkezik, és a Gauss függvénnyel jól megilleszthető. Ezzel ellentétben az optikai tengellyel közel párhuzamos PSF képek fánk alakúak, amiket a lokalizációs algoritmus már nem képes lokalizálni. Ebben az esetben foton begyűjtés hatékonysága is kissé elmarad az optikai tengelyre merőleges esethez képest, annak $\sim 83\%$ -ka. Ez alapján a nagy numerikus apertúrájú objektív még



20. ábra. A PSF alakjának függése a különböző dipól orientációk esetén, a dipól gerjesztést az orientációtól függetlenül azonos mértéken tartva. A felső sorban a PSF-ek képei vannak, míg az alsó sorban a PSF-ek metszetei. A sorok között a relatív foton begyűjtési hatásfokok vannak feltüntetve, illetve a lokalizációs koordináta eltolódása a forrás tényleges pozíciójához képest. Az optikai tengelyre párhuzamos dipól momentum képét a rainSTORM algoritmusa nem bírta lokalizálni. [A1]

az optikai tengellyel párhuzamos dipól forrásokból is jó hatékonysággal be tudja gyűjteni az emissziót. Emellett a PSF maximális értéke is jelentősen alacsonyabb a merőleges esethez, ez elsősorban annak a következménye, hogy a PSF alakja is szélesebb, az emissziós jel jobban szétterül.

A vektoriális PSF modell esetén a folt alakján kívül annak a fényessége is orientáció függő, ez a fotoszelekció jelensége. Ezt a előzőleg tárgyaló fotonbegyűjtési hatékonyság mellett a dipólus gerjesztésének erőssége szabja meg. Kis intenzitások esetén a festékek fényessége lineárisan függ a gerjesztő intenzitás erősségétől, vagyis ahányszor nagyobb intenzitással gerjesztjük a festéket, annyszor fényesebben világít. Szerves festékek esetén tipikusan csak pásztázó technikával [196] (konfokális, STED,..) tudunk olyan erős gerjesztő intenzitást létrehozni, hogy ez a függés eltérjen a lineáristól, míg a lokalizációs technikáknál alkalmazott széles látóterű megvilágításnál a lineáris függést tapasztalunk:

$$F = |\vec{p} \vec{E}|^2 S(\vec{p}), \quad (8)$$

ahol F jelöli a fluoreszcens jel fényességét, $\vec{p}$ a dipólus vektort, $\vec{E}$ a gerjesztő komplex

térerősség vektor, S pedig a foton begyűjtési hatásfokot.

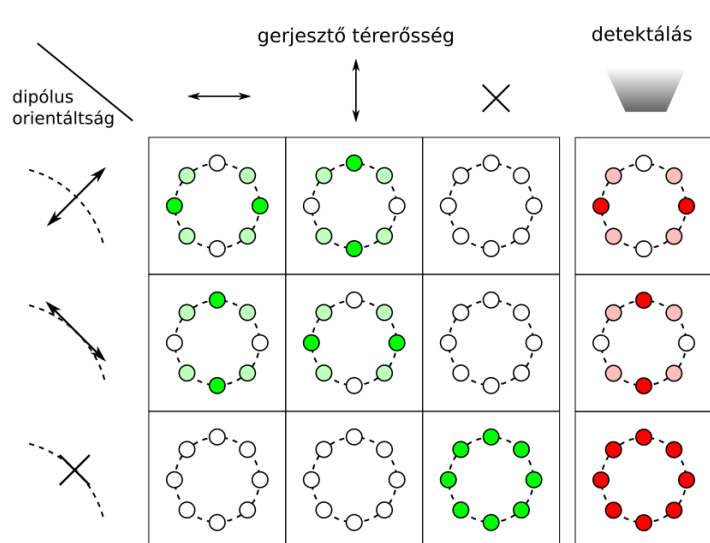
Lineáris polarizáció esetén a festék akkor gerjesztődik a legerősebben, amikor a dipól momentuma párhuzamos a gerjesztő fény polarizációjával, és amikor merőleges arra, akkor egyáltalán nem emittál jelet. A mérések során általában nem tudjuk befolyásolni, hogy a festékek milyen dipól orientációval álljanak be, ezért annak érdekében, hogy azok egyenletesebben gerjesztődjenek, sokszor cirkulárisan poláros gerjesztést alkalmaznak.

Ezeket egybevetve, az a jelölések emissziójánál a fotoszelekció nem befolyásolja érdemileg a detektálás hatékonyságát, ekkor a PSF alakja játssza a döntő szerepet. Ezzel szemben a gerjesztésnél a fotoszelekció hatása jelentős a mérhető fényességekre.

A fluoreszcens jelölések többségénél, mint az antitestek, vagy dsDNA jelölések a festékek hajlékony és forgékony kötőelemen keresztül vannak a kötőhelyhez láncolva, és a kamera expozíciós időnél jóval rövidebb, a fluoreszcens időtartamukkal összevethető időskálán változtatják a dipól orientációjukat, így az kiátlagolódik. Ilyen jelölések esetén nem tapasztalunk sem fotoszelekciót, sem (rögzített) vektoriális PSF-et. Viszont vannak olyan festékek amik direkt módon jelölik a mintát, a dipól momentumuk rögzített lesz. Ilyen festékek léteznek membránok, DNS szálak, amiloid fibrillumok jelölésére. Mind dS-TORM és mind a PAINT technikák segítségével végeztek már méréseket ilyen mintákon. Az ilyen, rögzített dipólus momentumokkal rendelkező minták esetén a vektoriális PSF és a fotoszelekció figyelembe vétele szükséges.

EPI kivilágítással azokat a dipól orientációjú festék tudjuk erősen gerjeszteni, amikből hatékonyan be tudjuk gyűjteni a fotonokat és a lokalizáló algoritmus is hatékonyan illeszti rájuk. Viszont ferde kivilágításokkal (TIRF, HILO) beállítható olyan polarizáció, amivel az optikai tengellyel párhuzamos dipól orientációjú festékeket gerjesztjük erősen, amiket nem tudunk hatékonyan lokalizálni.

A fotoszelekció és a lokalizálás hatékonyság hatását, hogy milyen lokalizációs artfaktumokat vezethet be, két struktúrán, henger alakú axon (22 ábra) és a gömb alakú vezikula struktúrán (23. ábra) vizsgáltam meg. A szimulációkhoz a két axon struktúrák tengelyét a fókusz síkba helyeztem, azoknak a sugarát 300 nm-esre állítottam. Az egyik axonra radiális irányítottságban helyeztem fel a dipólus momentumokat, a másokban azimutális irányítottsággal. A szimulációkat kétfajta gerjesztéssel végeztem el, "vízszintes" lineáris poláros, valamint "függőlegesen" lineárisan poláros gerjesztéssel, az előbbi

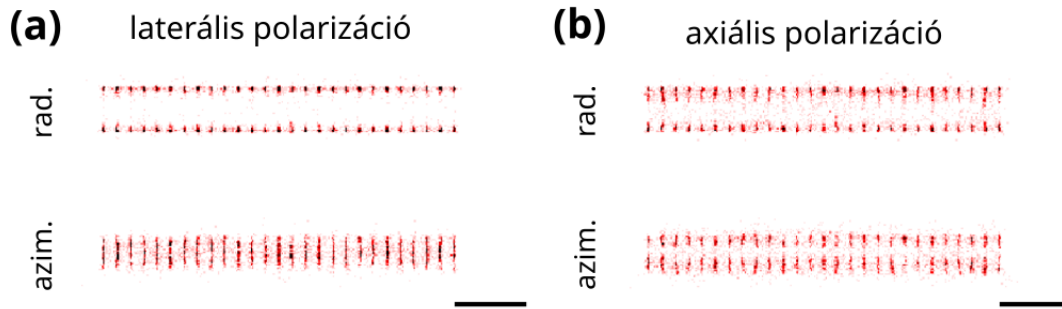


21. ábra. A gerjesztési fotoszelekció és a detektálás (lokalizálás) hatékonyságának a szemléltetése a különböző lineáris polarizációjú gerjesztési sémák és dipól orientáltságok esetén. A gerjesztés hatékonyságát a zöld korongok mutatják, minél halványabb a korong, annál gyengébben a gerjesztődik a jelölés. A piros korongok a detektálás hatékonyságát mutatják, minél halványabb a korong, annál kisebb eséllyel lokalizálja az algoritmus. [A1]

EPI megvilágításra jellemző, az utóbbi döntött megvilágítással érhető el.

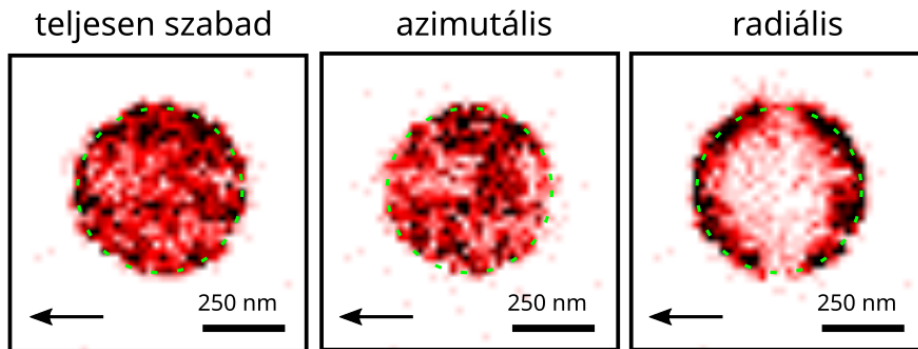
Vízszintes poláros gerjesztés esetén azokat a festékeket tudjuk hatékonyan gerjeszteni, amiket, a PSF alakjából kifolyóan, hatékonyan is tud lokalizálni. Ez radiális dipólus orientációk esetén a henger két oldalán elhelyezkedő festékeket jelenti, míg azimutális irányítottság esetén a henger alsó és felső részén lévőket. Ez a lokalizált képen is megjelenik, míg radiális irányítottság esetén a henger két oldalán lévő jelöléseket tudjuk detektálni, a középen lévőket nem, addig az azimutális irányítottság esetén a henger szélén lévő hiányoznak. Függőleges polarizáció esetén viszont azon irányultságú dipólus momentumokat tudjuk hatékonyan gerjeszteni, amiket kevésbé hatékonyan tudunk lokalizálni az alakjuk miatt. Ez mindkét dipólus irányítottság esetben a ténylegesnél keskenyebb struktúrát eredményez, amiknek a középső részén hiányoznak a lokalizációk. Radiális irányítottság esetén a széleken a hiányért a gerjeszthetőség, középen a detektálás hatékonysága a felelős, azimutális esetben pedig fordítva, a széleken a detektálás hatékonysága, középen pedig a gerjeszthetőség rossz hatékonysága okozza a lokalizációk megritkulását.

A gömb struktúra szimulációjához annak sugarát 250 nm-esre állítottam, és 400 db festéket helyeztem el a felszínén. Hasonlóan az axon struktúrán történt szimulációhoz, itt is



22. ábra. A fotoszelekció hatása a henger alakú axon struktúrákra, (a) vízszintesen (laterálisan), (b) függőlegesen (axiálisan) lineáris poláros gerjesztést alkalmazva. A dipólusok vagy merőlegesen (radiálisan) helyezkedtek az axon hengerpalástjára, vagy párhuzamosan (azimutálisan) annak gyűrűire. [A1]

megvizsgáltam a radiálisan és azimutálisan beállított dipólokkal kapott képet. A vezikula struktúrájánál az azimutális irányítottság a gömb felületével párhuzamos síkot takarja az gömbfelület adott pontján, ellentétben a axon struktúrával, ahol a gyűrűkkel párhuzamos, jól meghatározott irányt. Kontroll szimulációként dipólus forgási szabadsággal rendelkező vektoriális PSF modellel is elvégeztem a szimulációt 90° -os kúp félszöggel, aminél nincs polarizáció anizotrópia, ugyanúgy, mint a teljes forgási szabadság esetén.



23. ábra. A fotoszelekció hatása a gömb alakú vezikula struktúrákra vízszintesen polarizált gerjesztés esetén. A jelölések dipól orientációja vagy teljesen szabad volt, vagy a gömb felületére párhuzamos síkban véletlenszerűen (azimutálisan), vagy a gömb felületére merőlegesen (radiálisan). A skála $1\ \mu\text{m}$ méretű. [A2]

Azimutális irányítottság esetén a gömb alsó és középső része jó minőségben volt rekonstruálható, itt mind a gerjesztés, mind a lokalizálás magas hatékonyságú. Viszont a gömb szélein, ahol a dipólusok véletlenszerű orientáltsága miatt azok egy része nem volt

hatékonyan gerjeszthető és lokalizálható, itt a lokalizációs pontok megritkultak a kontroll méréshez képest. A ritkulás a gömb "jobb" és "bal" oldalán volt jelentősebb, ahol a gerjeszthetőség rosszabb volt. A radiális irányítottság esetén a lokalizációk jelentősen megritkultak a gömb alsó és felső részén, ahol mind a gerjesztés, mind a lokalizálás kevésbé hatékony, valamint a gömb két oldalán, ahol a gerjesztés kevésbé hatékony. Az utóbbi küszöbértékszerűen jelentkezik, a kép minőségre egészen addig nincs jelentősen befolyásolva, amíg a felvillanások fényessége el nem ér egy bizonyos értéket, ami alatt a lokalizációs algoritmus már nem bírja detektálni a felvillanást.

Ezeket figyelembe véve, nagy numerikus apertúrájú objektívet alkalmazva, a PSF alak szélesebb orientáció tartományon ronthatja a felvillanások detektálásának hatékonyságát, mint a gerjesztési fotoszelekció. Ez utóbbi küszöbérték szerűen jelentkezik, csak azoknál a jelöléseknél számottevő, amik orientációjukból adódóan csak minimálisan gerjesztődnek. Legerőteljesebben műtermékre akkor számíthatunk, amikor mindkét effektus egyszerre jelen van.

5.2.3. Polarizáció érzékeny szimuláció

A polarizáció érzékeny szimuláció segítségével a fluoreszcencia anizotrópia hatását vizsgáltam, és a szimulációk eredményeit egy mérési adatsorral vetettem össze. Az AdOptIm csoport korábban végzett polarizáció érzékeny méréseket phalloidin-Alexa Fluor 647 jelöléssel festett aktin szálakon [158]. A phalloidin egy rövid, merev jelölés, ami az aktin szál két alegysége közötti részbe ékelődik be, és több hidrogén kötéssel is hozzáköt [197, 198]. Emiatt lehet arra számítani, hogy a phalloidin jól meghatározott orientáltsággal kapcsolódik a szálhoz, és, hogy a hozzá kötött festék mozgása korlátozott lesz valamilyen mértékben. A polarizáció érzékeny mérések egy kettős kettőstörő ékkel lettek kivitelezve. A Wollaston prizmával vagy nyalábosztó kockával ellentétben az ék csak kis szögeltérést vezet be a két merőleges polarizációjú komponens között, így a látómezőt nem kell ketté osztani. Ez azt eredményezi, hogy a felvillanások ordinárius és extraordinárius komponensei meghatározott irányban és mértékben elcsúsztatva, de eltérő fényességekkel jelennek meg ugyanazon a képen. Ilyen képsorozat lokalizált adatsorán egy párkereső algoritmus párosítja a felvillanások két komponensét, és határozza meg a "polarizáció fokot" a következő összefüggéssel:

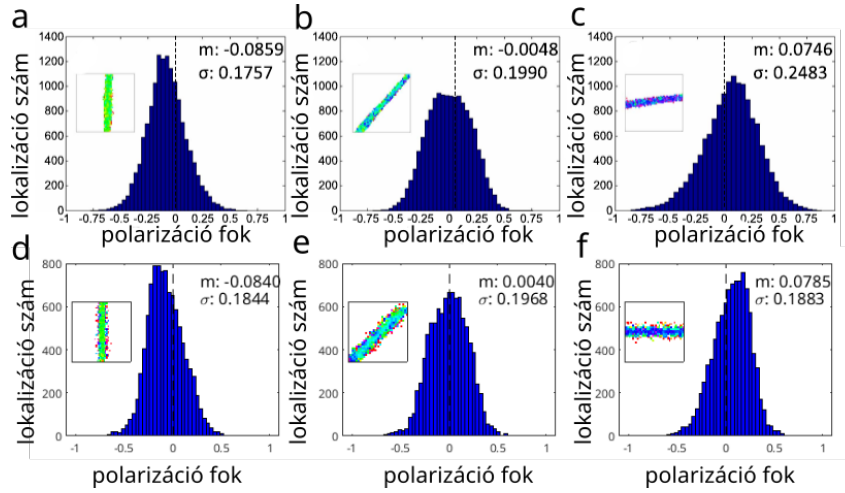
$$P = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + GI_{\perp}}, \quad (9)$$

ahol az $I_{\parallel}$ és $I_{\perp}$ rendre az ordinárius és extraordinárius komponensek, a G pedig a két komponens közti intenzitás transzmisszió különbséget kompenzálja.

Bár a mérés, és a hozzá kapcsolódó kiértékelés kimutatta, hogy ezen festékek rendelkeznek bizonyos mértékű fluoreszcencia anizotrópiával, és az átlagos orientációjuk korrelál a szálak irányával, nem adott számot az anizotrópia mértékéről, hogy a dipól festékek orientáció milyen mértékben volt korlátozott. Annak érdekében, hogy erre becslést lehessen tenni, a vektoriális PSF modell segítségével anizotrópiás szimulációkat végeztem. Bár ez a fajta megközelítés nem alkalmas a mért anizotrópia kvantitatív meghatározására, mégis becslést enged tenni annak a mértékére.

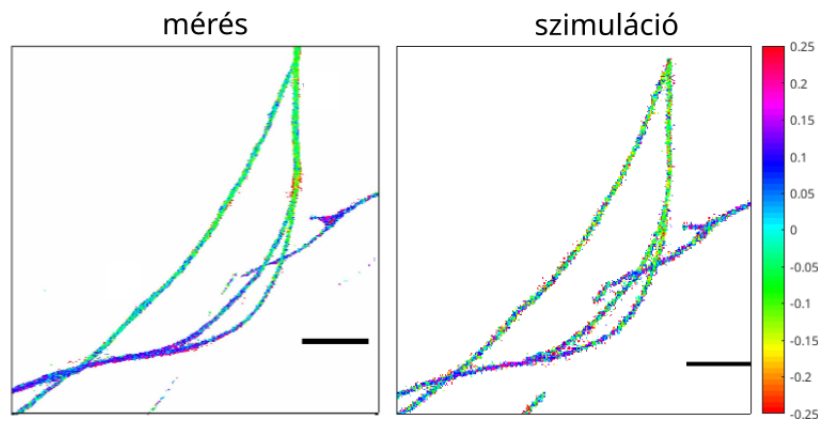
A mért aktin szál alakját az ImageJ JFilaments plugin segítségével törtvonallal megrajoltam, ennek a koordinátáit a TestSTORM "Read Lines from File" funkciójával olvastam be. Ez lehetőséget teremtett, hogy a mért struktúrával alakilag jól egyező struktúrát szimuláljak, ami az eredmények közvetlenebb összevetését tette lehetővé. A phalloidin jelölés rövidségét figyelembe véve, a kötőelem hosszát 2 nm-esre állítottam. A kísérleti eredményekben megvizsgálva a mért polarizáció fok előjeleket a szál orientációja függvényében, azt a következtetést lehet tenni, hogy a festékek dipólus momentumai merőlegesen voltak a szálak tengelyére. A szimulációkat is ennek megfelelően végeztem, a dipól momentumok a felület merőlegeshez képest 0° -osra állítottam. Szimulációt sorozatot végeztem, amik során a dipólus forgási szabadsággal rendelkező vektoriális PSF modell gömbsüveg félszögét és tengely orientációjának a szórását változtattam, és növeltem mindaddig, amíg kvantitatívan jó egyezést nem kaptam a kísérlettel. A szimulációkat a rainSTORM alapértelmezett beállításaiával értékeltem ki, és a polarizáció fok számoláshoz a méréshez is használt kódot használtam fel. A szimulált polarizáció fok eloszlásokat összevetettem a kísérleti eredményekkel, amiket a 24. ábra mutat.

Ahhoz, hogy jó egyezést kapjak a méréssel, a kúp félszögét 65° -osra, az orientáció szórását pedig 17° -osra kellett állítani. Ekkor a polarizáció fok eloszlások medián és szórás értékeit jól vissza lehetett kapni. A polarizáció fok eloszlás medián értékét a gömbsüveg félnyílás szöge befolyásolja elsősorban, azt növelve csökken, de emellett a gömbsüveg orientáció szórás értékének növelésével is csökkenő tendenciát mutat. Az eloszlás szórása



24. ábra. Az aktin szákon mérhető polarizáció fok három különböző orientátság (0° : (a) és (d), 45° : (b) és (e), 90° : (c) és (f)) esetén. A felső sorban ((a), (b) és (d)) a kísérleti eredmények vannak, az alsóban ((e), (f) és (g)) a szimulált eredmények. A polarizáció medián értékét (m) és szórását (σ) az ábrákon lévő számértékek mutatják. A szimulációkban a gömbsüveg félnyílás szöge 65° volt, az orientáció szórása pedig 17° .

három részből származik: a detektor zaja, a hengerpalást különböző részeihez kötött, és a beállított gömbsüveg orientáció szórásból. Megjegyzendő, hogy 90° -os gömbsüveg félnyílás szög esetén a mérhető polarizáció fok eloszlás várható értéke eltűnik minden szál orientációnál, és ennél magasabb félnyílás szög esetén az jelölésekből származó emissziók újból rendelkezni fognak nem nulla várható polarizáció fokkal. A kísérleti és a szimulált polarizáció érzékeny mérések összehasonlítását a 25. ábra szemlélteti:



25. ábra. Az aktin szál kísérleti és szimulált polarizáció érzékeny mérése. A színskála a polarizáció fok medián értékét mutatja, a skála $1\ \mu\text{m}$ nagyságú.

A TestSTORM dipólus forgási szabadsággal rendelkező vektoriális PSF modelljével történő szimuláció tanúsága szerint az Alexa Fluor 647 phalloidin konjugátummal jelölt aktin szálaknál a jelölés forgékonysága korlátozott, de csak kis mértékben. Ez az eredmény összhangban van Cruz és munkatársai eredményével [161], akik eltérő kísérleti elrendezésben szintén phalloidin konjugátumokkal jelölt aktin szálak esetén mérték a jelölések dipólus irányítottságát és annak a korlátozottságát. Jelöléseknek az Alexa Fluor 647 mellett az Alexa Fluor 568 és az Alexa Fluor 488 festékeket alkalmazták. Az előbbi esetén ők egyáltalán nem bírtak kimutatni korlátozottságot.

5.2.4. Kétszínű szimuláció

Kétszínű multimodális méréssel lehetőségünk van, hogy ugyanazon a mintán, egy minta előkészítés segítségével többféle struktúráról nyerjünk információt. A módszernél az egyik nehézség az, hogy általában a fluoreszcens jelölések spektrális elválasztása nem lehetséges teljes mértékben, mivel azok mind abszorpcióban és mind emisszióban véges sávszélességűek. Az egyedi molekula detektálásban fluoreszcens jelölésként leggyakrabban szerves festékeket használnak, ezek abszorpciós és emissziós spektruma általában tükörszimmetrikus, mindkét spektrum elnyúlt lecsengéssel rendelkezik.

A kétszínű mérés szimulációs vizsgálatához két gyakran használt szerves festék, az Alexa Fluor 647 és az Alexa Fluor 568 spektrális tulajdonságait használtam fel. A szimulációban két különböző alakzatot jelöltem a két festékkel, az előbbivel "axon", az utóbbival "vezikula" struktúrát. Mivel a két festék spektrálisan viszonylag közel helyezkedik el egymáshoz, az elnyúlt abszorpciós és emissziós spektrumaik részben átfednek, így mind az abszorpcióban és mind az emisszióban rendelkezni fognak áthallással.

A többszínű méréseket alapvetően kétféleképpen lehet kivitelezni. A festékeket gerjeszthetjük különállóan, a festékek abszorpcióira hangolt különböző hullámhosszú lézerekkel. Ekkor a két színcsatorna képét egymás után kell felvenni. Ebben az esetben az áthallás az elnyúlt és átfedő abszorpciós spektrumokból származik. Megjegyzendő, hogy ebben az esetben megfelelő spektrális szűrők alkalmazásával lehetséges lenne áthallás nélkül felvenni a két felvétel sorozatot, viszont ekkor emissziós szűrőket kéne cserélni a fényútban. Ez egyrészt plusz optikai elemet jelent, ami nem minden esetben áll rendelkezésre, másrészt a szűrőváltás a két kép összeregisztrálását is megnehezíti. A másik

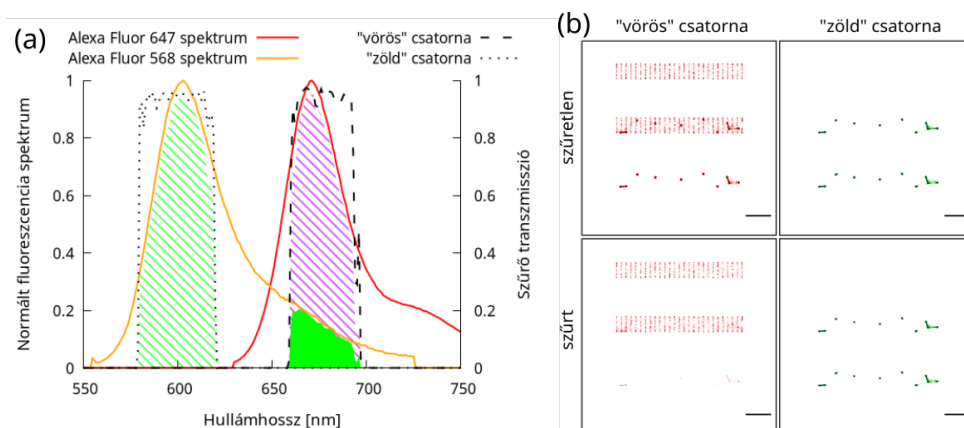
megközelítés, hogy egyszerre gerjesztjük a különböző festékeket, majd az emittált fluoreszcens jelet spektrálisan kettéválasztjuk, és két különböző kamera területre képezzük le őket. Ez a módszer rövidebb mérési időt tesz lehetővé, mivel a két színcsatorna képét egyidejűleg vehetjük fel. Ekkor az áthallás az elnyúlt és átfedő emissziós spektrumokból fog származni.

Mindkét esetre elvégeztem a szimulációkat, egyedül az áthallás mértékét igazítva az aktuális esethez. Ennek kiszámolásához a festékek forgalmazójától származó spektrumok mellett [199] az AdOptIm csoport mikroszkóp rendszerében használt szűrő kocka és emissziós szűrők transzmissziós spektrumait használtam fel [200–202]. Az egymás utáni felvétel esetén az Alexa Fluor 647 jele megjelenik a "zöld" színcsatornában. Az áthallás mértéke a festék abszorpciós spektrumából annak az 561 nm-es és 647 nm-es hullámhosszakon vett relatív gerjeszthetőségéből származik, erre 7,5%-os áthallással adódik. Az egyidejű felvételnél a Alexa Fluor 568 jele hall át a "vörös" színcsatornába. Az áthallás számolásához feltételeztem, hogy a mintát egyenlő intenzitással gerjesztjük a két hullámhosszon, 647 nm-en és 561 nm-en. Ezzel a festékek emissziós spektrumát skáláztam, és a színcsatornák spektrális szűrőinek transzmissziós spektruma szerint integráltam. A két színcsatorna integrált transzmittált jelének vettem az arányát, így 14,7%-os érték adódott az áthallásra. A szimulációk során figyelembe lett véve, hogy az Alexa Fluor 568 esetén egy felvillanás rövidebb ideig tart, és kevesebb fotonkibocsátás történik [102], mint az Alexa Fluor 647 festéknél.

Mivel ilyen elrendezés esetén az áthallás nem túl magas értékű, a felvillanások a nem megfelelő színcsatornában lényegesen kevesebb fotonszámmal jelennek meg, ezért fényességen alapuló szűrés hatékony lehet azok kiszűrésére. A rainSTORM Reviewer szűrő funkciójával elvégezve a lokalizációk fényesség alapú szűrését, a megfelelő küszöbértékek beállítása után az áthallás okozta "szellem" struktúrák nagy mértékben eltüntethetőek lettek anélkül, hogy az "elsődleges" struktúrákon észrevehető minőségromlás következett volna be.

Az egyidejű gerjesztés esetét a 26. ábra szemlélteti. Az ábrán jól kivehető, hogy a Alexa Fluor 561-gyel jelölt vezikulák képe megjelenik a "vörös" színcsatornában. Fényesség alapú szűrést alkalmazva a "szellem" kép nagy mértékben kiszűrhető anélkül, hogy a szűrés számottevően érintette volna az eredeti struktúrákat. Viszont a szűrés nem bírja

teljes mértékben kiszűrni a "szellem" képet, mivel az átfedő felvillanások miatt néhány lokalizáció nagyobb fényességgel rendelkezik, mint amire a festékek tulajdonságaiból és az áthallás mértékéből számítani lehetne.

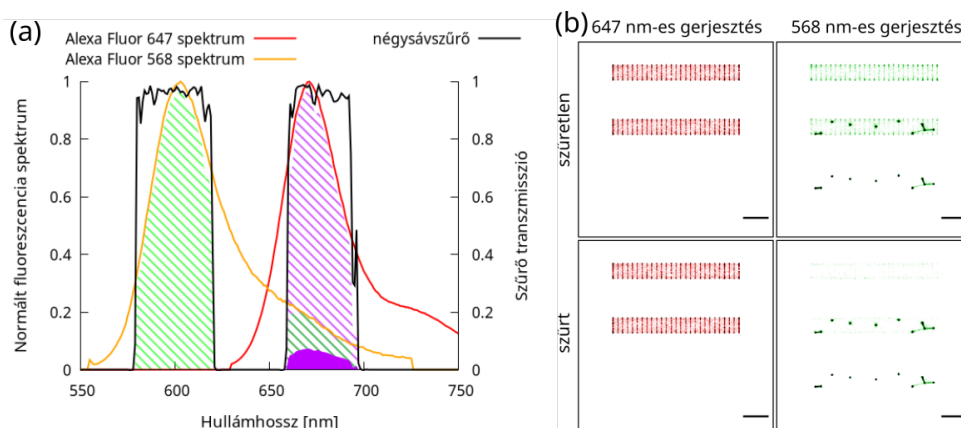


26. ábra. Egyidejű gerjesztés esetén a festékekből származó fluoreszcencia jelek szemléltetése (a). Az Alexa Fluor 561-től származó jel nagyságát a "zöld" színcsatornában a zöld satírozott terület szemléltetni, a "vörös" színcsatornában mérhető pedig a teli zöld terület, ez utóbbi felel az áthallásért. Alexa Fluor 647-től származó jelet a "vörös" színcsatornában a satírozott magenta terület mutatja. A festékek emissziós spektrumait a sárga és piros vonalak mutatják, a szűrő kocka transzmissziójának a fekete pöttyözött és szaggatott vonalak a színcsatornák transzmisszióit írják le. Az axon (Alexa Fluor 647 jelölt) és a vezikulák (Alexa Fluor 561 jelölt) megjelenő képei a két színcsatornában (b). [A1]

A különálló gerjesztés esetét a 27. ábra mutatja. Ebben az esetben az Alexa Fluor 647 festékkel jelölt axon struktúrák "szellem" képe jelenik meg az 561 nm-es gerjesztés esetén is. Habár a "szellem" kép lokalizációi jelentősen rosszabb lokalizációs precizitással rendelkeznek, mint az eredeti axon képet alkotó lokalizációk, azokon is kivehető a gyűrűs szerkezet.

5.2.5. Asztigmias 3D szimuláció

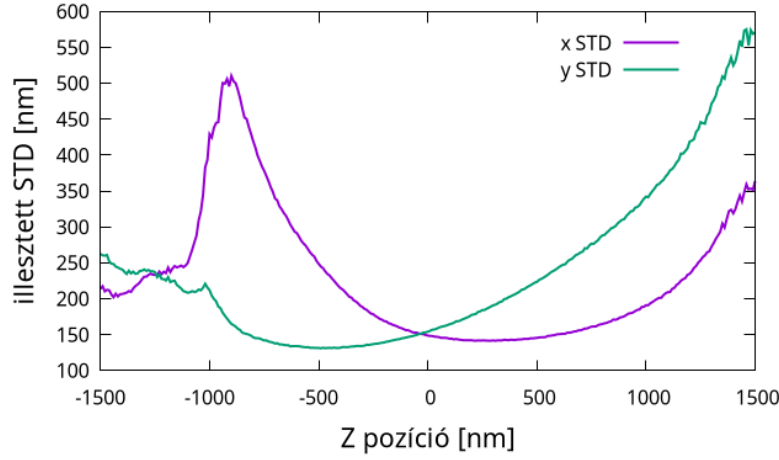
A lokalizációs technikáknál az axiális pozíció kinyerésére több lehetőség is van. Ezek közül talán a legegyszerűbb és legerjedtebb a henger lencsével történő 3D mérés. A TestSTORM-ba is ezt a 3D módszert implementáltam elérhető szimulációs modalitásként. Az asztigmias 3D módszer szimulációs vizsgálatára a skaláris PSF modellt használtam fel. Vizsgálandó struktúrának a gömb alakú vezikula mintázatot választottam, amire kis mértékű struktúrált háttérrel is beállítottam.



27. ábra. Különálló gerjesztés esetén a festékekből származó fluoreszcencia jelek szemléltetése (a). Az 561 nm-es gerjesztés esetén az Alexa Fluor 561-től származó jel nagyságát a zöld sáírozott terület szemléltetni, az Alexa Fluor 647-től származót pedig a teli magenta, ez utóbbi felel az áthallásért. A 647 nm-es gerjesztés esetén az Alexa Fluor 647-től származó jel nagyságát a magenta sáírozott terület mutatja. A festékek emissziós spektrumait a sárga és piros vonalak mutatják, a szűrő kocka transzmissziójának a fekete vonal felel meg. Az axon (Alexa Fluor 647 jelölt) és a vezikulák (Alexa Fluor 561 jelölt) megjelenő képei a két színcsatornában (b). [A1]

A kalibrációs adatsor elkészítéséhez a TestSTORM rács mintázatát használtam fel. 6×6 -os rácsot állítottam be, amiben a rácpontok távolságát kellő nagyságúra, $5 \mu\text{m}$ -esre állítottam annak érdekében, hogy a lokalizáló algoritmus még a szélső defókuszált esetekben is biztosan szét bírja választani a felvillanásokat. A festékek *OFF* állapotának karakterisztikus idejét 0 s-re állítottam, ezzel megszüntetve a villogásukat. Az axiális pozíció változtatásához egy konstans, z irányú driftet állítottam be, ami a mintázatot egy ismert defókuszált kezdő pozícióból átvitte a fókuszsíkon keresztül szintén egy ismert defókuszált végső pozícióba. Ezzel értem el, hogy minden egyes kamera felvételen egy bizonyos mennyiségű, nem átfedő PSF folt legyen jelen, és hogy minden egyes felvétel egy ismert axiális pozíciónak feleljen meg. A kalibráló felvétel sorozatot a rainSTORM "Least-Squares Gaussian 2D linear Bg" algoritmusával értékeltem ki, és az eredményül kaptam, illesztet elliptikus Gauss x és y standard deviációk felvételenként vett átlagos értékei alkották a kalibráló adatsort (28. ábra).

Az irodalomban sokszor az elliptikus Gauss két standard deviáció értékeiből egy ellipticitásnak nevezett mennyiséget származtatnak. A kalibráló adatsorra az ellipticitás függvényt illesztve, a mért adatok ellipticitás értékei alapján már visszaszámolható, hogy



28. ábra. Az asztigmias skaláris PSF kalibrációs görbéi. A két görbe a PSF-ekre illesztett elliptikus Gauss függvény x és y szélességeinek (standard deviáció) felel meg a defókuszáltság függvényében.

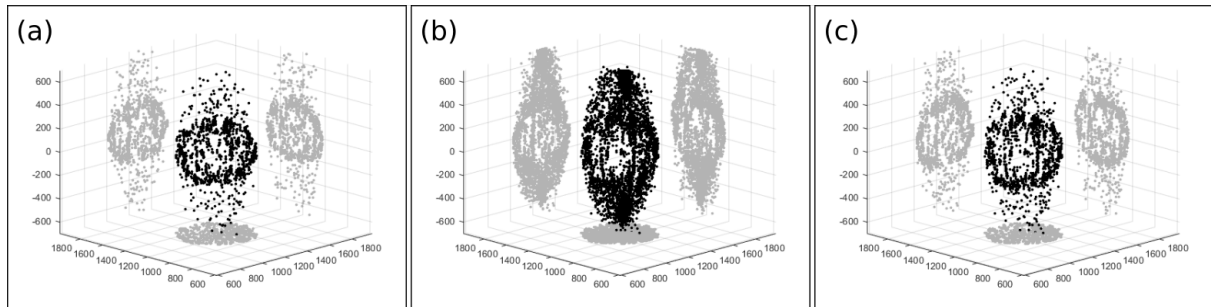
azok mely z pozícióhoz tartoznak. Ehelyett azonban más megközelítést választottam. A kalibráló adatsor két nyers standard deviációjára egyszerre végeztem el a mért értékek illesztését. Az illesztendő mennyiségnek a két adatsorra vett hiba négyzetösszegét számoltam, és ezt minimalizáltam:

$$z^{\text{mérés}} = \min((\sigma_x^{\text{kal}}(z) - \sigma_x^{\text{mérés}})^2 + (\sigma_y^{\text{kal}}(z) - \sigma_y^{\text{mérés}})^2) \quad (10)$$

A z pozíció visszaszámolása numerikusan volt lehetséges. Először meghatároztam, hogy az említett hibák négyzetösszege a kalibrációs adatsor mely diszkrét adatpontja esetén minimális, majd négyzetes interpoláció segítségével pontosítottam a meghatározott axiális pozíciót. Mind a kalibráló és mind a vizsgálandó struktúra felvétel sorozatát a rainSTORM "Least-Squares Astigmatic Gaussian 2D linear Bg" algoritmusával értékeltem ki, az alapértelmezett beállításokkal.

A vizsgálandó asztigmias 3D szimulációhoz a TestSTORM vezikula struktúráját választottam. A gömb struktúra sugarát 250 nm-esre állítottam, hogy az kitöltse az objektív mélységelességét. A vezikulára 200 db Alexa Fluor 647 festékek helyeztem el. A szimulált képsorozat 10000 felvételen, 2179 felvillanást tartalmazott, így egy festék átlagosan ~ 11 -szer villant fel a szimuláció során. Az asztigmat $f = 10$ m fókusztávolságú hengerlencse hatásának megfelelő fázisaberráció vezette be. Egy kis mértékű konstans, struktúrált

háttérrel is beállítottam, ennek maximális pixelértéke 10%-a volt a fókuszált felvillanások maximális értékének. Habár ez a háttér jóval halványabb, mint az expozíciós időt kitöltő, fókuszált felvillanások, de háttér kivonás hiányában, azokra ráarakódva befolyásolja a Gauss függvény illesztést.



29. ábra. A rekonstruált 3D asztigmias kép vezikula mintázat szimulációjáról. A (a) ábra a struktúrált háttér nélküli kontroll szimulációt mutatja. A (b) és a (c) ábrák azt az esetet mutatják, amikor a felvillanásokra rá volt rakódva egy kis mértékű struktúrált háttér. A előbbi esetben nem történt plusz szűrés a lokalizációkra, az utóbbi esetben egy fényesség alapú szűrést volt alkalmazva. [A2]

A háttér nélküli eset rekonstruált képét a 29. (a) ábra szemlélteti. Habár a kalibráló adatsor aszimmetrikus volt a $z = 0$ pozíció körül, a visszanyert axiális pozíciókon nem mutatkozik meg, hogy ez észrevehető hatással lenne azok hibájára. Axiális irányban kivehetőek a gömbhéjtól jelentősen eltávolodó lokalizációk. Ezek laterálisan a gömb közepe felé tolódnak el, míg axiálisan jelentősen szórt pozíciókat vesznek fel. Ezeket az átfedő felvillanások okozzák, az átfedések egyrészt laterálisan a struktúra közepe felé tolják a lokalizációkat, valamint a felvillanás alakját is módosítják, ami hibaként jelentkezik az illesztett elliptikus Gauss standard deviáció értékeiben. Továbbá a lokalizált képen felfedezhető axiális irányú oszlopos alakzat. Ez annak az eredménye, hogy axiális irányban rosszabb a lokalizációs precizitás, mint laterális irányban, így az átlagosan ~ 11 -szer felvillanó festékek axiálisan elnyúlt csomósodást eredményeznek.

A struktúrált háttér hatását a 29. (b) és (c) ábra szemlélteti. Már a gyenge struktúrált háttér is jelentős mértékű műterméket vezetett be a rekonstruált struktúrára. A rekonstruált alakzat axiálisan jelentősen elnyúlt lett. A gömb alakzat alsó és felső részén elnyúlt, sűrű lokalizáció csomósodás jelenik meg, ami nem magyarázható meg önmagában az átfedő felvillanásokkal. Ennek magyarázata kétrétű. Egyrészt a struktúrált háttér téves ("fals") lokalizációkat eredményez azokon a felvételeken, amiken nincs festéktől száрма-

zó felvillanás. A struktúrált háttér PSF-nél nagyobb kiterjedése miatt ezen lokalizációk x és y szélességei nem illeszkednek jól a kalibrációs görbére, a struktúra alá vagy fölé kerülnek elhelyezésre. Másrészt a struktúrált háttér ráakódik a felvillanásokra, torzítja azok alakját, módosítja az illesztett elliptikus Gauss paramétereit, ezáltal torzítja a visszaszámolt axiális pozíciókat. Fényesség alapú szűrést alkalmazva az említett műtermék szinte teljesen megszüntethető. A szűrés küszöbértéket magasabbra állítva, mint a struktúrált háttér fényessége, a fals lokalizációk eltávolíthatóak. A szűrés után a struktúra nagy hasonlóságot mutatott a háttér nélküli esethez. A gömb alsó és felső részén megmaradt csomósodott műterméket a halvány, az expozíciós időt nem teljes mértékben kitöltő felvillanásokból származó, de a fényesség szűrése átment lokalizációk okozzák, ezeket nagy mértékben befolyásolja a struktúrált háttér. Emellett a gömb alakú struktúra axiális irányban észrevehetően elnyúltabb lett. Ezt az okozza, hogy a struktúrált háttér ráakódik a felvillanásra, és ez a lokalizáló algoritmus a PSF standard deviáció meghatározásába helyfüggő, szisztematikus hibát vezet be még a fényes, az expozíciós időt kitöltő felvillanások esetén is. Ez nem szüntethető meg a lokalizált adatsor szűrésével. A probléma megoldására a lokalizálás előtt lépésben a felvétel sorozatról történő háttér eltávolítás szükséges.

5.3. Arany nanorudak dSTORM vizsgálata

Arany nanorudakhoz kötött fluoreszcens festékek fluoreszcencia erősödését vizsgáltam több kutatócsoporttal együttműködésben. A festék-nanorészecske kölcsönhatásra vonatkozó numerikus szimulációkat és az optimális nanorúd-festék rendszer megtervezését Tóth Emese végezte a Nanoplazmonika csoport (SZTE, Fizika Intézet, Optikai és Kvantum-elektronikai Tanszék) részéről, Dr. Csete Mária vezetésével. A szimulációk futtatásához szükséges számítástechnikai háttér és az optimalizáló algoritmus biztosításáért Dr. Bánhelyi Balázs (SZTE, Informatikai Intézet, Számítógépes Optimalizálás Tanszék) felelt. A kolloid arany nanorudak előállítását és karakterizálását Dr. Ungor Ditta végezte a Nanohibrid Struktúrák Kutatócsoport (SZTE, Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék) részéről, Dr. Csapó Edit vezetésével. Az oligonukleotid szálak szintézisét, és a nanorészecskék megjelölését Dr. Ferenc Györgyi (SZBK, Nukleinsav Szintézis Laboratórium) valósította meg. Én a dSTORM méréseket hajtottam végre az AdOptIm csoport

mikroszkóp rendszerével, és a mérési adatokat értékeltem ki, valamint a csoport részéről Ponyeczkiné Czvik Elvira készítette elő a mintákat a mérésekhez.

Aranyból készíthetőek nanorészecskék számos eltérő geometriával, amik plazmonikus tulajdonságokkal rendelkeznek, és kémiaiilag is stabilak [203]. Ilyen nanorészecskék felhasználást nyertek különféle bioszenzorikai alkalmazásokban, többek között a fluoreszcenciával való intenzív kölcsönhatásuknak köszönhetően [204]. Példaként a kis méretű (< 40 nm) arany nanogömbök tipikusan csökkentik a közelükben lévő fluoreszcens jelölések fényességét [205]. Ellenben, hogyha az egyik irányba kissé megnyúlt, rúd alakú részecskéket alkalmazunk, azok képesek erősíteni a hozzájuk kötött fluorofórok emisszióját. Az erősítés mértéke több paramétértől függ. A hatékony erősítéshez szükséges a nanorészecske plazmon rezonanciáját a fluorofór abszorpciós és emissziós spektrumaira hangolni annak érdekében, hogy a gerjesztési és az emissziós oldal is érdemileg hozzá tudjon járulni az erősítéshez [174]. Ez a hangolás megtehető a nanorúd geometriájának változtatásával, mivel a plazmon rezonancia csúcsa érzékenyen függ a rúd oldalviszonyától, vagyis a hossz tengely és az átmérő arányától. Az oldalviszony változtatásával az arany nanorudak plazmon rezonancia csúcsa szabadon hangolható egy széles, ~ 550 nm feletti optikai tartományon [206, 207]. Továbbá, a fluoreszcencia erősítés mértéke erősen függ a fluorofór-nanorészecske távolságtól. Túl távol helyezve a fluorofórt nem lesz számottevő kölcsönhatás, túl közel helyezve pedig fluoreszcencia kioltás következhet be a kvantum hatásfok leromlása miatt. Valamint az erősítés mértéke nem egyforma a nanorudak különböző részein, azok végeinél tipikusan nagyobb fluoreszcencia erősítés érhető el [208].

A projekt célja az volt, hogy számottevő fluoreszcencia erősítésre képes fluoreszcens festék-nanorúd rendszert alkossunk meg, és mérjük ki rajta a fluoreszcencia erősítés mértékét.

5.3.1. Minta

Fluorofórnak a Cy5 festéket választottuk, aminek az abszorpciós maximuma 649 nm-nél, az emissziós maximuma pedig 666 nm-nél van [209]. Azért erre a festékre esett a választás, mert egyrészt a megfelelő pufferoldatban, ún. "switching" pufferben fotovillogást végez [210], és így alkalmazható dSTORM mérésekre [28], másrészt a gerjesztési és az

emissziós spektruma olyan hullámhossz tartományra esik, ami tipikusan jellemző az arany nanorudak plazmon rezonanciájára. Továbbá a szabad festék viszonylag alacsony, $\sim 27\%$ körüli kvantum hatásfokkal bír [211], így az emissziós oldali kölcsönhatás is érdemileg hozzá tud járulni a fluoreszcencia erősödéshez.

A szimulációk segítségével egyrészt meg lett határozva az optimális nanorészecske-festék geometria, és az elérhető erősítés mértéke. Másrészt az optimális eset környékén a paraméterekre vonatkozó érzékenységi vizsgálat lett végezve. Ehhez véges elem módszerrel [212] lettek számolások végezve a fluoreszcencia erősítésre vonatkozóan [213]. A szimulációs eredmények egy globális extrémum kereső algoritmussal lettek optimalizálva [214]. Az optimalizáció során mind az arany nanorúd méretei, vagyis a hossza és az oldalviszonya, mind a festék elhelyezkedése, vagyis a nanorúd hossz tengelyén mért pozíciója, a felülettől való távolsága és az orientációja változtatva lett a kísérleti feltételekkel megszabott korlátok között.

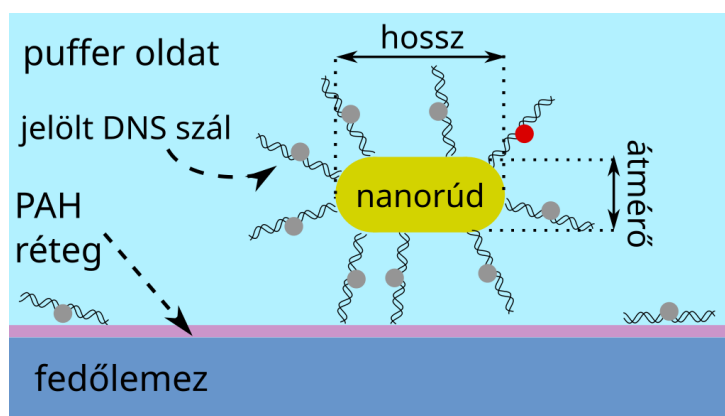
A kolloid nanorudak soft templát módszerrel lettek szintetizálva. A transzmissziós elektron mikroszkópiai mérés alapján a rúd alakú nanorészecskék átlagos hossza $42,9 \pm 7,1$ nm, átmérőjük pedig $14,6 \pm 2,5$ nm volt. A kolloid oldat UV-Vis spektrofotométerrel történő abszorbancia mérése alapján a részecskék rendelkeztek plazmon rezonanciával a várt hullámhossz tartományon, 662 nm-nél lévő elnyelési maximummal.

A mérésekhez a nanorészecskéket meg kellett jelölni a fluoreszcens festékekkel, ami oligonukleotid szálak segítségével történt. Egy 53 nt hosszú szál ($1 \text{ nt} \approx 0,33 \text{ nm}$, egy nukleotid egységhez tartozó hossz) thiol csoporttal kapcsolódott az arany felülethez aranykén kovalens kötással (30. ábra). Ilyen szálakhoz kötött hozzá a két kiegészítő szál DNS kettős spirált alkotva. Az egyik kiegészítő szál végéhez hozzá lett kötve a Cy5 festék, és ennek a szálnak a hosszával lehetett szabályozni a festék aranyfelület távolságot, míg a másik kiegészítő szál csak a megmaradt oligomer szál kiegyenesítésért felelt.

A kolloid nanorészecskék fluoreszcens jelölése oldat fázisban történt. Az oldat fázisú jelölés következtében a nanorészecskékhez kötetlen, szabad fluoreszcens jelölések is maradtak az oldatban. A megmaradt szabad festékek kitisztítása érdekében az oligomerekkel megjelölt nanorészecskék oldata centrifugálva lett. Ennek hatására a kolloid nanorészecskék lerakódtak az edény falára, és csak lassan kerültek vissza oldat fázisba, közben a felülúszó leszedésével, és új tiszta oldószer hozzáadásával a jelöléshez használt,

nanorészecskéhez nem kötött festékek koncentrációja le lett csökkentve.

Végül az így megjelölt részecskéket rögzíteni kellett a fedőlemez felszínére a dSTORM fluoreszcens mikroszkópiás vizsgálathoz. A mérésekhez használt nitrogén plazma tisztított üveg fedőlemez folyadék fázisban negatív elektrosztatikus töltéssel rendelkezik, így a szintén negatív töltéssel rendelkező oligonukleotid szálakkal megjelölt részecskék nem tapadnak ki rá. Annak érdekében, hogy a jelölt részecskéket ki bírjuk tapasztani, a fedőlemezt módosítottuk, bevontuk pozitív töltésű PAH réteggel. Megjegyzendő, hogy ehhez a réteghez a nanorészecskéhez nem kötött, megmaradt szabad oligonukleotid szálak is kitapadtak, és az ilyen, festékkel jelölt szálak is fluoreszcens jelet adtak a fedőlemezen. A méréshez előkészített mintát a 30. ábra szemlélteti.

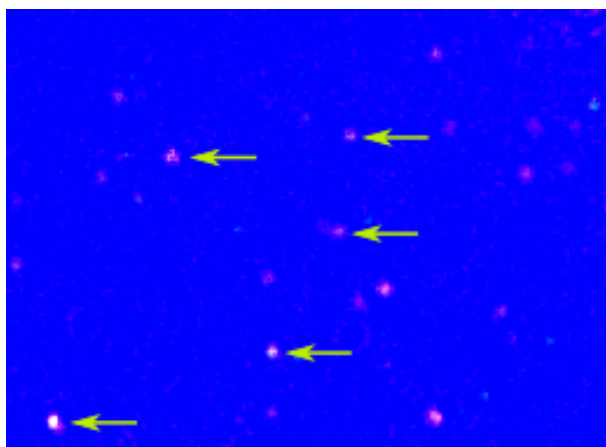


30. ábra. A fluoreszcensen megjelölt, és a fedőlemezre kitapasztott nanorudat tartalmazó minta vázlatos ábrája. A piros kör egy fluoreszcens állapotban lévő festéket jelöli, a szürke körök pedig sötét állapotban lévőket.

5.3.2. Mérés

A mikroszkóp kamerájával, fluoreszcens üzemmódban csak a fluoreszcens jel erősségét tudtuk mérni, ami önmagában nem szolgál egyértelmű információval arról, hogy az milyen forrásból származik. Ezért annak igazolásához, hogy a nanorészecskék ténylegesen kitapadtak a fedőlemezre, transzmissziós, fehér fényű felső kivilágítással is megvizsgáltam a mintát. Az arany nanorudak detektálhatóak fehér fényű, sötét látóterű megvilágítással [215], de a mikroszkóp rendszerünk ilyen mérési móddal nem rendelkezett. A probléma megoldására olyan fehér fényű transzmissziós megvilágítást alkalmaztam, amiben a mintát keresztezett polarizátorok közé helyeztem el. Ez egyrészt sötét háttérrel eredménye-

zett, másrésről a nanorudaktól azt vártam, hogy az orientációjuktól függő polarizációval szórják a fényt. Ennek megfelelően a rajtuk szóródó fény jelentős mértékben át tud hatolni a második polarizátoron, amennyiben a nanorúd orientációja nem egyezik meg egyik polarizátor transzmissziós tengelyével sem. A keresztezett polarizátoros elrendezést alkalmazva, a PAH réteggel bevont fedőlemezre történő nanorészecskék kitapadást tudtam igazolni (31. ábra).



31. ábra. A kitapadt nanorészecskék fehér fényű transzmissziós, keresztezett polarizátor állásban készült képe. A nanorészecskék a vörös színű foltoknak felelnek meg, például néhány zöld nyilakkal be van jelölve.

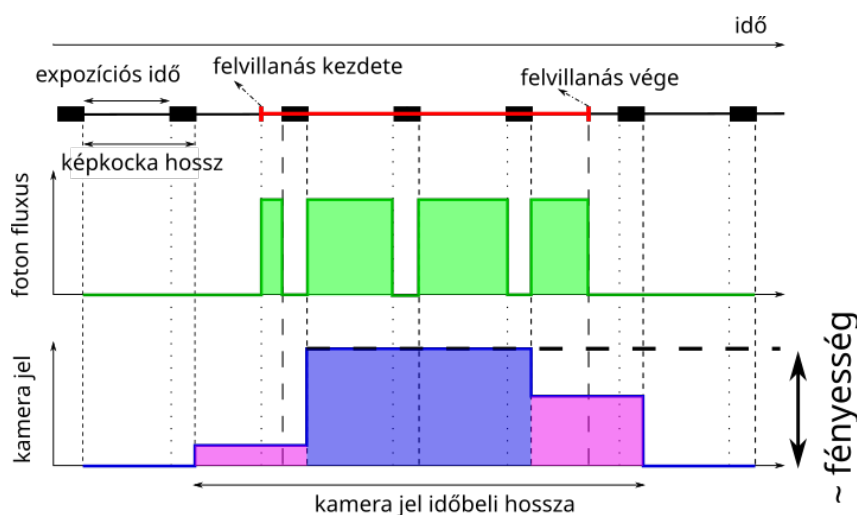
A dSTORM mérésekhez a mintára switching puffert [216] raktunk, tárgylemezre helyeztük, és szilikon ragasztóval lezártuk. A mérésekhez nagy fénygyűjtő képességű, 1,49-es numerikus apertúrájú olaj immerziós objektívet használtam. A mintát epifluoreszcensen világítottam ki lineárisan polarizált Gauss-nyalábbal, 647nm-es gerjesztő lézerrel, a fluoreszcens emissziót pedig a $\sim 660 - 694\text{nm}$ -es spektrális ablakban detektáltam. A felvételeket EMCCD kamerával vettem fel elektron sokszorozó üzemmódban. A mintán a felvétel területe a Gauss nyaláb közepén egy kis méretű régióra lett leszűkítve. A mérések előtt mind fluoreszcensen, mind fehér fényű megvilágítással ellenőriztem, hogy megfelelő sűrűségben vannak-e nanorészecskék a kiválasztott területen.

5.3.3. Kiértékelés

A nanorudak dSTORM felvételeinek kiértékelése több szempontból is eltért a biológiai mintákon végzett dSTORM felvételek kiértékelésének általános menetétől.

Egyrésről a nanorudak rendelkeztek egy stabil, közel diffrakció limitált foltméretű fluoreszcens háttérrel, és a nanorészecskékhez kötött festékek felvillanásai ezen a háttéren történtek. A kiértékelés során ezt a stabil háttérrel el kellett távolítani ahhoz, hogy a nanorészecskéken történő felvillanásokra a PSF illesztést el lehessen végezni anélkül, hogy a háttér befolyásolná az illesztett fényességet és pozíciót.

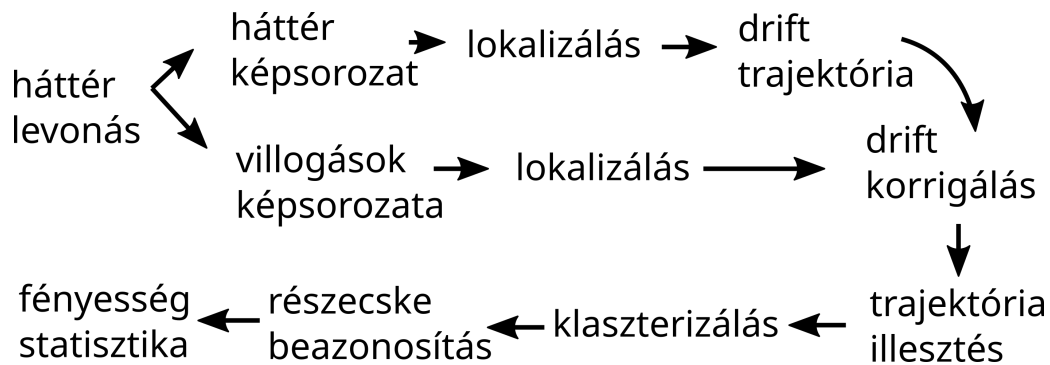
Másrésről a hagyományos lokalizációs mikroszkópai kiértékelésektől eltérően a hangsúly nem strukturális információ kinyerésén, hanem a fényességeiknek meghatározásán volt. Ehhez viszont figyelembe kell venni a jel felvétel egyik korlátját, hogy egy adott felvillanás a kamera expozíciós ideje által fel van szabdalva, így azt nem minden képkockán tölti ki teljes mértékben, amin szerepel (32. ábra). E tekintetben azok a képkockák vannak érintve, amiken a felvillanás kezdődik vagy befejeződik, így ezeken a detektált jel nem szolgáltat megbízható információval a felvillanás fényességéről. A probléma megoldható, ha a felvétel lokalizálását követően megkeressük az adott felvillanáshoz tartozó lokalizációkat, és ezek közül kiválogatjuk azokat, amelyeknél a felvillanás teljes mértékben kitöltötte az expozíciós időt. A lokalizációk ilyen fajta összecsoportosításának folyamatát hívom a későbbieknek "trajektória illesztésnek", a különálló felvillanásokhoz alkotott csoportokat pedig "trajektóriáknak".



32. ábra. Az kamera expozíció szerepe a fluoreszcens jel mérésében. A kék téglalap azokat a képkockákhoz tartozik, amiknél a felvillanás teljesen kitöltötte az expozíciós időt. A kamera jel várható értéke ekkor arányos a fluorofór fényességével. A magenta téglalapok azokon a felvételeken mutatják jelet, amiken a felvillanás nem töltötte ki az expozíciós időt.

Következő lépésként meg kell határozni, hogy mely felvillanások történhettek a külön-

álló arany nanorudakon, és szét kell választani őket az üveg fedőlemezen történt felvillanásoktól. A számolások alapján azt lehetett várni, hogy a nanorúdhoz kötött festékek felvillanásai között lesznek jelentősen fényesebbek, mint a hozzájuk nem kötött festékek esetén. Ez a nagy feloldású képen annak felel meg, hogy a fényes felvillanások csomósodásokat alkotnak azokon a helyeken, ahol a nanorészecskék vannak. Ezeknek a csomósodásának a vizsgálatát klaszterizáló algoritmussal végeztem el, az így megtalált csomósodásokat a nanorudaknak lehetett megfeleltetni. Végül a különálló nanorudakhoz tartozó adatokat elemezve, azok fluoreszcencia erősítéseit meg lehetett határozni. A különböző kiértékelési lépéseket a 33. ábra foglalja össze.



33. ábra. A kiértékelés lépéseinek vázlata.

Az adatok elemzését az AdOptIm csapat által fejlesztett rainSTORM szoftver [217] módosított változatával végeztem el. A szoftver grafikus kezelőfelületet használ, és a felvételek lokalizálására, a lokalizációs adatsor szűrésére, valamint az eredmények ábrázolására, úgy mint a lokalizációk nagyfeloldású képének vagy különböző hisztogramjainak megjelenítésére használatos. Azonban a nanorudas mintákról készült felvételek kiértékelésének menete nem illett bele a rainSTORM hagyományos profiljába, és annak nem minden lépését tudtam elvégezni a szoftver kezelőfelületén keresztül. Annak érdekében, hogy a felvételek elemzését egyetlen eszközzel, több kisebb lépés helyett egyben el lehessen végezni, a rainSTORM programkódját felhasználva készítettem egy attól különálló kiértékelő szoftveres eszközt. Ehhez a meglévő szoftveres eljárásokat, vagyis a felvételsorozat kezelő, lokalizáló, drift korrekciót végző, trajektória illesztő és klaszterizáló algoritmusokat úgy módosítottam, hogy jól rendezett, különállóan is jól is felhasználható, akár a későbbi projekteknél is alkalmazható kódot kapjak. Az eszköz ezeken felül a háttér levonó, a nanorészecske képeit megkereső és azokat kiértékelő kódokat tartalmazta. Továbbá

javítottam az említett algoritmusok adatkezelésén is annak érdekében, hogy csökkentsem azok memória igényét, így a kiértékelést le lehessen futtatni kevesebb memóriával rendelkező gépeken is.

Háttér levonás A kiértékelés legelső lépéseként a háttér levonást kell elvégezni a felvétel sorozatra. A cél az, hogy eltávolítsuk a felvételekről a nem a festék felvillanásokból származó, időben lassan változó, de a képsíkban erősen struktúrált fluoreszcens jelet. A háttér levonó algoritmusnál kritérium volt, hogy az egyedi molekula felvillanások képeit és fényességeit torzítatlanul adja vissza, valamint, hogy időben változó és képpontonként is különböző értékű, tetszőleges képsíkbeli struktúrával rendelkező háttérrel is el bírjon távolítani, még akkor is, hogyha a felvillanások időbeli sűrűsége viszonylag nagy. Továbbá, a háttér levonásnak figyelembe kell vennie, hogy míg a fluorofórok kiégése miatt általánosságban időben csökken a háttér, addig a drift-et végző mintán a nanorészecskék autofluoreszcens jele helyenként, bizonyos kamera képkockákon időben növekedhet is.

Az irodalomban számos háttér eltávolító módszert kidolgoztak SMLM felvételek előfeldolgozására (lásd: 3.2.3). Azonban ezek közül nem mindegyik alkalmas a nanorudakon lévő struktúrált, közel diffrakció limitált, viszonylag erős fluoreszcens háttér eltávolítására. A különböző háttér eltávolító módszerek közül a PSF illesztés során történő háttér levonás a nanorudak fluoreszcens képének kicsi, festék felvillanásokkal összevethető mérete miatt nem alkalmazható. Az egymást követő felvételeket egymásból kivonó algoritmusok pedig a fényesség értékeket nem képesek visszaadni. A lineáris szűrések jobban megfelelnek a célnak, azonban ezek sem ideálisak, mivel a fényesség értéket torzítják, főleg fényes vagy sűrű felvillanások esetében. A medián szűrés szintén bevezet egy kis mértékű szisztematikus hibát a fényesség értékek meghatározásába. A statisztikai elemzéseken alapuló háttér levonást azért nem találtam megfelelőnek, mivel az eltérő mértékben erősített felvillanások és a drift jelenléte összemoshatja a fényesség eloszlásban a háttérhez és a felvillanásokhoz tartozó kamera beütésszám értékeket. A felvillanások beazonosításán alapuló, és az azokat nem tartalmazó képkockákat felhasználó algoritmusok megbízható alkalmazása pedig nehézkes, amit tovább nehezít, hogy jelentősen eltérő fényességű felvillanások voltak várhatóak egyazon részecske esetén is.

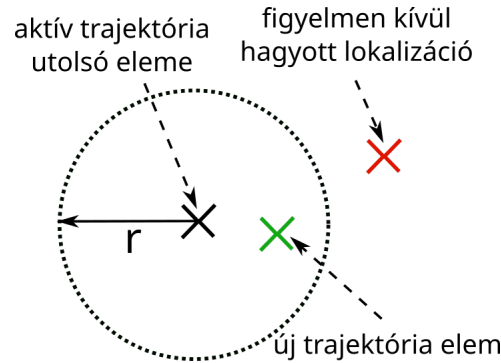
A problémák megoldására saját háttér levonó algoritmust fejlesztettem, ami a képkoc-

kák képpontjain külön-külön meghatározza és levonja a háttérét. Kezdetben az algoritmus az első néhány képkockát figyelembe véve, a képpontok fényesség hisztogramján megkeresi azt a csúcst, amihez a legkisebb kamera beütésszám tartozik, és ezt veszi a háttér kezdeti értékének. Az algoritmus a további lépésekben alapvetően egy súlyozott mozgóátlag szűrő, ami sorrendben végig megy a képkockákon. Az alkalmazott súlyokat a képpontok beütésszámainak és a háttér értékének a különbsége alapján számolja. Mivel a súlyok kiszámolásához szükséges a háttér értéke, és a háttér kiszámolásához pedig kellenek a súlyok, ezért az algoritmus az első lépésben a súlyokat egy becsült háttérből számolja, majd a becsült súlyok értékeiből határozza meg a háttérét. Az említett háttér becslést az előző képkockákhoz tartozó háttér értékeiből extrapolálással végzi. A súlyok értékeinek kiszámítására Fermi-Dirac függvényt választottam, így a súlyozás a fényesség szerint monoton függvény, kihasználja azt, hogy a felvillanások jelei csak hozzáadódni tudnak a háttéréhez, növelve a kamera beütés számokat. Vagyis, ha a képkocka adott képpontja minél fényesebb a háttérhez képest, annál kisebb súlyt kap (0-hoz tartva), míg ha minél halványabb, annál nagyobb (megközelítve az 1-et). A két szélső érték között van egy levágás, aminek a pozíciója és szélessége állítható. A levágás pozícióját érdemes a becsült háttérnél magasabb értékűre beállítani, annak érdekében, hogy a zaj okozta beütésszám ingadozásokat is még a háttér részeként kezelje az algoritmus. Ezért a levágásnak az aktuális becsült háttérhez képesti helyét annak a fotonzaj szórás várható értékéhez kötöttem, annak a várható értékének 5-szörösével magasabb pozícióra állítva alapértelmezetten. Továbbá, a lecsengés lefutása hangolható a Fermi-Dirac eloszlás β paraméterével, annak érdekében, hogy kevésbé ugrásszerű legyen az algoritmus viselkedése. Így, ha egy felvillanás történik a háttéren, akkor annak a jelét tartalmazó tartalmazó képpontok alacsony, 0 közeli súlyt kapnak, ellenkező esetben pedig magasat. További probléma, hogy a felvillanások nem jól meghatározott ugrásszerű változásként jelentkeznek a kamera beütés számokban. Ez igaz, mind a képsíkbeli változásra a PSF lecsengő volta és a pixelizálás miatt, mind az egymást követő felvételek közti változásra, a kamera expozíciós idő véletlenszerű kitöltése miatt. Ennek a kezelésére, egy képpontnak az átlagolásban megjelenő végső súlyához az algoritmus figyelembe veszi az adott képponttal "szomszédos" képpontok súlyait is, össze-szorozva őket. Ezáltal egy adott képponthoz akkor is alacsony súlyt rendel, ha mellette lévő valamelyik képponton felvillanást valószínűsít.

A háttér levonás helyes működését és hatékonyságát a TestSTORM szimulációs szoftverrel teszteltem. A szimulációnál a vezikula mintázatot használtam, amiben a struktúrák pontszerűnek tekinthetők, vagyis minden irányban a diffrakció limitnél kisebb kiterjedésűek, hasonlóan, mint a nanorudak. Két szimulációt végeztem, referenciaként az egyiket háttér nélkül, a másikon pedig egy lassan változó fényességű, közel diffrakció limitált méretű struktúrált háttér ráakódott a vezikulákra, jelentős mértékű drift jelenlétében. Az előbbi, a referencia szimulált adatsorra csak a lokalizálást végeztem el háttér levonás nélkül, míg az utóbbira a lefuttattam a háttér levonást is. Összehasonlítottam a lokalizációk különböző paramétereinek, mint az illesztett Gauss szélesség vagy a fényesség eloszlásait. Valamint a két szimulációs adatsor között összehasonlítottam az egyező felvillanásokat, így a visszanyert fényességbeli különbségek közvetlenül megmutatkoztak. Az átlagos fényesség értékre 0,36%-os relatív eltérést kaptam, míg az egyes felvillanások relatív eltérésnek szórására 0,074-ot, ez utóbbi a fotonzaj által is terhelve volt. A szimulációs eredmények alapján a háttér levonás nem okoz számottevő torzítást a mérhető felvillanás fényességeiben.

Trajektória illesztés A trajektória illesztő algoritmus szerepe, hogy összecsoportosítsa az ugyanahhoz a fluorofór felvillanáshoz tartozó lokalizációkat. Ezt azáltal éri el, hogy a képsíkban az egymáshoz közeli és az időben egymást folytonosan követő lokalizációkat sorrendben összefűzi. Ehhez az algoritmus időbeli sorrendben végig megy a felvétel képkockáin, és megvizsgálja, hogy az adott képkockán lévő lokalizációk mely trajektóriához tartozhatnak. Hogyha talál olyan lokalizációt, ami egy bizonyos r távolságnál kisebb távolságra van egy még le nem zárt trajektória legutolsó lokalizációs elemétől, akkor azt hozzáfűzi a trajektóriához (34. ábra). Amennyiben olyan lokalizációt talál, amit nem tud hozzáfűzni egyik trajektóriához sem, akkor új trajektóriát kezd, és az adott lokalizációt veszi a trajektória "kezdő" elemének. Hogyha van olyan trajektória, amihez az adott képkockán egyetlen lokalizációt sem bír hozzáfűzni, akkor a trajektóriát lezárja és a trajektória legutolsó lokalizációs elemét tekinti a "végső" elemnek. Az egy trajektória minden nem "kezdő" és nem "végső" lokalizációs elemét "közbülső" elemként kezeli.

A trajektória illesztés r értékét úgy választottam meg, hogy elég nagy legyen, hogy ugyanazon felvillanáshoz tartozó lokalizációk szinte biztosan beleessenek, de elég kicsi



34. ábra. A trajektória illesztés ábrázolása. Az aktív trajektóriához (fekete kereszt) a következő képkockán levő lokalizációk közül azokat (zöld kereszt) fűzi hozzá a trajektóriához az algoritmus, amelyik egy bizonyos távolságon belül (pontosított kör) esik hozzá, az ezen kívül esőket (piros kereszt) nem veszi figyelembe.

ahhoz, hogy a szomszédos felvillanások szétkülönüljenek. Ehhez egyrészt figyelembe vettem a lokalizációs precizitást, ami ~ 20 nm körüli az erősítetlen felvillanásokra, másrészt azt, hogy a multi-Gauss lokalizáló algoritmus milyen közel lévő PSF-eket képes még szétválasztani. Ez utóbbi TestSTORM szimulációk alapján 300 – 350 nm két azonos fényességű PSF esetére, függően azok pixelizálásától. Mivel a két említett érték között arányaiban jelenős az eltérés, így az r paramétert megválaszthattam egy viszonylag széles tartományon, anélkül, hogy a végeredmény érzékenyen függött volna tőle. Ezek alapján az r értéknek 50 nm-t választottam.

Annak érdekében, hogy a trajektória illesztés alkalmas legyen a felvillanások fényességeinek meghatározására, a meglévő algoritmus funkcióit kibővítettem. A pozíciók és az elemszámok mellett a felvillanások egyéb jellemzői, többek az összefotonszám, a legfényesebb képkockán a jel nagysága, vagy a trajektóriák átlagos fényessége is meghatározásra kerülnek. Ezen felül beraktam a bizonytalanul megalkotott trajektóriák kiszűrésének lehetőségét a hibás eredmények minimalizálása céljából. Amennyiben valamelyik trajektória megalkotása nem egyértelmű, vagyis egy adott képkockán egynél több lokalizációt is hozzá bírna fűzni, vagy egy adott lokalizációt akár két különböző trajektóriához is tartozhat, akkor az algoritmus a kérdéses trajektóriákat "összetett" jelzővel látja el. A kiértékelésnél az ilyen trajektóriákat figyelmen kívül hagytam. Megjegyzendő, hogy ilyen trajektóriák ritkán fordulnak csak elő, mivel még a multi-Gauss lokalizációs algoritmus sem képes olyan átfedő felvillanásokat megbízhatóan szétválasztani, mint amilyen méretű a trajektóriák

keresésének r távolsága volt.

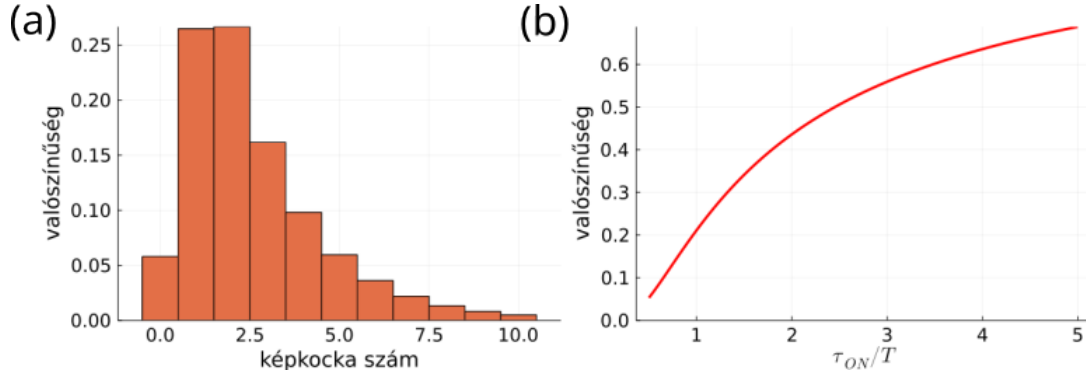
Annak értelmezéséhez, hogy a nanorudakhoz kötött festék felvillanások mennyire térnek el a szabad festékekétől, szükségem volt a felvillanások bizonyos paramétereire, mint az átlagos felvillanás fényesség, vagy az adott nanorúdon történt legerőteljesebb felvillanás értéke. Az előbbi paraméterhez a trajektória illesztés adatait használtam fel, mivel ehhez olyan lokalizációkra volt szükség, ahol a felvillanás teljesen kitöltötte a kamera expozíciós idejét, így azokon a fényessége számszerűsíthető. A trajektóriák "közbülső" lokalizációt véve kiválaszthatóak az említett lokalizációk. Mindez azt is jelenti, hogy az átlagos fényesség meghatározásba csak azok a trajektóriákat vettem figyelembe, amik legalább három lokalizációs elemet tartalmaztak, az ennél kevesebb elemszámú tartó trajektóriákat nem felhasználtam fel. Itt kompromisszumot kell kötni, mivel az expozíciós időt csökkentve nő a legalább három elemet tartalmazó trajektóriák száma (35. ábra), viszont a mérés jelzaj aránya romlik. Annak a valószínűsége (P_N), hogy egy felvillanást N egymást követő felvételek keresztül detektálunk kiszámolható:

$$P_N = \begin{cases} p_0 e^{-NT/\tau}, & N \geq 2 \\ p_0 e^{-T/\tau} + p_{1\text{ korr}}, & N = 1 \\ p_0 + p_{0\text{ korr}}, & N = 0, \end{cases} \quad (11)$$

ahol T az egy képkocka felvételéhez szükséges idő, p_0 szorzó konstans, a $p_{0\text{ korr}}$ és $p_{1\text{ korr}}$ korrekciós tagok. A számolás részleteit a 10.2 fejezet tartalmazza.

A számolások eredményét az 35. ábra szemlélteti:

Trajektóriánként véve a "közbülső" lokalizációknak az mért fotonszám átlagát, az adott felvillanás fényessége megbecsülhető. Nanorudanként pedig összegyűjtve az így meghatározott felvillanás fényességeket, statisztika kapható az adott nanorészecskére. A trajektóriák átlagos fényessége helyett véve a legfényesebb lokalizáció fotonszámát és a hozzá tartozó expozíciós idő hosszát pedig alsó becslés tehető a felvillanások fényességére, ami bármilyen elemszámú trajektóriára értelmezhető. Az így származtatott becsült fényesség a nanorudak helyeinek megkeresésére volt alkalmas, illetve a rajtuk történt legfényesebb felvillanás értékének alsó becslésére volt hasznos.



35. ábra. A felvillanások mért hosszainak statisztikái, (a) annak valószínűségi tömegfüggvénye, hogy a felvillanások hány egymást követő képkockán kerülnek detektálásra ($\tau = 2T$, $R = 0,1T$, $H = 0,1T$), (b) annak a valószínűsége az ON állapot τ időállandójának függvényében, hogy a felvillanások legalább három egymást követő képkockán azonosításra kerülnek.

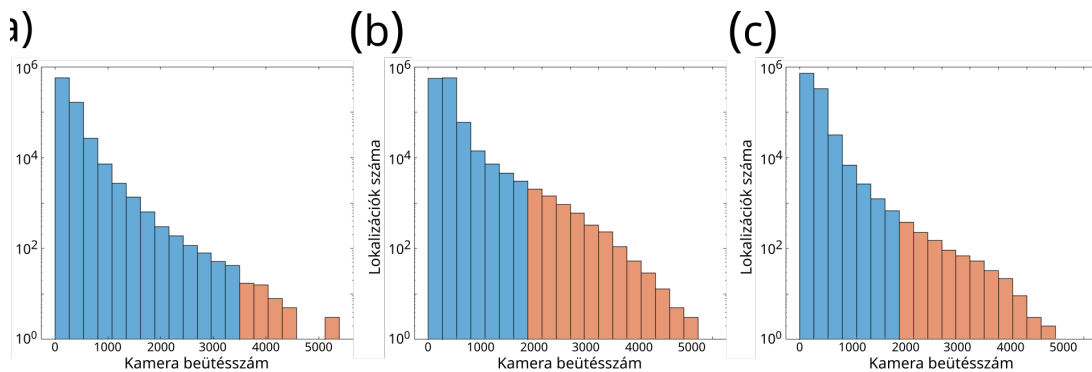
Klaszterizálás Az egy nanorúdhoz tartozó felvillanások összecsoportosítására a DBSCAN algoritmust [218] alkalmaztam. Az algoritmus pontszerű adatokon működik, mint a lokalizációk vagy a trajektóriák, és azoknak a képsíkbeli koordinátáit használja fel egyedül. Lényegében a képsíkban az egymáshoz közeli pontokból képez csomósodásokat, ún. klasztereket, azoknak az egyfajta módon definiált sűrűsége alapján. Az így létrehozott klasztereket kétfajta pont alkotja, a "központi" és a "határ" pontok. Az előbbiek a klaszter legalább N eleméhez ϵ távolságon belül vannak, saját magukat is beleszámítva. A "határ" pontokra nem teljesül ez a feltétel, viszont ϵ távolságon belül vannak a klaszter legalább egy "központi" pontjától. Az összes többi pontot, amit nem tud egyik klaszterbe sem besorolni, "zajnak" tekinti, és figyelmen kívül hagyja.

A nagy feloldású képek esetén arra számítottam, hogy a nanorudak helyein a trajektóriák nagyobb sűrűségben vannak jelen, és fényesebbek, mint ahol nem volt nanorészecske. Ezt kihasználva, a különböző nanorudakon történt felvillanásokat két lépésben kerestem meg. Első körben a klaszterizálást ($\epsilon = 160$ nm és $N = 5$) azokra a trajektóriákra végeztem el, amiknek a maximális fényessége nagyobb volt egy bizonyos értéknél. Ez az érték úgy lett beállítva (3500 kamera beütésszám), hogy a nem erősített felvillanások ne ériék el, még akkor sem, ha két ilyen felvillanás átfed. Az így kapott klaszterek középpontjait feleltettem meg a megtalált nanorészecskék koordinátáinak. Második körben ezen koordináták körül kivágtam egy 2×2 kamera pixel méretű (320 nm $\times$ 320 nm) négyzet

alakú területet, amin belül az összes trajektóriára újból elvégeztem a klaszterizálást, most már kisebb sugárral ($\epsilon = 5$ nm) és elem értékkel ($N = 1$), tekintettel a megnövekedett trajektória sűrűsége. Majd az újonnan kapott klaszterek közül megkerestem azokat, amelyek tartalmazták azokat a fényes trajektóriákat, amik az első klaszterizálási körben megtalált nanorészecskéhez tartoztak. Az így kiválasztott trajektória klaszterekből már lehetett átlagos és maximális fényesség értékeket számolni a nanorudakhoz kötött festékek felvillanásaira.

5.3.4. Eredmények

Három, különböző hosszúságú festékes oligonukleotid szállal jelölt minta esetén végeztem el a dSTORM méréseket és a felvillanások fényességeinek kiértékelését. A három szálhosszúság 14 nt, 27 nt és 53 nt bázispár értékek voltak, amik rendre $\sim 4,6$ nm, $\sim 8,9$ nm, $\sim 17,5$ nm festék-nanorúd távolságnak felelnek meg. Az eltérő festékes szál hosszakat leszámítva mind a három minta ugyanazon kolloid oldatból származó nanorudakat tartalmazta, ugyanazon minta előkészítési alkalommal és ugyanazon protokoll szerint lett elkészítve. A felvillanások fényességeinek meghatározását és a nanorészecskéken történt felvillanások megkeresését a 5.3.3 alfejezetben leírt módon végeztem. Továbbá referenciaként a nanorészecskéken kívül, az üvegfelületen történt felvillanásokat használtam fel, ezek fényességével vetettem össze a nanorészecskéken történő felvillanásokat. A különböző mintákon a mért fényesség eloszlásokat a 36. ábra mutatja.

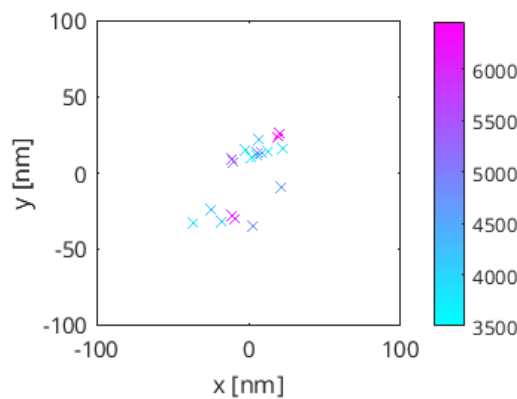


36. ábra. A lokalizációk fényességeinek hisztogramjai a különböző oligomer hosszúságok ((a): 14 nt, (b): 27 nt, (c): 53 nt) esetén. [A3]

A felvillanások fényességeinek kiértékelésénél 3500 kamera beütésszám határértéket

állítottam be, ami felett biztosra lehet mondani, hogy a felvillanás nem szabad festéktől származott. Mindhárom minta esetén felvillanás hisztogramok mutatták a szabad festékekénél jelentősen fényesebb felvillanások jelenlétét. A hisztogramokról leolvasható, hogy arányaiban a legkevesebb fényes felvillanást a legrövidebb, 14 nt hosszú festékes szálak esetén tapasztaltam, a festék-fém felület közelsége miatt ennél volt várható a legmagasabb fluoreszcencia kioltás. A leghosszabb, 53 nt szálhossz esetén már több és fényesebb felvillanások voltak tapasztalhatóak. A legtöbb detektált fényes felvillanást pedig a köztes, 27 nt szálhossz eredményezte, de ennél is csak a felvillanások $\sim 1\%$ -a lépte át a beállított küszöbértéket.

A kiértékelő algoritmus a következő lépésben megtalálta az erős felvillanások csomósodásait, amiket a nanorudak képeivel azonosítottam. A legnagyobb erősítéseket a rudak végeihez kötött festékektől vártuk, ez néhány nanorúd nagyfeloldású, lokalizációs képénél látszódik is (37. ábra). Megjegyzendő, hogy a nanorudakra kikötött festékek pozícióit nem tudtuk pontosan leképezni, mivel a festék az emisszió során csatolódik nanorészecskével, ami a szabad festékekhez képest eltorzítja a kisugárzott távolteret és a leképzett PSF-et. Emiatt a nanorészecskék lokalizált képe a valós méretekhez képest tipikusan kisebbnek látszódik [178].

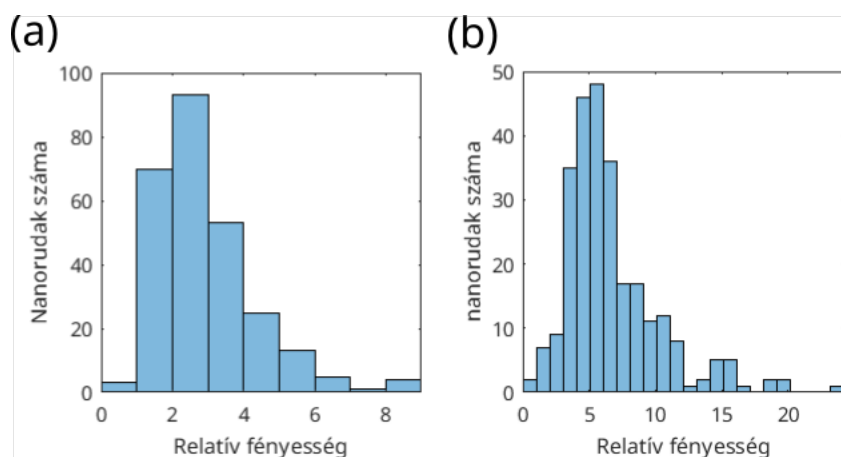


37. ábra. Egy nanorúd lokalizált képe, csak a fényes felvillanásokat megtartva. A színkód a a lokalizációk fényességét mutatja kamera beütés szám szerint. [A3]

A nanorudak megkeresése után már külön lehetett választani a nanorészecskéken történő felvillanásokat a szabad festékekétől. Megjegyzendő, hogy a nanorudak keresésénél alkalmazott fényesség küszöb önkényes volt. Mivel a küszöbérték úgy volt beállítva, hogy

lényegesen nagyobb legyen, mint a szabad festékektől várható maximális fényesség, ezért előfordulhatott, hogy néhány nanorúd képét a szabad festékekhez sorolta, de a fordított esetnek, hogy a szabad festékek véletlenszerű csomósodását nanorúdként azonosította volna, elhanyagolható volt a valószínűsége. Mivel a szabad festékek nagyságrendekkel többen voltak, mint a nanorészecskéhez kötött festékek, ez azok statisztikáját nem torzította.

Statisztikai elemzést a 27 nt hosszú jelöléssel készült mintákon végeztem (38. ábra), egyedül ez szolgált elegendő beazonosított nanorészecskével. A mérés során, összes nanorudat véve, a legfényesebb mért felvillanások ~ 20 -szor erősebbek voltak a szabad festékekéhez képest. Azonban csak kevés nanorúdon voltak tapasztalhatóak ilyen fényes felvillanások. A nanorészecskéket külön-külön elemezve meghatározható a rajtuk történt átlagos és legfényesebb felvillanás értékek. Ezt elvégezve, az átlagos felvillanás fényességre $\sim 2,9$ -szor magasabb értéket kapunk a szabad festékekéhez képest, a legfényesebb felvillanásokra pedig $\sim 6,7$ -szerest.



38. ábra. A 27 nt oligmeres mintán lévő nanorészecskéken történt felvillanás fényesség statisztikák, (a) az átlagos relatív fényesség, (b) a maximális relatív fényesség értékek. [A3]

6. Összefoglaló

6.1. Bevezetés

A mikroszkópok már évszázadok óta nélkülözhetetlen eszközei a mikrovilág vizsgálatának. Ezen idő alatt sokrétű alkalmazást nyertek számtalan tudomány területen, amik kielégítésére számos speciális módszert fejlesztettek ki. Az egyik ilyen optikai technika, a fluoreszcens mikroszkópia egy fél évszázada terjedt el a biológiai kutatásokban. Népszerűségét elsősorban annak köszönheti, hogy a különböző sejtalkotók jó specificitással vizsgálhatóak a segítségével. Az optikai mikroszkópok alkalmazhatóságának azonban egy jelentős akadályt állít magának az optikai rendszernek a diffrakcióból származó feloldóképessége. Ezt csak a közelmúltban sikerült leküzdeni különböző mérési trükkökkel, amiket gyűjtőnéven nagyfeloldású mikroszkópiának hívunk. Ezen belül is egy igen népszerű ág a lokalizációs mikroszkópia, aminél időben szétválasztjuk a fluoreszcens jelölések jeleit, így azok egyedileg mérhetőek. Példaként a dSTORM technikánál a festékeket speciális puffer oldatba helyezzük, ami fotovillogást indukál. Így a festékeket külön-külön lokalizálva akár ~ 20 nm-es feloldás is elérhető. A megnövekedett feloldás azonban nem jár ingyen, a lokalizációs módszerek összetett adatelemzést és eredmény kiértékelést kívánnak.

A lokalizációs mikroszkópiában igen fontos értékmérő a felvillanások lokalizálásának precizitása és pontossága, amik rendre a véletlenszerű és a szisztematikus hibát írják le. Ugyanilyen lényeges, hogy a jelöléseket elegendő sűrűségben detektáljuk annak érdekében, hogy a vizsgálandó struktúra jól kirajzolódjon. Az előbb említett mennyiségek számszerűsíthetőek, azonban a képminőség teljes jellemzésére önmagukban nem elegendőek. Minden esetben, amikor a mérés nem ideális, vagyis nem csak az egyedi molekulák jeleit detektáljuk, képrekonstrukciós hibákat kapunk. Ilyen fordul elő, amikor nagy sűrűségben történnek a véletlenszerű fotovillogások, a molekulák képei összemosódnak, és az algoritmus nem bírja őket különválasztani. Ez tipikusan azt eredményezi, hogy több felvillanás egyként kerül azonosításra téves középponttal, vagy pedig teljesen mellőzve lesznek. Ezen felül egyéb tényezők, mint a minta fokozatos elmozdulásával vagy a belőle származó autofluoreszcens háttérrel is számolni kell. Példaként az utóbbi téves lokalizációkat eredményez, illetve eltolja a lokalizációk középpontjait.

A műtermékek mind elméleti leírással, mind kísérletileg nehezen vizsgálhatóak. Erre

leginkább szoftveres szimuláció ad lehetőséget, ahol is a paramétereket szabadon változtatva, könnyen vizsgálható, hogy mennyire is tér el a rekonstruált struktúra a tényleges-től. Így megállapítható, hogy az adott mérési modalitás és minta típus esetén milyen képminőség várható a különböző mérési paraméterek alkalmazásával. A lokalizációs mikroszkópia a laterális pozíció mellett számos egyéb információ kinyerésére is lehetőséget nyújt az egyedi molekulák jeleiből. A nagy feloldást megtartva, sokaságból származó információ helyett egyedi események statisztikáját kapuk. Az egyik ilyen információ a 3D rekonstrukcióhoz szükséges axiális pozíció. Ez talán a legegyszerűbben a leképző rendszerbe történő hengerlencse elhelyezéssel érhető el. Ennek a következtében a fókusz sík két oldalán két, egymásra merőleges tengely mentén lesz elnyúlt a molekula képe, aminek alakja magában kódolja annak az axiális pozícióját. Több eltérő spektrális tulajdonságú fluorofórt alkalmazva ún. többszínű mérést is végezhetünk, gazdagabb struktúrális információt nyerve egyazon mintáról. A különböző fluorofórok eltérő spektrális tulajdonságait kihasználva a gerjesztési vagy az emissziós oldalon, azok jelei szétválaszthatóak több mérési csatornára. Ekkor a csatornák közti jel arányokból állapítjuk meg, hogy a felvillanás melyik fluorofórhoz tartozhat. A fluorofórokról, mint dipól sugárzók irányultságáról is van lehetőség információkat szerezni polarizáció érzékeny elemet helyezve a fényútba. Ez csak azokban az esetekben tehető meg, amikor a fluoreszcens jelölések jól beágyazódnak a mintába, és ennek következtében a forgásuk korlátozott, vagy akár rögzített. Ekkor az orientációt mérve, a minta molekuláris elrendeződéséről nyerhetünk információkat. A fluorofórok erőteljes elektrodinamikai kölcsönhatásba is léphetnek a környezetükben lévő plazmonikus struktúrákkal, ami szintén vizsgálható egyedi molekula szinten. A kölcsönhatás több emissziós tulajdonságban is megnyilvánul, de a legközvetlenebbül a felvillanások fényességen keresztül mérhető. Így a plazmonikus struktúrák tulajdonságaira lehet következtetéseket tenni, vagy pedig az elméleti predikciók ellenőrizhetőek kísérletileg.

Mindegyik mérési modalitás más-más kísérleti elrendezést és adat kiértékelést kíván, és ennek megfelelően különböző képalkotási hibákra lehet számítani.

6.2. Célok és kutatási módszerek

Célul tűztem ki, hogy az egyedi molekula lokalizációs mérések szimulálására szolgáló Test-STORM szoftver eszköztárát kibővítssem, és ezáltal többféle lokalizációs mérés szimulációs

vizsgálatát tegyem lehetővé, mindezt minél inkább valósághűen. Feladatomnak tekintetem, hogy a valósághű felvillanás pontátviteli függvényeket alkalmazva megvizsgáljam a defókuszáltság és a dipól orientáció rekonstruált képre gyakorolt hatását. Célul tűztem ki, hogy karakterizáljam az asztigmias 3D és kétszínű mérési modalitások esetén várható képrekonstrukciós műtermékeket, továbbá, hogy értelmezsem az AdOptIm csoport korábbi polarizáció érzékeny mérését. Terveim közt szerepelt, hogy kiértékelési eljárást dolgozzak ki, amivel az egyedi molekula jelekből kinyerhető a felvillanások fényességeinek információja, és ezt mérési eredményének elemzésére felhasználjam.

A TestSTORM szimulációs szoftver fejlesztését és a lokalizációs mérések kiértékelését MATLAB programnyelven végeztem. A TestSTORM forráskódja nyíltan elérhető az AdOptIm csoport honlapján (<http://titan.physx.u-szeged.hu/~adoptim/>). A trajektóriák képkocka számaira vonatkozó számolásokat Julia nyelven írtam. A dSTORM és a fehér fényű transzmissziós méréseket az AdOptIm csapat saját építésű mikroszkóp rendszerén végeztem. A rendszer Nikon Eclipse Ti-E mikroszkóp vázra épül. A dSTORM mérések során az MPB Communications Inc. 647 nm-es lézert használtam, a felvételeket Andor iXon3 897 kamera elektron sokszorozó üzemmódjával készítettem.

6.3. Új tudományos eredmények

T1: Diffrakciós PSF modellek segítségével megvizsgáltam a rétegezett közeg fázisaberrációjának és a dipól momentum rögzítettségének hatását a lokalizációs képre. Megmutattam, hogy a fázisaberráció által bevezetett defókuszáltságra való aszimmetria megjelenik a lokalizációs képen, elsősorban PSF standard deviációra vagy illesztés reziduumra történő szűrés hatására. A vektoriális PSF modell segítségével megvizsgáltam a fotoszelekció és PSF alak hatását henger, illetve gömb alakú struktúrákra, különböző dipólus irányítottságok mellett. Megmutattam, hogy eltérő gerjesztési sémák és dipólus orientáltságok esetén jelentősen különböző képrekonstrukciós műtermékek alakulhatnak ki. [A1]

T2: A TestSTORM szimulációs szoftverbe beépítettem és alkalmaztam a polarizáció érzékeny, a kétszínű és az asztigmias 3D szimulációs lehetőségeket. Polarizáció érzékeny szimuláció segítségével értelmeztem az AdOptIm csoport

korábbi mérési eredményét, és becslést adtam a mért dipól orientáció korlátozottság értékére. Kétszínű szimulációt alkalmazva megvizsgáltam a fényesség alapú szűrés hatékonyságát az áthallás eltávolítására. 3D asztigmias szimulációk segítségével megmutattam a defókuszáltság aszimmetriájának, az átfedéseknek és a struktúrált háttérnek a hatását a rekonstruált képre. Megmutattam különféle műtermékek jelenlétét, amik lokalizációs adat szűréssel nem korrigálhatóak. [A1, A2]

T3: Eljárást dolgoztam ki plazmonikus nanorészecskéken történő dSTORM mérések végzésére és kiértékelésére az egyedi molekula fényességek meghatározása céljából. Az általam fejlesztett szoftveres módszer meghatározza a fotovillogást végző festékek felvillanásainak fényességét. A hű egyedi molekula információk kinyerése érdekében az algoritmust képessé tettem a nanorészecskékből származó fluoreszcens háttér kezelésére. Továbbá a módszer képes beazonosítani a nanorészecskéket, és kiválogatni a hozzájuk tartozó lokalizációs adatokat. Arany nanorudakat tartalmazó mintán dSTORM méréseket végeztem és a kidolgozott eljárással vizsgáltam a rajtuk történő felvillanások fényességét. [A3]

7. Summary

7.1. Introduction

Microscopes have been indispensable tools for the study of the microscopic world for centuries. Since then they have gained a wide variety of applications in many scientific fields, for which many specialized techniques have been developed. One such optical method is the fluorescence microscopy which gained widespread adoption in biology half a century ago. Its popularity is mainly due to its ability to examine the cell components with great specificity. However, the applicability of the optical microscopes is hindered by the resolution due to the diffraction of the optical system. This was only recently overcome with different measurement solutions collectively termed as super resolution microscopy. Among these, a popular branch is the localization microscopy, which is based on temporal separation of the signals of individual fluorophores. For example, in the dSTORM technique, the fluorophores are placed in a special buffer solution which induces photoblinking. In this way, localizing the dyes separately, ~ 20 nm resolution can be reached. However, the increased resolution does not come without drawbacks, these methods require elaborate data evaluation and result interpretation.

In localization microscopy, a very important measure is the precision and accuracy of the blinking events, which describe stochastic and systematic errors, respectively. It is equally important that the labels are detected at a sufficient density, so the structure under examination emerges in details. The aforementioned quantities can be quantified, but in themselves are inadequate to fully characterise image quality. In every non-ideal experimental condition, that is not only the signals of individual molecules are detected, image reconstruction artifacts are introduced. This happens when the random photoblinking occurs at high density, the images of the molecules overlap and the algorithm cannot separate them. This typically results in multiple blinking events being identified as one with a false center, or being missed altogether. Moreover, other factors such as the drift of the sample or the autofluorescence background must be taken into account. As an example, the latter results in false localizations or their centers being shifted.

The imaging artifact are difficult to investigate both theoretically and experimentally. This is best done by software simulation, where the parameters can be freely varied and

it is easy to observe the deviation of the reconstructed structure from the ground-truth. In this way, it is possible to determine what image quality can be expected for the given measurement modality and sample type in case of different measurement parameters. In the localization microscopy, beside the lateral position, many other information can be inferred from the single molecule signals. We obtain statistics of single events instead of ensemble information keeping the high resolution. One such information is the axial position which is required for 3D reconstruction. This is perhaps most easily achieved by placing a cylindrical lens into the imaging system. This causes the image of the molecule to be elongated along two perpendicular axes on either side of the focal plane, whose shape encodes its axial position. By applying several fluorophores with distinct spectral properties, multi-color measurements can be performed, obtaining richer structural information from the same sample. Exploiting the different spectral properties of the fluorophores on the excitation or emission side, their signals can be separated into several channels. Then we can identify the fluorophores based on the signal ratios measured in the channels. It is also possible to obtain information on the orientation of fluorophores acting as dipole emitters. This can only be done in cases where the fluorescent labels are well embedded in the sample and consequently their rotation is limited or even fixed. In this case, information about the molecular organization of the sample can be obtained by measuring the orientation. The fluorophores can engage into intense interaction with plasmonic structures in their vicinity. This can also be investigated at single molecule level. The interaction manifests in several emission properties, but is most directly measured through the emission brightness of blinking events. Thus, inferences can be made about the properties of plasmonic structures, or theoretical predictions can be verified experimentally.

Each measurement modality requires a different experimental setup and data evaluation procedure and, accordingly, different imaging artifacts can be expected.

7.2. Objectives and methods

One of my goals was to extend the functionality of the TestSTORM software tool used for simulating single molecule localization measurements, and thus to enable the simulation of a wide range of localization measurements, as realistically as possible. I aimed to investigate the effect of defocus and dipole orientation on the reconstructed image using

realistic point spread functions. I set the goal of characterising the image reconstruction artifacts arising for astigmatic 3D and two-colour measurement modalities, and to interpret a previous polarisation sensitive measurement of the AdOptIm group. My task was to develop an evaluation procedure to extract information on the brightness of the blinking events from single molecule signals and apply the procedure to analyse the measurement results.

The development of the TestSTORM simulation software and the evaluation of the localization measurements were carried out in MATLAB. The source code for TestSTORM is freely available on the AdOptIm group website (<http://titan.physx.u-szeged.hu/~adoptim/>). The frame count calculations for the trajectories were written in Julia. The dSTORM and white-light transmission measurements were performed on the AdOptIm group's custom built microscope system. The instrument is based on a Nikon Eclipse Ti-E microscope frame. For dSTORM measurements, I used a 647 nm laser from MPB Communications Inc. and the images were acquired using the electron multiplier readout mode of an Andor iXon3 897 camera.

7.3. New scientific results

T1: Using diffraction-based PSF models, I have investigated the impact of the stratified medium's phase aberration and the effect of static dipole moments on the localization image. I have shown, that the phase aberration induced asymmetry regarding the defocus appears on the reconstructed image, mainly as the consequence of filtering on the PSF standard deviation or on the residuum of the fit. Using the vectorial PSF model I have examined the effect of the photo-selection and the PSF shape on cylindrical spherical structures in case of different static dipole orientations. I have shown that under different excitation schemes and dipole orientations, significantly different imaging artifacts can be expected. [A1]

T2: I have implemented and applied the polarization sensitive, the dual-color and the astigmatic 3D simulation modalities in the TestSTORM software. Using the polarization sensitive simulation, I have interpreted a previous measurement result of the AdOptIm group and provided an estimate of the dipole moment

confinement value. Using dual-color simulations, I have examined the effectiveness of the brightness-based filtering on the crosstalk removal. With the application of the astigmatic 3D simulations I have shown the effect of the defocus asymmetry, of the overlaps and of the structured background on the reconstructed image. I have shown the presence of various localization artifacts that cannot be corrected by localization data filtering. [A1, A2]

T3: I have developed a procedure for performing and evaluating measurements on plasmonic nanoparticles to extract the single molecule brightness information. The algorithm I developed determines the brightness of the photoblinking dyes. In order to extract the faithful single molecule information, I have made the algorithm capable of removing fluorescence background originating from the nanoparticles. Furthermore, the method is able to identify the individual nanoparticles and select the localization data belonging to them. I have performed dSTORM measurements on samples containing gold nanorods and I have examined the brightness of the blinking events occurring on them utilizing the developed procedure. [A3]

8. Köszönetnyilvánítás

A dolgozatom megvalósulásáért a legnagyobb köszönettel és hálával a témavetőmnek, Dr. Erdélyi Miklósnak tartozom. Tanácsaival hozzásegített a kutatói munka fortélyainak elsajátításához, szakmai támogatásával és türelmével végig kalauzolt a rögös úton, biztatásaival rendszeresen átlendített a megtorpanásaimon. Munkatársaihoz való emberi hozzáállása példaértékű. Köszönöm az AdOptIm csoport tagjainak az évek során nyújtott tanácsokat és egyéb segítségeket, valamint hogy egy jókedvű és támogató csoport légkört tudtunk kialakítani. Különösképpen köszönettel tartozom Ponyeczkiné Czvik Elvirának a minta előkészítések során nyújtott fáradhatatlan és nélkülözhetetlen segítségéért, és azért a tényért, hogy még a nehéz helyzetekben sem vesztette el a belém vetett hitet. Hálával tartozom számára a vegyészeti problémák megoldására tartott beszélgetésekért és a hozzájuk nyújtott hasznos ötletekért. Köszönöm a családomnak és barátaimnak, hogy támogatásukat fejezték ki és türelmüket adták a doktori tanulmányaimhoz, még akkor is, amikor ez a rájuk fordított idő rovására ment.

Doktori tanulmányaim során a következő pályázati forrásokban részesültem: Nemzeti Agykutatási Program (KTIA-13-NAP-AI/14, 2017-1.2.1-NKP-2017- 00002); GINOP-2.3.2-15-2016-00036; EFOP-3.6.1-16-2016-00008; Új Nemzeti Kiválóság Program 2019/2020. tanév (ÚNKP-19-3); Új Nemzeti Kiválóság Program 2020/2021. tanév (ÚNKP-20-4); Innovációs és Technológiai Minisztérium (TKP2021-NVA-19).

9. Publikációs lista

Az MTMT azonosítóm: 10058546

Felhasznált publikációk

- [A1] Novák, T., Gajdos, T., Sinkó, J., Szabó, G. and Erdélyi, M., 2017. TestSTORM: Versatile simulator software for multimodal super-resolution localization fluorescence microscopy. *Scientific reports*, 7(1), pp.1-8.
- [A2] Erdélyi, M., Sinkó, J., Gajdos, T. and Novák, T., 2017, February. Enhanced simulator software for image validation and interpretation for multimodal localization

super-resolution fluorescence microscopy. *In Single Molecule Spectroscopy and Superresolution Imaging X* (Vol. 10071, pp. 70-75). SPIE.

- [A3] Tóth, E., Ungor, D., Novák, T., Ferenc, G., Bánhelyi, B., Csapó, E., Erdélyi, M. and Csete, M., 2020. Mapping fluorescence enhancement of plasmonic nanorod coupled dye molecules. *Nanomaterials*, 10(6), p.1048.

Egyéb publikációk

- [B1] Csizmadia, T., Erdélyi, M., Smausz, T., Novák, T. and Hopp, B., 2015. Simulation of the reflectivity properties of microstructured titanium surface by ray tracing method. *Journal of Laser Micro Nanoengineering*, 10(2), pp.210-215.
- [B2] Gajdos, T., Cserteg, Z., Szikora, S., Novák, T., Kovács, B.B., Szabó, G., Mihály, J. and Erdélyi, M., 2019. mmSTORM: Multimodal localization based super-resolution microscopy. *Scientific reports*, 9(1), pp.1-9.
- [B3] Szikora, S., Gajdos, T., Novák, T., Farkas, D., Földi, I., Lenart, P., Erdélyi, M. and Mihály, J., 2020. Nanoscopy reveals the layered organization of the sarcomeric H-zone and I-band complexes. *Journal of Cell Biology*, 219(1).
- [B4] Szikora, S., Novák, T., Gajdos, T., Erdélyi, M. and Mihály, J., 2020. Superresolution Microscopy of Drosophila Indirect Flight Muscle Sarcomeres. *Bio-protocol*, 10(12), pp.e3654-e3654.

Konferencia poszter

- [P1] T. Gajdos, T. Novák, Zs. Cserteg, M. Erdélyi (2017) *Multimodal localization based super-resolution microscopy with efficient photon collection*. MMC2017, 2017.07.3-6., Manchester, Egyesült Királyság
- [P2] T. Gajdos, T. Novák, Zs. Cserteg, M. Erdélyi (2017) *Multimodal localization based super-resolution microscopy with efficient photon collection*. MBFT XXVI. Kongresszus, 2017.08.22-25., Szeged
- [P3] T. Gajdos, T. Novák, Zs. Cserteg, M. Erdélyi (2018) *Multimodális lokalizációs mikroszkóp effektív fotongyűjtéssel*. Kvantumelektronika 2018, 2018.06.15., Budapest

- [P4] T. Gajdos, Zs. Csérteg, Sz. Szikora, J. Mihály, B. B. H. Kovács, T. Novák, M. Erdélyi (2019) *Multimodal localization microscopy with efficient photon collection.*, FOM2019, 2019.04.14-17., London, Egyesült Királyság

10. Függelék

10.1. Forgási szabadsággal rendelkező dipólus PSF-je

A forgási szabadsággal rendelkező dipólusok PSF-je a "gyors" és a "lassú" esetekre az 5. egyenletekkel írható fel. Ezek a formulák egyszerűbb alakra hozhatóak.

A kilépő apertúrán az egymásra merőleges térerősség komponensek egymástól függetlenül hozzák létre a képtérben a megfelelően megválasztott két egymásra merőleges térerősség komponenst, így a PSF számolás két tagra bontható [219]:

$$PSF(\vec{p}) = PSF^x(\vec{p}) + PSF^y(\vec{p}) = \left| \sum_{i=1}^3 E_i^x p_i \right|^2 + \left| \sum_{i=1}^3 E_i^y p_i \right|^2 \quad (12)$$

ahol E_i^x és E_i^y jelöli rendre a dipólus i komponense által létrehozott elektromos x és y komponenseket. Mivel a dipólus orientáció mindhárom része hozzájárul a két térerősség taghoz, ezért az intenzitás számolás során dipólus orientáció komponens szorzatok permutációi jelennek meg:

$$PSF(\vec{p}) = \sum_{i,j} (PSF_{i,j}^x + PSF_{i,j}^y) p_i p_j \quad (13)$$

Ez összesen hat egymástól független tagot jelent, amik az alábbi módon fejezhetőek ki:

$$\begin{aligned} PSF_{i,i}^k &= |E_i^k|^2 \\ PSF_{i,j}^k &= E_i^k E_j^{k*} + E_i^{k*} E_j^k \quad i \neq j \end{aligned} \quad (14)$$

Ezen tagokat visszaírva a 5. egyenletbe, az egyszerűbb alakra hozható:

$$\begin{aligned}
PSF_{gyors} &= \sum_{i,j} (PSF_{i,j}^x + PSF_{i,j}^y) \int P(\vec{p}) \left| \vec{E}_{gerjesztő} \vec{p} \right|^2 d\vec{p} = \\
&\quad \sum_{i,j} (PSF_{i,j}^x + PSF_{i,j}^y) C_{i,j}^{gyors} \\
PSF_{lassú} &= \sum_{i,j} (PSF_{i,j}^x + PSF_{i,j}^y) \int P(\vec{p}) d\vec{p} \int \left| \vec{E}_{gerjesztő} \vec{p} \right|^2 d\vec{p} = \\
&\quad \sum_{i,j} (PSF_{i,j}^x + PSF_{i,j}^y) C_{i,j}^{lassú}
\end{aligned} \tag{15}$$

Az egyenletek szimmetrikusak az i és j összegző indexekre, így a PSF intenzitás eloszlásának számolása elvégezhető hat egymástól független, képtér koordináta függő tag összegeként.

10.2. Trajektória detektálási hossz

A lokalizációs mikroszkópiában a kamera expozíciós ideje összemérhető a fluorofórok felvillanásainak idejével. Emiatt a felvillanások pontos időhosszát nem tudjuk megállapítani, hanem csak azt, hogy hány egymást követő képkockán van rajta a felvillanásokból származó fluoreszcens jel.

A feltételezés, hogy a fluorofór fényes ON állapotának időtartama exponenciális eloszlást követ:

$$\frac{1}{\tau} e^{-t/\tau}, \tag{16}$$

ahol τ a fluoreszcens ON időhöz tartozó időállandó.

Egyéb időállandók :

T : egy képkocka teljes időbeli hossza

R : a kamera kiolvasási ideje, jel gyűjtés nélküli holt idő

H : a detektáláshoz szükséges minimális idő, ami alatt a fluorofór elegendő jelet ad, hogy a lokalizáló algoritmus azonosítsa a felvillanást

Vegyünk egy adott képkockán kezdőd felvillanást. Ekkor a valószínűség, hogy a felvil-

lanás a $[t_{s1}, t_{s2}]$ időintervallumban kezdődik, és a $[t_{l1}, t_{l2}]$ intervallumban fejeződik be:

$$\int_{t_{s1}}^{t_{s2}} dt_s \frac{1}{T} \int_{t_{l1}}^{t_{l2}} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} \quad (17)$$

Innen levezethetők a formulák, hogy egy adott felvillanás hány egymást követő képkockán van detektálva.

A valószínűség, hogy a felvillanás túl rövid ideig tartott, hogy detektálható legyen:

$$P_0 = \int_0^{H+R} dt_s \frac{1}{T} \int_0^{H+R+H-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} + \int_{H+R}^T dt_s \frac{1}{T} \int_0^H dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} \quad (18)$$

Az első tag azt az esetet írja le, amikor a felvillanás a kamera holt idejében kezdődik vagy az előző képkocka legvégén, amihez már nem szolgáltat elegendő fotont, hogy azon detektálható legyen, és azelőtt befejeződik, hogy az aktuális képkockán detektálható lenne. A második tag annak felel meg, hogy a felvillanás az aktuális képkocka expozíciója közben kezdődik, de túl rövid ideig tart, hogy észlelhető jelet szolgáltatson. Hasonló logikával levezethető, hogy egy, két, három, stb. képkockán történő detektálásra vonatkozó formula.

A valószínűség, hogy a felvillanás egyetlen képkockán volt detektálva:

$$P_1 = \int_0^{H+R} dt_s \frac{1}{T} \int_{H+R+H-t_s}^{H+R+H+T-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} + \int_{H+R}^T dt_s \frac{1}{T} \int_H^{H+R+H+T-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} \quad (19)$$

Általános esetben, amikor a felvillanás N ($N > 1$) képkockán volt detektálva, a valószínűség:

$$P_N = \int_0^{H+R} dt_s \frac{1}{T} \int_{H+R+H+(N-1)T-t_s}^{H+R+H+NT-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} + \int_{H+R}^T dt_s \frac{1}{T} \int_{H+R+H+(N-1)T-t_s}^{H+R+H+NT-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} = \int_0^T dt_s \frac{1}{T} \int_{2H+R+(N-1)T-t_s}^{2H+R+NT-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} \quad (20)$$

Az egy képkockás eset felírható az általános esettel egy korrekciós tag hozzáadásával:

$$P_{N=1} = \int_0^T dt_s \frac{1}{T} \int_{2H+R+(N-1)T-t_s}^{2H+R+NT-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} \Big|_{N=1} + p_{1\text{corr}} \quad (21)$$

$$p_{1\text{corr}} = \int_{H+R}^T dt_s \frac{1}{T} \int_H^{2H+R-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} \quad (22)$$

A P_0 szintén felírható az általános esettel, egy másik korrekciós tag segítségével:

$$\begin{aligned} P_0 = & \int_0^T \frac{1}{T} dt_s \int_0^{2H+R-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} - \int_{R+H}^T \frac{1}{T} dt_s \int_H^{2H+R-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} = \\ & \int_0^T \frac{1}{T} dt_s \int_{2H+R-T-t_s}^{2H+R-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} + \int_0^T \frac{1}{T} dt_s \int_0^{2H+R-T-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} - \\ & \int_{R+H}^T \frac{1}{T} dt_s \int_H^{2H+R-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} \end{aligned} \quad (23)$$

$$P_{N=0} = \int_0^T dt_s \frac{1}{T} \int_{2H+R+(N-1)T-t_s}^{2H+R+NT-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} \Big|_{N=0} + p_{0\text{corr}} \quad (24)$$

$$p_{0\text{corr}} = \int_0^T \frac{1}{T} dt_s \int_0^{2H+R-T-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} - \int_{R+H}^T \frac{1}{T} dt_s \int_H^{2H+R-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{-t_l/\tau} \quad (25)$$

A fenti integrálok mindegyik valamelyik alábbi alakú:

$$\int_a^b \frac{1}{T} dt_s \int_c^d dt_l \frac{1}{\tau} e^{t_l/\tau} = \frac{b-a}{T} (e^{-c/\tau} - e^{-d/\tau}) \quad (26)$$

$$\int_a^b \frac{1}{T} dt_s \int_c^{d-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{t_l/\tau} = \frac{b-a}{T} e^{-c/\tau} - \frac{\tau}{T} e^{-d/\tau} (e^{b/\tau} - e^{a/\tau}) \quad (27)$$

$$\int_a^b \frac{1}{T} dt_s \int_{c-t_s}^{d-t_s} dt_l \frac{1}{\tau} e^{t_l/\tau} = \frac{\tau}{T} (e^{-c/\tau} - e^{-d/\tau}) (e^{b/\tau} - e^{a/\tau}) \quad (28)$$

Az integrálások elvégezhetőek, és ekkor az alábbi alakokat kapjuk:

$$P_N = \frac{\tau}{T} (e^{T/\tau} - 1)^2 e^{-(R+2H)/\tau} e^{-NT/\tau} = \text{konst}_{P_N} e^{-NT/\tau} \quad (29)$$

A korrekciós tényező az $N = 1$ esetre:

$$p_{1\text{corr}} = -\frac{\tau + T - R - H}{T} e^{-H/\tau} + \frac{\tau}{T} e^{-(R+2H-T)/\tau} \quad (30)$$

A korrekciós tényező az $N = 0$ esetre:

$$p_{0\text{corr}} = 1 - \frac{\tau}{T} e^{-(2H+R+T)/\tau} (e^{T/\tau} - 1) + \frac{T - R - H}{T} (1 - e^{-H/\tau}) \quad (31)$$

A formulákból látszódik, hogy az eloszlásfüggvény, ami azt írja le, hogy a felvillanás

hány képkockán van detektálva, exponenciális eloszlást követ minden legalább 2 képkocka szám esetre. Az 0 és 1 képkocka szám esetre azonban eltér ettől, főleg, ha a festék ON ideje kisebb a képkocka felvételi idejénél.

Hivatkozások

- [1] I Hemmilä és V Laitala. “Progress in lanthanides as luminescent probes”. *Journal of Fluorescence* 15.4 (2005), 529–542. old.
- [2] Ute Resch-Genger és tsai. “Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels”. *Nature methods* 5.9 (2008), 763–775. old.
- [3] William E Moerner és Lothar Kador. “Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid”. *Physical review letters* 62.21 (1989), 2535. old.
- [4] Carlo Manzo és Maria F Garcia-Parajo. “A review of progress in single particle tracking: from methods to biophysical insights”. *Reports on progress in physics* 78.12 (2015), 124601. old.
- [5] Hisham Mazal és Gilad Haran. “Single-molecule FRET methods to study the dynamics of proteins at work”. *Current opinion in biomedical engineering* 12 (2019), 8–17. old.
- [6] Elana MS Stennett, Monika A Ciuba és Marcia Levitus. “Photophysical processes in single molecule organic fluorescent probes”. *Chemical Society Reviews* 43.4 (2014), 1057–1075. old.
- [7] Stefan W Hell és Jan Wichmann. “Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy”. *Optics letters* 19.11 (1994), 780–782. old.
- [8] Eric Betzig. “Proposed method for molecular optical imaging”. *Optics letters* 20.3 (1995), 237–239. old.
- [9] Thomas A Klar és tsai. “Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.15 (2000), 8206–8210. old.
- [10] Michael J Rust, Mark Bates és Xiaowei Zhuang. “Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)”. *Nature methods* 3.10 (2006), 793–796. old.
- [11] Eric Betzig és tsai. “Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution”. *Science* 313.5793 (2006), 1642–1645. old.
- [12] Stefan W Hell. “Far-field optical nanoscopy”. *science* 316.5828 (2007), 1153–1158. old.
- [13] CJ R SHEPPARD. “Super-resolution in confocal imaging”. *Optik (Stuttgart)* 80.2 (1988), 53–54. old.

- [14] Giulia MR De Luca és tsai. “Re-scan confocal microscopy: scanning twice for better resolution”. *Biomedical optics express* 4.11 (2013), 2644–2656. old.
- [15] Mats GL Gustafsson. “Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy”. *Journal of microscopy* 198.2 (2000), 82–87. old.
- [16] Stefan Bretschneider, Christian Eggeling és Stefan W Hell. “Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy by optical shelving”. *Physical review letters* 98.21 (2007), 218103. old.
- [17] Rainer Heintzmann, Thomas M Jovin és Christoph Cremer. “Saturated patterned excitation microscopy—a concept for optical resolution improvement”. *JOSA A* 19.8 (2002), 1599–1609. old.
- [18] Mats GL Gustafsson. “Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.37 (2005), 13081–13086. old.
- [19] Jan Vogelsang és tsai. “Make them blink: Probes for super-resolution microscopy”. *ChemPhysChem* 11.12 (2010), 2475–2490. old.
- [20] Sebastian van de Linde és tsai. “Photoinduced formation of reversible dye radicals and their impact on super-resolution imaging”. *Photochemical & Photobiological Sciences* 10.4 (2011), 499–506. old.
- [21] Thomas Dertinger és tsai. “Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI)”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.52 (2009), 22287–22292. old.
- [22] Cyril Ruckebusch és tsai. “Mapping pixel dissimilarity in wide-field super-resolution fluorescence microscopy”. *Analytical chemistry* 87.9 (2015), 4675–4682. old.
- [23] Francisco Balzarotti és tsai. “Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes”. *Science* 355.6325 (2017), 606–612. old.
- [24] Lusheng Gu és tsai. “Molecular resolution imaging by repetitive optical selective exposure”. *Nature methods* 16.11 (2019), 1114–1118. old.
- [25] Jelmer Cnossen és tsai. “Localization microscopy at doubled precision with patterned illumination”. *Nature methods* 17.1 (2020), 59–63. old.
- [26] Samuel T Hess, Thanu PK Girirajan és Michael D Mason. “Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy”. *Biophysical journal* 91.11 (2006), 4258–4272. old.
- [27] Claudia Geisler és tsai. “Resolution of $\lambda/10$ in fluorescence microscopy using fast single molecule photo-switching”. *Applied Physics A* 88.2 (2007), 223–226. old.
- [28] Mike Heilemann és tsai. “Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes”. *Angewandte Chemie International Edition* 47.33 (2008), 6172–6176. old.

- [29] Jonas Fölling és tsai. “Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return”. *Nature methods* 5.11 (2008), 943–945. old.
- [30] Christian Steinhauer és tsai. “Superresolution microscopy on the basis of engineered dark states”. *Journal of the American Chemical Society* 130.50 (2008), 16840–16841. old.
- [31] Dehong Hu és tsai. “Photoswitchable nanoparticles enable high-resolution cell imaging: PULSAR microscopy”. *Journal of the American Chemical Society* 130.46 (2008), 15279–15281. old.
- [32] Alexey Sharonov és Robin M Hochstrasser. “Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.50 (2006), 18911–18916. old.
- [33] Ralf Jungmann és tsai. “Single-molecule kinetics and super-resolution microscopy by fluorescence imaging of transient binding on DNA origami”. *Nano letters* 10.11 (2010), 4756–4761. old.
- [34] Ingmar Schoen és tsai. “Binding-activated localization microscopy of DNA structures”. *Nano letters* 11.9 (2011), 4008–4011. old.
- [35] Eric J Rees és tsai. “Elements of image processing in localization microscopy”. *Journal of Optics* 15.9 (2013), 94012. old.
- [36] Richik N Ghosh és Watt W Webb. “Automated detection and tracking of individual and clustered cell surface low density lipoprotein receptor molecules”. *Biophysical journal* 66.5 (1994), 1301–1318. old.
- [37] Peter B Stetson. “DAOPHOT: A computer program for crowded-field stellar photometry”. *Publications of the Astronomical Society of the Pacific* 99.613 (1987), 191. old.
- [38] Michael K Cheezum, William F Walker és William H Guilford. “Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles”. *Biophysical journal* 81.4 (2001), 2378–2388. old.
- [39] Gerhard J Schütz, Hansgeorg Schindler és Thomas Schmidt. “Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion”. *Biophysical journal* 73.2 (1997), 1073–1080. old.
- [40] Ulrich Kubitscheck és tsai. “Imaging and tracking of single GFP molecules in solution”. *Biophysical Journal* 78.4 (2000), 2170–2179. old.
- [41] Sjoerd Stallinga és Bernd Rieger. “Accuracy of the Gaussian point spread function model in 2D localization microscopy”. *Optics express* 18.24 (2010), 24461–24476. old.
- [42] Alex Small és Shane Stahlheber. “Fluorophore localization algorithms for super-resolution microscopy”. *Nature methods* 11.3 (2014), 267. old.
- [43] Kim I Mortensen és tsai. “Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy”. *Nature methods* 7.5 (2010), 377. old.

- [44] Raimund J Ober, Sripad Ram és E Sally Ward. “Localization accuracy in single-molecule microscopy”. *Biophysical journal* 86.2 (2004), 1185–1200. old.
- [45] Ulrike Endesfelder és tsai. “A simple method to estimate the average localization precision of a single-molecule localization microscopy experiment”. *Histochemistry and cell biology* 141.6 (2014), 629–638. old.
- [46] Ulrich Kubitscheck, Thorsten Kues és Reiner Peters. “[13] Visualization of nuclear pore complex and its distribution by confocal laser scanning microscopy”. *Methods in enzymology* 307 (1999), 207–230. old.
- [47] Russell E Thompson, Daniel R Larson és Watt W Webb. “Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes”. *Biophysical journal* 82.5 (2002), 2775–2783. old.
- [48] Michael C DeSantis és tsai. “Precision analysis for standard deviation measurements of immobile single fluorescent molecule images”. *Optics express* 18.7 (2010), 6563–6576. old.
- [49] Hui Jia, Jiankun Yang és Xiujian Li. “Minimum variance unbiased subpixel centroid estimation of point image limited by photon shot noise”. *JOSA A* 27.9 (2010), 2038–2045. old.
- [50] Sjoerd Stallinga és Bernd Rieger. “The effect of background on localization uncertainty in single emitter imaging”. *2012 9th IEEE International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*. IEEE. 2012, 988–991. old.
- [51] Michael Hirsch és tsai. “A stochastic model for electron multiplication charge-coupled devices—from theory to practice”. *PloS one* 8.1 (2013), e53671.
- [52] Jerry Chao, E Sally Ward és Raimund J Ober. “Localization accuracy in single molecule microscopy using electron-multiplying charge-coupled device cameras”. *Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XIX*. 8227. köt. International Society for Optics és Photonics. 2012, 82271P.
- [53] Michael C DeSantis és tsai. “Single-image axial localization precision analysis for individual fluorophores”. *Optics express* 20.3 (2012), 3057–3065. old.
- [54] François Aguet, Dimitri Van De Ville és Michael Unser. “A maximum-likelihood formalism for sub-resolution axial localization of fluorescent nanoparticles”. *Optics Express* 13.26 (2005), 10503–10522. old.
- [55] Sripad Ram és tsai. “A novel 3D resolution measure for optical microscopes with applications to single molecule imaging”. *Ultrasensitive and Single-Molecule Detection Technologies II*. 6444. köt. International Society for Optics és Photonics. 2007, 64440D. old.
- [56] Majid Badieirostami és tsai. “Three-dimensional localization precision of the double-helix point spread function versus astigmatism and biplane”. *Applied physics letters* 97.16 (2010), 161103. old.

- [57] Ginni Grover, Sri Rama Prasanna Pavani és Rafael Piestun. “Performance limits on three-dimensional particle localization in photon-limited microscopy”. *Optics letters* 35.19 (2010), 3306–3308. old.
- [58] Eric J Rees és tsai. “Blind assessment of localisation microscope image resolution”. *Optical Nanoscopy* 1.1 (2012), 1–10. old.
- [59] James E Fitzgerald, Ju Lu és Mark J Schnitzer. “Estimation theoretic measure of resolution for stochastic localization microscopy”. *Physical review letters* 109.4 (2012), 48102. old.
- [60] Robert PJ Nieuwenhuizen és tsai. “Measuring image resolution in optical nanoscopy”. *Nature methods* 10.6 (2013), 557–562. old.
- [61] Niccolo Banterle és tsai. “Fourier ring correlation as a resolution criterion for super-resolution microscopy”. *Journal of structural biology* 183.3 (2013), 363–367. old.
- [62] Hendrik Deschout és tsai. “Precisely and accurately localizing single emitters in fluorescence microscopy”. *Nature methods* 11.3 (2014), 253. old.
- [63] Jörg Enderlein, Erdal Toprak és Paul R Selvin. “Polarization effect on position accuracy of fluorophore localization”. *Optics express* 14.18 (2006), 8111–8120. old.
- [64] Johann Engelhardt és tsai. “Molecular orientation affects localization accuracy in superresolution far-field fluorescence microscopy”. *Nano letters* 11.1 (2011), 209–213. old.
- [65] Matthew D Lew, Mikael P Backlund és WE Moerner. “Rotational mobility of single molecules affects localization accuracy in super-resolution fluorescence microscopy”. *Nano letters* 13.9 (2013), 3967–3972. old.
- [66] Matthew D Lew és WE Moerner. “Azimuthal polarization filtering for accurate, precise, and robust single-molecule localization microscopy”. *Nano letters* 14.11 (2014), 6407–6413. old.
- [67] Mikael P Backlund és tsai. “Removing orientation-induced localization biases in single-molecule microscopy using a broadband metasurface mask”. *Nature photonics* 10.7 (2016), 459–462. old.
- [68] Oleksii Nevskyi és tsai. “Fluorescence polarization filtering for accurate single molecule localization”. *APL Photonics* 5.6 (2020), 61302. old.
- [69] Christiaan Nick Hulleman és tsai. “Simultaneous orientation and 3D localization microscopy with a Vortex point spread function”. *bioRxiv* (2020).
- [70] Angélique Jimenez, Karoline Friedl és Christophe Leterrier. “About samples, giving examples: optimized single molecule localization microscopy”. *Methods* 174 (2020), 100–114. old.
- [71] Hari Shroff és tsai. “Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics”. *Nature methods* 5.5 (2008), 417–423. old.

- [72] Sebastian van de Linde és tsai. “The effect of photoswitching kinetics and labeling densities on super-resolution fluorescence imaging”. *Journal of biotechnology* 149.4 (2010), 260–266. old.
- [73] Eran A Mukamel és Mark J Schnitzer. “Unified resolution bounds for conventional and stochastic localization fluorescence microscopy”. *Physical review letters* 109.16 (2012), 168102. old.
- [74] Siân Culley és tsai. “Quantitative mapping and minimization of super-resolution optical imaging artifacts”. *Nature methods* 15.4 (2018), 263. old.
- [75] Steve Wolter és tsai. “Measuring localization performance of super-resolution algorithms on very active samples”. *Optics Express* 19.8 (2011), 7020–7033. old.
- [76] József Sinkó és tsai. “TestSTORM: Simulator for optimizing sample labeling and image acquisition in localization based super-resolution microscopy”. *Biomedical optics express* 5.3 (2014), 778–787. old.
- [77] Anne Burgert és tsai. “Artifacts in single-molecule localization microscopy”. *Histochemistry and cell biology* 144.2 (2015), 123–131. old.
- [78] Alexander R Small. “Theoretical limits on errors and acquisition rates in localizing switchable fluorophores”. *Biophysical journal* 96.2 (2009), L16–L18. old.
- [79] Hesam Mazidi és tsai. “Measuring localization confidence for quantifying accuracy and heterogeneity in single-molecule super-resolution microscopy”. *Single Molecule Spectroscopy and Superresolution Imaging XIII*. 11246. köt. International Society for Optics és Photonics. 2020, 1124611. old.
- [80] Timothée Verdier és tsai. “Single particle maximum likelihood reconstruction from superresolution microscopy images”. *PloS one* 12.3 (2017), e0172943.
- [81] Thomas Pengo, Nicolas Olivier és Suliana Manley. “Away from resolution, assessing the information content of super-resolution images”. *arXiv preprint arXiv:1501.05807* (2015).
- [82] David Baddeley, Mark B Cannell és Christian Soeller. “Visualization of localization microscopy data”. *Microscopy and microanalysis* 16.1 (2010), 64. old.
- [83] Varun Venkataramani és tsai. “SuReSim: simulating localization microscopy experiments from ground truth models”. *Nature methods* 13.4 (2016), 319–321. old.
- [84] Inc. The MathWorks. *MATLAB*. 2020. URL: <https://www.mathworks.com/products/matlab.html> (elérés dátuma 2020. 09. 06.).
- [85] Olga N Shilova, Evgeny S Shilov és Sergey M Deyev. “The effect of trypan blue treatment on autofluorescence of fixed cells”. *Cytometry Part A* 91.9 (2017), 917–925. old.
- [86] Alexander WAF Reismann és tsai. “Temporal Filtering to Improve Single Molecule Identification in High Background Samples”. *Molecules* 23.12 (2018), 3338. old.

- [87] Tao Li és tsai. “Three-dimensional orientation sensors by defocused imaging of gold nanorods through an ordinary wide-field microscope”. *ACS nano* 6.2 (2012), 1268–1277. old.
- [88] Eric J Titus és Katherine A Willets. “Accuracy of superlocalization imaging using gaussian and dipole emission point-spread functions for modeling gold nanorod luminescence”. *ACS nano* 7.7 (2013), 6258–6267. old.
- [89] Eelco Hoogendoorn és tsai. “The fidelity of stochastic single-molecule super-resolution reconstructions critically depends upon robust background estimation”. *Scientific reports* 4.1 (2014), 1–10. old.
- [90] Benjamin P Isaacoff és tsai. “SMALL-LABS: Measuring single-molecule intensity and position in obscuring backgrounds”. *Biophysical journal* 116.6 (2019), 975–982. old.
- [91] Søren Preus, Lasse L Hildebrandt és Victoria Birkedal. “Optimal background estimators in single-molecule FRET microscopy”. *Biophysical journal* 111.6 (2016), 1278–1286. old.
- [92] Ricardo Henriques és tsai. “QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ”. *Nature methods* 7.5 (2010), 339–340. old.
- [93] David Baddeley és tsai. “Light-induced dark states of organic fluochromes enable 30 nm resolution imaging in standard media”. *Biophysical journal* 96.2 (2009), L22–L24. old.
- [94] Samuel T Hess és tsai. “Dynamic clustered distribution of hemagglutinin resolved at 40 nm in living cell membranes discriminates between raft theories”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.44 (2007), 17370–17375. old.
- [95] Christoph Cremer és tsai. “Superresolution imaging of biological nanostructures by spectral precision distance microscopy”. *Biotechnology journal* 6.9 (2011), 1037–1051. old.
- [96] Karole L Blythe és tsai. “Ground state depletion microscopy for imaging interactions between gold nanowires and fluorophore-labeled ligands”. *Physical Chemistry Chemical Physics* 15.12 (2013), 4136–4145. old.
- [97] Christian Steuwe és tsai. “Visualizing electromagnetic fields at the nanoscale by single molecule localization”. *Nano Letters* 15.5 (2015), 3217–3223. old.
- [98] Hongqiang Ma, Jianquan Xu és Yang Liu. “WindSTORM: Robust online image processing for high-throughput nanoscopy”. *Science advances* 5.4 (2019), eaaw0683.
- [99] Karole L Blythe, Eric J Titus és Katherine A Willets. “Comparing the accuracy of reconstructed image size in super-resolution imaging of fluorophore-labeled gold nanorods using different fit models”. *The Journal of Physical Chemistry C* 119.33 (2015), 19333–19343. old.
- [100] Patrick Fox-Roberts és tsai. “Local dimensionality determines imaging speed in localization microscopy”. *Nature communications* 8.1 (2017), 1–10. old.

- [101] Jean-François Rupprecht és tsai. “Trade-offs between structural integrity and acquisition time in stochastic super-resolution microscopy techniques”. *Optics express* 25.19 (2017), 23146–23163. old.
- [102] Graham T Dempsey és tsai. “Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging”. *Nature methods* 8.12 (2011), 1027. old.
- [103] Mingzhai Sun és tsai. “Superresolution microscope image reconstruction by spatio-temporal object decomposition and association: application in resolving t-tubule structure in skeletal muscle”. *Optics express* 22.10 (2014), 12160–12176. old.
- [104] Fang Huang és tsai. “Simultaneous multiple-emitter fitting for single molecule super-resolution imaging”. *Biomedical optics express* 2.5 (2011), 1377–1393. old.
- [105] Seamus J Holden, Stephan Uphoff és Achillefs N Kapanidis. “DAOSTORM: an algorithm for high-density super-resolution microscopy”. *Nature methods* 8.4 (2011), 279–280. old.
- [106] Hazen Babcock, Yaron M Sigal és Xiaowei Zhuang. “A high-density 3D localization algorithm for stochastic optical reconstruction microscopy”. *Optical nanoscopy* 1.1 (2012), 1–10. old.
- [107] Martin Ovesný és tsai. “ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging”. *Bioinformatics* 30.16 (2014), 2389–2390. old.
- [108] Sébastien Mailfert és tsai. “A theoretical high-density nanoscopy study leads to the design of UNLOC, a parameter-free algorithm”. *Biophysical journal* 115.3 (2018), 565–576. old.
- [109] Susan Cox és tsai. “Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics”. *Nature methods* 9.2 (2012), 195–200. old.
- [110] Yina Wang és tsai. “PALMER: a method capable of parallel localization of multiple emitters for high-density localization microscopy”. *Optics express* 20.14 (2012), 16039–16049. old.
- [111] Mohamadreza Fazel és tsai. “Bayesian multiple emitter fitting using reversible jump Markov Chain Monte Carlo”. *Scientific reports* 9.1 (2019), 1–10. old.
- [112] Richard J Marsh és tsai. “Artifact-free high-density localization microscopy analysis”. *Nature methods* 15.9 (2018), 689–692. old.
- [113] Junhong Min és tsai. “FALCON: fast and unbiased reconstruction of high-density super-resolution microscopy data”. *Scientific reports* 4.1 (2014), 1–9. old.
- [114] Lei Zhu és tsai. “Faster STORM using compressed sensing”. *Nature methods* 9.7 (2012), 721–723. old.
- [115] Eran A Mukamel, Hazen Babcock és Xiaowei Zhuang. “Statistical deconvolution for superresolution fluorescence microscopy”. *Biophysical journal* 102.10 (2012), 2391–2400. old.

- [116] Siewert Hugelier és tsai. “Sparse deconvolution of high-density super-resolution images”. *Scientific reports* 6.1 (2016), 1–11. old.
- [117] Tamás Gajdos és tsai. “mmSTORM: Multimodal localization based super-resolution microscopy”. *Scientific reports* 9.1 (2019), 1–9. old.
- [118] Lexy von Diezmann, Yoav Shechtman és WE Moerner. “Three-dimensional localization of single molecules for super-resolution imaging and single-particle tracking”. *Chemical reviews* 117.11 (2017), 7244–7275. old.
- [119] Christian Franke, Markus Sauer és Sebastian van de Linde. “Photometry unlocks 3D information from 2D localization microscopy data”. *nature methods* 14.1 (2017), 41–44. old.
- [120] Laurent Holtzer, Tobias Meckel és Thomas Schmidt. “Nanometric three-dimensional tracking of individual quantum dots in cells”. *Applied Physics Letters* 90.5 (2007), 53902. old.
- [121] Manuel F Juette és tsai. “Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples”. *Nature methods* 5.6 (2008), 527–529. old.
- [122] Zdeněk Švindrych, Martin Ovesný és Guy M Hagen. “PALM/STORM microscopy with a dual objective microscope”. ().
- [123] H Pin Kao és AS Verkman. “Tracking of single fluorescent particles in three dimensions: use of cylindrical optics to encode particle position”. *Biophysical journal* 67.3 (1994), 1291–1300. old.
- [124] Bo Huang és tsai. “Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy”. *Science* 319.5864 (2008), 810–813. old.
- [125] Ignacio Izeddin és tsai. “PSF shaping using adaptive optics for three-dimensional single-molecule super-resolution imaging and tracking”. *Optics express* 20.5 (2012), 4957–4967. old.
- [126] Ke Xu, Hazen P Babcock és Xiaowei Zhuang. “Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton”. *Nature methods* 9.2 (2012), 185–188. old.
- [127] Sri Rama Prasanna Pavani és Rafael Piestun. “Three dimensional tracking of fluorescent microparticles using a photon-limited double-helix response system”. *Optics express* 16.26 (2008), 22048–22057. old.
- [128] David Baddeley, Mark B Cannell és Christian Soeller. “Three-dimensional sub-100 nm super-resolution imaging of biological samples using a phase ramp in the objective pupil”. *Nano Research* 4.6 (2011), 589–598. old.
- [129] Shu Jia, Joshua C Vaughan és Xiaowei Zhuang. “Isotropic 3D super-resolution imaging with a self-bending point spread function”. *CLEO: Science and Innovations*. Optical Society of America. 2013, CTh5D–10.
- [130] Adam S Backer és tsai. “A bisected pupil for studying single-molecule orientational dynamics and its application to three-dimensional super-resolution microscopy”. *Applied physics letters* 104.19 (2014), 193701. old.

- [131] Yoav Shechtman és tsai. “Precise three-dimensional scan-free multiple-particle tracking over large axial ranges with tetrapod point spread functions”. *Nano letters* 15.6 (2015), 4194–4199. old.
- [132] Joran Deschamps, Markus Mund és Jonas Ries. “3D superresolution microscopy by supercritical angle detection”. *Optics Express* 22.23 (2014), 29081–29091. old.
- [133] Nicolas Bourg és tsai. “Direct optical nanoscopy with axially localized detection”. *Nature Photonics* 9.9 (2015), 587–593. old.
- [134] Alan M Szalai és tsai. “Three-dimensional total-internal reflection fluorescence nanoscopy with nanometric axial resolution by photometric localization of single molecules”. *Nature communications* 12.1 (2021), 1–13. old.
- [135] Gleb Shtengel és tsai. “Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.9 (2009), 3125–3130. old.
- [136] Daniel Aquino és tsai. “Two-color nanoscopy of three-dimensional volumes by 4Pi detection of stochastically switched fluorophores”. *Nature methods* 8.4 (2011), 353–359. old.
- [137] Michael J Mlodzianoski és tsai. “Super-resolution imaging of molecular emission spectra and single molecule spectral fluctuations”. *PloS one* 11.3 (2016), e0147506.
- [138] Christophe Leterrier és tsai. “Nanoscale architecture of the axon initial segment reveals an organized and robust scaffold”. *Cell reports* 13.12 (2015), 2781–2793. old.
- [139] Bo Huang és tsai. “Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution”. *Nature methods* 5.12 (2008), 1047–1052. old.
- [140] Zhengyang Zhang és tsai. “Ultrahigh-throughput single-molecule spectroscopy and spectrally resolved super-resolution microscopy”. *Nature methods* 12.10 (2015), 935–938. old.
- [141] Yang Zhang és tsai. “Multicolor super-resolution imaging using spectroscopic single-molecule localization microscopy with optimal spectral dispersion”. *Applied optics* 58.9 (2019), 2248–2255. old.
- [142] Eran Hershko és tsai. “Multicolor localization microscopy and point-spread-function engineering by deep learning”. *Optics express* 27.5 (2019), 6158–6183. old.
- [143] Mark Bates és tsai. “Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes”. *Science* 317.5845 (2007), 1749–1753. old.
- [144] Mariano Bossi és tsai. “Multicolor far-field fluorescence nanoscopy through isolated detection of distinct molecular species”. *Nano letters* 8.8 (2008), 2463–2468. old.
- [145] André Lampe és tsai. “Multi-colour direct STORM with red emitting carbocyanines”. *Biology of the Cell* 104.4 (2012), 229–237. old.
- [146] Leila Nahidiazar és tsai. “Optimizing imaging conditions for demanding multi-color super resolution localization microscopy”. *PLoS One* 11.7 (2016), e0158884.

- [147] Miklos Erdelyi és tsai. “Correcting chromatic offset in multicolor super-resolution localization microscopy”. *Optics express* 21.9 (2013), 10978–10988. old.
- [148] Ilaria Testa és tsai. “Multicolor fluorescence nanoscopy in fixed and living cells by exciting conventional fluorophores with a single wavelength”. *Biophysical journal* 99.8 (2010), 2686–2694. old.
- [149] Susan E Sund, Joel A Swanson és Daniel Axelrod. “Cell membrane orientation visualized by polarized total internal reflection fluorescence”. *Biophysical journal* 77.4 (1999), 2266–2283. old.
- [150] Alla Kress és tsai. “Mapping the local organization of cell membranes using excitation-polarization-resolved confocal fluorescence microscopy”. *Biophysical journal* 105.1 (2013), 127–136. old.
- [151] Haitham A Shaban és tsai. “Polarized super-resolution structural imaging inside amyloid fibrils using Thioflavine T”. *Scientific reports* 7.1 (2017), 1–10. old.
- [152] Tianben Ding és tsai. “Single-molecule orientation localization microscopy for resolving structural heterogeneities between amyloid fibrils”. *Optica* 7.6 (2020), 602–607. old.
- [153] Long Chen és tsai. “Advances of super-resolution fluorescence polarization microscopy and its applications in life sciences”. *Computational and Structural Biotechnology Journal* (2020).
- [154] Martin Böhmer és Jörg Enderlein. “Orientation imaging of single molecules by wide-field epifluorescence microscopy”. *JOSA B* 20.3 (2003), 554–559. old.
- [155] François Aguet és tsai. “Super-resolution orientation estimation and localization of fluorescent dipoles using 3-D steerable filters”. *Optics express* 17.8 (2009), 6829–6848. old.
- [156] Mikael P Backlund és tsai. “Simultaneous, accurate measurement of the 3D position and orientation of single molecules”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.47 (2012), 19087–19092. old.
- [157] Oumeng Zhang és tsai. “Imaging the three-dimensional orientation and rotational mobility of fluorescent emitters using the Tri-spot point spread function”. *Applied physics letters* 113.3 (2018), 31103. old.
- [158] József Sinkó és tsai. “Polarization sensitive localization based super-resolution microscopy with a birefringent wedge”. *Methods and applications in fluorescence* 5.1 (2017), 17001. old.
- [159] Jack W Shepherd és tsai. “Combining single-molecule super-resolved localization microscopy with fluorescence polarization imaging to study cellular processes”. *Journal of Physics: Photonics* 3.3 (2021), 34010. old.
- [160] Adam S Backer, Maurice Y Lee és WE Moerner. “Enhanced DNA imaging using super-resolution microscopy and simultaneous single-molecule orientation measurements”. *Optica* 3.6 (2016), 659–666. old.

- [161] Cesar Augusto Valades Cruz és tsai. “Quantitative nanoscale imaging of orientational order in biological filaments by polarized superresolution microscopy”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.7 (2016), E820–E828.
- [162] Caio Vaz Rimoli és tsai. “4polar-STORM polarized super-resolution imaging of actin filament organization in cells”. *bioRxiv* (2021).
- [163] Daniel Axelrod. “Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization”. *Biophysical journal* 26.3 (1979), 557–573. old.
- [164] Kazuhiko Kinosita Jr, Suguru Kawato és Akira Ikegami. “A theory of fluorescence polarization decay in membranes.” *Biophysical journal* 20.3 (1977), 289. old.
- [165] Joseph R Lakowicz. “Radiative decay engineering: biophysical and biomedical applications”. *Analytical biochemistry* 298.1 (2001), 1–24. old.
- [166] Pascal Anger, Palash Bharadwaj és Lukas Novotny. “Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence”. *Physical review letters* 96.11 (2006), 113002. old.
- [167] Katherine A Willets és tsai. “Super-resolution imaging and plasmonics”. *Chemical reviews* 117.11 (2017), 7538–7582. old.
- [168] SaaJ Chattopadhyay és Julie S Biteen. “Super-Resolution Characterization of Heterogeneous Light–Matter Interactions between Single Dye Molecules and Plasmonic Nanoparticles”. *Analytical Chemistry* 93.1 (2020), 430–444. old.
- [169] Eric Johlin és tsai. “Super-resolution imaging of light–matter interactions near single semiconductor nanowires”. *Nature communications* 7.1 (2016), 1–6. old.
- [170] Harrison J Goldwyn és tsai. “Mislocalization in plasmon-enhanced single-molecule fluorescence microscopy as a dynamical Young’s interferometer”. *ACS Photonics* 5.8 (2018), 3141–3151. old.
- [171] Stephen A Lee és Julie S Biteen. “Spectral reshaping of single dye molecules coupled to single plasmonic nanoparticles”. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 10.19 (2019), 5764–5769. old.
- [172] Tiancheng Zuo és tsai. “Rotation of single-molecule emission polarization by plasmonic nanorods”. *The journal of physical chemistry letters* 10.17 (2019), 5047–5054. old.
- [173] Hu Cang és tsai. “Probing the electromagnetic field of a 15-nanometre hotspot by single molecule imaging”. *Nature* 469.7330 (2011), 385–388. old.
- [174] Bing Fu és tsai. “Super-resolving the distance-dependent plasmon-enhanced fluorescence of single dye and fluorescent protein molecules”. *The Journal of Physical Chemistry C* 119.33 (2015), 19350–19358. old.
- [175] David L Mack és tsai. “Decoupling absorption and emission processes in super-resolution localization of emitters in a plasmonic hotspot”. *Nature communications* 8.1 (2017), 1–10. old.
- [176] Tiancheng Zuo és tsai. “Model-Based Insight into Single-Molecule Plasmonic Mislocalization”. *The Journal of Physical Chemistry C* 125.44 (2021), 24531–24539. old.

- [177] Frank Bloksma és Peter Zijlstra. “Imaging and Localization of Single Emitters near Plasmonic Particles of Different Size, Shape, and Material”. *The Journal of Physical Chemistry C* 125.40 (2021), 22084–22092. old.
- [178] Karole L Blythe, Eric J Titus és Katherine A Willets. “Triplet-State-Mediated Super-Resolution Imaging of Fluorophore-Labeled Gold Nanorods”. *ChemPhysChem* 15.4 (2014), 784–793. old.
- [179] Esther Wertz és tsai. “Single-molecule super-resolution microscopy reveals how light couples to a plasmonic nanoantenna on the nanometer scale”. *Nano letters* 15.4 (2015), 2662–2670. old.
- [180] Bing Fu, Benjamin P Isaacoff és Julie S Biteen. “Super-resolving the actual position of single fluorescent molecules coupled to a plasmonic nanoantenna”. *ACS nano* 11.9 (2017), 8978–8987. old.
- [181] A Swarnapali De Silva Indrasekara és tsai. “Optimization of spectral and spatial conditions to improve super-resolution imaging of plasmonic nanoparticles”. *The journal of physical chemistry letters* 8.1 (2017), 299–306. old.
- [182] Adam Taylor és tsai. “All-optical imaging of gold nanoparticle geometry using super-resolution microscopy”. *The Journal of Physical Chemistry C* 122.4 (2018), 2336–2342. old.
- [183] Sarah Frisken Gibson és Frederick Lanni. “Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in three-dimensional light microscopy”. *JOSA A* 8.10 (1991), 1601–1613. old.
- [184] B Richards és Emil Wolf. “Electromagnetic diffraction in optical systems, II. Structure of the image field in an aplanatic system”. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* 253.1274 (1959), 358–379. old.
- [185] Emil Wolf. “Electromagnetic diffraction in optical systems-I. An integral representation of the image field”. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* 253.1274 (1959), 349–357. old.
- [186] Matthew B Smith és tsai. “Segmentation and tracking of cytoskeletal filaments using open active contours”. *Cytoskeleton* 67.11 (2010), 693–705. old.
- [187] John E Greivenkamp. “Field guide to geometrical optics”. SPIE Bellingham, WA. 2004.
- [188] Olivier Haeberlé. “Focusing of light through a stratified medium: a practical approach for computing microscope point spread functions. Part I: Conventional microscopy”. *Optics communications* 216.1-3 (2003), 55–63. old.
- [189] Praveen Pankajakshan és tsai. “Point-spread function retrieval for fluorescence microscopy”. *2009 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*. IEEE. 2009, 1095–1098. old.

- [190] Simon Sehayek és tsai. “A High-Throughput Image Correlation Method for Rapid Analysis of Fluorophore Photoblinking and Photobleaching Rates”. *ACS nano* 13.10 (2019), 11955–11966. old.
- [191] James D Manton és tsai. “ELM: super-resolution analysis of wide-field images of fluorescent shell structures”. *Methods and applications in fluorescence* 6.3 (2018), 37001. old.
- [192] Benedict Diederich és tsai. “cellSTORM-Cost-effective Super-Resolution on a Cellphone using dSTORM”. *arXiv preprint arXiv:1804.06244* (2018).
- [193] Johan Öfverstedt, Joakim Lindblad és Nataša Sladoje. “Stochastic Distance Transform: Theory, Algorithms and Applications”. *Journal of Mathematical Imaging and Vision* 62.5 (2020), 751–769. old.
- [194] Dániel Varga és tsai. “Quantification of DNA damage induced repair focus formation via super-resolution dSTORM localization microscopy”. *Nanoscale* 11.30 (2019), 14226–14236. old.
- [195] Rik Littlefield. *What’s the depth of field (DOF) for a diffraction-limited lens?* 2020. URL: http://janrik.net/MiscSubj/2014/DefocusAnalysis201405/WhatIsTheDOF_DiffractionLimitedLens_v01.pdf (elérés dátuma 2020. 11. 10.).
- [196] Koen Visscher, GJ Brakenhoff és TD Visser. “Fluorescence saturation in confocal microscopy”. *Journal of Microscopy* 175.2 (1994), 162–165. old.
- [197] Joel Vandekerckhove és tsai. “The phalloidin binding site of F-actin.” *The EMBO journal* 4.11 (1985), 2815–2818. old.
- [198] Ahmet Menten és tsai. “High-resolution cryo-EM structures of actin-bound myosin states reveal the mechanism of myosin force sensing”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.6 (2018), 1292–1297. old.
- [199] ThermoFischer scientific. *ThermoFischer*. 2022. URL: <https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer#!/> (elérés dátuma 2022. 08. 28.).
- [200] Semrock. *FF01-446/523/600/677-25*. 2022. URL: <https://www.semrock.com/filterdetails.aspx?id=ff01-446/523/600/677-25> (elérés dátuma 2022. 08. 28.).
- [201] Semrock. *FF01-600/37-25*. 2022. URL: <https://www.semrock.com/filterdetails.aspx?id=ff01-600/37-25> (elérés dátuma 2022. 08. 28.).
- [202] Semrock. *BLP01-647R-25*. 2022. URL: <https://www.semrock.com/filterdetails.aspx?id=blp01-647r-25> (elérés dátuma 2022. 08. 28.).
- [203] Vincenzo Amendola és tsai. “Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review”. *Journal of Physics: Condensed Matter* 29.20 (2017), 203002. old.
- [204] Jin-Ho Lee és tsai. “Application of gold nanoparticle to plasmonic biosensors”. *International journal of molecular sciences* 19.7 (2018), 2021. old.
- [205] Magdalena Swierczewska, Seulki Lee és Xiaoyuan Chen. “The design and application of fluorophore-gold nanoparticle activatable probes”. *Physical Chemistry Chemical Physics* 13.21 (2011), 9929–9941. old.

- [206] Stephan Link és Mostafa A El-Sayed. “Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods”. *The Journal of Physical Chemistry B* 103.40 (1999), 8410–8426. old.
- [207] Liane S Slaughter és tsai. “Single-particle spectroscopy of gold nanorods beyond the quasi-static limit: varying the width at constant aspect ratio”. *The Journal of Physical Chemistry C* 114.11 (2010), 4934–4938. old.
- [208] Yi Fu, Jian Zhang és Joseph R Lakowicz. “Plasmon-enhanced fluorescence from single fluorophores end-linked to gold nanorods”. *Journal of the American Chemical Society* 132.16 (2010), 5540–5541. old.
- [209] Thermo Fisher Scientific. *Cy5 dye*. 2020. URL: <https://www.thermofisher.com/hu/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/cy5-dye.html> (elérés dátuma 2020. 06. 14.).
- [210] Mike Heilemann és tsai. “Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch”. *Journal of the American Chemical Society* 127.11 (2005), 3801–3806. old.
- [211] Ratnakar B Mujumdar és tsai. “Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters”. *Bioconjugate chemistry* 4.2 (1993), 105–111. old.
- [212] Inc. COMSOL. *COMSOL*. 2021. URL: <https://www.comsol.com/comsol-multiphysics> (elérés dátuma 2021. 04. 22.).
- [213] András Szenes és tsai. “Enhancing diamond color center fluorescence via optimized plasmonic nanorod configuration”. *Plasmonics* 12.4 (2017), 1263–1280. old.
- [214] Balázs Bánhelyi és tsai. *The Global Optimization Algorithm: Newly Updated with Java Implementation and Parallelization*. Springer, 2018.
- [215] Lehui Xiao és tsai. “Three dimensional orientational imaging of nanoparticles with darkfield microscopy”. *Analytical chemistry* 82.12 (2010), 5268–5274. old.
- [216] Sebastian Van de Linde és tsai. “Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes”. *Nature protocols* 6.7 (2011), 991–1009. old.
- [217] AdOptIm. *rainSTORM weboldal*. 2013. URL: https://titan.physx.u-szeged.hu/~adoptim/?page_id=582 (elérés dátuma 2022. 07. 09.).
- [218] Martin Ester és tsai. “A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise.” *Kdd*. 96. köt. 34. 1996, 226–231. old.
- [219] Adam S Backer és WE Moerner. “Determining the rotational mobility of a single molecule from a single image: a numerical study”. *Optics express* 23.4 (2015), 4255–4276. old.