

Válaszok Dr. Pálfalvi László opponens kérdéseire

Mindenekelőtt szeretném megköszönni az opponens munkáját, a dolgozat alapos átnézését és a részletes bírálatot. A feltett kérdésekre azok eredeti sorrendjében az alábbiakban igyekszem válaszolni.

Az ábrákkal kapcsolatban viszont vannak kifogásaim. Jelölt kényelmi megfontolásból idegen nyelvű ábrákat használ. Ezzel semmi gond nem lenne, ha nem menne a minőség rovására. Számos ábra feliratának, skálájának mérete olyan kicsi, felbontása olyan gyatra, hogy komolyabb erőfeszítés árán is csak nehezen, vagy egyáltalán nem fejthető meg. Fordul elő ez egy olyan műben, amely a képalkotás minőségének javítása terén elért eredményeket mutatja be. A 4.3.2 a, b és c (41. old.) ábrarészek esetén hiányzik a rájuk való hivatkozás, a 4.3.5 ábráról hiányoznak az a, b, c és d jelölések (47. old). Nagyra értékelendő, hogy a Jelölt és szerzőtársai által készített lokalizációs mikroszkópiai felvétel kiemelte a Biophysical Journal címlapján való megjelenést, ahogy azt a 4.4.3 ábra (59. old.) mutatja. Viszont a dolgozatban nincs ezen ábrára mutató hivatkozás. Egy-két sematikus, illusztratív ábra hasznos lett volna főként a 14-18. oldalakon foglaltak mellé (EPI, TIRF, stb...).

Válasz: A dolgozatban igyekeztem a képeket/ábrákat egységes formátumban beilleszteni, azaz három (fél, háromnegyed vagy egész) tükrömetet használtam és az ábrák döntő részét az eredeti cikkekből változtatás nélkül vettem át. Ez magyarázza, hogy a legtöbb ábra angol felirattal szerepel és pár ábra minősége gyengébb.

1. A szimulációk végzéséhez az OSLO optikai tervezőprogramot használta. Miért pont erre a szoftverre esett a választás? Használt-e – ha csak néhány ponton is – esetleg más programot az OSLO eredmények hitelességének ellenőrzése céljából?

Válasz: Az OSLO optikai rendszertervező programot közel 20 éve használom. A program kiválasztásánál döntő szempont volt, hogy oktatási/kutatási célra ingyenes licenst kapott az egyetem. Az évek során számos projektben volt segítségemre és több tudományos folyóiratban jelentek meg a velem végzett szimulációs eredmények. Más programmal nem végeztem ellenőrző számításokat. Megjegyzem, hogy volt hallgatóim közül többen a Zemax programot használják az ipari szférában, és a visszajelzések alapján lényegi eltérést nem találtak a két program között. Azonban a bíráló kérdésfelvetése jogos, mert az OSLO (mint általában minden külső fejlesztésű program) használata validálást igényel, és a leprogramozott modellek alkalmazhatósága is kérdéses. Ezért az egyes projekteknél az „egyszerűtől a komplikált” felé haladva elvet szoktam követni, azaz az első lépésnél olyan paramétereket állítok be, aminél az eredmény viszonylag egyszerűen megkapható. Továbbá a legnagyobb problémát az optikai rendszer OSLO-ban történő definiálása jelenti, mert pl. a mikroszkóp objektívek paramétereit (optikai felületek helye, görbülete, anyagi minősége stb.) nem publikus, azokat tipikusan szabadalmakból tudjuk kinézni. A szabadalmak azonban nem egyértelműen rendelhetők hozzá a tényleges objektívekhez, és számos fontos paramétert nem adnak meg (pl. AR bevonat). Megítélésem szerint az OSLO hitelességének ellenőrzéséhez nem egy másik program lenne alkalmas, hanem a kísérleti eredményekkel való összevetés. Ezért kutatásaim során az OSLO-s szimulációs eredményeket a kísérleti eredményekkel igyekeztem összevetni.

2. A kísérletek, illetve szimulációk során többnyire kalcit, MgF_2 , illetve LiNb (vélelmezem lítium-niobát, $LiNbO_3$) anyagokat használ egytengelyű, kettőtörő kristály gyanánt (4.1, illetve 4.2 fejezetek). Miért pont ezekre az anyagokra esett a választás? Mi alapján döntötte el, hogy mikor melyiket használja? Az 500 illetve 1000 μm -es tipikus minta vastagságok mi alapján lettek kiválasztva? A 4.1.4 fejezetben kalcit és $LiNbO_3$ anyagokon keresztül történt az átfókuszálás, az intenzitásprofilokat ábrákkal is illusztrálja. Hiányolom a két különböző anyaggal kapott eredmények bemutatása után az összehasonlítást, konklúziót. Kérem, ezt tegye meg.

Válasz: A kettősen törő lemezen történő átfókuszálás során kialakuló kettős fókuszpont szeparációját a lemez vastagsága és az ordinárius/extraordinárius törésmutatók (n_o , n_e) értéke határozza meg. A hivatkozott cikkben [dolgozat 80-as hivatkozása] összeállítottam egy táblázatot (1. tábla) a potenciális kettősen törő kristályokról, azok törésmutatójáról (532 nm hullámhosszon) és az OSLO-val számolt fókuszszeparációról (0,5 és 1 mm vastag lemezek esetén).

Table 1. Birefringent materials and their properties.

Material	n_o @ 532 nm	n_e @ 532 nm	δn @ 532 nm	ε (mm) @ 0.5 mm thick plate	ε (mm) @ 1 mm thick plate
Calcite [OSLO]	1.6629	1.4885	-0.1049	0.0737	0.1474
LiNb [23]	2.323	2.234	-0.0383	0.0169	0.0338
KDP [24]	1.5129	1.4709	-0.0268	0.0190	0.0380
Quartz [25]	1.547	1.556	+0.0058	0.0037	0.0074
MgF_2 [25]	1.379	1.391	+0.0087	0.0062	0.0125

1. tábla: Számolt fókuszszeparáció értékek különböző kettősen törő anyagok esetén

A lemez vastagságának és a törésmutatók különbségének $|n_o - n_e|$ növelésével az ordinárius és extraordinárius fókuszok szeparációja növelhető, ami előnyös a fókuszok szétválasztásánál, de növeli a szférikus aberrációt. Ezért a számolások és a mérések során fedőlemezre korrigált objektívet használtam. E korrekció következménye, hogy az ábrán (dolgozat 80-as hivatkozásában 3. és 4. ábra) vizuálisan nincs eltérés a különböző lemezekkel generált fókuszok között. A listából a kalcit és a $LiNbO_3$ anyagokat választottam, mert meg kívántam vizsgálni, hogy a vastagsággal vagy a törésmutatóval érdemes-e a szeparációt beállítani (a kalcit erősen, míg a $LiNbO_3$ gyengén kettősen törő). A választás (anyag és vastagság) másik oka az volt, hogy a kísérletek elvégzésének idején ezeket a lemezeket sikerült beszerezni. A kalcitlemezeket pl. az Almaz Optics-től rendeltük és ők 500 mikronnál vékonyabb lemezt nem tudtak gyártani. A kísérletek jó egyezést mutattak a szimulációkkal (lásd 2. tábla), ami szintén az OSLO-s számolások megbízhatóságát támasztja alá.

	Kalcit (0,5 mm)	Kalcit (1 mm)	$LiNbO_3$ (1 mm)
számolt szeparáció (mm) (forrás: 80-as hivatkozás a dolgozatban)	0,0737	0,1474	0,0338
mért szeparáció (mm) (forrás: 80-as hivatkozás a dolgozatban)	0,079	0,158	0,040

2. tábla: Számolt és mért fókuszszeparáció

A fókuszok optimális távolsága megítélésem szerint alkalmazásfüggő. Ha gyors váltás szükséges (pl. térszűréssel), akkor a kisebb szeparációt, ha a szétválasztás hatásfoka a kritikus paraméter, akkor a nagyobb szeparációt látom előnyösebb választásnak.

A fókuszok távolságának beállítása az alkalmazott lemez vastagságának és az ordinárius/extraordinárius törésmutatók különbségének megválasztásával szintén alkalmazásfüggő. A bevezetett szférikus hibát kompenzálni tudtuk, de pl. kis munkatávolságú lencse esetén a vékony lemez alkalmazása előnyösebb lehet.

3. A 4.1 fejezetben bemutatott mellett milyen egyéb módszerek létez(hetnek) radiálisan, illetve azimutálisan polarizált nyalábok generálására? A dolgozatban bemutatott módszer milyen előnyökkel bír ezekhez képest?

Válasz: Számos módszert javasoltak az irodalomban radiálisan és/vagy azimutálisan polarizált nyalábok előállítására. A teljesség igénye nélkül: Az interferometrikus módszerekben TEM_{01} és TEM_{10} módusokat kombinálnak rezonátoron belül vagy azon kívül [1-3]. Speciálisan kiképzett polarizációs rács és axikon [4,5], hullámhossz alatti rácsállandóval rendelkező rács és fázislemez [6], Wollaston-prizma és SLM [7] kombinált használatát és többmódusú optikai szál [8] alkalmazását javasolták radiálisan polarizált nyalábok előállítására. A szuperrezolúciós technikák közül a STED-hez szükséges „fánk alakú” nyalábot előállítani, ami pl. radiálisan polarizált nyalábokkal érhető el. Ezirányú kutatásaim azonban nem folytatódtak, mert a lokalizációs módszerekkel kezdtem foglalkozni.

Megítélésem szerint a kettősen törő elemek használatának egyik legnagyobb előnye az eltolási invarianciájuk, azaz az optikai tengelyre merőlegesen szabadon eltolhatók, ami megkönnyíti a beállítást, illetve növeli a rendszer időbeli stabilitását. Meg kell említenem, hogy annak ellenére, hogy a dolgozatban is felsorolt négy publikációra kapott hivatkozások száma meghaladja a negyvenet (Google Scholar), a módszert tudomásom szerint más kutatócsoport ezidáig nem használta.

4. A tomografikus vonalpásztázó módszer kísérleti demonstrálása során (35. old. 4.2.4. ábra) mekkora volt a pásztázás során a radiális és az azimutális lépésköz?

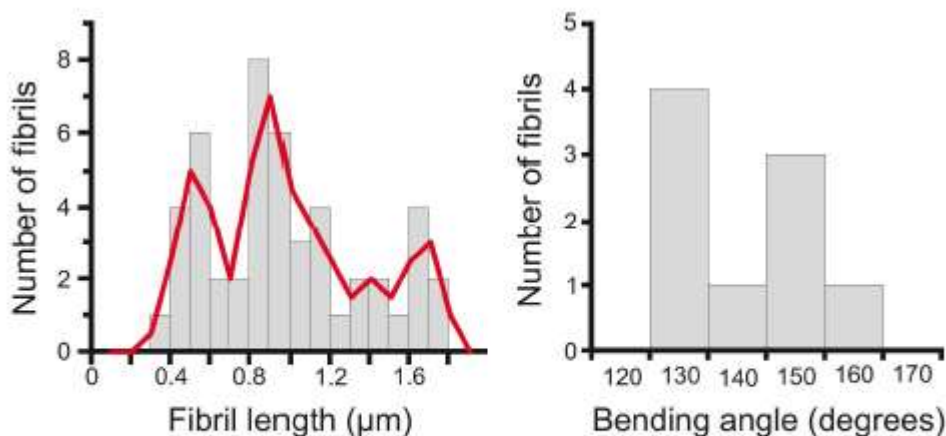
Válasz: 360 fokos körbefordulás mellett 2 fokonként 58 nm-es lépésközzel történtek a mérések.

5. Tipikusan mennyi a 4.3.4. pontban ismertetett RainSTORM fedőnevű kiértékelés időtartama?

Válasz: A rainSTORM futási ideje függ a kiválasztott opcióktól és a mintán a felvillanások számától, de az alapbeállítás esetén tipikusan összemérhető a felvétel elkészítésének idejével, azaz 5-10 perc. Drift korrekció, többszörös Gauss-eloszlás illesztés és trajektória számolás esetén a teljes kiértékelés órákat vehet igénybe egyetlen kép esetén. Megjegyzem, hogy a rainSTORM futtatható batch file-lal, azaz a napi mérések kiértékelését éjszaka tudjuk (szoktuk) elvégezni. Terveztem, hogy a kódot átírjuk és futtatjuk GPU-n, ami meggyorsítaná a kiértékelést. A program futási idejének csökkentése akkor válna igazán jelentőssé, ha valós időben lehetne a képrekonstrukciót követni és visszacsatolással dinamikusan változtatni a kísérleti paramétereket. A csoportban a szoftveres fejlesztés jelenlegi fő irányát a felvett képek automatizált kvantitatív kiértékelése jelenti. A kiértékelő rutinok gyorsítása fontos, de nem elsődleges feladat a csoportban.

6. A 4.3.5 fejezetben intracelluláris fibrillumok statisztikus kiértékeléséről (is) szó esik. Tudhatunk-e valamit a hossz-szerinti eloszlásukról a megadott mérettartományban?

Válasz: Igen, megtörtént a fibrillumok hosszának statisztikus kiértékelése, de a dolgozatban ezt valóban nem szerepeltettem. Válaszképpen most bemásolom a 112. referencia kiegészítő anyagának (Supplementary) 8. ábráját, ami mutatja a kérdéses méreteloszlást.



Supplementary Figure 8: **Left.** Analysis of the distribution of intracellular $A\beta_{1-42}$ fibril lengths in HeLa cells shows that typical filament lengths range from 0.3 up to nearly 2 μm , which closely resembles fibril lengths obtained *in vitro*. **Right.** Analysis of a subset of intracellular $A\beta_{1-42}$ fibrils that display a well defined morphology with bending angles ranging from 135 -165°.

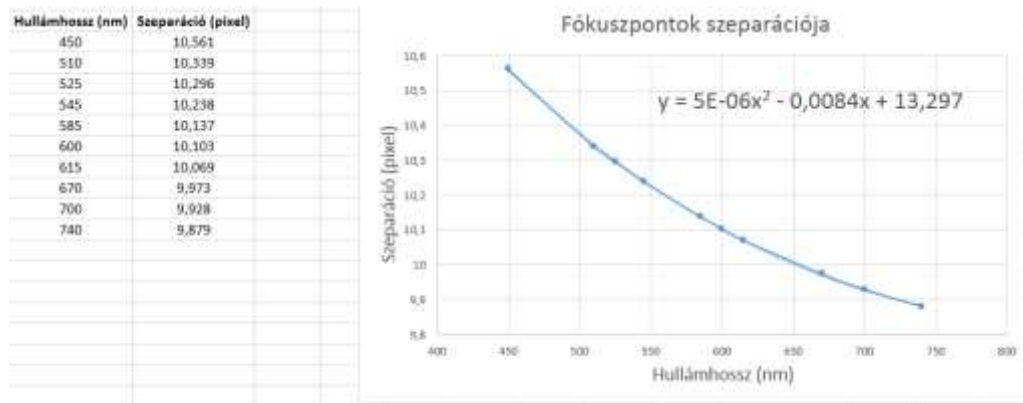
7. A 4.4.4 ábra alsó része piros görbéje a szimulációk alapján kapott lokalizációs pontosságot, mint a monokromatikus hibák egyik mérőjét mutatja az optikai tengelytől mért távolság függvényében (61. old.). Mi határozza meg a görbe karakterisztikáját, a maximumhelyet, és a maximumot?

Válasz: A lokalizációs pontatlanság helyfüggésének oka a PSF helyfüggő torzulása. A 4.4.4 ábra a PSF helyfüggésére végzett szimulációs eredményeket mutatja. Kellően nagy látótér esetén (>100 mikron) a PSF torzulása már vizuálisan is kivehető a szimulációk alapján (lásd 4.4.4 H ábra). Meg kell jegyezni, hogy a STORM-os mérések során a teljes látótér ennél kisebb (80 mikron) a tényleges dSTORM képfelvételek pedig a látótér közepén történnek, tipikusan 40 mikron alatti ROI használatával. Ezért vizuálisan nem érzékelhetők az optikai leképezési hibák. A lokalizáció során azonban az illesztett Gauss-görbék paramétereit a leképezési hibák befolyásolják, a szimulációk alapján 80 mikronos látótér esetén 100 nm-es eltérés is lehet a molekula tényleges pozíciója és a számolt lokalizációs koordináták között. A szimulációk során nem választottuk szét a különböző típusú optikai aberrációhoz kötött hibákat, mert (i) a szimulációk során a trendek és a hiba nagyságának megbecslése volt a fő cél, (ii) a tényleges méréseknél a mikroszkóp objektív csak az egyik forrása a leképezési hibáknak, valós méréseknél az aberrációk kompenzációját nem terveztük, (iii) a minták karakterisztikus mérete (DNS törési fókuszok, szarkomer) 1–3 mikron, amely tartományon belül a hiba kisebb (<5 nm) mint a lokalizációs pontosság (≈ 20 nm). Megítélésem szerint a karakterisztikát az egyes aberrációk együttes hatása határozza meg, annak megállapítása, hogy pontosan mely komponens felelős a nagy látótér szélén a lokalizációs pontosság javulásáért, további vizsgálatokat igényel.

8. A bipolSTORM módszer során a látható tartományban az ordinárius és extraordinárius foltok távolságának hullámhosszfüggésére „kismértékben másodfokú függvényt” kapnak a szimulációk során (71. old.). Mit ért a *kismértékű* kifejezés alatt? A megadott képletben a c együttható értéke 13,74, a és b pedig pozitív. Ezek fényében nem értem, hogy jönnek ki a tartomány két széléhez tartozó 10,7, illetve 9,9 pixeles távolság értékek.

Válasz: Az illesztett polinomban a másodfokú tag együtthatója három nagyságrenddel kisebb, mint a lineáris tagé. Az illesztés 300 nm széles tartományban történt (430 nm alsó és 740 nm felső határral), azaz jóval nagyobb tartományban, mint ahol a tényleges mérések történnek. Erre utal a dolgozatban a „kismértékű” kifejezés. Például kétszínű méréseknél (leggyakrabban 561 nm és 647 nm gerjesztésekkel végzett kísérletek) a párok távolsága 0,2 pixel körüli értékkel változik. A gyakorlatban ez azt jelenti, hogy a párkeresésnél a párok távolságára megadott érték nem függ a hullámhossztól.

Az illesztett görbe b paramétere előjelhibásan szerepel a dolgozatban. Az ábra az alacsony hullámhosszakat (<450 nm) elhagyva mutatja az illesztést és a számolt paramétereket.



Válasz: Az emissziós dipól irányát a két polarizációs csatornában detektált fluoreszcens jelek arányából próbáltuk meghatározni. A várt eredménytől való eltérés megítélésem szerint több ok együttesére vezethető vissza, több hipotézis is felmerült: (i) az inzulinszálak nem egyedi szálak, a kötegekből álló

9. Jelölt meglepődve tapasztalta, hogy a ThT molekulák dipólmomentuma a fibrillum tengelyével kb. 45-fokos szöveget zár be (73. old.). Mi állhat ennek hátterében, illetőleg milyen vizsgálatokat lehet annak érdekében végezni, hogy erre fény derüljön?

inzulinra a festék rendezetten, de eltérő orientációval köt be. Itt megoldást jelenthet olyan protokoll kifejlesztése, amely során egyedi inzulinszálakat tudunk létrehozni és a dSTORM-os mérések előtt elektronmikroszkóppal ellenőrizzük a szálakat. (ii): A párkeresés során az alacsony intenzitású felvillanást a program nem találja meg, esetünkben egy magasabb fluoreszcens háttér elnyomja, ezért a nagy polarizációfokhoz tartozó molekulák nem kerülnek be a végső kiértékelésbe. Itt megoldást jelenthet a minta (vagy a gerjesztés/detektálás) forgatása, és több kép együttes kiértékelése. A kérdés megválaszolásán jelenleg is dolgozunk.

Referenciák:

1. Tidwell, S.C., Ford, D.H. and Kimura, W.D., 1990. Generating radially polarized beams interferometrically. *Applied Optics*, 29(15), pp.2234-2239.
2. Tidwell, S.C., Ford, D.H. and Kimura, W.D., 1992. Transporting and focusing radially polarized laser beams. *Optical Engineering*, 31(7), pp.1527-1531.
3. Oron, R., Blit, S., Davidson, N., Friesem, A.A., Bomzon, Z. and Hasman, E., 2000. The formation of laser beams with pure azimuthal or radial polarization. *Applied Physics Letters*, 77(21), pp.3322-3324.
4. Tervo, J. and Turunen, J., 2001. Generation of vectorial propagation-invariant fields by polarization-grating axicons. *Optics communications*, 192(1-2), pp.13-18.
5. Schafer, F.P., Max-Planck-Gesellschaft zur Forderung der Wissenschaften, 1988. *Method and device for polarizing light radiation*. U.S. Patent 4,755,027.
6. Bomzon, Z.E., Biener, G., Kleiner, V. and Hasman, E., 2002. Radially and azimuthally polarized beams generated by space-variant dielectric subwavelength gratings. *Optics letters*, 27(5), pp.285-287.
7. Neil, M.A., Massoumian, F., Juškaitis, R. and Wilson, T., 2002. Method for the generation of arbitrary complex vector wave fronts. *Optics letters*, 27(21), pp.1929-1931.
8. Grosjean, T., Courjon, D. and Spajer, M., 2002. An all-fiber device for generating radially and other polarized light beams. *Optics communications*, 203(1-2), pp.1-5.

Szeged, 2022. március 9.

Erdélyi Miklós