

MTA Doktori cím elnyerésére benyújtott értekezés

**Szuperrezolúciós optikai módszerek fejlesztése és
mikroszkópiai alkalmazása**

Dr. Erdélyi Miklós

Szegedi Tudományegyetem

2020

Gyakran használt rövidítések jegyzéke

AF568:	Alexa Fluor 568 (fluoreszcens festék)
AF647:	Alexa Fluor 647 (fluoreszcens festék)
AOTF:	Acousto-optic tunable filter (akusztó-optikai modulátor)
APP:	Amyloid Precursor Protein
CW:	Continuous Wave (folytonos sugárzás)
DBSCAN:	Density-based spatial clustering of applications with noise
DIC:	Differential Interference Contrast (interferencia kontraszt)
DOF:	Depth of Focus (mélységélesség)
dsDNA:	double-stranded DNA (kettős szálú DNS)
dSTORM:	direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
EGF:	Epidermal Growth Factor (epidermális növekedési factor)
EM:	Electron Microscope (elektronmikroszkóp)
EPI:	EPI kivilágítási mód (a gerjesztő nyaláb merőleges a fedőlemezre)
FCS:	Fluorescence Correlation Spectroscopy (fluoreszcens korrelációs spektroszkópia)
FISH:	Fluorescent in situ hybridization
FLIM:	Fluorescence lifetime imaging (fluoreszcencia élettartam mérés)
FOV:	Field of View (látótér)
FRET:	Förster-type resonance energy transfer (Förster-féle rezonáns energiaátadás)
GLOX:	Glucose oxidase (glükóz-oxidáz)
GUI:	Graphical User Interface
HETERO-FRET:	Különböző molekulák közötti FRET
HILO:	Highly inclined illumination (nagy szögű kivilágítási mód)
HOMO-FRET:	Azonos molekulák körötti FRET
MEA:	Mercaptoethylamine (merkaptóetilamin)
MTF:	Modulation Transfer Function (Modulációs transzferfüggvény)
NPL:	National Physical Laboratory (Nemzeti Fizikai Kutatólaboratórium)
OSLO:	Optics Software for Layout and Optimization (optikai rendszerek optimalizálására alkalmas kommerciális szoftver)
PALM:	Photoactivated Localization Microscopy (fotoaktivációs lokalizációs mikroszkópia)

PFS:	Perfect Focus System (automatikus mintapozicionáló egység)
PSF:	Point Spread Function (pontátviteli függvény)
ROI:	Region of Interest (vizsgálandó terület)
SC laser:	Supercontinuum laser
SIM:	Structured Illumination Microscopy (strukturált kivilágítású mikroszkópia)
SLM:	Spatial Light Modulator
SMLM:	Single Molecule Localization Microscopy (egymolekula lokalizációs mikroszkópia)
STED:	Stimulated Emission Depletion (kényszerített emissziós kioltás)
STORM:	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (sztohasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia)
ThT:	Thioflavine-T (fluoreszcens festék béta-redők jelölésére)
TIRF:	Total Internal Reflection (teljes visszaverődés)

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés.....	6
2	Irodalmi áttekintés, előzetes eredmények és módszerek	8
2.1	A Rayleigh-féle feloldási küszöb és a mélységélesség	8
2.2	Szuperrezolúciós fluoreszcens mikroszkópiai módszerek	9
2.2.1	Strukturált kivilágítású mikroszkópia (SIM).....	9
2.2.2	Kényszerített emissziós kioltás (STED) mikroszkópia	10
2.2.3	Egymolekula lokalizációs mikroszkópia (SMLM).....	11
2.3	Alkalmazott szoftverek.....	19
2.3.1	OSLO.....	20
2.3.2	MatLab	20
2.3.3	Labview	20
3	Célkitűzések	21
4	Tudományos eredmények.....	23
4.1	A pontátviteli függvény módosítása kettősen törő lemez segítségével	23
4.1.1	Fókuszpontok szeparációja.....	24
4.1.2	A mélységélesség növelésének kísérleti kimutatása konfokális mikroszkóppal	25
4.1.3	Radiálisan és azimutálisan polarizált nyaláb generálása – elméleti eredmények.....	27
4.1.4	Radiálisan és azimutálisan polarizált nyaláb generálása – kísérleti eredmények.....	30
4.2	Tomográfia elvén működő, vonalpásztázó optikai mikroszkóprendszer (LSTOM) fejlesztése és optimalizálása.	33
4.2.1	A tomografikus vonalpásztázó mikroszkóp működési elve	33
4.2.2	Tomografikus vonalpásztázó mikroszkóp kísérleti megvalósítása	34
4.2.3	Asztigmias LSTOM (aLSTOM).....	36
4.3	Szuperrezolúciós lokalizációs optikai mikroszkópok tervezése, technikai megvalósítása és tesztelése.....	39
4.3.1	A Cambridge-i Egyetemen épített dSTORM rendszer (CAM_STORM)	39
4.3.2	A Nemzeti Fizikai Laboratóriumban épített STORM rendszer (NPL_STORM).....	41
4.3.3	A Szegedi Tudományegyetemen épített dSTORM rendszer (SZTE_STORM).....	43
4.3.4	RainSTORM.....	45
4.3.5	Példák a megépített STORM szuperrezolúciós rendszerek alkalmazására	49
4.4	Leképezési hibák a lokalizációs optikai szuperrezolúciós mikroszkópiában: következmények és lehetséges kompenzációk.....	54
4.4.1	TestSTORM	55
4.4.2	A mikroszkóprendszer által bevezetett műtermékek.....	60

4.4.3	Minta által bevezetett műtermékek	66
4.4.4	Algoritmusok által bevezetett műtermékek.....	67
4.5	Multimodális lokalizációs mikroszkópiás eljárások fejlesztése és alkalmazása	70
4.5.1	Kettőtörésen alapuló polarizáció-érzékeny STORM (bipolSTORM).....	70
4.5.2	Kettős-objektív elrendezésű multimodális STORM (mmSTORM)	74
4.6	Kvantitatív STORM	78
4.6.1	DNS kétszálú törési helyeinek klaszteranalízise	78
4.6.2	Szarkomer struktúrák geometriai kiértékelése	81
4.7	Fluoreszcencia anizotrópia mérésére alkalmas TIRF/EPI/HILO kivilágítású mikroszkóp fejlesztése és alkalmazása	84
4.7.1	A mérőrendszer kifejlesztése.....	84
4.7.2	P2Y1 receptor fehérje dimerizációjának időbeli követése és kvantitatív elemzése	87
4.7.3	Centralspindlin motoros doménjeinek regulációja	89
4.7.4	Kvantitatív fehérje-ligand kölcsönhatás mérése mikrofluidikai rendszerekben.....	90
5	Összefoglalás és távlati célok.....	93
6	Köszönetnyilvánítás	94
7	Felhasznált irodalom	95

1 Bevezetés

Az egyszerű nagyító elvén alapuló olvasóköveket már a középkorban is alkalmazták, de használatuk inkább az empirikus tapasztalásra, mintsem az optika elveinek ismeretére épült. A szemüvegek elterjedése már az újkorra tehető és az üveg finom megmunkálását igényelte. A mikroszkópok feltalálása az 1600-as évek elejére tehető és holland szemüveggéztők nevéhez fűződik. Sokáig érdekességként és nem tudományos eszközként használták. Áttörést Robert Hook *Micrographia* című, számos illusztrációval gazdagított munkájának a megjelenése hozott. Ebben a műben láthatott a nagyközönség először ízeltlábúakról és növényekről készített mikroszkopikus rajzokat, és ebben a könyvben használták először a *sejt* szót az élő rendszerek építőköveire utalva. A kezdeti mikroszkópokat kis látótér és alacsony képminőség jellemezte. A tudományos közösség számára is alkalmas mikroszkópok kifejlesztéséhez hosszú út vezetett. Ernst Abbe (1840-1905) tervezte meg az első akromatikus objektívet, dolgozta ki a képalkotás elméleti hátterét és adta meg az aplanatikus leképezés szükséges feltételét, a szinuszfeltételt. Kiterjedt fényforrásokat alkalmazva a tárgy homogén megvilágításának módszere August Köhler (1866-1948) nevéhez fűződik. Érdeemes megjegyezni, hogy a Köhler-féle kivilágítás a térbeli koherencia változtatására is lehetőséget ad. Az állati sejtek megfigyelésének egyik nehézsége, hogy a magas transzmisszió miatt a kialakuló intenzitáskép kontrasztja alacsony. A fény polarizációján alapuló fáziskontraszt és differenciális interferencia mikroszkópok kifejlesztése Frits Zernike (1888-1966) és Georges Nomarski (1919-1997) nevéhez fűződik. Az alacsony háttérű 3D képalkotást lehetővé tevő konfokális elvet Marvin Minsky (1927-2016) szabadalmaztatta. A pásztázó konfokális mikroszkópok mára széles körben elterjedt és elfogadott eszközzé váltak a biológiai és orvosi laboratóriumokban.

A fény diffrakciója határt szab a térbeli feloldásnak. A Rayleigh-féle feloldási küszöb szerint két pontszerű fényforrás akkor megkülönböztethető, ha az egyik diffrakciós képének első minimuma a másik főmaximumára esik. A látható tartományban ez ≈ 250 nm-re korlátozza a feloldást. Egy Albert Einsteinnek tulajdonított idézet szerint „*Mindenki tudja, hogy bizonyos dolgokat nem lehet megvalósítani, mígnem jön valaki, aki erről nem vesz tudomást, és megvalósítja*”. A mikroszkópiában az áttörés William Moerner, Eric Betzig, és Stefan Hell nevéhez fűződik, akik a szuperrezolúciós mikroszkópok kifejlesztéséért 2014-ben megosztva nyerték el a kémiai Nobel-díjat.

Dolgozatomban az elmúlt 15 évben az optikai szuperrezolúció terén elért eredményeimet foglalom össze. A tématerülettel közvetlenül az egyetem elvégzése után ösztöndíjas kutatóként a houstoni Rice Egyetemen kezdtem el foglalkozni. Frank Tittel, Bor Zsolt és Szabó Gábor

professzorok témavezetésével optikai mikrolitográfiai alkalmazásokra fejlesztettünk feloldóképességet növelő módszereket. A PhD dolgozatomat is ebben a témában írtam és védtem meg a Szegedi Tudományegyetemen. A doktori után posztdoktorként visszahívtak a Rice Egyetemre, ahol Robert Curl szakmai vezetésével spektroszkópiai kutatásokban vettem részt. A téma nem kötődik szorosan a szuperrezolúcióhoz, ezért a dolgozatomban nem is térek ki ezekre az eredményekre, de az itt megszerzett tudás nagyon hasznosnak bizonyult később, a fluoreszcens mikroszkópiai kutatásoknál. Miután visszatértem Szegedre, OTKA és OM posztoktori ösztöndíjasként végzett kutatásaim nyomán születtek meg a PSF manipulációval, a saját fejlesztésű konfokális mikroszkóppal és a tomografikus mikroszkóppal kapcsolatos eredmények. Ezeket foglalom össze az első két tézispontban (**4.1 és 4.2 fejezet**). 2009-ben hároméves ösztöndíjat nyertem a Cambridge-i Egyetemre, ahol lokalizációs szuperrezolúciós mikroszkóp fejlesztésével és alkalmazásával kezdtem foglalkozni. Az angliai évek alatt két dSTORM szuperrezolúciós rendszer megépítésében vettem részt. Miután 2012 végén visszatértem Szegedre, egy „saját” dSTORM rendszer megépítését tűztem ki célul, amely a mikroszkóp optikai fejlesztésén túl egy alkalmazásorientált kutatói hálózatnak is részét képezi az orvos és biológus kollégákkal folytatott szoros együttműködésnek köszönhetően. Az elmúlt hat évben közel húsz kutatócsoporttal dolgoztam együtt és számos közös munka eredményét publikáltuk szakfolyóiratokban. A lokalizációs módszerrel elért eredményeimet négy tézispontban foglalom össze (**4.3-4.6 fejezet**). Az utolsó pontban a fluoreszcens anizotrópia mikroszkópiai kutatásaimat írom le (**4.7 fejezet**).

A dolgozatban elért eredmények jellegüknél fogva szinte mindig csapatmunka során jöttek létre. Ezt jól mutatja, hogy a témához kapcsolódóan, megosztott vagy teljes témavezetésemmel 4 PhD dolgozat és közel 20 szakdolgozat, diplomamunka és TDK dolgozat született. A mikroszkóp fejlesztésénél mindig fontos szempont volt az alkalmazhatóság, azaz hogy tényleges biológiai kérdések megválaszolására alkalmas rendszert fejlesszünk. A dolgozatban szereplő ábrák jelentős részét (a forrás megjelölésével) változatlan formában vettem át a megjelent cikkekből, ezért ezeken az ábrákon az eredeti angol feliratok olvashatók.

2 Irodalmi áttekintés, előzetes eredmények és módszerek

2.1 A Rayleigh-féle feloldási küszöb és a mélységélesség

Az optikai képalkotás minőségének kiértékeléséhez számos jósági tényezőt vezethetünk be, amelyek eltérő szempontból jellemzik a végső képet. A kép kontrasztja a maximális és minimális intenzitásértékekkel adható meg ($C=(I_{max}-I_{min})/(I_{max}+I_{min})$). A modulációs transzfer függvény (*MTF*) a térbeli frekvencia függvényében adja meg a kontraszt értékét, ezáltal informatívabb módon jellemzi a képalkotást. A rendszer által bevezetett monokromatikus és kromatikus optikai leképezési hibákat megadhatjuk a Zernike vagy Seidel koefficiensekkel. Az optikai mikroszkópiában a végső képet gyakran az optikai rendszer pontátviteli függvényével (point spread function: *PSF*) jellemezzük. Ha a rendszer optikai leképezési hibáktól mentes, csak a fény diffrakciója limitálja a feloldást. A *PSF*-et ebben az esetben az Airy-féle diffrakciós folttal jellemezhetjük, amelynek laterális méretét a numerikus apertúra (*NA*) és a hullámhossz (λ) határozza meg. A Rayleigh-féle feloldási küszöb szerint két pontszerű fényforrás (pl. két fluoreszcens molekula) még akkor is feloldható, ha az egyik diffrakciós foltjának első minimuma a másik maximumára esik. Az optikai feloldást gyakran ennek a küszöbnek a segítségével szoktuk megadni: $R=k*\lambda/NA$, ahol k arányossági tényező függ az alkalmazott fény koherencia fokától és az apertúra alakjától. A Rayleigh-féle feloldási küszöb értékei az optikai mikroszkópiában tipikusan alkalmazott négy hullámhosszra és három numerikus apertúrára a 2.1 táblázatban láthatók. A mélységélesség (depth of field: *DOF*) azt az axiális tartományt adja meg, amelyen belül a kép minősége egy meghatározott küszöbérték felett van. Az optikai leképezés során ezt az értéket gyakran a $DOF=2\lambda/NA^2$ képlettel jellemezzük, de érdemes megjegyezni, hogy nagysága erősen alkalmazásfüggő. Érdemes megemlíteni, hogy a térbeli feloldás és a mélységélesség hasonlóképpen függ a numerikus apertúrától és a hullámhossztól. Az optikai litográfiában ez problémát jelent, hiszen a finomabb struktúrák leképezése a „vastag” fotorezisztbe a lecsökkent *DOF* miatt nem lehetséges. Itt a feladatot a feloldóképesség növelése jelenti a mélységélesség megtartása mellett. Az optikai mikroszkópiában a mélységélesség csökkenése a feloldás javulásán túl azért is előnyös, mert lehetőséget ad a minta 3D leképezéséhez.

Jól látszik, hogy a térbeli feloldás növelésére két tradicionális megközelítés létezik: a hullámhossz csökkentése és a numerikus apertúra növelése. Az optikai mikroszkópiában a hullámhossz csökkentése tipikusan a háttérzaj növelésével jár, mert a nagyobb energiájú fotonok nagyobb valószínűséggel nyelődnek el, autofluoreszcenciát okozva. A modern technikák

érzékenyek a háttérzajra, ezért gyakran preferált az infravörös tartomány alkalmazása, ami az elérhető feloldási küszöb csökkenését jelenti. A numerikus apertúra növelése szintén korlátozott; immerziós objektívekkel 1,5-nél nagyobb érték nem érhető el. A fentiek alapján megállapítható, hogy a klasszikus képalkotás segítségével a hullámhossz felénél kisebb struktúrák leképezése nem lehetséges.

hullámhossz NA	405 nm	488 nm	561 nm	647 nm
0,1	2471 nm	2977 nm	3422 nm	3947 nm
0,8	309 nm	372 nm	428 nm	493 nm
1,5	165 nm	198 nm	228 nm	263 nm

2.1 táblázat: Rayleigh-féle feloldás függése a numerikus apertúrától és a hullámhossztól

2.2 Szuperrezolúciós fluoreszcens mikroszkópiai módszerek

A fluoreszcens mikroszkópiában a mintát fluoreszcens festékkel jelölik meg. A munkám során használt minták többsége immunhisztokémiai jelöléssel lett megfestve, azaz elsődleges és másodlagos antitesteket használtunk a kérdéses fehérje vagy sejtalkotó jelölésére. A fluoreszcens festékek specifikus jelölést biztosítanak, azaz nagy hatásfokkal a célmolekulához kötnek, a nem specifikus bekötésekből származó fluoreszcencia megfelelő protokollok alkalmazása esetén elhanyagolható. A fluoreszcens mikroszkópok térbeli feloldását a Rayleigh-féle feloldási küszöbvel jellemezhetjük. Az optikai mikroszkópia területén jelenleg három nagyfeloldású módszer áll a fejlesztések homlokterében: A strukturált kivilágítás, a kényszerített emissziós kioltáson alapuló STED és a lokalizációs mikroszkópia. A következőkben ezeket mutatom be, különös tekintettel a lokalizációs módszerre, amelynek fejlesztése a dolgozat jelentős részét is képezi.

2.2.1 Strukturált kivilágítású mikroszkópia (SIM)

A strukturált kivilágítású mikroszkópiában (Structured Illumination Microscopy - SIM) a fluoreszcens mintát egy térben modulált, tipikusan \sin^2 intenzitásprofilú nyalábbal gerjesztik [1]. A modulációt két nyaláb interferenciája okozza, ahol a nyalábokat praktikusán holografikusan, vagy rácsok diffrakciós rendjeivel hozzák létre. A SIM módszerben 2D képet vesznek fel a

gerjesztési mintázat különböző fázisai és irányítottságai mellett. A modulált gerjesztés következtében kialakuló Moiré mintákat hagyományos, széles látóterű mikroszkóp elrendezéssel veszik fel 2D kamerával (CMOS). A nagy feloldású kép rekonstrukciójához minimálisan $3 \times 3 = 9$ kép felvétele szükséges. A végső kép egy összetett algoritmus alkalmazásával rekonstruálható, amely során a fluoroforok térbeli eloszlásfüggvényének Fourier-transzformáltja $R(\mathbf{k})$ mellett a gerjesztő mintázatot jellemző \mathbf{k}_g rácsvektorral eltolt $R(\mathbf{k} + \mathbf{k}_g)$ és $R(\mathbf{k} - \mathbf{k}_g)$ függvényeket is ki lehet számítani. Mivel a gerjesztő mintázatot tipikusan ugyanaz a mikroszkópjelző hozza létre, mint amelyik a leképezést is végzi, a SIM mikroszkóppal kétszeres térbeli feloldásnövelés érhető el. A minta fluoreszcens jelölésekor hagyományos festési protokollokat követhetünk és a leképezés során nincs szükség speciális pufferfolyadék alkalmazására. Ez lehetőséget biztosít élősejtes kísérletek elvégzésére is. A módszer további előnye, hogy a gerjesztő mintázat gyors térbeli eltolásával (haladó hullámú gerjesztés) és forgatásával valós idejű leképezés (>10 Hz) valósítható meg [2, 3]. A SIM technika viszonylag könnyen implementálható [4], illetve a szükséges vezérlő és kiértékelő programok jórészt szabad hozzáférésűek. E körülmények nagymértékben segítik a módszer széles körű elterjedését. A nemlineáris SIM [5] a gerjesztett állapot telítődését használja ki és tovább növeli a térbeli feloldást (<50 nm).

2.2.2 Kényszerített emissziós kioltás (STED) mikroszkópia

A kényszerített emissziós kioltás (STimulated Emission Depletion - STED) mikroszkóp egy pásztázó konfokális elrendezésen alapuló módszer [6]. A gerjesztő nyalábot (λ_{ger}) a mintába fókuszáljuk, ahol a feloldási küszöbnek megfelelő méretű térfogatban a minta fluoreszkál, azaz a fluoreszcens molekulák abszorbeálnak és spontán emisszió révén visszakérülnek alapállapotba. A festékek fluoreszcencia élettartama tipikusan 1-3 ns és erősen függ a lokális kémiai környezettől. A stimulált vagy kényszerített emisszió során egy megfelelő hullámhosszú ($\lambda_{STED} > \lambda_{ger}$) kioltó- vagy STED-nyaláb lép kölcsönhatásba a gerjesztett állapotban lévő festékmolekulával, és azt visszakényszeríti alapállapotba. A folyamat során a festékmolekula a STED-fotonnal egyező paraméterekkel rendelkező fluoreszcens fotont bocsát ki. A STED nyalábprofilja úgy van kialakítva, hogy a nyaláb közepén az intenzitása zéró, azaz a gerjesztett térfogat közepén a fluoreszcens molekulák nem kényszerített emisszió révén kerülnek vissza az alapállapotba. A tórusz formába fókuszált STED nyaláb lecsökkenti a gerjesztett térfogatot és ezáltal javítja a térbeli feloldást. A STED módszerrel <50 nm térbeli feloldás érhető el, és a konfokális elrendezésnek köszönhetően 3D leképezés is megvalósítható. A feloldás a STED nyaláb intenzitásával állítható be:

$$R = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + \frac{I_{STED}}{I_{SAT}}}},$$

ahol I_{sat} azt a küszöbintenzitást jelöli, ahol 50%-os valószínűséggel kerül vissza alapállapotba a molekula [7]. A feloldás jelentős javítása időnként igen nagy teljesítményű ($>1 \text{ GW/cm}^2$) gerjesztést igényel. A STED módszer kifejlesztéséért 2014-ben Stefan W. Hellnek ítelték a kémiai Nobel-díjat.

2.2.3 Egymolekula lokalizációs mikroszkópia (SMLM)

A hagyományos fluoreszcens módszerekben a gerjesztett térfogatban lévő festékmolekulák az abszorpció/spontán emisszió cikluson keresztül fotonokat bocsátanak ki. A képalkotás térbeli feloldását a rendszer pontátviteli függvénye jellemzi, ami egy idealizált pontszerű fényforrás (pl. egy fluoreszcens festékmolekula) képe. A leképezés során detektált $D(\mathbf{r})$ kép a fluoreszcens molekulák $R(\mathbf{r})$ térbeli eloszlásfüggvényének és a rendszer pontátviteli függvényének a konvolúciója

$$D(\mathbf{r}) = R(\mathbf{r}) \otimes PSF.$$

A Rayleigh-féle feloldási küszöb a PSF méretéhez köti a még megkülönböztethető molekulák távolságát. Ha két fluoreszcens molekula e küszöbnél közelebb van egymáshoz, akkor a mikroszkóprendszer által létrehozott PSF -ek nagymértékben átfednek és a két molekula megkülönböztethetlenné válik. Az egymolekula lokalizációs mikroszkópia (Single Molecule Localization Microscopy – SMLM) során a fluoreszcens molekulák gerjesztését időben szétválasztjuk. A képfelvétel során el kell érni, hogy a PSF karakterisztikus méretének megfelelő gerjesztett térfogatban csak egyetlen fluoreszcenciára képes molekula legyen. A mikroszkóprendszer e térben és időben szétválasztott egyedi fluoreszcens molekulák képeit rögzíti. Optikai leképezési hibáktól mentes, ún. diffrakciólimitált rendszert feltételezve az egyes képkockákon detektált kép

$$D(\mathbf{r}) = \sum_{i=1}^N \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_i) \otimes PSF,$$

ahol N a képkockán található fluoreszcens molekulák számát, míg \mathbf{r}_i ezen molekulák helyvektorait

jelöli. A feltétel szerint az i -dik molekula *PSF* környezetében nincs másik fluoreszcens molekula, azaz tetszőleges (i, j) molekulapárra

$$|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j| > \text{Rayleigh-féle feloldási küszöb.}$$

A festékmolekulák aktív (fluoreszcens) állapotainak időbeli szétválasztása és kontrollja az SMLM módszer központi feladata. Számos módszer ismert, amelyek közül itt most hármat ismertetek röviden:

Fotoaktivációs lokalizációs mikroszkópia (PALM): A PALM (PhotoActivation Localization Microscopy) technikában a mintát fotoaktiválható fluoreszcens fehérjével (pl. paGFP) jelölik [8, 9]. A fotoaktiválható fehérjék natív állapotban nem fluoreszkálnak, de egy aktivációs lézer hatására a fehérjében konformációváltozás jön létre és a fehérje bekapcsol, azaz fluoreszcenssé válik. A gyakorlatban a gerjesztő (readout) és az aktivációs lézerek folytonos üzemmódban gerjesztik, illetve aktiválják a mintát. Amíg az aktiváló lézer teljesítménye az aktivált molekulák, addig a gerjesztő lézer intenzitása az aktivált molekulák által emittált fotonok számával arányos. A gyakorlatban az aktiváló lézer alacsony, míg a gerjesztő lézer magas teljesítményen üzemel, azaz alacsony értéken tartják az aktív állapotban lévő molekulák számát, de azokat magas fotonzámmal detektálják. A PALM módszer előnye, hogy a fluoreszcens fehérjéket maguk a sejtek expresszálják le, azaz erősen szelektív jelölést lehet végezni velük. A módszer nem alkalmaz toxikus puffert és élősejtes kísérleteket is lehetővé tesz. A PALM módszer kifejlesztéséért és gyakorlati alkalmazhatóságának demonstrálásáért 2014-ben Eric Betzig és William L. Moerner kémiai Nobel-díjban részesült.

Sztokasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia (STORM): A STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy) technikában a célmolekulát egy aktivátor (pl. Cy5, Cy5.5 és Cy7) és egy riporter (pl. AF405, Cy3 és Cy2) festékpárral jelölik meg [10]. Az aktivációs lézer impulzus, míg a kiolvasó lézer folytonos üzemmódban működik. Többszínű leképezés lehetséges egy aktiváló festékkal, amikor ugyanazt az aktiváló lézert használjuk aktiválásra, de a riporter festékek emissziós jeleit spektrálisan szétválasztjuk. A kromatikus hiba csökkentésére kidolgozták az egy riportert, de eltérő aktiváló festéket használó módszert. Ezen eljárás során a spektrális szétválasztást az eltérő hullámhosszon működő aktiváló lézerek végzik, a detektálás mindig ugyanabban, a riporter emissziója által meghatározott spektrális tartományban történik. A módszer speciális pufferfolyadékot igényel.

Direkt sztochasztikus optikai rekonstrukciós mikroszkópia (dSTORM): A dSTORM (direct STochastic Optical Reconstruction Microscopy) módszerben a célmolekula egy darab festékmolekulával van megjelölve [11, 12]. A fluoreszcens festék kikapcsolása itt is speciális pufferfolyadékot igényel, ami kettős szerepet tölt be. Egyrészt tartalmaz egy tiol (-R-S-H) csoporttal rendelkező vegyületet (általában β -Merkaptoetilamint vagy β -Merkaptoetanolt), ami egy fotokémiai reakció során beköt a gerjesztett tripllett állapotban lévő molekula fluoreszcenciáért felelős részéhez és kikapcsolja azt. Ezáltal a molekula egy hosszú élettartamú, nem fluoreszcens (OFF-state) állapotba kerül. Másrészt a puffer tartalmaz egy enzimátikus oxigénelvonást biztosító rendszert. Az oxigén koncentrációjának alacsonyan tartása csökkenti a nagy teljesítményű (2-5 kW/cm²) lézer hatására bekövetkező foto-bleachinget. A kikapcsolt állapotba került festékmolekulákat reaktiválni lehet egy, a gerjesztésnél nagyobb fotonenergiájú lézerrel (általában 405 nm). Itt meg kell említeni, hogy a témában megjelent cikkek és könyvek jelentős száma ellenére a dSTORM technikában használt szerves festékek fotokapcsolásának pontos mechanizmusa nem tisztázott [13].

A fluoreszcens molekulák térben és időben szétválasztott detektálása lehetőséget biztosít az egyedi molekulák térbeli helyzetének nagy pontosságú megadására. A fent leírt mérési módszer biztosítja, hogy a detektált egyedi felvillanások egy-egy pontszerűnek tekinthető molekula képeinek, azaz a rendszer pontátviteli függvényének (*PSF*) tekinthetők. A lokalizációs módszerekben az egyedi molekulák képeire 2D Gauss-függvényt illesztünk. A Gauss-függvény választásának három fontos oka is van:

- Az SMLM módszerekben az egyedi festékmolekulák kevés fotont (tipikusan <10000) emittálnak, ezért a detektálás határfokának növelésére nagy *NA*-jú (>1,4) mikroszkópobjektíveket használnak. A nagy numerikus apertúrájú objektívek *PSF*-je jó közelítéssel Gauss-eloszlást mutat [14].
- A 2D Gauss-görbe illesztése egyszerű matematikai feladat, a változók szétválaszthatósága miatt gyors algoritmusok léteznek.
- A molekula pozícióját az illesztett görbe maximumának a koordinátája adja meg, az illesztett görbe tényleges lefutása másodrangú.

A maximumhely illesztésének pontossága adja meg a lokalizációs pontosságot, azaz a

fluoreszcens molekulák helyének a bizonytalanságát. A lokalizációs pontosság a zajtól (pl. autofluoreszcencia) és a detektált fotonszámától függ [15]:

$$\sigma_x^2 = \frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^4},$$

ahol s a *PSF* standard deviációja, a a detektor pixelmérete, N a detektált fotonszám és b a fluoreszcens zaj szintjét jellemző mennyiség. Fontos megemlíteni, hogy a lokalizációs pontosság optimalizálásához a *PSF* foltméretét (s) illeszteni kell a kamera pixelméretéhez (a). A számítások azt mutatják, hogy ideális esetben az s/a hányados 1 körül van. Túl nagy nagyítást alkalmazva a *PSF* mérete nagy lesz és a fluoreszcens molekula által emittált fotonok sok pixelt világítanak ki. Ebben az esetben lecsökken az egyes pixeleken a jel/zaj arány és romlik a lokalizációs pontosság. Ellenkező esetben, amikor túl kicsi a nagyítás, az összes emittált foton egy pixelre eshet, lehetlenné téve a lokalizációt. A hányados optimális értékét a nagyítás hangolásával lehet beállítani. Meg kell azonban említeni, hogy a *PSF* hullámhosszfüggése miatt szigorúan csak egy gerjesztési hullámhosszra lehet optimalizálni. Többszínű leképezés esetén célszerű a központi (középső) hullámhosszat használni. A fluoreszcens háttér csökkentése nagymértékben függ a kivilágítás módjától. A minta jellegétől függően különböző kivilágítási módokat szokás használni:

EPI fluoreszcens kivilágítás esetén a D átmérőjű gerjesztő lézernyalábot a mikroszkópobjektív hátsó fókuszpontjába fókuszáljuk. A nyaláb méretét a mintán (D_{minta}) a fókuszáló lencse és az objektív fókusz távolságának a hányadosa adja meg: $D_{minta} = D \times f_{objektív} / f_{lencse}$. EPI kivilágításkor a mintát teljes mélységében gerjesztjük, a leképezés mélységélességét az objektív mélységélessége ($DOF \sim \lambda / NA^2$) határozza meg. Itt érdemes megemlíteni, hogy a mikroszkópobjektívek hátsó fókusza a lencserendszer belsejében van (pl. Nikon M= $\times 100$ objektív esetén $f_{objektív} = 2 \text{ mm}$). Mivel az objektíveket nem az SMLM-hez szükséges nagy lézerteljesítményekhez tervezték, azok idővel károsodhatnak.

TIRF (teljes visszaverődésen alapuló) kivilágításkor a nyalábot a mikroszkópobjektív hátsó fókusz síkjába, az optikai tengelytől d távolságra fókuszáljuk telecentrikusan [16]. Az objektívet az optikai tengellyel $\alpha = \arctan(d / f_{objektív})$ szög bezáró kollimált nyaláb hagyja el. Kellően nagy numerikus apertúrájú objektívet alkalmazva az α beesési szög meghaladja az üveg/víz (fedőlemez/minta) határfelülethez tartozó kritikus szöget. Ekkor a nyaláb teljes visszaverődést szenved és a minta csak a felület közvetlen közelében kialakuló vékony ($\sim 100 \text{ nm}$) evaneszcens

térben gerjesztődik. A módszer nagymértékben csökkenti a fluoreszcens háttérrel és a mélységélességet. Gyakran alkalmazott módszer a sejtmembrán vizsgálatoknál, mert a leképezés mélységélességét az evaneszcens tér behatolási mélysége határozza meg.

Semi-TIRF kivilágítás esetén a fedőlemez/minta felületet a határszögnél kisebb szögben éri el a gerjesztő nyaláb, azaz nem jön létre teljes visszaverődés, de a mintában a nyaláb az optikai tengelyhez képest ferde szögben terjed. A módszer sok esetben csökkenti a fluoreszcens háttérrel, de csak akkor alkalmazható, ha a vizsgálni kívánt tartomány a fedőlemez közelében van.

HILO (ferdeszögű) kivilágításkor a nyalábot a mikroszkópobjektív hátsó fókusz síkjába, az optikai tengelytől d távolságra fókuszáljuk [17]. A fókuszálással egyidejűleg a nyaláb tengelyét az objektív optikai tengelyéhez képest elforgatjuk. Ezáltal a mintát kivilágító ferde nyaláb eltolódik és a mintán belül egy kb. 5 μm mélységű réteget világít ki. A módszer előnye, hogy szelektíven lehet a mintán belül egyes mélységekben gerjeszteni. Mivel a nyaláb szélesebb, mint az objektív mélységélessége, a leképezés mélységélességét az EPI kivilágításhoz hasonlóan az objektív mélységélessége határozza meg.

A lokalizációs mikroszkópiában az optimális kivilágítási mód mindig mintafüggő, és célszerű a mérés kezdetén egy optimalizálási folyamat során kiválasztani a legmegfelelőbbet. Az optimális módszer nem feltétlenül egyezik meg a hagyományos leképezéshez használt legjobb módszerrel. Sejtmembránban lezajló folyamatok vizsgálatára például tipikusan TIRF kivilágítást javasol a szakirodalom a citoplazma fluoreszcens háttérének csökkentése végett. A dSTORM módszerben azonban a gerjesztő fénytjeljesítménynek el kell érnie egy küszöbértéket, hogy a molekulák döntő része kikapcsolt állapotba kerüljön. A TIRF kivilágítás során kialakuló evaneszcens tér exponenciálisan cseng le, azaz a fedőlemeztől távolodva a molekulák egyre nagyobb valószínűséggel bekapcsolt (ON-state) állapotban maradnak. Mivel az evaneszcens tér behatolási mélysége kisebb, mint az objektív mélységélessége, a fluoreszcens állapotban maradt molekulák megnövelik a háttérrel.

A lokalizációkat általánosságban három csoportra bonthatjuk:

- i. Valós pozitív: Valóban létező izolált fluoreszcens molekulát detektálunk és lokalizálunk.
- ii. Valós negatív: Valóban létező fluoreszcens molekulát nem detektálunk.
- iii. Nem valós pozitív: Nem létező fluoreszcens molekulát vagy több molekulát együttesen

detektálunk és lokalizálunk.

A lokalizációs mikroszkópia kifejlesztésének elsődleges motivációja a laterális térbeli feloldás növelése volt. A 2006-ban publikált PALM és STORM megoldások egy nagyságrenddel javították a feloldást és <10 nm térbeli struktúrák vizsgálatát tették lehetővé. A 2D leképezésen túl hamar felmerült az igény további modalitások kifejlesztésére. Az elmúlt évtizedben számos 3D, polarizáció érzékeny és többszínű SMLM technikát fejlesztettek ki és alkalmaztak biológiai minták szuperrezolúciós leképezésére. A fontosabb multimodális módszereket a 2.2 táblázatban foglaltam össze.

	3D leképezés	polarizáció érzékeny detektálás	többszínű leképezés
PSF közvetlen kiértékelés	TRABI [18]	[19]	
PSF manipuláció	Asztigmatikus [20, 21] Airy-nyaláb [22]	Kettőtörés [23]	prizma gerjesztési időbeli modulációja (PAINT-ben)
Kép szétválasztás	Double helix [24] Biplane [25]	polarizációs nyalábosztó [26-28]	Nullad és elsőrendben használt rács [28] Dikroikus szétválasztás [29, 30]
Kettős objektív	Interferometrikus [31] Kombinált asztigmatizmus [32] Ön-interferencia [33]		

2.2 táblázat: Multimodális SMLM technikák

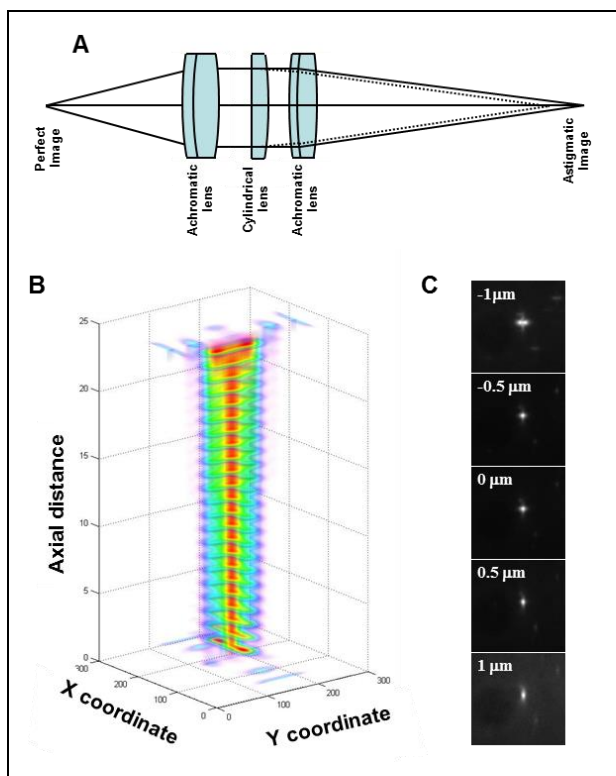
DOF limitált 3D lokalizációs módszerek

A 3D SMLM megnevezés kissé félrevezető, mert e technikák tipikusan a lencse mélységélessége által meghatározott tartományon (~ 1 μ m) belül lokalizálják a molekulák axiális pozícióját. Valódi 3D képek (az axiális és a laterális képméret közel azonos) felvételéhez egymást fedő szeleteket szekvenciálisan kell felvenni és regisztrálni. Mivel a megfigyelni kívánt minták ezt a méretet ritkán követelik meg, illetve a módszer jelentősen megnövelné a mintavételi időt, az ilyen típusú, léptetéssel kombinált SMLM felvételekre ritkán kerül sor. A könnyebb áttekinthetőség miatt a 3D módszereket négy csoportra bontottam.

A PSF közvetlen kiértékelésén alapuló 3D módszerek a PSF manipulációja nélkül, a PSF alakjából és intenzitásából következtetnek vissza a fluoreszcens molekula axiális pozíciójára. A TRABI (temporal, radial-aperture-based intensity estimation) módszerben pl. a PSF defókuszálás hatására bekövetkező kiszélesedését használják fel az axiális pozíció meghatározására [18]. A módszer gyorsan és egyszerűen implementálható a meglévő lokalizációs szoftverekbe. Hátránya,

hogy a kiszélesedés szimmetrikus, azaz nem tesz különbséget a fókuszsík alatt és felett azonos távolságra lévő molekulák között. Ennek kiküszöbölésére a módszert kombinálták a biplane technikával, és 600 nm tartományban 17 nm-es precizitást értek el.

A **PSF manipulációján alapuló 3D módszerek** a fluoreszcens molekula axiális pozícióját a PSF alakjába kódolják. Az egyik legelterjedtebb technika az asztigmias 3D módszer, amikor egy megfelelő fókusztávolságú hengerlencsét helyezünk a detektorkarba. A módszer jól ismert, például CD-lejátszóknál alkalmazzák a fókusztávolsági hiba meghatározására [34]. A STORM mikroszkópiában Zhuang kutatócsoportja 2008-ban alkalmazta először [21] és azóta széles körben elterjedt. A gyors elterjedés oka egyszerűségében és könnyű implementálhatóságában rejlik. A hengerlencse enyhe asztigmatizmust vezet be, és az elliptikusan torzult PSF alakja ad információt az axiális pozícióról [20]. A mérés tipikusan egy kalibrációs lépéssel kezdődik, amikor például fluoreszcens gyöngyöket használunk mintaként, és egy precíz (pl. piezó) eltoló segítségével felvesszük a *PSF* alakját. Az elliptikus torzulás miatt a *PSF* elveszti hengerszimmetriáját. A σ_x és σ_y értéke eltér a lokalizáció szempontjából optimális $\sigma_{x,y}=1$ pixel értéktől, ezért eltérő lokalizációs pontosságot ad a két laterális irányban.



2.1 ábra: Asztigmatikus 3D lokalizációs mikroszkópia. Hengerlencsét helyezve az emissziós karba (A) a PSF torzul és elliptikussá válik (B). Az ellipszis alakja információt hordoz a molekula axiális pozíciójáról (C).

A kép szétválasztásán alapuló 3D módszerek az emittált fotonokat a detektorkarban kettéválasztják. A leképezés során a kamera egy fluoreszcens molekula képét két foltként detektálja, melyek relatív intenzitása, mérete vagy orientációja hordoz információt a molekula axiális pozíciójáról. A biplane [25] eljárásban egy 50%-os nyalábosztóval választják ketté az emittált fotonokat és a két kar között optikai úthosszkülönbséget (L) hoznak létre. Ezért a kamerán detektált két folt ugyanannak a molekulának egymáshoz képest L/M^2 -el defókuszált képe. A módszer megtartja a PSF hengerszimmetriáját, ezért izotróp lokalizációt biztosít. Moerner kutatócsoportja 2008-ban egy másik 3D módszert fejlesztett ki, ami kettős-spirál (double-helix) néven vált ismertté [24]. A módszer egy $M=1$ -es nagyítású 4f rendszert alkalmaz a detektorkarban. A 4f rendszer lencséinek közös fókusz síkjában egy reflektív fázismaszkkal (SLM) manipulálja a PSF alakját. A kialakuló kettős spirál miatt a kamera két foltot detektál, melyek relatív orientációja ad információt a festékmolekula axiális pozíciójáról. A módszer $2\ \mu\text{m}$ axiális tartományban izotróp, $<20\ \text{nm}$ lokalizációs pontosságot biztosít [35]. A módszer hátránya az SLM-en fellépő fényvesztés, ami kezdetben elérte a 75%-ot.

A kettős objektívek alkalmazásán alapuló 3D módszerek közül az interferometrius módszer a legismertebb [31]. A minta két, egymással szembe fordított immerziós objektív között helyezkedik el. A két objektív által összegyűjtött fotonok egy speciális háromutas nyalábosztón haladnak keresztül és eltérő fázisokkal három öninterferencia képet hoznak létre egyidejűleg három kamerán. Az interferenciakép intenzitása a molekula axiális pozíciójától függ. A z koordináta pontos meghatározásához három intenzitásértékre van szükség. A módszerrel $<20\ \text{nm}$ feloldást értek el egy korlátozott $0,25\ \mu\text{m}$ axiális tartományban. Az eljárás hátránya, hogy nehezen implementálható meglévő mikroszkóprendszerekbe, és a három kamera nagyon költségessé teszi a megvalósítást.

Polarizáció-érzékeny lokalizációs módszerek

A lokalizációs mikroszkópiában a fluoreszcens festékek általában egy flexibilis linkeren keresztül kötődnek a célmolekulához és a bekapcsolt (ON-state) állapot 5-30 ms-os ideje alatt az emissziós dipólusok iránya bejárja az egész 4π térszöget. Ennek következtében a fluoreszcens fény nem polarizált, és a polarizáció érzékeny detektálás nem ad további információt a mintáról. Esetenként a festék dipólmomentuma kötött, és polarizáció érzékeny detektálással meghatározhatjuk a molekulák irányítottságát vagy feltérképezhetjük közvetlen környezetüket. Az egymolekula anizotrópiás mérésekre számos technikai megoldás született az elmúlt években. A javasolt eljárások döntő részében egy polarizációs nyalábosztóval bontják ketté a fluoreszcens

fényt. A fluoreszcencia anizotrópiát (r) és a polarizáció fokát (p) a gerjesztő fény polarizációjával párhuzamos (I_{\parallel}) és merőleges (I_{\perp}) komponensekből számíthatjuk ki:

$$r = \frac{I_{\parallel} - G \times I_{\perp}}{I_{\parallel} + G \times 2I_{\perp}} ; \quad p = \frac{I_{\parallel} - G \times I_{\perp}}{I_{\parallel} + G \times I_{\perp}},$$

ahol a G -faktor a két karban mért intenzitások hányadosát jelenti $r=0$ esetén. A molekulák sokaságára időben átlagolt (steady-state) fluoreszcencia anizotrópia maximális értéke $r=0,4$. Ekkor a molekulák izotróp elrendezésben teljesen rögzítettek és nincs energiaátadás (FRET) a környezetükkel [36]. Az anizotrópia mértéke csökken, ha a molekulák elfordulnak a gerjesztett állapot időtartama alatt, vagy FRET révén egy másik molekula emissziója játszik szerepet. Teljes depolarizáltság esetén az anizotrópia értéke zéró.

Többszínű lokalizációs módszerek

A fluoreszcens mikroszkópia egyik nagy előnye, hogy a minta egyes alkotóelemei (fehérjék, sejtalkotók, struktúrák stb.) specifikusan, különböző festékekkel jelölhetőek meg, és a mérés során spektrálisan szétválasztott képek a kiértékelési folyamat során egymáshoz regisztrálhatók. A lokalizációs módszereknél is lehetőség nyílik a többszínű detektálásra, de számos, a klasszikus képalkotásnál nem jelentkező problémát kell megoldani.

- (i) A kromatikus hiba jelentősebb hibát vezet be, mint a lokalizációs módszer térbeli feloldása, ezért a rendszert kalibrálni kell.
- (ii) Az eltérő festékek eltérő puffert igényelnek az ideális villogási dinamika eléréséhez.
- (iii) A festékek bleach-elődése miatt a képek felvételi sorrendje kritikus.

Számos módszert és festékkombinációt javasoltak a többszínű dSTORM praktikus megvalósítására. Tapasztalatunk szerint a legjobb festékpárnak az Alexa Fluor 647 (vagy ATTO 647) és a CF568 bizonyult.

2.3 Alkalmazott szoftverek

A dolgozatban bemutatott eredmények döntő részét saját fejlesztésű optikai elrendezések és módszerek segítségével értem el. Természetesen számos gyári eszközt és szoftvert is alkalmaztam, melyekre a dolgozat megfelelő részén hivatkozom. Az ismertett eredmények eléréséhez gyakran alkalmaztam három szoftvert, ezért ezeket röviden ismertetem. Meg kell említeni, hogy az egyes

rendszerekben alkalmazott kódok együttes használata nem erősítette a rendszerek felhasználóbarát jellegét. Az akadémiai kutatások során tipikusan azokat a szoftvereket kellett használnom, melyekre az adott kutatóhelynek érvényes licencszerződése volt.

2.3.1 OSLO

A dolgozatban számos alkalommal használtam az OSLO optikai rendszertervező programot a kísérleti elrendezés megtervezésére, optimalizálására és az eredmények megmagyarázására. Az OSLO egy sugárkövető program, amelyben egy optikai rendszert az azt alkotó optikai felületek fizikai paramétereinek (törésmutató, görbületi sugár, vastagság stb.) segítségével kell megadni. Az adott elrendezések implementálása az OSLO-ba azért kihívás, mert a gyártók nem adják meg a felületek jellemző paramétereit. A dolgozatban alkalmazott mikroszkópjektívekhez például olyan szabadalmakat kerestem, amelyekben a megadott gyári paraméterek (nagyítás, munkatávolság, numerikus apertúra stb.) a lehető legjobban közelítettek a valós értékekhez. Az adott feladattól függően használtam az OSLO-ba épített sugárkövető és kiértékelő algoritmusokat. A kettősen törő lemezen való átfókuszálásnál, illetve a nagy numerikus apertúrájú objektívek modellezésénél polarizáció érzékeny sugárkövetésre és az egyes felületeken a Fresnel-egyenletek figyelembevételére volt szükség. Az optikai rendszerek kiértékelésére a Strehl-arányt, az aberrációs együtthatókat, a PSF geometriai paramétereit és a befoglalt intenzitást használtam.

2.3.2 MatLab

A MatLab programozási nyelvet a rendszerek vezérlésére és az adatok feldolgozására is használtam. A lokalizációs mikroszkópiához fejlesztett testSTORM, RainSTORM, AVAR; az anizotrópiás mérésekhez írt anitirf és az egyes lézerek vezérlését végző kódok MatLab-ban íródtak. A projektek során mindig cél volt, hogy a mikroszkópiás közösség szabadon hozzáférjen a programokhoz, ezért honlapunkról a kódok a leírásokkal együtt ingyenesen letölthetők.

2.3.3 Labview

A Labview programot elsősorban kísérleti eszközök vezérlésére használtuk. A konfokális mikroszkópban használt piezo eltoló vezérlését, a Nemzeti Fizikai Laboratóriumban összeállított dSTORM rendszer teljes irányítását, illetve egyes lézerek, forgatók és kisebb mechanikus egységek vezérlését is Labview kódokkal oldottuk meg.

3 Célkitűzések

A dolgozatomban ismertetett munkám általános motivációja az optikai leképezés minőségének, elsősorban a térbeli feloldásnak a növelése volt. A kidolgozott módszereket mindig igyekeztem tényleges biológiai problémák megoldására felhasználni, illetve több esetben éppen a biológus kollégák által felvetett problémák inspirálták a fejlesztéseket. Ezen általánosan megfogalmazott motiváción belül a következő specifikus célokat tűztem ki:

- Szimulációval és kísérletekkel kívánom megvizsgálni, hogy egy kettősen törő lemezen való átfókuszálás hogyan és milyen mértékben változtatja meg a PSF-et. Megvizsgálom, hogy mennyire lehet függetlenül létrehozni a merőleges polarizációs állapotokhoz tartozó ordinárius és extraordinárius fókuszokat. Egy saját tervezésű konfokális mikroszkópot építetek, amellyel kísérletileg kiértékelem a módszer alkalmazhatóságát a mélységélesség növelésére. Eljárást dolgozok ki radiálisan és azimutálisan polarizált nyalábok generálására.
- Egy tomografikus elven működő vonalpásztázó optikai mikroszkóprendszert (LSTOM) fejlesztetek ki, amelyben a látótér méretét a nyaláb diffrakciója nem korlátozza és a rekonstruált kép térbeli feloldása homogén. A nyaláb forgatása során fellépő kóválygási hiba kiküszöbölésére egy eltolás-invariáns kettősen törő lemezt tervezetek használni, amely elrendezést szimulációkkal és kísérletekkel kívánok tesztelni.
- Egyedi modalitásokkal (EPI-HILO-TIRF kivilágítás, 3D, többszínű leképezés) rendelkező lokalizációs mikroszkóprendszereket fejlesztetek ki, tesztelek és alkalmazok orvosi és biológiai minták vizsgálatára. A hardveres fejlesztéseken túl egy lokalizációs kódot fejlesztünk ki.
- A lokalizációs mikroszkóp szimulációjára, a lehetséges műtermékek vizsgálatára alkalmas kódot fejlesztünk ki. Összehasonlító kísérleti és szimulációs vizsgálatokat végzünk a műtermékek jellemzéséhez és lehetséges kiküszöbölésükre.
- Egy multimodális lokalizációs rendszert fejlesztünk ki, amely az 2D SMLM képek minőségi romlása nélkül képes 3D, polarizáció-érzékeny és többszínű leképezés megvalósítására.

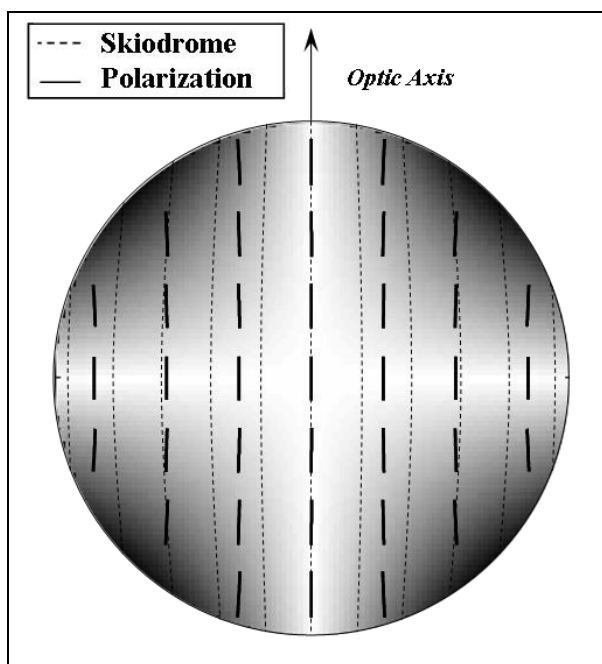
- Egy kettősen törő lemez alkalmazásán alapuló polarizáció érzékeny dSTORM módszert fejlesztünk ki, amely a látótér csökkentése nélkül képes az egyedi fluoreszcens molekulák orientációjának meghatározására.
- A szuperrezolúciós képek kvantitatív kiértékeléséhez értékmérőket adunk meg, és protokollokat dolgozunk ki ezen értékmérők meghatározásához. A kiértékelő rutinokat teszteljük és beépítjük a lokalizációs kódba.
- Anizotrópia mérésére alkalmas TIRF-EPI kivilágítású fluoreszcens mikroszkópiás rendszert fejlesztünk ki, kalibrálunk és alkalmazunk pl. fehérjék dimerizációjának követésére.

4 Tudományos eredmények

4.1 A pontátviteli függvény módosítása kettősen törő lemez segítségével

Az optikai rendszerek pontátviteli függvényének manipulációján alapuló koherens és inkoherens leképezési módszerek fejlesztése egy aktívan művelt kutatási terület. A bevezetőben említett 3D SMLM és STED eljárásokon kívül a „PSF engineering” módszert számos területen alkalmazzák, mint például a litográfiában [37, 38], az optikai adattárolásban [39, 40] az anyagtudományban [41] vagy a többfotonos mikroszkópiában [42].

A PhD dolgozatomban már foglalkoztam azzal a kérdéssel, hogy miként lehet egy kettősen törő lemezen átvilágítva kettős fókuszpontot generálni. A témában számos tanulmány jelent meg, melyekben többször előfordult az a félreérthető megfogalmazás, hogy a kialakuló fókuszokat a bejövő nyalábok polarizációs állapotaihoz kötik, azaz lineárisan polarizált nyalábbal szelektíven gerjeszthető a kiválasztott ordinárius vagy extraordinárius fókusz [43-46].



4.1.1 ábra: Polarizációs irányok ortografikus projekciós képe (szkiodróm) pontszerű fényforrást feltételezve extraordinárius esetben (vékony szaggatott vonal), és egy lineárisan polarizált nyalábbal kivilágított, 0,45 numerikus apertúrájú objektív után a polarizációs vektorok iránya (vastag szaggatott vonal) [47].

Két okunk is volt azt feltételezni, hogy a fókuszok független gerjesztése kísérletileg nehezen megvalósítható:

- (i) Lineárisan polarizált beeső nyalábot alkalmazva a lencsék elforgatják a polarizáció síkját. A jelenség a numerikus apertúra növelésével egyre jelentősebb. Két azonos orientációjú

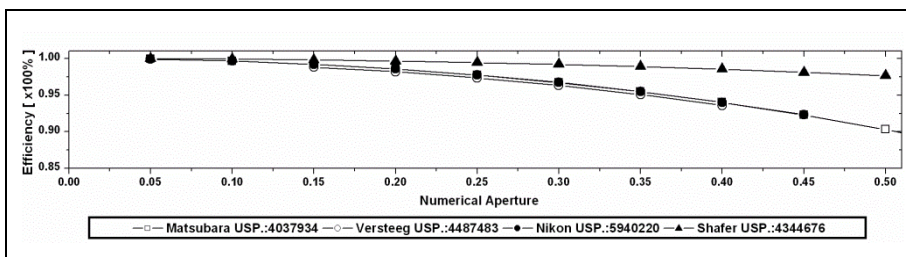
polarizátort alkalmazva a szagittális és meridionális síkaktól távolodva (a négy negyedben) az intenzitás lecsökken (**4.1.1 ábra**) [48].

(ii) Extraordinárius esetben egy pontszerű fényforrás polarizációs vektorának ortografikus vetülete (szkiodróm) szintén eltérést mutat a lineáris polarizáció irányától [48].

A két hatás legtöbbször ellentétes módon dönti a polarizáció síkját (**4.1.1 ábra**), ezért az extraordinárius fókusz mellett az ordinárius is megjelenik.

4.1.1 Fókuszpontok szeparációja

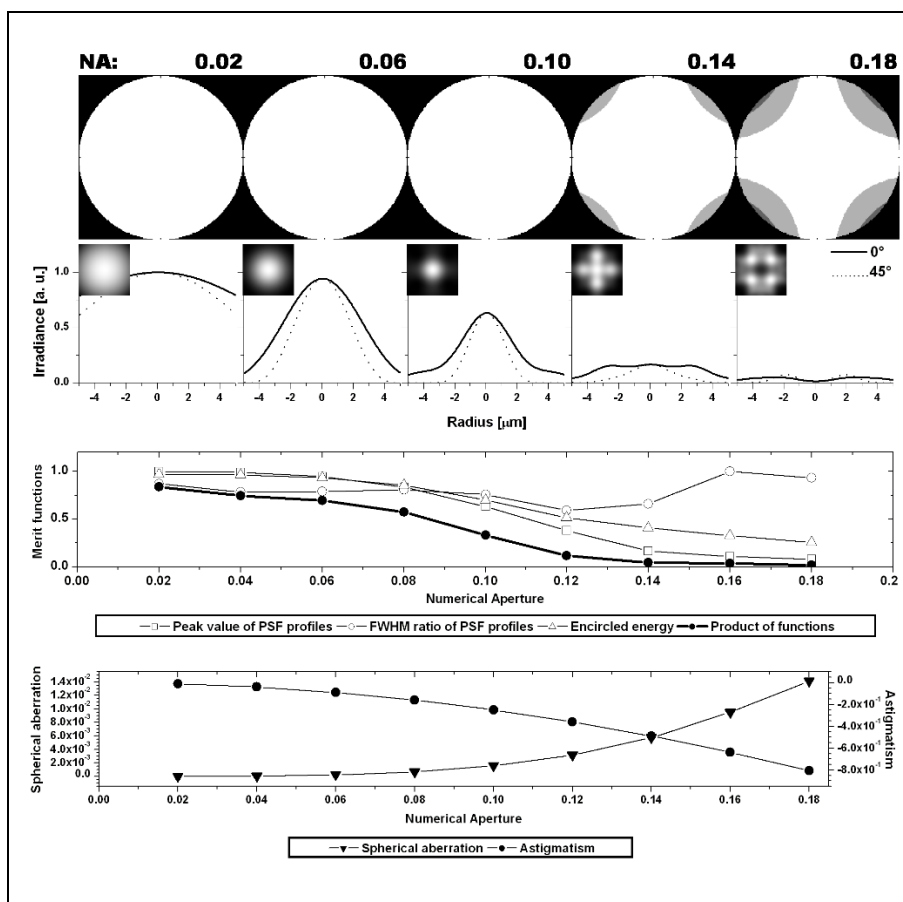
A kérdés tisztázására az OSLO optikai rendszerek tervezésére alkalmas programmal szimulációkat végeztünk refraktív [49, 50] és katadioptrikus [51, 52] rendszerekre. Megvizsgáltuk, mekkora hatásokkal lehet az „ordinárius” és „extraordinárius” fókuszokat szeparálni az alkalmazott lencse numerikus apertúrájának függvényében, és mekkora leképezési hibát vezet be a kettősen törő lemez. Hatásfokot a tényleges polarizációs vektorok irányának (vastag szaggatott vonal a **4.1.1 ábrán**) és a szkiodróm (vékony szaggatott vonal a **4.1.1 ábrán**) által megadott optimális irány átfedési integráljából számoltunk.



4.1.2 ábra: Hatásfok függése a numerikus apertúrától a vizsgált négy lencsénél [47].

A **4.1.2 ábra** mutatja a négy kiválasztott lencse esetén a hatásfokot a numerikus apertúra függvényében. A hatásfok mindegyik lencsénél csökken az apertúra növelésével. Három lencsénél a veszteség közel hasonló módon változik és 0,5-ös numerikus apertúra értéknél eléri a 10%-ot. Egyedül a katadioptrikus Shafer-lencse használatakor kaptunk jelentősen kisebb veszteséget ($\approx 2\%$). A részletes vizsgálat megmutatta, hogy ez az objektív a polarizációt éppen ellentétes, a szkiodrómmal jellemzett optimális iránnyal megegyezően forgatja el, ezért a veszteség lényegesen kisebb. A depolarizáltságból eredő 2-10%-os intenzitásveszteség önmagában általában nem jelent problémát. Az apertúrán belül azonban inhomogén módon változik a fázis és az amplitúdó is, melyek a PSF alakját jelentősen torzíthatják. A terjedelmi korlátok miatt itt csak a hatásfok szempontjából legjobb eredményt adó Shafer katadioptrikus rendszer kiértékelését mutatom be, amikor 500 μm vastag kalcitlemezen fókuszáltunk át (**4.1.3 ábra**). Három jóság tényező (Strehl-arány, 0 és 45 fokban mért *FWHM*-ek aránya és befoglalt intenzitás) és két aberráció (szférikus

hiba és asztigmia) segítségével jellemeztük a kialakuló *PSF*-et. A szimuláció jól mutatja, hogy $NA=0,1$ -ig a *PSF* félértékszélessége csökken, de ezen érték felett már jelentős a torzulás. A BK7-es lemezre vonatkozó hasonló számítások $NA=0,5$ esetén csak a szférikus hiba gyenge jelenlétét mutatták ki. Kalcitlemez használatával, $NA=0,1$ felett a *PSF* hengersizimetriája teljesen megszűnik. A részletes elemzés azt is megmutatta, hogy a *PSF* torzulása nem az intenzitáseloszlás inhomogenitásának, hanem a lemez által bevezetett fázistolásnak köszönhető aberrációknak a következménye. Ez utóbbi hatást a későbbi kísérletek során változtatható fedőlemez-korrekciós objektívek alkalmazásával igyekeztünk kiküszöbölni.

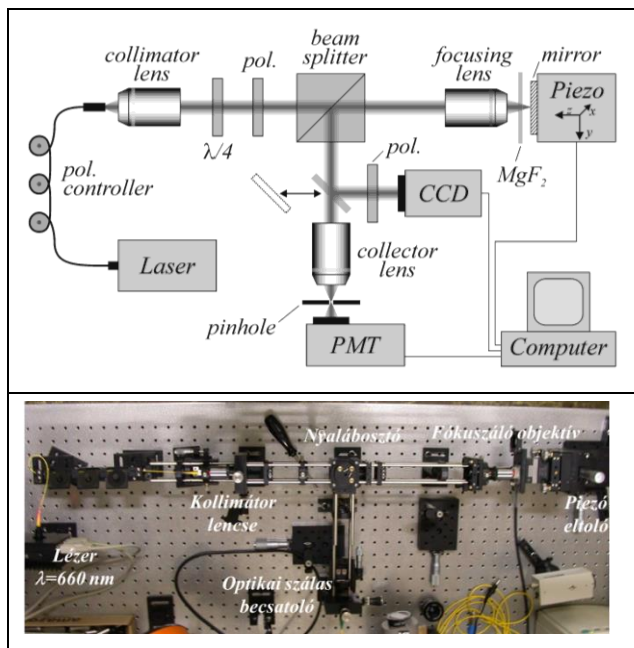


4.1.3 ábra: Kalcitlemez mögött, a bejövő nyaláb polarizációjával megegyező orientációjú polarizátor után és a fókuszban számolt intenzitásprofil (izogír), *PSF*, számolt jósági tényezők és aberrációk a numerikus apertúra függvényében [47].

4.1.2 A mélységélesség növelésének kísérleti kimutatása konfokális mikroszkóppal

A PhD dolgozatomban diffrakciós számításokat végezve megmutattam, hogy a kivilágító nyaláb polarizációs állapotának, továbbá a kristály vastagságának és optikai tengelyének megfelelő megválasztásával növelhető a mélységélesség. OTKA posztdoktori éveim alatt lehetőségem nyílt egy konfokális mikroszkóp megépítésére és a korábbi elméleti számítások

kísérleti igazolására. Ebben a fejezetben ezeket a kísérleti eredményeimet foglalom össze. A területi korlátok miatt csak az axiális feloldással foglalkozom részletesebben.

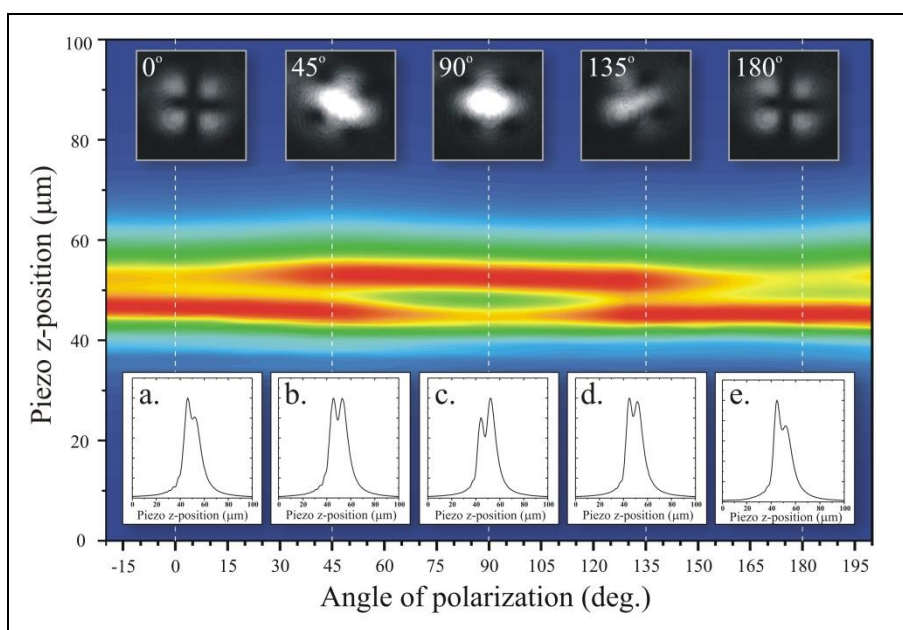


4.1.4 a ábra: A megépített konfokális mikroszkóp sematikus elrendezése. A pásztázás a minta mozgásával történt, a PSF manipulációjára MgF_2 lemezt használtam [53].

4.1.4. b ábra: A megépített konfokális mikroszkópról készült fénykép.

A mélységélesség növeléséhez a két fókusz axiális távolságát kisebbnek kell választani, mint a lefókuszáláshoz tartozó mélységélesség. A kísérletekhez a kristály optikai tengelyével párhuzamosan kivágott, 500 μm vastag MgF_2 lemezt használtunk. A fókusz 3D feltérképezésére egy saját fejlesztésű konfokális mikroszkópot alkalmaztunk (**4.1.4 b ábra**). Fényforrásként egy optikai szálba csatolt 660 nm-en működő diódalézer fényét egy mikroszkópobjektívvel ($NA=0,25$) kollimáltuk. Egy optikai szál polarizációs controllerrel lineárisan polarizált nyalábot állítottunk elő. A kollimált nyaláb egy nyalábosztó kockán áthaladva világította ki a kísérletekhez használt két fókuszáló mikroszkópobjektívet (fedőlemez-korrekciónélkül, $NA=0,3$; 0-2 mm állítható fedőlemez korrekció, $NA=0,45$). A minta egy $100 \times 100 \times 100 \mu m^3$ maximális eltolást biztosító piezo eltolóra (P-611 NanoCube, PI) lett felszerelve. A fókuszpont axiális feltérképezéséhez egy tükröt használtunk mintaként. A mintáról visszavert nyalábot a nyalábosztó a kollektor lencsére továbbította, amelynek a fókuszpontjába egy 5 μm átmérőjű tüllyukat helyeztünk. A detektor (PMT) a tüllyuk után mérte az átjutó intenzitást. A rendszer vezérléséhez egy LabView-ban írt programot használtunk. A detektorkarban egy mozgatható tükörrel tudtuk kicsatolni a nyalábot és egy CCD kamerával felvenni annak 2D intenzitáseloszlását. A CCD kamera elé helyezett polarizátor segítségével a rendszert egyszerű konoszkópként [48] is lehetett használni. A kettősen törő lemez nélkül a mért mélységélesség nagysága $\sim 7,5 \mu m$, és független a beeső fény polarizációjától. A MgF_2 lemez hatására kialakuló kettős fókusz axiális normált intenzitáseloszlása

és konoszkópikus képe a polarizáció függvényében a **4.1.5 ábrán** látható. A polarizátor forgatásával a fókuszok helyzete nem változik, de intenzitásuk aránya 180° -os periodicitással oszcillál (a-e ábrák). A két csúcs közel azonos intenzitású, amikor a nyaláb polarizációs síkja 45° -ot zár be a kristály optikai tengelyével. A mélységélesség növelése szempontjából ez az ideális beállítás. Ebben az esetben a mért $DOF \sim 17 \mu\text{m}$, ami $\sim 127\%$ -os javulásnak felel meg. Mivel a MgF_2 pozitív kristály, az axiális pásztázás során az extraordinárius csúcs jelenik meg hamarabb (ez van közelebb az objektívhez). Érdeemes megjegyezni, hogy feltételezésünkkel összhangban az ordinárius és extraordinárius fókuszokat egymástól függetlenül nem tudtuk gerjeszteni, csak az intenzitásarányukat tudtuk változtatni. Az ábrán a CCD kamerával rögzített konoszkópikus képek jól mutatják a keresztezett (0° és 180°) és párhuzamos (90°) polarizáció esetén kialakuló sötét és világos keresztet (izogíreket), jó egyezésben az előző fejezetben tárgyaltakkal.



4.1.5 ábra: Mért axiális intenzitásprofil a polarizáció függvényében [53].

A mikroszkóppal leellenőriztük a laterális feloldást is, amelyben a polarizációs viszonyoktól függően $\sim 10\%$ -os romlást tapasztaltunk.

4.1.3 Radiálisan és azimutálisan polarizált nyaláb generálása – elméleti eredmények

Ha a kettősen törő lemez a kristály optikai tengelyével párhuzamosan van kivágva, akkor az előző pontban leírt korlátokkal az ordinárius és extraordinárius fókuszok lineárisan polarizált nyalábokhoz köthetők. Ha a kristályt az optikai tengelyére merőlegesen vágjuk ki, akkor azt várjuk, hogy radiálisan és azimutálisan polarizált nyalábokkal lehet az extraordinárius és ordinárius fókuszokat gerjeszteni. Egyedi fókuszálási tulajdonságaik miatt e speciális, cilindrikus

vektornyaláboknak vagy optikai vortexnek is nevezett nyalábok felhasználása egyre szélesebb körű [54-58], pl. az optikai litográfiában és mikroszkópiában [59-61], elektronok lézeres gyorsításánál [62, 63], vagy optikai csipeszekben [64]. Az alkalmazások széles köre miatt több módszert [65-75] is javasoltak radiálisan és azimutálisan polarizált nyalábok létrehozására. Mi a kettősen törő lemezen való átfókuszálás során fellépő polarizáció-szelektív fókuszálást kihasználva egy polarizátor megtervezését, elméleti vizsgálatát és kísérleti tesztjét tűztük ki célul.

A nyaláb elméleti leírásakor leggyakrabban Richard és Wolf vektordiffrakciós módszerét [76] használják. A teljes teret a hengerkoordinátákban felírt transzverzális ($E_t(r, z)\vec{e}_t$), longitudinális ($E_z(r, z)\vec{e}_z$) és azimutális ($E_\phi(r, z)\vec{e}_\phi$) térerősség-komponensek eredője [54] adja:

$$\vec{E}(r, z) = E_t(r, z)\vec{e}_t + E_z(r, z)\vec{e}_z + E_\phi(r, z)\vec{e}_\phi.$$

A számolások során feltételeztük, hogy a beeső nyaláb $m=1$ topológiai töltésű (azimutálisan egy teljes körfordulás alatt a fázis 2π -vel változik) radiális és azimutális polarizációs állapotok szuperpozíciójaként írható fel. A komplex pupillafüggvényt a $P(\Theta)$ apodizációt és a $W(\Theta)$ aberrációt megadó tényezők szorzataként írhatjuk fel:

$$l_0(\Theta) = P(\Theta) \cdot W(\Theta).$$

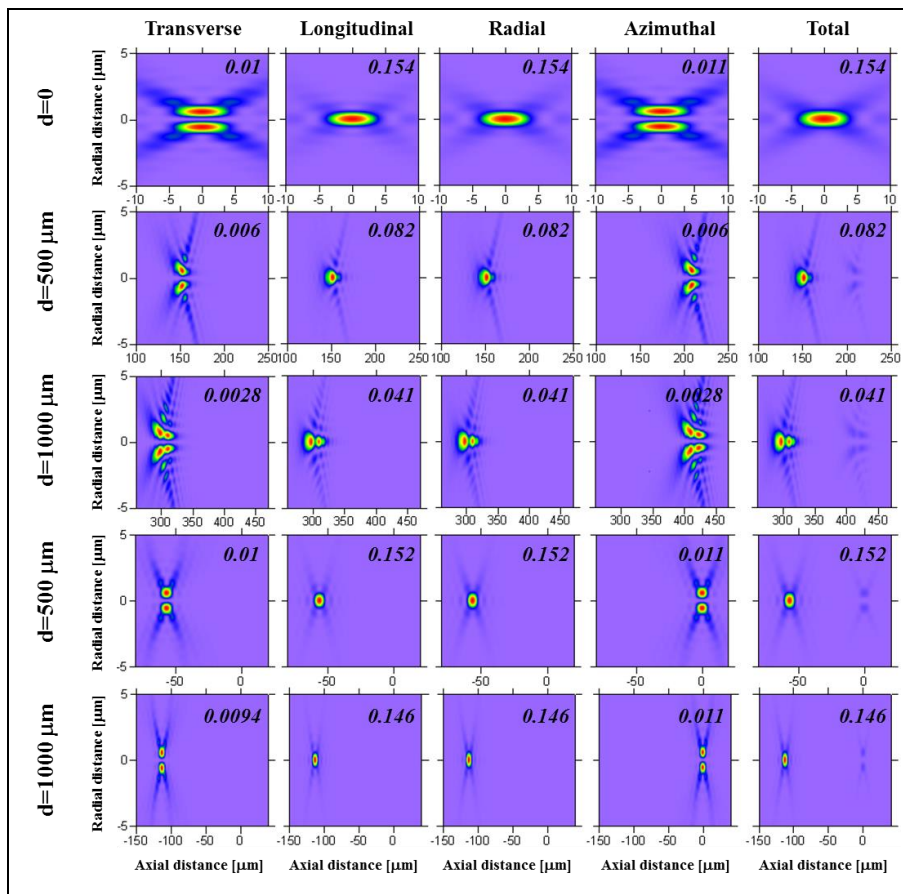
A számolások során tiszta, kör alakú apertúrát és homogén kivilágítást feltételeztünk:

$$P(\Theta) = \begin{cases} 1 & \text{if } 0 \leq \Theta \leq \sin^{-1}(\Theta_{\max}) \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}.$$

A fókuszáló lencse által bevezetett optikai leképezési hibáktól eltekintettünk, és csak a lemez által bevezetett $\Phi(\Theta)$ fázistolás hatását vettük figyelembe:

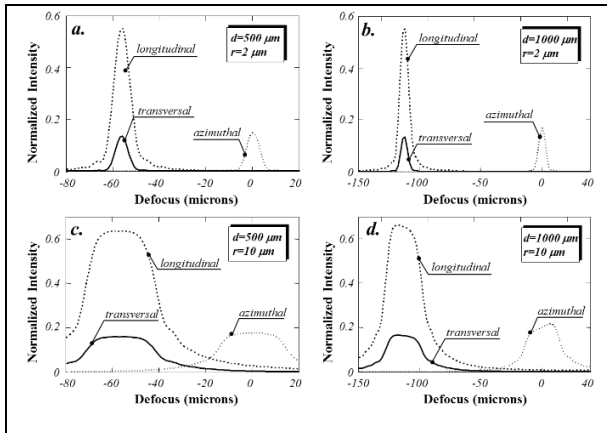
$$W(\Theta) = e^{ik\Phi(\Theta)}.$$

Ordinárius esetben a $\Phi_o(\Theta)$ fázistag analitikusan számolható [77], de az extraordinárius esetben a sugárirány és a hullámirány eltérése miatt [78] a $\Phi_e(\Theta)$ értékét numerikusan számítottuk ki. A fedőlemez korrekciót azimutális esetben (ordinárius nyaláb) a fázistag elhagyásával ($\Phi_{lemez}(\Theta) = \Phi_o(\Theta) - \Phi_{korrekció}(\Theta) = 0$), transzverzális és longitudinális esetben (extraordinárius nyaláb) a $\Phi_{lemez}(\Theta) = \Phi_e(\Theta) - \Phi_o(\Theta)$ kifejezéssel vettük figyelembe.



4.1.6 ábra: Számolt transzverzális, longitudinális, radiális, azimutális és teljes fókuszok lemez nélkül (első sor) és 500 illetve 1000 μm vastag kalcitlemezzel, fedőlemez korrekció nélkül (második és harmadik sor) és korrekcióval (utolsó két sor) [79].

A számításokat $d=500$ és $1000 \mu\text{m}$ vastag kalcitlemezzel, $NA=0,9$ és $0,45$ numerikus apertúrájú objektívvel, fedőlemez korrekcióval és korrekció nélkül végeztük, 660 nm hullámhosszat feltételezve. Terjedelmi korlátok miatt csak az $NA=0,45$ objektívvel kapott eredményeket mutatom be. A **4.1.6 ábrán** a három (transzverzális, longitudinális és azimutális) komponens szeparáltan, illetve a radiális (transzverzális+longitudinális) és a teljes (total) eloszlásokat láthatjuk. Korrekció nélkül a második és harmadik, korrekcióval a negyedik és ötödik sor mutatja a fókuszokat. Az egyes képeken az intenzitáseloszlás maximális értékét is feltüntettük. A korrekció jelentősen csökkenti a fókuszpont aberrációját és növeli a csúcshintenzitás értékét. A várakozásoknak megfelelően az azimutális fókusz (ordinárius eset) korrekcióval nem szenved eltolást az optikai tengely mentén. A radiális és azimutális fókuszok axiális távolságára $60 \mu\text{m}$ és $120 \mu\text{m}$ értékeket kaptunk az $500 \mu\text{m}$ és az $1000 \mu\text{m}$ vastag lemezek használatakor. Az azimutális fókusz gyűrűs alakja miatt a csúcshintenzitás tipikusan egy nagyságrenddel kisebb, mint a radiális tagé.



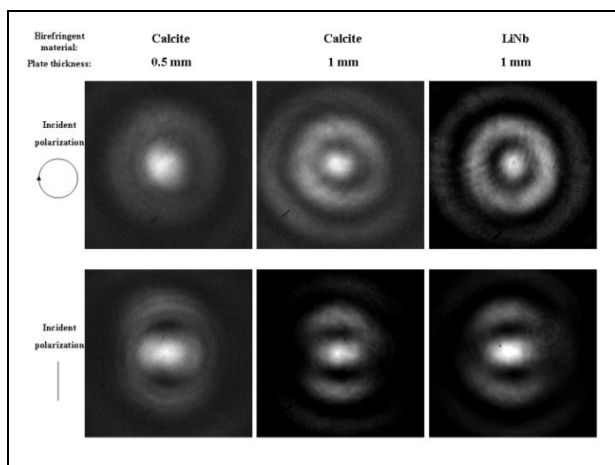
4.1.7 ábra: Fókuszok szétválasztása $2\ \mu\text{m}$ (a, b) és $10\ \mu\text{m}$ sugarú tlyukak segítségével a defokuszálás függvényében [79].

A fókuszok és rajtuk keresztül a polarizációs állapotok az optikai tengelyre helyezett tlyukkal (térshúr) szétválaszthatók. A tlyukon áteső normált intenzitást $2\ \mu\text{m}$ és $10\ \mu\text{m}$ sugarú tlyukak axiális pozíciójának függvényében a **4.1.7 ábra** mutatja. Mindegyik esetben a fedőlemezre korrigált eseteket vizsgáltuk. A $2\ \mu\text{m}$ tlyuk méretét az Airy-féle diffrakációs folt méretéhez illesztve ($FWHM_{\text{Airy}}=0,85\ \mu\text{m}$) választottuk ki. A longitudinális tag maximumára ($\approx 56\%$) pozicionálva a tlyukat a polarizációs szűrő kontrasztrája ($(T^+ + T^-)/T^\phi$) 20000 és 80000 értékeket kapunk az $500\ \mu\text{m}$ és az $1000\ \mu\text{m}$ lemezvastagságok esetén. A tlyuk méretének növelésével a kontraszt jelentősen csökken: 165 ($500\ \mu\text{m}$ lemez) és 1200 ($1000\ \mu\text{m}$ lemez). A vastagabb lemez által bevezetett jelentősebb aberrációk miatt a transzmissziós görbe axiális szimmetriája is megszűnik.

4.1.4 Radiálisan és azimutálisan polarizált nyaláb generálása – kísérleti eredmények

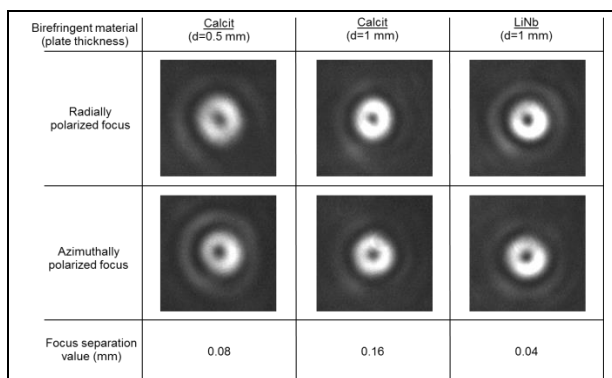
Az elméleti számítások során kapott eredményeket kísérletileg is szeretnénk volna igazolni. Mivel a kísérleti munka és az előző fejezetben bemutatott számítások elvégzése között két év telt el, a kísérleteket nem pontosan ugyanazokkal a paraméterekkel végeztük el. A kísérleteket bemutató cikkünkben az OSLO-val végzett szimulációkkal vetettük össze a mérési eredményeket. Terjedelmi korlátok miatt itt eltekintünk az OSLO-s szimulációk ismertetésétől, de meg kell jegyezni, hogy nagyon jó egyezést mutattak a kísérletekkel. A mérésekhez $500\ \mu\text{m}$ és $1000\ \mu\text{m}$ vastag kalcit, illetve $1000\ \mu\text{m}$ vastag LiNb lemezeket használtunk. A lemezeken $532\ \text{nm}$ hullámhosszúságú, cirkulárisan és lineárisan polarizált nyalábokat fókuszáltunk keresztül egy $NA=0,45$ mikroszkópobjektív [50] segítségével. Az objektívet $0\text{-}2\ \text{mm}$ vastag fedőlemezre lehetett korrigálni. A fókuszot két, tandemben elhelyezett mikroszkópobjektívvel nagyítottuk ki és képeztük rá egy CCD kamerára. A radiális komponens képét a három lemez és a két kivilágítási polarizáltság esetén a **4.1.8 ábra** mutatja. Cirkulárisan polarizált beeső nyaláb esetén a polarizátor mindig

kiválasztja a radiális tagot, ezért a kapott profil hengersizmetrikus lesz, melynek maximuma van az optikai tengelyen. Ezzel szemben, lineárisan polarizált nyalábot használva a szimmetria megszűnik, a nyalábnak csak az a része látszik, ahol a polarizáció iránya radiális.



4.1.8 ábra: Mért intenzitásprofilok cirkulárisan és lineárisan polarizált nyalábot, 500 és 1000 mikron vastag kalcit- illetve 1000 mikron vastag LiNb lemezek esetén. A kettősen törő lemezek optikai tengelyei merőlegesek a lemezekre [80].

Radiálisan és azimutálisan polarizált nyalábot esetén be tudjuk vezetni a topológiai töltés fogalmát [81, 82]. Az alkalmazások jelentős részében cilindrikus vektornyaláb alatt az $m=1$ topológiai töltésű nyalábot értik. Ebben az esetben a nyalábra merőleges síkban az optikai tengely körül egy teljes fordulathoz 2π fázisváltozás tartozik. E nyalábot fókuszálása során ezért mind a transzverzális, mind az azimutális esetben kioltást kell tapasztalunk az optikai tengelyen (**4.1.6 ábra** első és negyedik oszlop). A kísérleti bizonyításhoz egy fázislemezt kellett tervezni és csináltatni. A fázislemez használatával felvett radiális és azimutális fókuszok CCD képeit a **4.1.9 ábra** mutatja a három különböző lemez esetén. A felvett képeken az elmélettel jó egyezésben látható a várt gyűrű alakú eloszlás.



4.1.9 ábra: $m=1$ topológiai töltésű, radiálisan és azimutálisan polarizált nyalábot mért intenzitáseloszlása a fókuszban [83].

Összefoglalva: Elméleti és kísérleti vizsgálatokat végeztem az egytengelyű, kettősen törő plánparallel lemezen átfókuszált nyalábotokkal.

- Megvizsgáltam az ordinárius és extraordinárius fókuszok közötti áthallást, amikor a kristály optikai tengelye a lemez síkjában van. Megállapítottam, hogy síkban polarizált nyalábbal a fókuszok nem gerjeszthetők egymástól függetlenül. Az áthallás két fő okának a fókuszáló objektív depolarizációját és a kettősen törő lemezt jellemző szkiodróm polarizációs vektorainak kidőlését jelöltem meg. A két hatás tipikusan ellentétes irányú, ami növeli az áthallás mértékét ($\approx 10\%$, $0,5$ numerikus apertúra esetén). A hiba csökkentésére katadioptrikus rendszer alkalmazását javasoltam, ahol az áthallás 2% -ra csökkenthető. A numerikus apertúra függvényében megvizsgáltam az optikai aberrációk mértékét. Megállapítottam, hogy a torzulások $0,1$ numerikus apertúra felett már jelentőssé válnak, ezért fedőlemezre korrigált objektíveket kell használni.
- Egy saját fejlesztésű konfokális mikroszkóppal kísérletileg megmutattam, hogy a lefókuszált nyaláb útjába optimalizált vastagságú és orientáltságú kettősen törő lemezt helyezve a leképezés mélységelessége több mint 100% -kal növelhető, miközben a laterális feloldás 10% -kal csökken.
- Elméleti és kísérleti vizsgálatokkal megmutattam, hogy megfelelően optimalizált kettősen törő lemezzel (amikor a kristály optikai tengelye merőleges a lemez síkjára), a radiálisan és azimutálisan poláros komponensek szétválaszthatók. Térbeli szűréssel a két komponenst nagy hatásfokkal szét tudtam választani. A javasolt optikai rendszert egy fázislemezzel kiegészítve a beeső, cirkulárisan polarizált nyalábot gyakorlatilag fényvesztés nélkül $m=1$ topológiai töltésű, radiálisan vagy azimutálisan polarizált nyalábbá alakítottam.

Releváns publikációk: [47, 53, 79, 80, 83]

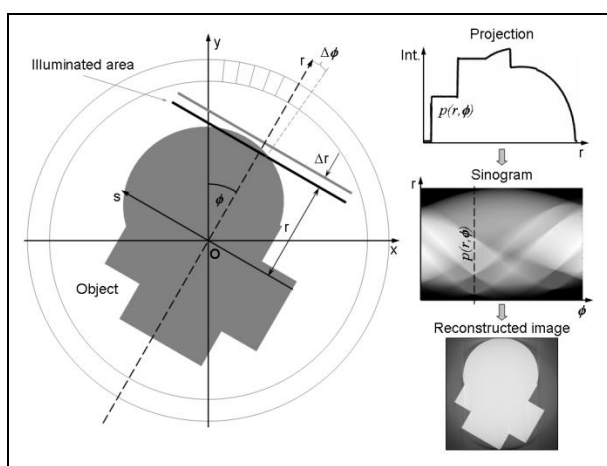
4.2 Tomográfia elvén működő, vonalpásztázó optikai mikroszkóprendszer (LSTOM) fejlesztése és optimalizálása.

2004-ben egy TDK projekt során tomografikus elven mértük ki lefókuszált lézernyalábok intenzitásprofilját [84]. Az eljárás a késéles módszer 2D változata [85], amelynek egyik legnagyobb előnye, hogy 2D intenzitásprofil lehet mérni egy egyszerű fotodetektorral. A munka során merült fel, hogy a tomografikus leképezést próbáljuk meg a mikroszkópiában is alkalmazni. Az optikai projekciós tomografikus (OPT) mikroszkópoknál már korábban is használták a tomografikus képalkotás elvét, de tipikusan a röntgentechnika analógiájára a szinogramok felvételéhez longitudinális projekciókat alkalmaztak [86, 87].

A mi célunk egy vonalpásztázáson alapuló homogén és izotróp pásztázást biztosító módszer kidolgozása és tesztelése volt. A módszert szabadalmaztattuk [88], két PhD dolgozat [89, 90] és számos diplomamunka és szakdolgozat született belőle. A módszer kísérleti megvalósításában együttműködő partnerünk volt a Carl Zeiss MicroImaging GmbH.

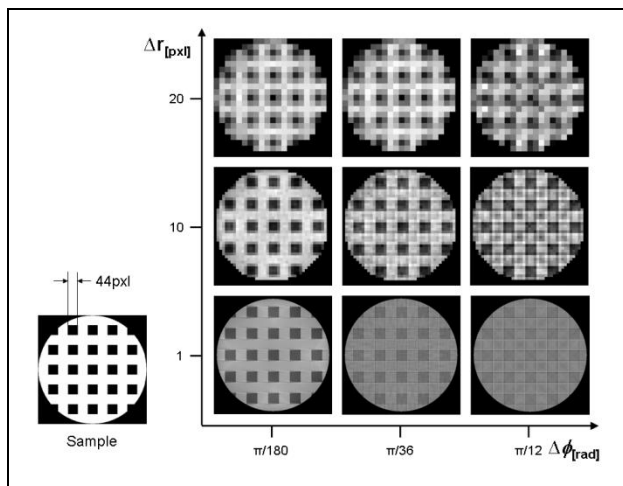
4.2.1 A tomografikus vonalpásztázó mikroszkóp működési elve

A tomografikus vonalpásztázó mikroszkópban a mintát egy vonallá lefókuszált kivilágító/gerjesztő nyalábbal pásztázzuk. A pásztázás iránya merőleges a vonalra és a nyaláb optikai tengelyére is (**4.2.1 ábra**). A mintát végigpásztázva kapjuk az adott orientációhoz tartozó projekciót. A vonal irányát változtatva ($\Delta\phi$) a projekciókból előáll a szinogram, melyből szűrt visszavetítéssel rekonstruálhatjuk a minta 2D intenzitáseloszlását.



4.2.1 ábra: A vonalpásztázás egy adott ϕ szög esetén megadja a $p(r, \phi)$ projekciót. A projekciók összessége alkotja a szinogramot, amelyből szűrt visszavetítéssel kapjuk meg a rekonstruált képet. A kivilágító nyaláb optikai tengelye merőleges a lapra [91].

A módszer előnye, hogy a vonalak merőlegesek a detektálás síkjára, ezért (a hagyományos OPT-ben alkalmazott longitudinális átvilágítással szemben) a gerjesztés profilja nem változik a trajektória mentén. A rekonstruált kép feloldása homogén és izotróp lesz és méretét a fókuszvonal hossza határozza meg. Ennek csak technikai korlátjai vannak, fizikai törvény nem limitálja. A módszer alkalmazható reflexiós és transzmissziós üzemmódban, festetlen vagy fluoreszcens mintákra, továbbá kombinálható a konfokális elrendezéssel.



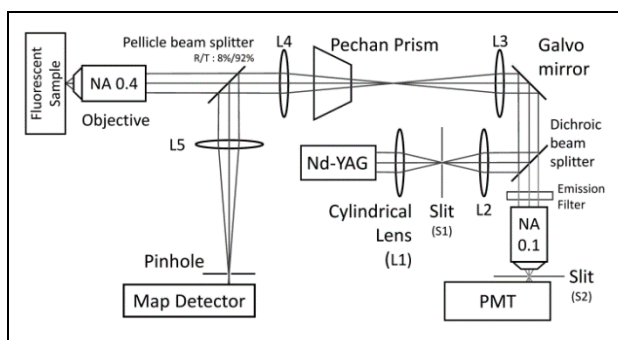
4.2.2 ábra: Szimulált rekonstruált kép minőségének függése a pásztázás és a forgatás finomságától [91].

A végső kép minősége függ a fókuszvonal szélességétől, a pásztázás (Δr) és a forgatás ($\Delta\phi$) feloldásától. A **4.2.2 ábra** a pásztázási paraméterek függvényében mutatja a rekonstruált kép minőségét. A szimulációkhoz használt 2D rács periódusát 88 pixelnek, a pásztázó fókuszvonal szélességét 1 pixelnek választottuk. A pásztázáskor használt Δr lépésköz határozza meg a rekonstruált kép pixelméretét. A rekonstruált kép élessége és kontrasztja javítható a Δr lépésköz csökkentésével, illetve a projekciók számának növelésével ($\Delta\phi$ csökken). Mivel az azonos numerikus apertúrájú objektívvel létrehozott fókuszvonal keskenyebb [92, 93], mint az Airy diffrakciós kép, a módszerrel elvileg $\approx 20\%$ -os térbeli feloldásnövekedést érhetünk el.

4.2.2 Tomografikus vonalpásztázó mikroszkóp kísérleti megvalósítása

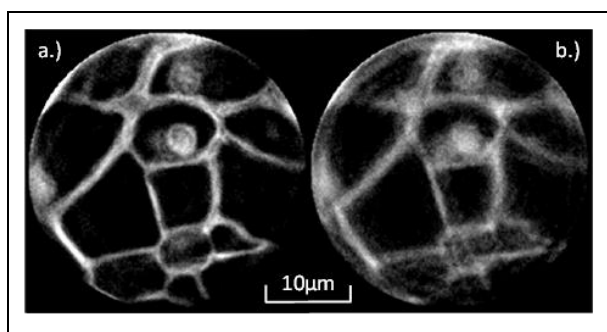
A kísérletek elvégzéséhez egy saját tervezésű és építésű mikroszkópot használtunk (**4.2.3 ábra**). A fényforrás kitágított nyalábját egy hengerlencse fókuszálta le, majd térszűrésre egy rést használtunk. A mérés felgyorsítására a pásztázáshoz galvó-tükröket, a forgatáshoz pedig egy egyenes látású képfordító Pechan-prizmát használtunk. A mintáról visszavert gerjesztő vagy fluoreszcens jelet a konfokális karban egy PMT detektorral rögzítettük. A **4.2.3 ábrán** a

fluoreszcens minta leképezésére alkalmas elrendezés látható, de minimális átrendezéssel (a dikroikus tükröt egy nyalábosztóra cserélve) a mikroszkóp lézeres pásztázásra könnyen átalakítható [91]. A beállítás legkritikusabb lépése a szinogramot alkotó projekciók egymáshoz illesztése. Ennek oka, hogy a forgástengely a Pechan-prizma leggondosabb beállítása mellett is „kóvályog”. A hiba korrigálására számos kalibrációs [94-97] és algoritmikus [98, 99] megoldást javasoltak.



4.2.3 ábra: Tomografikus fluoreszcens vonalpásztázó mikroszkóp kísérleti elrendezése [100].

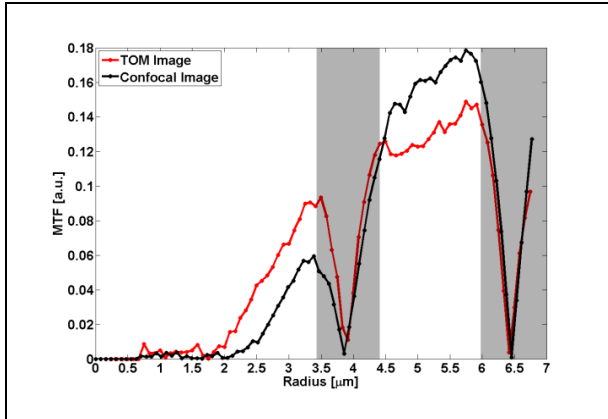
A forgástengely kóválygásának kimérésére az objektív előtt kicsatoltuk a pásztázó nyaláb egy részét és egy rögzített túlyukon keresztül átjutó fényt detektáltuk. A túlyuk a minta konjugált síkjában volt elhelyezve, ezért a detektált jelből a korrekciós térkép meghatározható. A módszer előnye, hogy valós időben, mindig az adott méréshez határozza meg a korrekciós térképet. A jel/zaj viszony növelése érdekében a fluoreszcens mintáknál tipikusan lock-in technikával történt a mérés. A **4.2.4 ábrán** egy standard fluoreszcens mintáról (*Convallaria Majalis*) 532 nm gerjesztéssel felvett képeket láthatunk korrekcióval (a) és korrekció nélkül (b).



4.2.4 ábra: *Convallaria Majalis* rekonstruált képe korrekcióval (a) és korrekció nélkül (b) [100].

A módszer térbeli feloldásának meghatározására a Richardson-féle tárgylemezen (Richardson Test Slide: RTS) [101] a csillagmintázatot használtuk. A minta egy adott sugarához egy meghatározott periódusú rács rendelhető ezért a leképezés modulációs transzfer függvénye (MTF) megmérhető. A **4.2.5 ábra** egy gyári konfokális mikroszkóppal (Zeiss Axiovert 135M) és az általunk kifejlesztett tomografikus vonalpásztázó mikroszkóppal felvett képek alapján számolt

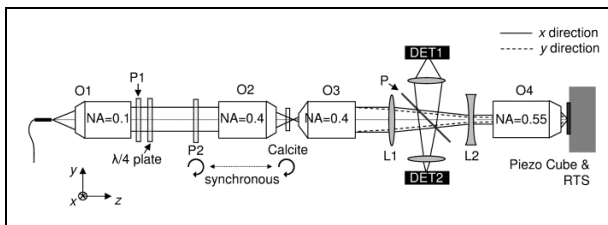
MTF-eket mutatja. A kisebb sugarak (magasabb térfrekvencia) tartományában a feloldóképesség közel 15%-os javulást mutat. A szürke tartományokban az *MTF* nem értékelhető ki pontosan, mert ezeken a helyeken fázisugrás van a mintán (**4.2.8 ábra**).



4.2.5 ábra: Konfokális és tomografikus mikroszkópok mért modulációs transzfer függvényei [90].

4.2.3 Asztigmias LSTOM (aLSTOM)

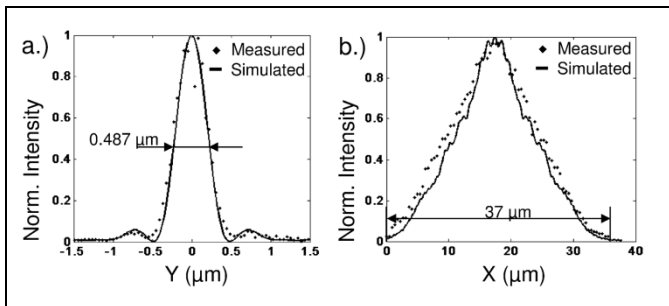
Az LSTOM elrendezés egyik kritikus pontja a forgatás pontatlanságából eredő műtermékek megjelenése. Ideális esetben a fókuszvonal helyzete nem változik a forgatást biztosító optikai elem laterális elmozdulásával. Az optikában ilyen translációra invariáns elem a polarizátor és az előző fejezetben részletesen tárgyalt kettősen törő lemez. Ezért megterveztünk, optimalizáltunk és kísérletileg teszteltünk egy módosított LSTOM elrendezést. Az asztigmatikus LSTOM-ra (aLSTOM) keresztelt módszerben a fókuszvonalat egy kettősen törő lemezen való átfókuszálással nyert, erős asztigmiaival terhelt fókusszal hozzuk létre. A rendszert az OSLO programmal modelleztük. A modellezés eredményét terjedelmi korlátok miatt nem részletezem, csak a kísérleti eredményeket tárgyalom. Az aLSTOM kísérleti elrendezése a **4.2.6 ábrán** látható.



4.2.6 ábra: Asztigmatikus LSTOM kísérleti elrendezése [102].

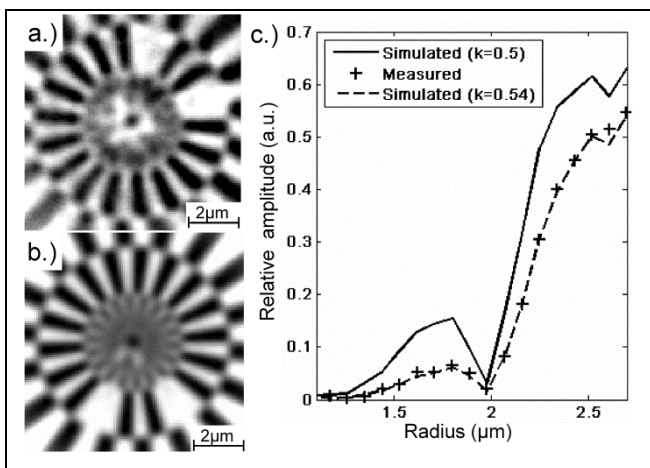
Az asztigmatiát az O2 és O3 objektívek közé elhelyezett kalcit lemezzel vezetjük be. Az ordinárius fókusz kiküszöbölésére a fényforrás polarizációs síkját a kalcit lemezzel szinkronban forgatjuk. A polarizátor előtt a nyalábot egy $\lambda/4$ -es retarder segítségével cirkulárisan polarizálttá alakítottuk. A forgatás során elkerülhetetlen intenzitásmodulációt, illetve a lézer teljesítményének

időbeli változását egy referenciadetektorral (DET2) mértük. Az asztigmias nyalábot a mintára egy $NA=0,55$ numerikus apertúrájú objektívvel fókuszáltuk le. A projekciók felvételéhez a mintát piezó eltolóra helyeztük, amivel $100\ \mu\text{m}$ maximális elmozdulást $5\ \text{nm}$ -es pontossággal lehetett elérni mind a három dimenzióban. A projekciókat $90\ \text{nm}$ -es lépésközzel, a szinogramot $0,9^\circ$ -os szögelfordulással vettük fel. A fókuszvonal mért félértékszélessége ($0,495\ \mu\text{m}$) jó egyezést mutatott a számolt értékkel ($0,487\ \mu\text{m}$). A fókuszvonal hosszmenti eloszlása inhomogén volt (**4.2.7 ábra**), ezért a méréskor csak a középső $10\ \mu\text{m}$ -es tartományt használtuk.



4.2.7 ábra: A minta pásztázására létrehozott asztigmias vonal kereszt- és hosszmetsete [102].

A mért szinogramokból szűrt visszavetítéssel rekonstruáltuk a képeket. A rendszer leképezésének vizsgálatához az RTS-t használtuk. A kvantitatív elemzéshez kiszámoltuk a *MTF*-et. A **4.2.8 ábrán** az RTS minta aLSTOM-mal mért és szimulált képei láthatók. A mért *MTF* alapján a feloldás 8%-ban elmaradt a várt elméleti értéktől. A hiba legjelentősebb forrásának a piezo eltoló hiszterézisét gondoltuk, ami a nagyobb sebességeknél lépett fel. A hibát a pásztázási sebesség csökkentésével vagy a nyalábpásztázásra való áttéréssel terveztük kiküszöbölni, erre azonban a projekt során már nem került sor.



4.2.8 ábra: Richardson csillagminta aLSTOM rekonstruált (a) és szimulált (b) képei, illetve a kiértékelt modulációs transzfer függvények [102].

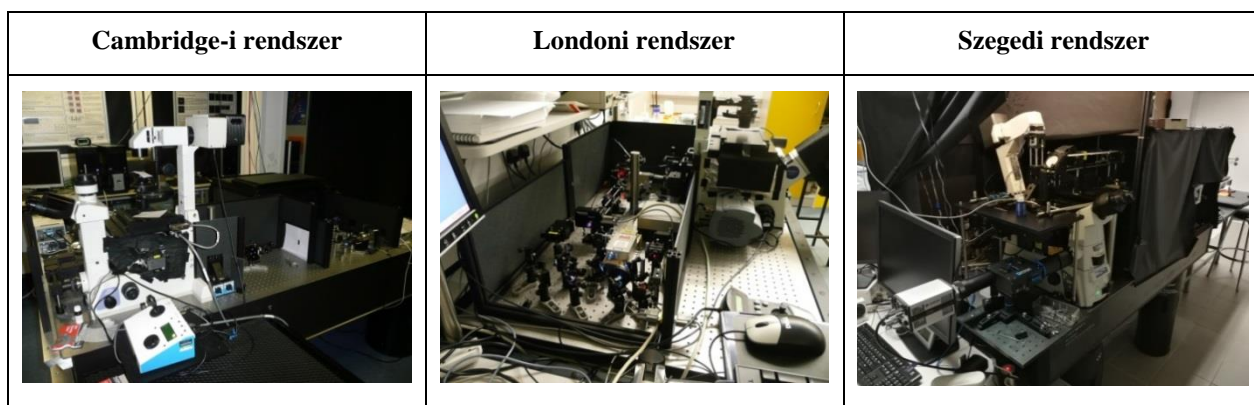
Összefoglalva:

- Egy vonalpásztázáson alapuló, tomografikus képrekonstrukciós optikai elrendezést dolgoztunk ki, amiben a pásztázás iránya merőleges a vonalra és a nyaláb optikai tengelyére. Megmutattuk, hogy az elrendezésnek köszönhetően – a hagyományos transzmissziós geometriákkal szemben – a látótér méretét a nyaláb diffrakciója elvileg nem korlátozza, a rekonstruált kép térbeli feloldása homogén és izotróp. Megvizsgáltuk, hogyan függ a rekonstruált képek minősége a szinogramok felvételénél beállított paramétertől. Megmutattuk, hogy vonalpásztázás miatt az LSTOM $\approx 20\%$ -os térbeli feloldásjavulást eredményez.
- Szakmai vezetéssel megépítettük és teszteltük a javasolt LSTOM optikai rendszert reflektív és fluoreszcens minták vizsgálatára, nyaláb- vagy mintapásztázás alkalmazásával konfokális üzemmódban. A nyaláb forgatása során fellépő kóválygási hiba korrekciójára egy valós idejű mérési elrendezést javasoltunk és teszteltünk eredményesen. A rendszer térbeli feloldását Richardson tesztmintával ellenőriztük és a feloldási küszöb környékén $\approx 15\%$ -os javulást mutattunk ki.
- Javaslatot tettem a pásztázó nyaláb tisztán eltolás-invariáns optikai elemekkel (polarizátorral és kettősen törő lemezzel) történő generálására és forgatására a kóválygásból adódó hibák kiküszöbölésére. Számítógépes szimulációval megterveztük és optimalizáltuk a mikroszkóprendszert, és kísérletileg megmutattuk, hogy asztigmiaát bevezetve a TOM mikroszkópban vonalpásztázásra használható a módosított pontátviteli függvény. A pásztázó nyaláb félértékszélességére kísérletileg kapott $0,495 \mu\text{m}$ jó egyezést mutatott az elméleti $0,487 \mu\text{m}$ értékkel.

Releváns publikációk: [88-91, 100, 102, 103]

4.3 Szuperrezolúciós lokalizációs optikai mikroszkópok tervezése, technikai megvalósítása és tesztelése

2010 és 2012 között ismerkedtem meg a szuperrezolúciós mikroszkópiával a Cambridge-i Egyetemen és a Nemzeti Fizikai Laboratóriumban, ahol vezetésemmel két egyedi kialakítású lokalizációs mikroszkóprendszer épült meg. Az újszerűséget az is mutatja, hogy tudomásunk szerint az Egyesült Királyságban mi építettük az első dSTORM rendszereket. 2013 januárjában visszatértem Szegedre, ahol a lokalizációs módszer továbbfejlesztését tűztem ki célul. A dolgozatomban bemutatott dSTORM-os eredmények döntő része az általam tervezett és épített mikroszkópok egyikén születtek. E fejezet elején bemutatom a három rendszer fontosabb elemeit, kiemelve a közöttük meglévő különbségeket. Fontos megemlíteni, hogy a mikroszkóprendszerek megépítése idején nem léteztek kifejezetten a szuperrezolúciós mikroszkópiához tervezett elemek, ezért az optikai komponensek, a hardverek, a vezérlő és a kiértékelő programok összehangolása, azok optimalizációja fontos részét képezték a munkámnak. Mivel a tudományterület gyorsan fejlődik és évente több új technikai megoldás születik és válik széles körben elérhetővé, a rendszerek ismertetésekor nem egy reprodukálhatóságot biztosító részletes leírás, hanem a szuperrezolúciós funkciók kiemelése volt a fő célom. A mikroszkóprendszerek bemutatása után röviden kitérek a kidolgozott lokalizációs kódra, majd végül három példán keresztül bemutatom a rendszerek alkalmazhatóságát.



4.2.1 ábra: Megépített dSTORM rendszerek

4.3.1 A Cambridge-i Egyetemen épített dSTORM rendszer (CAM_STORM)

A Cambridge-i Egyetemen megépített rendszerben egy manuális, inverz mikroszkópot (Nikon TE-300 Eclipse) használtam alapvázként. A biológiai minták vizsgálatához szükséges volt a minta kivilágítási szögének tetszőleges változtatása EPI és TIRF módok között. A TEM₀₀

nyalábprofil eléréséhez a lézereket optikai szálba csatoltam és dikroikus tükrökkel egy közös tengelyre fűztem. A nyaláb méretét úgy állítottam be, hogy a mintán elérjük a dSTORM technikához szükséges $\sim 5\text{ kW/cm}^2$ fényteljesítményt. A szuperrezolúciós STORM képek rögzítéséhez egy hátsó kivilágítású EMCCD (Andor Ixon 897, 512×512 , pixelméret: $16\ \mu\text{m}$) kamerát használtunk. Az alkalmazott Nikon TIRF objektív ($M=100\times$, $NA=1,49$) hátsó fókuszába egy $f=200\ \text{mm}$ fókusz távolságú akromatikus lencsével fókuszáltunk. Az alkalmazott lézerek kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy a mintán a gerjesztő nyaláb nagysága összemérhető legyen a látótérrel ($\sim 80 \times 80\ \mu\text{m}^2$). E feltételek teljesítéséhez viszonylag nagy teljesítményű ($>100\ \text{mW}$), folytonos üzemmódú (CW) lézerekre van szükség. A rendszerbe beépített lézerek listája a **4.3.1 táblázatban** olvasható.

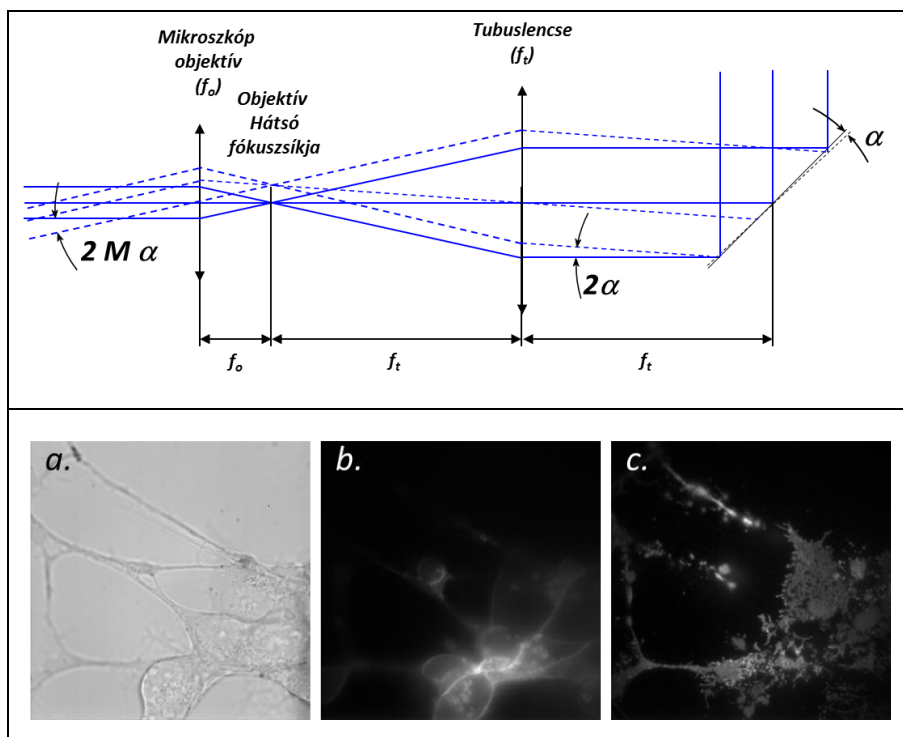
A lokalizációs technika a gerjesztés finom beállítását követeli meg. Míg a vizsgálandó terület kiválasztása alacsony, addig a STORM adatgyűjtés nagy gerjesztési intenzitást igényel. A teljesítmény hangolását lézereként egyedileg kellett megoldani, mert a stabil működtetés érdekében a teljesítményt nem lehetett egy bizonyos küszöb (tipikusan $30\ \text{mW}$) alá csökkenteni. A rendszerbe ezért egy polarizátorból, egy $\lambda/2$ retarderből és egy analizátorból álló egységet építettem be. A retarder motorikus forgatásával az átmenő fény intenzitását a Malus-törvény adja meg, lehetővé téve az intenzitás reprodukálható és tetszőleges beállítását a $0-I_{\text{max}}$ határok között.

Gyártó	Modell	Hullámhossz	Teljesítmény
Toptica	iBeam smart	642 nm	150 mW
Oxxius	SLIM	561 nm	300 mW
Cobolt	DPSS	492 nm	100 mW
Mitsubishi	Dióda (ML320G2-11)	405 nm	120 mW

4.3.1 táblázat: A CAM-STORM rendszerben használt lézerek

A fókuszon kívüli és az autofluoreszcenciából származó fluoreszcens háttér a minta ideális kivilágításával csökkenthető. A minta gerjesztését biztosító optikai elrendezés sematikus képe a **4.3.2 ábrán** látható. A rendszerben alkalmazott lézereket térszűrés (optikai szálcsatlós) és nyalábtágítás után dikroikus tükrökkel egy közös optikai tengelyre fűztem fel. A tubuslencse a beérkező nyalábot az objektív hátsó fókusz síkjába fókuszálja, így a mintát egy kollimált nyalábbal világítjuk ki. A kivilágított felület nagyságát ($D_{\text{gerjesztés}}$) a beérkező nyaláb mérete (D_{laser}) és a lencsék fókusz távolsága határozza meg: $D_{\text{gerjesztés}} = f_o/f_t \times D_{\text{laser}}$, ahol f_o az objektív, f_t a tubuslencse fókusz távolsága. EPI kivilágítás esetén a tubuslencse az optikai tengelyre fókuszál és a mintát

merőlegesen, egész térfogatában gerjesztjük (**4.3.2 ábrán** a kék folytonos sugarak). A kivilágítás szögének változtatásához a tubuslencse elülső fókuszába elhelyeztem egy tükröt (TIRF tükör). Látható, hogy a tükör és a minta síkjai egymás konjugált síkjai, a tükör α szöggel való elfordítása a mintán a nyalábot $2M\alpha$ szöggel dönti meg, ahol a nagyítás értéke $M = f_t/f_o$. Kellően nagy numerikus apertúrájú objektívet alkalmazva elérhetjük, hogy a fedőlemez/minta felületen a beesési szög meghaladja a teljes visszaverődéshez szükséges kritikus szöget. Ezért a rendszerben egy Nikon TIRF objektívet (CFI Apo) használtunk, aminek a numerikus apertúrája $NA=1,49$ volt.



4.3.2 ábra: A minta a tubuslencse elülső fókusz-síkjába helyezett (TIRF) tükör segítségével tetszőleges irányból kivilágítható.

Fehér fényű kivilágítással (a), EPI (b) és TIRF (c) gerjesztéssel felvett képek a minta azonos területéről.

4.3.2 A Nemzeti Fizikai Laboratóriumban épített STORM rendszer (NPL_STORM)

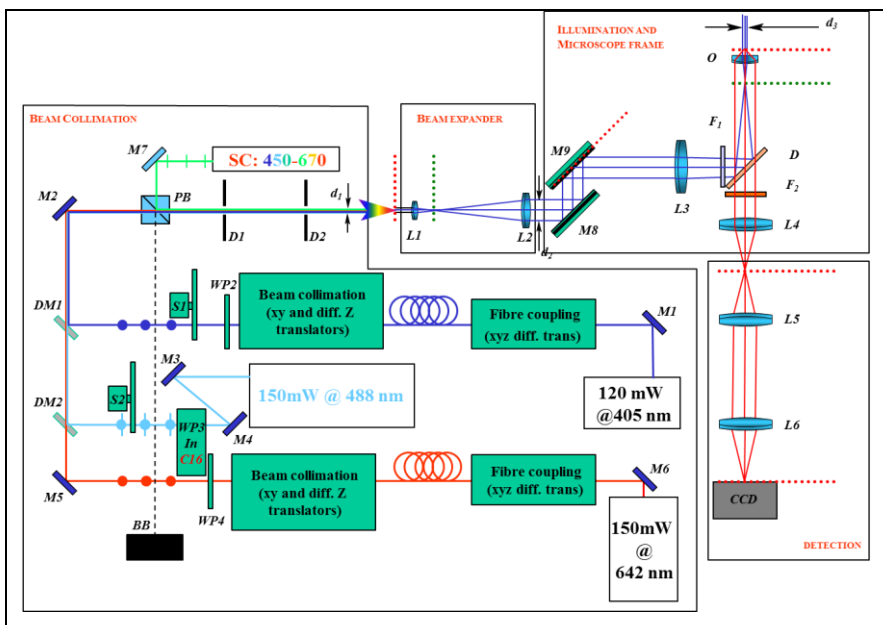
A Nemzeti Fizikai Laboratóriumban (NPL) felépített dSTORM lokalizációs mikroszkóp vázlatos felépítését a **4.3.3 ábra** mutatja. A mikroszkóprendszerbe három keskenysávú és egy szuperkontinuum lézert csatoltam be (**4.3.2 táblázat**). A 4 W teljesítményű szuperkontinuum (SC) lézer szélessávú nyalábjából a kísérletekhez alkalmazott hullámhosszakot egy, a látható tartományban (420-650 nm) működő, nyolccsatornás AOTF szűrő segítségével választottuk le. Az egyes csatornák sávszélessége 2-5 nm volt. Az AOTF-ben fellépő interferenciák miatt több, egymáshoz közeli csatorna együttes alkalmazása további spektrális szűrést igényelt. Mivel az SC-lézer spektrális teljesítménye egy adott hullámhosszú, keskenysávú lézerhez képest nagyon alacsony, még a nyolc, egymáshoz nagyon közeli AOTF csatorna megnyitása sem biztosította a

kellő fénytéljesítményt dSTORM képek felvételéhez. Ezért az SC-lézert elsősorban kalibrálásra és hagyományos fluoreszcens képek felvételére használtuk. Az SC-lézert egy polarizációs nyalábosztó kockával fűztem fel a többi lézernyalábra.

Gyártó	Modell	Hullámhossz	Teljesítmény
Toptica	iBeam smart	642 nm	150 mW
Coherent	Sapphire 488 LP	488 nm	150 mW
Mitsubishi	dióda (ML320G2-11)	405 nm	120 mW
Fianium	SC400-4 FemtoPower1060	420-2000 nm	4W, 1-2 mW/AOTF csatorna (400-650 nm)

4.3.2 táblázat: Az NPL-STORM rendszerben használt lézerek

A minta kivilágításának szögét a CAM-STORM rendszerben alkalmazott elrendezéssel valósítottam meg, de ebben a rendszerben a tükör forgatását motorizáltam. A motorizációnak kettős oka volt: egyrészt gyors és reprodukálható módon lehetett az egyes kivilágítási módok között váltani, másrészt lézerbiztonsági okokból a rendszernek zártnak kellett lennie. További biztonsági elem volt a mintatartóra tervezett mágneses kapcsolóval ellátott fedél, amely nyitása esetén lekapcsolta a lézert. A rendszert úgy kellett megtervezni, hogy biológus kollégák is biztonságosan használhassák önállóan. A rendszerhez használati utasítás és kockázatkezelési útmutató készült. A rendszer mechanikai stabilitását nagymértékben tudtuk növelni a mintatartó asztal alatti térrész izolációjával, mert az instabilitás elsődleges oka a légáramlás (nem pedig a hőmérsékletváltozás) volt.



4.3.3 ábra: A Nemzeti Fizikai Laboratóriumban (NPL) megépített dSTORM rendszer sematikus rajza.

4.3.3 A Szegedi Tudományegyetemen épített dSTORM rendszer (SZTE_STORM)

2013-ban visszatértem Szegedre, az Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékre, ahol nekiálltam egy „saját” dSTORM rendszer megtervezésének. A célom az volt, hogy az angliai rendszerek építése során összegyűjtött tapasztalatok alapján egy tökéletesebb, stabilabb és univerzálisabb rendszert építsek. Munkámat a Nemzeti Agykutató Program, az MTA Bolyai János Kutatói Ösztöndíja, az EU Marie Curie „hazatérő”, illetve a GINOP Multimodális Optikai Nanoszkópia pályázata támogatta.

A szegedi rendszer alapja egy Nikon Eclipse TiE váz. A gyári EPI/TIRF kivilágító egység helyett saját rendszert építettünk. Az NPL_STORM rendszerhez képest itt a TIRF tükör elé, az objektív hátsó fókuszának konjugált síkjába beépítettem egy HILO kivilágítást biztosító tükröt. E tükör segítségével a gerjesztő nyaláb a mintán önmagával párhuzamosan eltolható, így elérhető a biológiai minták gerjesztéséhez előnyös HILO kivilágítás [104]. A nyaláb dőlésének (EPI-TIRF beállítás) és eltolásának (HILO) függetlenítése miatt a rendszerben Gimbal típusú tükröket használtam, amelyek a nyaláb eltolása nélkül képesek dönteni a fázisfrontot. A gyors és reprodukálható váltásokhoz a TIRF tükör mindkét tengelyét motorizált eltolóra helyeztem. Ennek segítségével a minta tetszőleges 2π térszögből gerjeszthetővé vált.

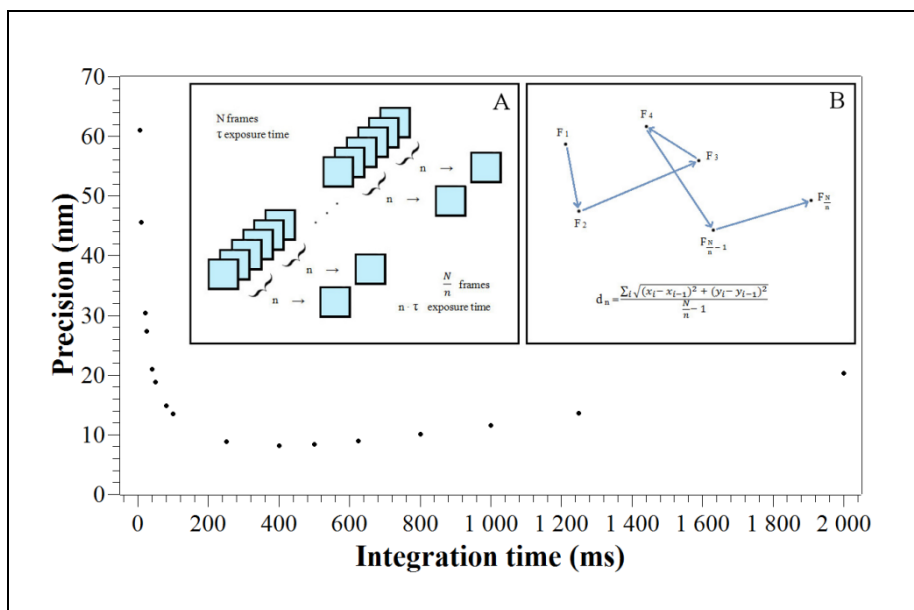
A mikroszkóp 647 nm, 561 nm, 488 nm és 405 nm gerjesztési hullámhosszal működik (**4.3.3 táblázat**). A lézerek teljesítményét a Nikon négycsatornás lézeregységében lévő AOTF segítségével tudjuk finoman hangolni. Az 561 nm és a 405 nm lézereket külön optikai szálcsatlós után vezetjük a lézeregységbe. Alkalmazástól függően 450 nm-es és 532 nm-es lézerek is becsatlakozhatnak a mikroszkópba.

Gyártó	Modell	Hullámhossz	Teljesítmény
MPBC	VFL-P-300-647_B1	647 nm	300 mW
Cobolt	Jive	561 nm	300 mW
Coherent	Sapphire	488 nm	200 mW
Nitcia	NDHV310APC	405 nm	60 mW

4.3.3 táblázat: Az SZTE-STORM rendszerben használt lézerek

A mintát mérés közben a Nikon gyári perfect focus rendszere (PFS) tartja fókuszban. A mechanikai stabilitás növelésére az egész mikroszkóprendszert bedobozoltuk, csökkentve ezzel a légáramlás miatt fellépő elmozdulást. A STORM-os képek felvételéhez szükséges hosszú mérési

idő (>3 perc) miatt Allan Variance módszerrel vizsgáltuk a rendszer időbeli stabilitását. A méréshez fedőlemezen fixált fluoreszcens mikrogömböket használtunk és rövid expozíciós idővel ($\tau=5$ ms), hosszú (40 000 képkocka) felvételeket rögzítettünk. A kiértékelés során az egymást követő képkockákat $n= 2, 4, 8$ stb. integrációs számú csoportokba rendezve imitáltuk a 10 ms, 20 ms, 40 ms stb. expozíciós időkkel rögzített felvételeket. Például N képkockát tartalmazó felvétel és n integrációs szám esetén $n\tau$ expozíciós idejű felvételeket tudunk generálni, miközben a képkockák száma N/n -re csökken (**4.3.4 A ábra**). Meghatározva a mikrogömbök pozícióját az egyes képkockákon kiszámolhatjuk a szomszédos kockák közötti eltérést. Az így kiszámolt, adott n integrációs számhoz tartozó N/n elmozdulás-értékkel jellemezhetjük az $n\tau$ expozíciós időhöz tartozó lokalizációs pontosságot (**4.3.4 B ábra**). Egy stabil mérőrendszer esetén az expozíciós idő növelésével a lokalizációs pontosság minden határon túli javulását várjuk. Ezzel szemben a tapasztalat azt mutatja, hogy létezik egy optimális expozíciós idő (integrálási szám), ami felett a precizitás nem javul tovább, a mikrogömbök pozíciójának meghatározása egyre bizonytalanabbá válik. A kísérleteket öt különböző fixálási protokollal (poli-L-lizin; glicerin, metanol, paraformaldehid, glutáraldehid) végeztük el és minimális eltéréssel mindig 400 ms expozíciós idővel kaptuk a legprecízebb lokalizációt. A fixálási protokolloktól való függetlenség azt jelenti, hogy a mikrogömbök azonos jelleggel kötődnek a felülethez mind a négy esetben. Annak megállapítására, hogy az időbeli instabilitást a minta (mikrogömbök mozognak a felületen) vagy maga a mikroszkóprendszer vezeti be, megismételtük a kísérletet egy olyan tesztmintával, amelyen egy vékony fémrétegben diffrakciós küszöbnél kisebb méretű túlyukak voltak. Ilyenkor a minta saját mozgásától eltekinthetünk, instabilitást csak a rendszer vezethet be. Az eredmények azt mutatták, hogy az optimális expozíciós idő 600 ms-ra növekedett. Feltételezésünk szerint az instabilitás legfőbb forrása a motorizált tárgyasztal és a PFS, ezért a STORM mérések protokolljába bevezettünk egy extra (1-2 perc) várakozási időt a ROI kijelölése és a tényleges adatgyűjtés között. Ez az időtartam elegendő ahhoz, hogy a szoros mechanikai kapcsolatban lévő asztal/minta/objektív rendszer termálisan stabilizálódjon. Az Allan Variance módszerre alapuló stabilitásmérést egy igen hasznos és praktikus eszköznek véljük az optimális STORM paraméterek meghatározásához, ezért felhasználóbarát GUI felületet szerkesztettünk az általunk AVAR-nak nevezett Matlab kódhoz, és egy részletes leírással együtt szabadon letölthetővé tettük a kutatócsoport honlapján [<http://titan.physx.u-szeged.hu/~adoptim/>].



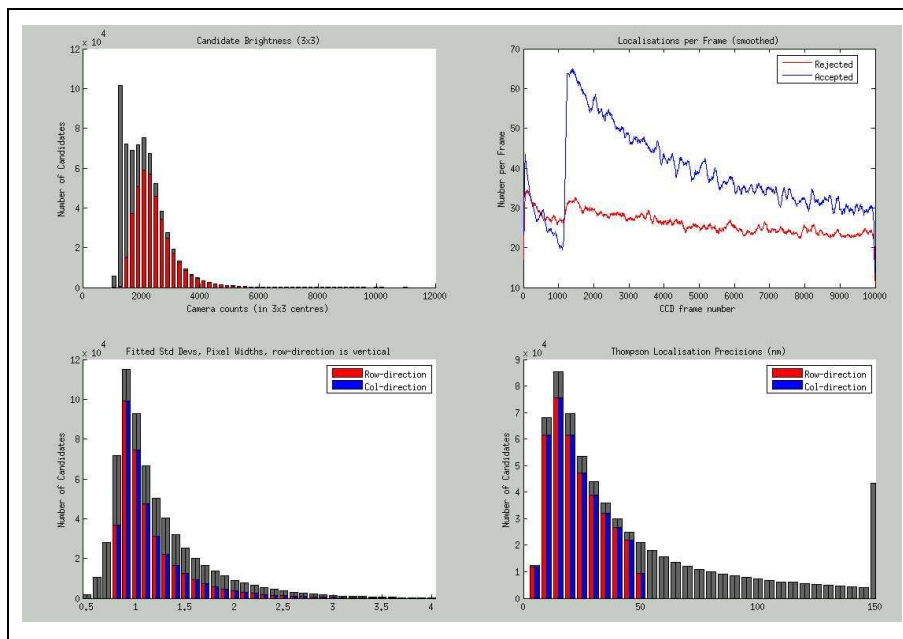
4.3.4 ábra: Allan Variance stabilitási görbe

A mikroszkóprendszer a STORM modalitáson túl képes konfokális, DIC, fáziskontraszt, FLIM, FCS és anizotrópiás mérések elvégzésére. E modalitások részletezése nem tárgya dolgozatomnak, de szükséges őket megemlíteni, mert e modalitások együttes alkalmazása az egyik fontos távlati célunk.

4.3.4 RainSTORM

2018-ban megrendezésre került egy önkéntes jelentkezésen alapuló verseny, amely során a lokalizációs szoftverek teljesítményét lehetett fel- és összemérni [105]. A versenybe harminc programot neveztek be, ami jól mutatja a kutatási terület dinamikus fejlődését és azt, hogy egyelőre nincs a szakterületen bevett, széles körben elfogadott lokalizációs kód. Ennek elsődleges oka, hogy a felhasználók egy dinamikus, az egyedi igényeket is figyelembe vevő szoftvert szeretnek használni. Ez legtöbbször oda vezet, hogy a kutatócsoportok saját fejlesztésbe kezdenek és maguk írják meg egyedi lokalizációs kódjukat. 2009-ben még nem állt rendelkezésre ennyi kód, számunkra nem volt választási lehetőség, csak egy saját fejlesztésű algoritmus megírása jöhetett szóba. A RainSTORM-nak nevezett program az elmúlt tíz évben többször is megújult és jelenleg a 3.1.7 verziót használjuk. (A RainSTORM-ban a „rain” nem rövidítés, a névválasztásnál a Cam folyón a szemerkélő esőcseppek ihlették meg Eric Rees kollégámat.) Az egyes verziók a kutatócsoport honlapjáról letölthetők és szabadon használhatók. A felhasználókat használati utasítás segíti.

A RainSTORM egy Matlab-ben írt lokalizációs kód, amely képkockánként értékeli ki a felvételeket és egy szűrési lépés után Gauss-függvényt illeszt az egyedi molekulák képeként azonosított felvillanásokra [106]. A végső kép minőségét alapvetően befolyásolják a beállított szűrési paraméterek. A két legfontosabb paraméter a felvillanás intenzitása (fotonszám) és félértékszélessége. A programban más paraméterekkel együtt ezek is szabadon választhatók. A képminőség ellenőrzésére leggyakrabban használt kiértékelő hisztogramokat megadó ablakot a **4.3.5 ábra** mutatja. Az első, (a) részábrán a szürke szín az összes, a vörös a szűrési feltételeknek eleget tevő felvillanások intenzitásainak hisztogramját mutatja. A (b) részábrán az illesztett 2D Gauss-görbék x/y irányú (kék/vörös) standard deviációi kerültek ábrázolásra. A szürke itt is az összes, míg a kék/vörös színű oszlopok a szűrési feltételeknek eleget tevő lokalizációkat mutatja. Jól látszik, hogy a maximum az optimális 1-es pixelértéknél található. A két irány azonos jellege bizonyítja, hogy ennél a mérésnél nem volt asztigmiaával terhelt a rendszer. A (c) részábra az elfogadott (kék) és kiszűrt (vörös) lokalizációk számát mutatja. A 10 000 képkocka felvétele során az elfogadott lokalizációk száma 45-ről viszonylag gyorsan (1000 képkocka felvétele után) 20-ra csökkent, ezért itt bekapcsoltuk a 405 nm-es lézert, hogy reaktiváljuk a korábban inaktív állapotba (OFF-state) hozott festékmolekulákat. Az elfogadott lokalizációk monoton csökkenésének oka a minta gyenge bleachelődése lehetett, ami gyakori jelenség dSTORM-os képek felvételekor. A kiszűrt lokalizációk száma lényegesen nem változott a mérés ideje alatt, ami arra utal, hogy a felvillant molekulák detektált képe időben állandó volt, a puffervolyadék a mérés során végig egyenletesen működött. A (d) ábra a Thompson-képlettel számolt lokalizációs pontosságot mutatja. A végső kép rekonstrukciójában ebben az esetben csak az 50 nm-nél pontosabb lokalizációk vettek részt. Látható, hogy a hisztogramok segítségével optimalizálhatók a képfelvétel paraméterei és következtetni lehet az esetleges hibaforrásokra, ezért ezek nagyon hasznos szerepet játszanak a dSTORM mérések során.



4.3.5 ábra: A RainSTORM kiértékelő ablaka az egyes felvillanások intenzitását (a), féltétkészességét (b), az elfogadott és kiszűrt lokalizációk számát (c) és a lokalizációs pontosságot (d) mutató hisztogrammal.

A RainSTORM számos beépített funkcióval rendelkezik. Többek között képes többszínű fluoreszcens mikrogömbökkel kalibrálni a rendszer laterális kromatikus hibáját, klaszteranalizálni a végső szuperrezolúciós képeket, batch fájl segítségével rekonstruálni tetszőleges számú adatfájlt, időben megmutatni egy kiválasztott területen a felvillanások pozícióját és képet készíteni a kiszűrt lokalizációk segítségével. Terjedelmi korlátok miatt ebben a dolgozatban az autodrifting korrekciót kívánom csak részletesebben tárgyalni, mert ez az egyik leggyakrabban használt funkció. Az autodrifting algoritmus beépítésének fő motivációja, hogy az esetek jelentős részében fluoreszcens markert nem tudunk használni, csak a felvett dSTORM nyers képsorozatot tudjuk a laterális drift kiküszöbölésére felhasználni. Az algoritmus a következő négy lépést végzi el:

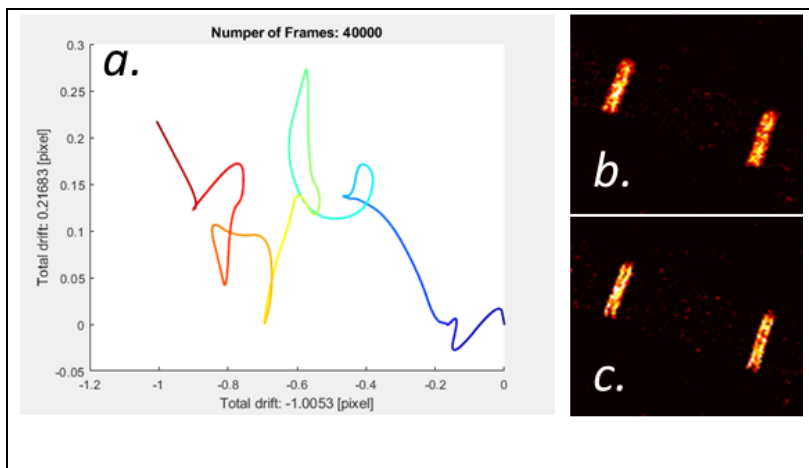
- (i) Az N db képből álló képsort 2001 képből álló csoportokra bontjuk, melyek között 1000 kép átfedés van. Így $K=N/1000-1$ db, 2001 képből álló csoportot hozunk létre. Mivel a STORM képek felvétele során a tipikus expozíciós idő 30 ms, minden egyes csoport $\tau=6$ s hosszú felvételi időablakot jelent. Feltételezzük, hogy e rövid időszak alatt a drift egy \mathbf{v}_{drift} vektorral jellemezhető.
- (ii) Az elfogadott lokalizációkat minden csoportban a lokalizációs pontosságuk alapján sorrendbe rakjuk és 1000 lokalizációnként alcsoportokat hozunk létre. Így az első alcsoport tartalmazza az adott csoportban az 1000 legpontosabb lokalizációt. Ezután egy párkereső algoritmus lokalizációs párokat keres alcsoporton belül és különböző alcsoportokban lévő lokalizációk között. A párkereső algoritmus időbeli és térbeli átfedést keres. Az egymást követő képkockákon a túl kicsi vagy nagy laterális eltérésű

lokalizációkat azonos, illetve különböző festékmolekulaként azonosít, és nem jelöli ki párnak. Mivel a párkereső algoritmus az alcsoportokat sorrendben értékeli ki, a legjobb lokalizációk nagyobb valószínűséggel kerülnek be a megtalált párok közé. Az 500 000 pár megtalálása után az algoritmus egy Gauss-eloszlás illesztésével kiszámolja a \mathbf{v}_{drift} vektort a

$$\sum_i e^{-\frac{(\mathbf{d}_i - \mathbf{v}_{drift} \cdot \tau)^2}{2\sigma^2}}$$

függvényre, ahol $\mathbf{d}_i = (x_{i1} - x_{i2}) \mathbf{e}_x + (y_{i1} - y_{i2}) \mathbf{e}_y$ az i -edik pár lokalizációs koordinátái által meghatározott távolságvektor. Azonos módon mindegyik csoportban kiszámítjuk a \mathbf{v}_{drift}^i ($i=1..K$) vektort.

- (iii) Feltételezzük, hogy ugrásszerű elmozdulások nem történnek a mérések során, ezért a k -adik és $k+1$ -dik csoportot jellemző \mathbf{v}_{drift}^k és \mathbf{v}_{drift}^{k+1} vektorok amplitúdóit és orientációit lineáris interpolációval kötjük össze és számoljuk ki minden egyes eredeti képkockára a laterális elmozdulást. A RainSTORM ezt ábrázolja. A **4.3.6 (a) ábra** egy tipikus elmozdulástérképet mutat. Jól látszik, hogy a mérés folyamán a perfect focus rendszer ötször kapcsolts be, és a drift iránya mind az ötször hirtelen megváltozott. Érdeemes megemlíteni, hogy adott mérésnél a teljes pálya egy $0,3 \times 1 \text{ pixel}^2$ területen belül marad, azaz egy hagyományos képfelvétel során ekkora elmozdulás nem okoz műterméket a végső képen.



4.3.6 ábra: Egy 40 000 képkocka hosszúságú felvétel során mért drift (a) Szarkomer szerkezet dSTORM képe korrekció nélkül (b) és korrekcióval (c)

- (iv) A számolt elmozdulással képkockánként korrigáljuk az eredeti képet. A **4.3.6 b** és **c ábra** a korrekció előtt és után mutatja a rekonstruált szuperrezolúciós képet.

A dolgozatban bemutatott dSTORM szuperrezolúciós képeket a RainSTORM programmal rekonstruáltuk. A RainSTORM-ot számos más kutatócsoport is sikerrel használja [107-111]. Alkalmazhatóságát az is bizonyítja, hogy a fejezet elején említett versenyben a „2D nagy festési sűrűségű” kategóriában a hetedik helyet érte el [105].

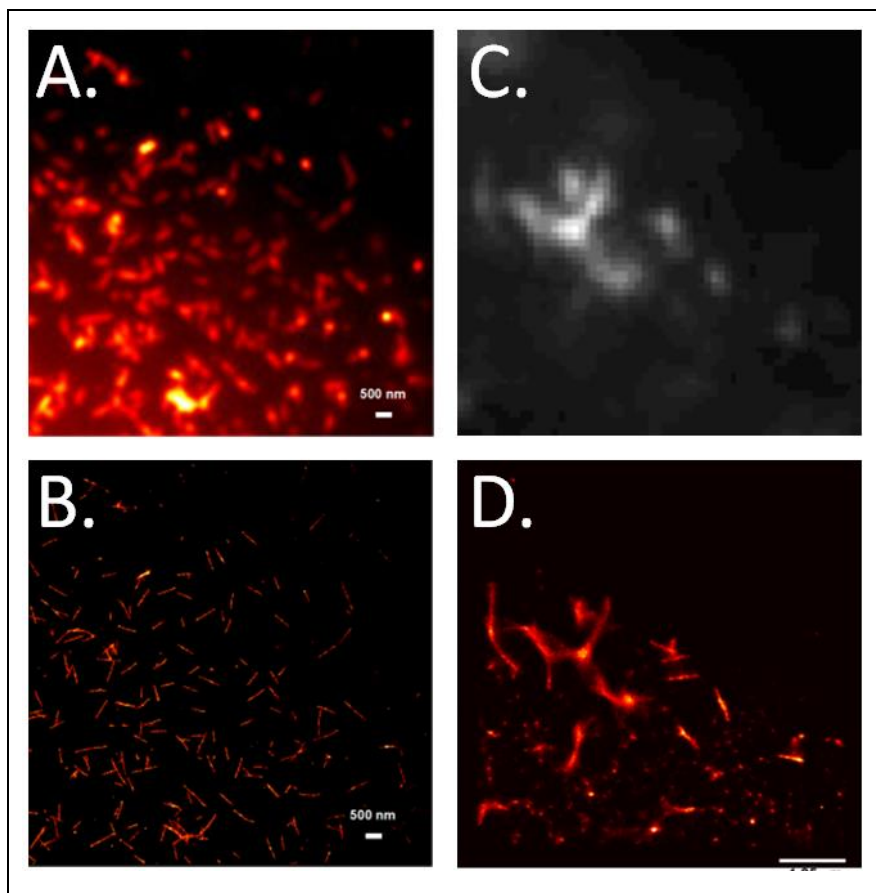
4.3.5 Példák a megépített STORM szuperrezolúciós rendszerek alkalmazására

A rendszer folyamatos fejlesztése mellett méréseket is végzünk orvosi és biológiai kutatócsoportokkal együttműködve. Szöveti metszetekről (agy, gerincvelő stb.), sejt kultúrákról, preparált mintákról felvett <20 nm térbeli feloldású képekkel követjük nyomon és igyekszünk megmagyarázni a molekuláris szinten lejátszódó biokémiai folyamatokat. A kutatások során többek között degeneratív betegségeket (Alzheimer, Parkinson stb.), fehérjék aggregációját, klaszterizálódását és sejtvázak szerkezetét vizsgáljuk. A következő részben reprezentatív példákon keresztül szeretném bizonyítani a megépített STORM szuperrezolúciós rendszerek előnyeit és alkalmazhatóságát. A felsorolt példákban nem a biológia szempontjából releváns konklúziók jelentik a dolgozatomban megfogalmazott tézispontok lényegét, ezt a kooperáló kutatócsoportokra hagyom. Ki kell azonban emelnem, hogy a szuperrezolúciós dSTORM rendszerek alkalmazása nélkül az ő eredményeik sem fogalmazódhattak volna meg.

- **A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ fehérjék internalizációjának és intracelluláris aggregációjának kimutatása**

Az A β ₁₋₄₀ és A β ₁₋₄₂ az amiloid prekursor fehérje (APP) enzimatis hasításakor keletkező 40, illetve 42 aminosav hosszúságú fehérjék. E fehérjék kóros feltekeredése és aggregációja a feltételezések szerint központi szerepet játszik az Alzheimer-kór kialakulásában. Az A β ₁₋₄₂ vizsgálata különösen fontos, mert a hasadáskor sokkal gyakrabban létrejövő A β ₁₋₄₀ fehérjénél jelentősen nagyobb az aggregációs hajlama (és ezért toxicitása). Az extracelluláris térben felhalmozódó A β ₁₋₄₂-ből álló plakkok az Alzheimer-kór jellegzetes velejárói. A plakkok tipikusan az extracelluláris tartományban halmozódnak fel, de egyes feltételezések szerint endocitózissal az intracelluláris térbe is visszakerülhetnek. Mivel az aggregáció kezdeti szakaszában kialakuló oligomerek, illetve maguk a vezikulák is a diffrakció alatti mérettartományba esnek, szuperrezolúciós dSTORM mikroszkópiával vizsgáltuk meg ideg- (SH-SY5Y) és HeLa sejtekben az internalizáció folyamatát. Az eredmények azt mutatták, hogy a folyamat azonos módon zajlott

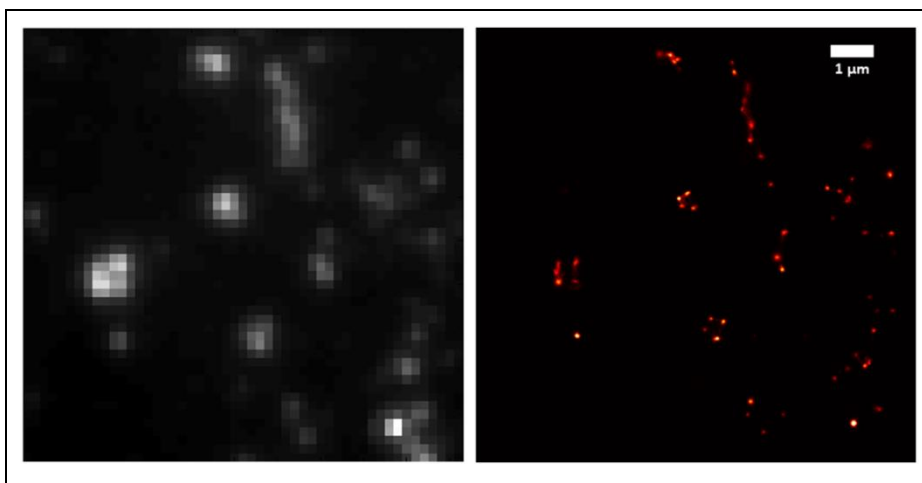
le a két sejttípusban. A sejt kultúrához adott, direkt módon és antitestekkel jelölt $A\beta_{1-40}$ és $A\beta_{1-42}$ fehérjék endocitózissal bekerültek a sejtekbe, ahol $A\beta_{1-40}$ esetén kisebb, míg $A\beta_{1-42}$ esetén nagyobb aggregátumok voltak megfigyelhetők. Az intracelluláris környezetben kialakuló fibrillumok jellege megegyezett az in vitro környezetben aggregálódott fibrillumokéval. A STORM mikroszkópos felvételek lehetőséget adtak az egyes fibrillumok statisztikus kiértékelésére is. Ennek alapján az intracelluláris fibrillumok 300-1900 nm hosszúak és tipikusan (>90%) egyenesek voltak, míg a maradék 10% hajlásszöge a $135-165^\circ$ tartományba esett. A rekonstrukció során <20 nm lokalizációs pontosságot értünk el, és a STORM képeken 40-50 nm szélesnek találtuk a fibrillumokat. Az alkalmazott antitestek tipikus méretének ismeretében (~10 nm) a fibrillumok méretét 20-30 nm-re becsültük. A sejtben tipikusan TIRF kivilágítást alkalmaztunk. A **4.3.7 ábrán** extra- és intracelluláris $A\beta_{1-42}$ fibrillumokat láthatunk hagyományos és szuperrezolúciós felbontásban. Kimutattuk, hogy az egyes fibrillumok idővel nagyobb aggregátumokká és kötegekké állnak össze. Itt érdemes megemlíteni, hogy az $A\beta$ fibrillumokat a világon elsőként vizsgáltuk dSTORM szuperrezolúciós mikroszkóppal.



4.3.7 ábra: $A\beta_{1-42}$ fibrillumok hagyományos fluoreszcens (A, C) és dSTORM képe (B, D), in-vitro (A, B) és sejten belül (C, D) [112].

- ***Endocitózis során kialakuló vezikulák vizsgálata***

A klatrin mediált endocitózis során kialakuló vezikulák mérete a diffrakciós határ alatt van, ezért optikai mikroszkópokkal nem feloldhatók. A dSTORM szuperrezolúciós módszer alkalmas a folyamat követésére és a TIRF kivilágítás különösen alkalmas a sejtfa közelében lévő vezikulák kimutatására. A minta előkészítése során fontos volt, hogy az EGF-Alexa Fluor 647 jelöléssel való 30 perces inkubáció jégen történjen, hogy ezzel nagymértékben lassítsuk a vezikulák internalizációját. Ellenkező esetben a vezikulák mélyebbre jutottak a sejtben és méretük is nagyobb volt. A **4.3.8 ábra** a fenti protokollal festett HeLa sejtekben mutatja a kialakuló vezikulák hagyományos fluoreszcens (A) és dSTORM (B) képét. A kiértékelés azt mutatta, hogy az 50-100 nm átmérőjű vezikulák előszeretettel rendeződnek 3-5-ös csoportokba. Meg kell említeni, hogy a dSTORM szuperrezolúciós képen látható, az egyes vezikulákat összekötő hidak műtermékek, melyek eredetére a **4.4.4 fejezetben** részletesen kitérek.

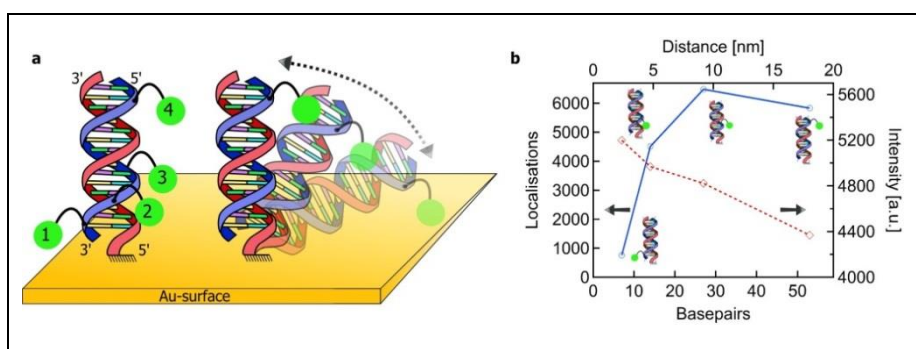


4.3.8 ábra: Klatrin mediált endocitózis során kialakuló vezikulák hagyományos fluoreszcens (a) és dSTORM (b) képei.

- ***Lokalizált felületi plazmonok kimutatása***

A biológiai minták vizsgálatán túl a dSTORM mikroszkópia potenciális lehetőséget nyújt felületi plazmonok szuperrezolúciós feltérképezésére. A fluoreszcens festék megfelelő megválasztásával mind a gerjesztési, mind az emissziós hullámhosszakon csatolás jöhet létre a lokális elektromágneses térrel, ami az adott geometriai paramétereiktől függően fluoreszcencia erősítés vagy kioltás (quenching) formájában jelenik meg. 2011-ben Cambridge-ben kezdtük el azt a projektet, amelynek célja a strukturált vékony fémréteggel bevont felületek közelében lévő fluoreszcens molekulák vizsgálata volt. A biológiában FISH (fluorescence in situ hybridization) néven ismert módszer [113] kitűnően alkalmas a felület és a festékmolekula távolságának finomhangolására. E jelölés során az egyik szál végére egy tiol csoportot kapcsolnak, ami

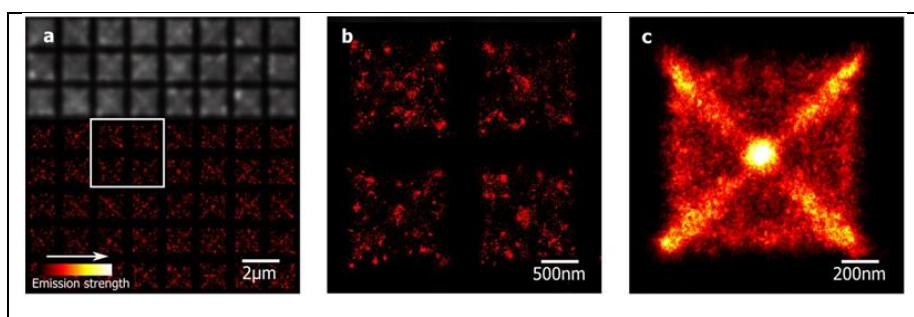
biztosítja az aranyfelülethez való kikötődést. A kettős szál másik oligójához festékmolekulát kötöttünk egy előre megtervezett helyen. Mivel a kettős szálú DNS-ben (dsDNS) egy bázispár hossza jól meghatározott ($\sim 0,3$ nm), az oligókban a nukleinsav sorrendjével pontosan lehet hangolni a festék-tiol csoport távolságát. Ha a dsDNS merőlegesen áll a felületre, akkor ez a távolság megegyezik a felület-festékmolekula távolságával (**4.3.9a ábra**). A kísérletek során négy eltérő hosszúságú oligót használtunk (7, 14, 27 és 53 bázispár) és az aranyfelülettől mért távolság függvényében a lokalizációk száma és a felvillanások átlagos intenzitása a **4.3.9b ábrán** látható. Minden jelölésnél 4200 képkocka hosszúságú felvételeket készítettünk és a 20 nm-nél pontosabb lokalizációt adó felvillanásokat használtuk a statisztikai kiértékeléseknél. A kísérletek azt mutatják, hogy a lokalizációk száma drasztikusan csökken a távolság függvényében, míg a felvillanások intenzitása csak lassan változik. A kezdeti hipotézisünk szerint kis távolság esetén az arany kioltja a festékmolekulát, ezért a detektált fluoreszcens molekulák száma alacsony. A távolság növelésével a kioltás hatása csökken, optimális távolságban a fluoreszcencia-erősítés dominál. A távolság további növelésével a felületi hatások elhanyagolhatóvá válnak. A detektált lokalizációk intenzitásának meghatározása után azonban a távolság növelésével enyhe intenzitáscsökkenést tudtunk kimutatni (**4.3.9b ábra**). Feltevésünk szerint ez a dsDNS szálak elhajlásának (**4.3.9.a ábra**) köszönhető, amikor a szál végén elhelyezkedő festékmolekula közelebb kerül az arany hordozóhoz. Az elhajlás okozta hiba a rövidebb szálaknál kisebb problémát okoz.



4.3.9 ábra: Aranyfelülethez DNS szállal kötött festékmolekulák (a) lokalizációs száma és intenzitása (b) [114].

Arannyal bevont klarite (piramis) struktúrák szuperrezolúciós vizsgálatára a FISH jelölést alkalmaztuk. Cy5 és Hilyte 647 festékeket használtunk 642 nm gerjesztési hullámhossz és 20 ms expozíciós idő mellett (CAM-STORM rendszer). A mintát LabTech tartóba, az „aktív” felülettel lefelé helyeztük el és a pufferfolyadékba nem tettünk MEA-t. Ez utóbbival szerettük volna elkerülni azt, hogy a MEA tiol csoportja leválassza a szintén tiol csoporttal kötődő oligót az arany felületéről. A jelölést úgy próbáltuk optimalizálni, hogy az aranyhoz kötődő oligók telítődésbe

menjenek, azaz 100%-ban fedjék a felületet, míg a festett oligók koncentrációjával a festési sűrűséget tudtuk beállítani. A hagyományos és STORM képek összehasonlítása (**4.3.10 a** és **b ábra**) jól mutatja a szuperrezolúciós képek részletgazdagságát. A képek kiértékelése során levontuk a statikus fluoreszcens háttérrel, továbbá kihasználva a mintázatok periodikus jellegét 60 klarit STORM képet átlagoltunk össze (**4.3.10 c ábra**). A végső, kiátlagolt képen jól látszanak az aktív területek (az élek és a csúcs). Itt érdemes megemlíteni, hogy az elsők között javasoltuk a minta periodikus jellegének kihasználását a dSTORM szuperrezolúciós képek minőségének javítására. Ez a módszer a biológiai minták leképezése során válik fontossá, mert lehetővé teszi a mérési idő csökkentését.



4.3.10 ábra: FISH módszerrel jelölt klarit-struktúra hagyományos fluoreszcens (a), dSTORM (a, b) és az egyedi dSTORM felvételek átlagolt képei [114].

Összefoglalva:

- Az Egyesült Királyságban (Cambridge, NPL) és Magyarországon (Szeged) elsőként építettem dSTORM szuperrezolúciós mikroszkóprendszereket, melyeket alkalmassá tettem EPI-HILO-TIRF kivilágításra/gerjesztésre, 3D és többszínű dSTORM felvételek készítésére. Optimalizáltam és teszteltem a mikroszkópokat, és számos alkalmazáson keresztül kísérletileg megmutattam, hogy a térbeli feloldás 20 nm alá csökkenthető. Az Allan Variance módszerrel meghatároztam a mikroszkóp stabilitását és különválasztottam a minta és a rendszer által bevezetett hibákat. A stabilitási vizsgálatok megmutatták, hogy a rendszerhez köthető optimális 400-600 ms-os integrálási idő egy nagyságrenddel hosszabb, mint a dSTORM technikában tipikusan alkalmazott expozíciós idők.
- Elsőként alkalmaztuk a dSTORM szuperrezolúciós módszert A β és lizozim aggregációjának vizsgálatára sejten és in-vitro körülmények között. A kísérletek kimutatták, hogy az A β ₁₋₄₀ és A β ₁₋₄₂ fehérjék endocitózissal be- illetve visszakerülhetnek a sejtekbe, ahol aggregálódnak. A mérések alátámasztották, hogy az A β ₁₋₄₂ könnyebben formál fibrillumokat,

melyek hosszát 300-1900 nm-nek találtuk.

- FISH módszerrel jelölt 3D klaritstruktúrán 642 nm gerjesztés hatására kialakuló lokális elektromágneses teret térképeztem fel kísérletileg. A dSTORM szuperrezolúciós képek a klaritstruktúra csúcában és az éleknél adták a maximális intenzitást. Kísérletileg megmutattam, hogy a felülettől távolodva a felvillanások száma drasztikusan csökken, miközben intenzitásuk csak lassan változik. A struktúra periodicitását kihasználva az egyes képek átlagolásával javítani tudtam a képminőséget a mérési idő csökkentése mellett.
- Az elsők között egy szabadon hozzáférhető lokalizációs kódot (RainSTORM) fejlesztettünk ki a felvett dSTORM adatok feldolgozására, a szuperrezolúciós képek vizualizációjára és kvantitatív elemzésére. A RainSTORM egy folyamatos fejlesztés alatt álló, számos egyedi beépített funkcióval rendelkező Matlab kód. Többek között képes többszínű fluoreszcens mikrogömbökkel kalibrálni a rendszer laterális kromatikus hibáját, klaszteranalizálni a végső szuperrezolúciós képeket, markerek használata nélkül 2D-ben korrigálni a mérés során fellépő laterális driftet és trajektória-fitteléssel összekötni az egymást követő képkockákon ugyanazon molekulához tartozó felvillanásokat. A program a kiszűrt lokalizációkból is képes képet alkotni, segítve ezzel a lehetséges műtermékek okainak meghatározását. A program segítségével alátámasztottuk azt a feltételezést, hogy a dSTORM technikában a vezikulák leképezésénél gyakran megjelenő, a vezikulákat összekötő hidak műtermékek, a vezikulák a valóságban nincsenek összekötve.

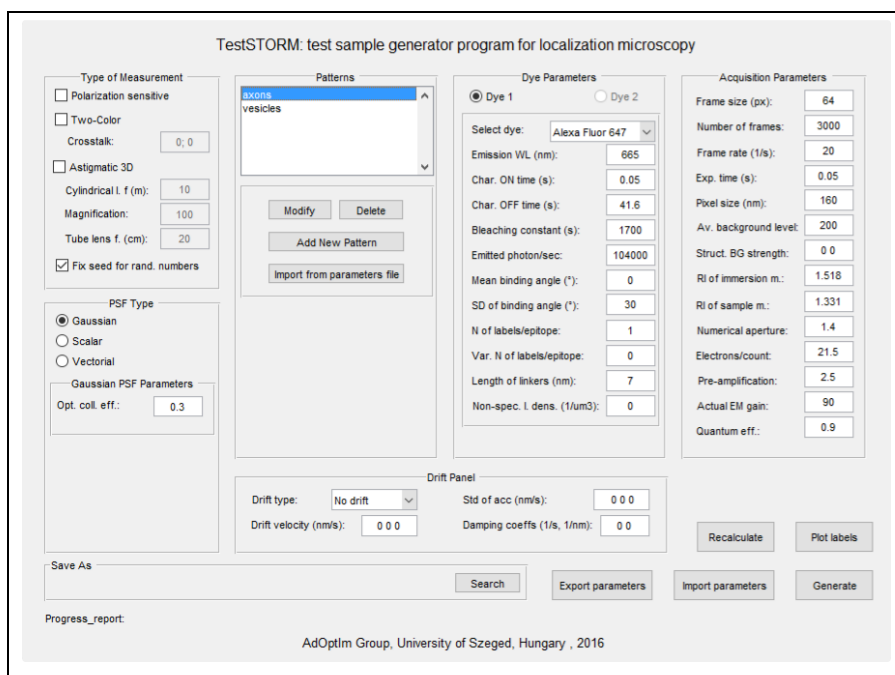
Releváns publikációk: [104, 112, 114-118]

4.4 Leképezési hibák a lokalizációs optikai szuperrezolúciós mikroszkópiában: következmények és lehetséges kompenzációk

A lokalizációs mikroszkópiában generált képek egy összetett rekonstrukciós folyamat eredményeként jönnek létre, amely adatgyűjtési, képfeldolgozási és megjelenítési lépésekből áll. A végső kép számos műterméket tartalmazhat, melyek kiszűrése elengedhetetlenül fontos az eredmények helyes értelmezéséhez. Műterméket a mikroszkóprendszer mindhárom eleme, a minta, az optikai rendszer és az alkalmazott algoritmusok is bevezethetnek. Ebben a fejezetben a műtermékek okait, tulajdonságait, a végső képre gyakorolt hatásait és a lehetséges kiküszöbölésükkel kapcsolatos eredményeimet foglalom össze.

4.4.1 TestSTORM

A mikroszkóprendszer több, a mintát, az optikai rendszert és a mintavételezést számszerűsíthető paraméterrel jellemezhető. A paramétertér finomhangolása kísérletileg nehezen megvalósítható, illetve nagyon költséges eljárás. Az optimális paraméterek és az egyes műtermékek paraméterfüggésének vizsgálatához egy szimulációs programot, a TestSTORM-ot fejlesztettünk ki [119, 120]. A TestSTORM képes a lokalizációs módszerben szerepet játszó paraméterek tetszőleges megválasztása mellett képsorozatot felvenni. A festékmolekulák pontos helyének ismeretében (ground truth model) meghatározhatjuk a rekonstrukció során fellépő hibákat, azok forrását, jellegét, és javaslatot tehetünk kiküszöbölésükre. Érdeemes megemlíteni, hogy nagyon kevés (<5) szabadon elérhető, a TestSTORM-hoz hasonló generálóprogram létezik, a kutatócsoportok legtöbbször a saját speciális eseteik szimulálására írt kódokat használnak. A TestSTORM-ban egy felhasználóbarát GUI felületen lehet a paramétereket beállítani.



4.4.1 ábra: A TestSTORM GUI felülete a minta és a leképezés paramétereinek beállításához [120].

A testSTORM program fontosabb funkciói

Terjedelmi korlátok miatt röviden ismertetem a fontosabb opciókat, és részletesebben csak a polarizáció-érzékeny gerjesztés és detektálás lehetőségére térek ki.

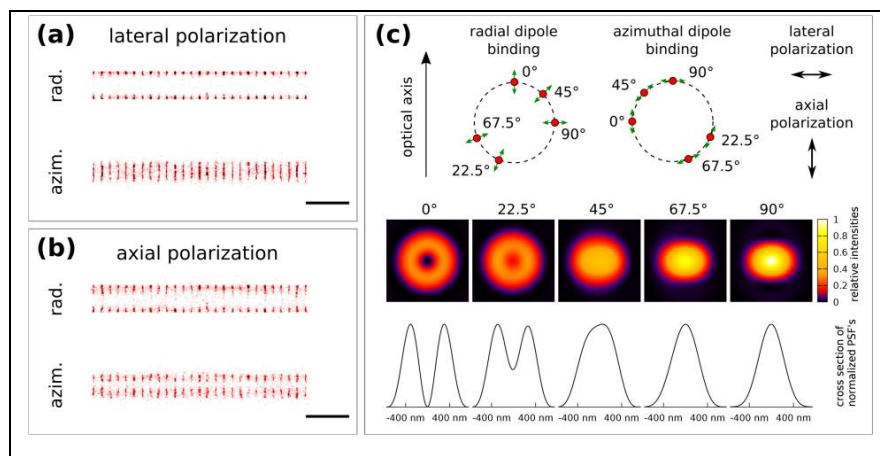
- i. **PSF modellek:** Három *PSF* modellt implementáltunk a szoftverbe. A Gauss-modell alkalmazása esetén a fókuszpontban az intenzitáseloszlást a Gauss-nyalábbal [121] lehet

jellemezni. Ez a leggyakrabban alkalmazott modell, ami jól illeszkedik a fókuszban lévő PSF tényleges alakjához, ám defókuszáláskor műterméket vezethet be, hiszen az optikai tengelyen a Gauss-nyaláb intenzitásprofilja (a valósággal szemben) soha nem csökken nullára. A 3D szimulációkhoz ezért a skalár diffrakció [122], illetve polarizáció-érzékeny gerjesztés/detektálás esetén a vektordiffrakció [76] PSF modellt célszerű használni.

- ii. Többszínű leképezés: A fluoreszcens molekulák többnyire széles (>100 nm) abszorpciós és emissziós spektrummal rendelkeznek [123], ezért a spektrális csatornák közötti áthallás kritikus a dSTORM-nál alkalmazott viszonylag magas ($\approx 1\text{-}5 \text{ kW/cm}^2$) gerjesztési intenzitások mellett. A detektor oldalán sávszűrők alkalmazásával az áthallás csökkenthető, de teljesen nem küszöbölhető ki. A TestSTORM az egyes festékek spektrumai és a beállított szűrőparaméterek alapján megbecsüli az áthallás mértékét, kiszámolja a fotonszámot és legenerálja az egyes képeket.
- iii. Asztigmias 3D STORM: A 3D STORM megvalósításának egyik legegyszerűbb módja, ha egy hengerlencsével asztigmatizációt vezetünk be és a torzult PSF ellipticitásából következtetünk vissza a fluoreszcens molekula axiális pozíciójára. A hengerlencsét a fókusztávolságával definiáljuk a TestSTORM-ban.
- iv. Strukturált, konstans háttér: A minta autofluoreszcenciája és/vagy a fókuszsíkon kívül eső jelölő molekulák állandó háttérrel terhelhetik a STORM képeket. A TestSTORM-ban az egyes képekhez az összegképből tetszőleges súllyal (Struct. BG strength) számolt strukturált háttérrel tudunk hozzáadni. Ez a háttér befolyásolja az egyes lokalizációkat (**4.4.3 fejezet**).
- v. Elmozdulás: A TestSTORM-ba épített drift algoritmus két független erő hatására létrejövő elmozdulások összegeként szimulálja a minta mozgását. Az első egy véletlenszerű (random-walk), míg a második egy előre beállított irányú mozgást eredményez. A mozgást 3D-ben nyolc paraméterrel tudjuk megadni. A programban előre beállított paraméterekkel is kiválaszthatjuk az elmozdulás mértékét. Erre azért van szükség, mert a jelentős elmozduláshoz tartozó sebesség az 1 nm/s nagyságrendbe esik, amit a felhasználók könnyen félrebecsülhetnek.
- vi. Jelölések kötési geometriája: A fluoreszcens molekulák tipikusan antitestekkel kötődnek a mintához (immunhisztokémiai jelölés). A kötések (linkerek) hossza állandónak tekinthető, de orientációjuk általában gyorsan változik. A TestSTORM-ban lehetőség van a linker hosszának és orientációjának megadására.
- vii. Polarizáció-érzékeny gerjesztés és detektálás: A lokalizációs módszerekben a polarizációs effektusok az esetek döntő részében elhanyagolhatók. A mintát cirkulárisan polarizált nyalábban gerjesztik, hogy elkerüljék a fotoszelekció hatását. A képek felvételéhez használt expozíciós idő (5-50 ms) nagyságrendekkel nagyobb, mint a fluoreszcens jelölések

karakterisztikus rotációs ideje [124], azaz a kamera egy időben átlagolt, hengerszimmetrikus *PSF*-et detektál. A polarizáció-érzékeny lokalizációs módszerek akkor válnak fontossá, amikor a mintát jelölő molekulák irányára, mozgékonyására, vagy lokális környezetére vagyunk kíváncsiak. A TestSTORM-ban be tudjuk állítani a jelölések kötési, és a fluoreszcens molekulák dipólmomentumának irányát. A polarizáció-érzékeny STORM szimulációkhoz a TestSTORM-ba polarizátorokat implementáltunk a gerjesztő és detektor karokba. Ezt a funkciót egy aktinyűrűket [125] tartalmazó mintán mutatom be. Az axonokban kialakuló gyűrűs aktinváz a STORM mikroszkópiával kimutatott egyik legkorábbi eredmény. A szimuláció során két jelölési geometriát vizsgáltunk. A fluoreszcens molekulák mindkét esetben rögzítettek voltak, de az első esetben a dipólmomentumuk radiálisan (**4.4.2 a ábra**), míg a másodikban azimutálisan (**4.4.2 b ábra**) álltak a gyűrűhöz képest. A fotoszelekció miatt azt várjuk, hogy a gerjesztéssel párhuzamos dipólmomentummal rendelkező festékmolekulákat tudjuk a legnagyobb hatásfokkal gerjeszteni. Ha a gerjesztő fény polarizációját a gyűrűk síkjával párhuzamosra állítjuk (laterális gerjesztés), akkor a **4.4.2 c ábrán** 90°-ban álló molekulák lesznek szelektíven gerjeszthetők. A számolt **PSF** ebben az esetben enyhén elliptikus lesz, de a STORM felvételek pixelizációja miatt ez a lokalizációt csak kismértékben befolyásolja. A STORM képeken a fotoszelekció a vonalak felhasadását (radiális eset) illetve lerövidülését (azimutális eset) okozza (**4.4.2 a ábra**). A gerjesztő fény polarizációs síkját 90°-kal elforgatva az optikai tengellyel párhuzamos dipóllal rendelkező molekulák lesznek nagy hatékonysággal gerjeszthetők. Ez a geometria „p” polarizációjú TIRF kivilágítással érhető el [126]. A detektált **PSF** alakja ebben az esetben gyűrű alakú és kevés fotont tartalmaz, ezért a lokalizációs kód nem tud Gauss-eloszlást illeszteni rá, azaz nem tudja lokalizálni. A STORM képeken ezért mind a radiális, mind az azimutális jelölések esetén felhasad és meg is rövidül a gyűrűk képe.

Az eredmények jól mutatják, hogy a végső kép jellege mennyire függ a polarizációs viszonyoktól. A mért képeken az átlagolás miatt sem a mintázat felhasadása, sem lerövidülése nem volt megfigyelhető [125]. A szimulációs eredmények kísérleti kimutatásához a festékmolekulákat direkt módon kell rögzíteni az aktin struktúrához (**4.5.1 fejezet**), ami a kutatócsoport egyik távlati célja.

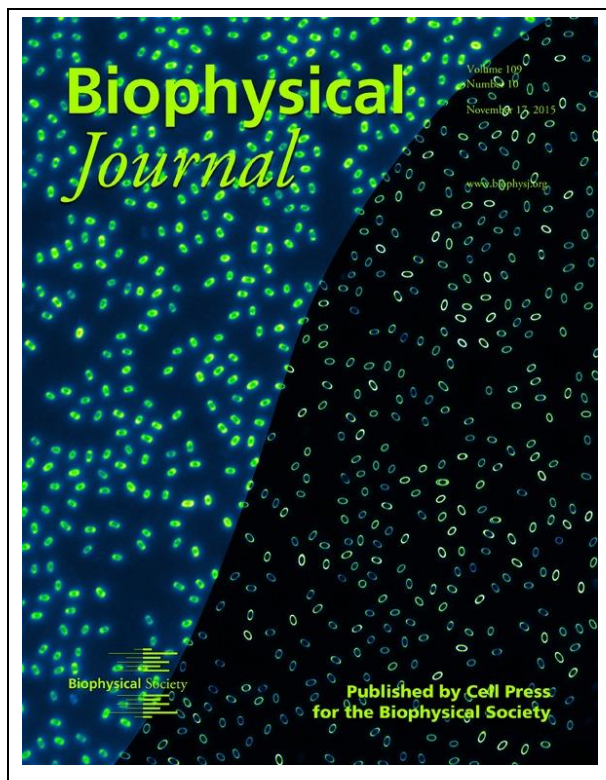


4.4.2 ábra: Polarizáció-érzékeny dSTORM leképezés szimulációja aktívgyűrűkhöz stabilan rögzített festékek esetén [120].

A TestSTORM program kifejlesztését elsősorban a műtermékek vizsgálata motiválta, de megírása után számos más projektben is hasznos szolgálatot tett, illetve független kutatócsoportok is elkezdtek használni a programot.

Reprezentatív példák a TestSTORM alkalmazására saját projekteken

- i. A szénabacillus (*Bacillus subtilis*) endospóra a több mint 70 különböző fehérjét tartalmazó köpenyének köszönheti a kedvezőtlen környezeti feltételekkel szembeni ellenálló képességét. A köpenyt alkotó egyes fehérjék rétegszerkezetének pontos feltérképezéséhez <math><10\text{ nm}</math> pontosságú mérésekre van szükség. A kidolgozott módszerben felhasználtuk a struktúra geometriai formájának (ellipszoid) ismeretét, és a hagyományos fluoreszcens képekre illesztve a rétegek sugarait 10 nm pontossággal tudtuk meghatározni. Az illesztési modell validálásához a TestSTORM-ot használtuk. A teszteléshez egy 500 nm sugarú gömbfelületet jelöltünk meg 10 000 fluoreszcens festékkel homogén módon. A defókuszálást is figyelembe véve a 3D PSF modell generáló funkciót alkalmaztuk, 1,3 numerikus apertúra és 500 nm emissziós hullámhossz mellett. Az expozíciós idő/ON-state élettartam hányadost kellően nagyra választottuk, hogy a molekulák egyszerre legyenek aktívak, ezzel szimulálva a hagyományos fluoreszcens képfelvételt. Az illesztés 497 ± 2 nm sugarat adott vissza, ami bizonyította a módszer kellő pontosságát [127].



4.4.3 ábra: A *Biophysical Journal* 2015. októberi számának borítója az ellipszisillesztő módszerünk reprezentatív képével

- ii. Az általunk kifejlesztett multimodális STORM (mmSTORM) két objektívet használ az emittált fotonok nagy hatásfokú összegyűjtésére (bővebben lásd **4.5.2 fejezet**). A két objektívvel például eltérő tárgysíkokat tudunk egyidejűleg leképezni, így a biplane 3D képalkotás megvalósítható. Döntött miofibrillumok leképezésének szimulálására a TestSTORM szoftvert használtuk. Minden szál hét szarkomer hosszúságú ($\approx 20 \mu\text{m}$) volt és 2° -os lépésekben döntöttük meg őket 0° és 10° között. A zónákban egymástól 130 nm-re lévő 600 nm sugarú korongokban 40-es jelölési sűrűséggel helyeztük el a festékeket. A RainSTORM-mal kiértékelt képeket a *PSF* ellipticitására szűrve vizsgáltuk. A kiértékelés megmutatta, hogy a 4° -ban döntött mintában a kettős vonalak kontrasztja már jelentősen lecsökken. Az ellipticitásra való szűréssel a kontraszt javítható, mert a defókuszált *PSF*-ek járuléka jelentősen csökken [128].
- iii. Az egyedi fluoreszcens molekulák pozíciójának időbeli követése (tracking) egyike a kutatócsoport tervezett projektjeinek. A projekt első fázisában glicerin vizes oldatában vizsgáltuk fluoreszcens festékek diffúzióját. A diffúziós mozgás vizsgálatához a TestSTORM-ba épített Drift algoritmus segítségével generáltunk képsorozatot. A laterális drift paraméter (mean drift velocity) megfelelő megválasztásával a szimulációs eredményekkel jó egyezést mutattak a kísérletek [129].

Reprezentatív példák a TestSTORM alkalmazására független kutatócsoportoktól

- i. Fluoreszcens molekulák fotofizikai paramétereinek gyors mérésére kidolgozott korrelációs módszer tesztelésére alkalmazták a programot [130]. Ebben a munkában a beépített csillagstruktúrát használták magas festési sűrűség és drift mellett. Az Alexa 568 és 647 festékek beépített értékei mellett 3000 frame-ből álló filmeket generáltak 50 ms expozíciós idővel.
- ii. A cellSTORM-nak nevezett olcsó, mobiltelefonos STORM rendszer tesztelésére vonalából és véletlenszerűen elhelyezett vezikulákból generált képeket, illetve a Leibniz Intézet logóját használták a kifejlesztett kameramodellre és neurális hálózatra épülő algoritmus kvantitatív tesztelésére [131].
- iii. Mesterséges neurális hálózatot használó, többszínű dSTORM leképezést lehetővé tévő algoritmus tesztelése. A beépített csillagmintázatot használták két festék (Alexa 647 és Alexa 565) jelölések mellett [132].

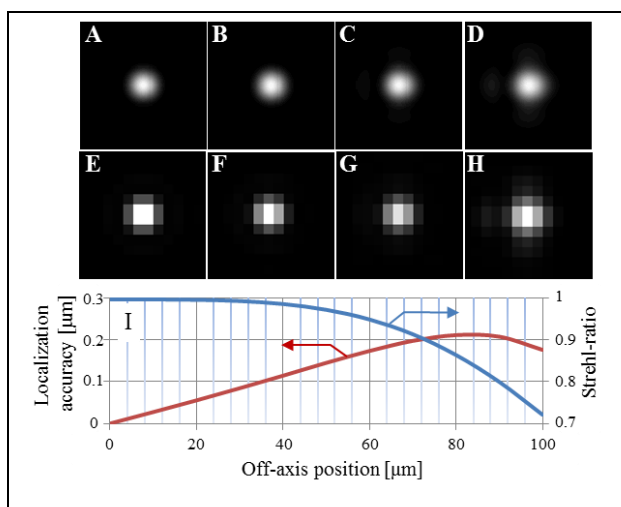
4.4.2 A mikroszkóprendszer által bevezetett műtermékek

A lokalizációs technika kifejlesztése és demonstrálása hagyományos mikroszkópokon történt. E rendszerek tervezésénél a diffrakciólimitből adódó korlátokat vették figyelembe, így az egy nagyságrenddel nagyobb térbeli feloldást biztosító szuperrezolúciós módszerek gondos kalibrációt és optimalizálást igényelnek. Az elmúlt években jelentek meg az első olyan objektívek, szűrők és komplett mikroszkópok, amelyeket kifejezetten szuperrezolúcióra terveztek. Az alkalmazott rendszerek tipikusan gyári mikroszkópokra épültek, ezért vizsgálni kellett az általuk bevezetett optikai leképezési hibákat; a mérések helyes értelmezése lehetetlen e hibák ismerete nélkül.

Monokromatikus leképezési hibák

A szférikus aberráció, kóma és asztigmia torzítják a rendszer pontátviteli függvényét, együttesen vagy egyedileg tolhatják el az illesztett maximumok helyeit, illetve rontják a lokalizációs pontosságot. A torzulás mértéke függ az optikai tengelytől mért távolságtól. Mivel a lokalizációs módszereknél tipikusan redukált (<50 μm) és centrált látótérrel vesszük fel a képeket, a szimulációk során hengerszimmetriát tételezhetünk fel, azaz a pontforrás optikai tengelytől mért távolságának függvényében adjuk meg a hiba nagyságát. Meg kell említeni, hogy speciális esetekben (egymolekula követés, többcsatornás *SMLM* stb.) előfordulhat, hogy a *ROI* mérete

jelentősen megnő. A hiba mértékének meghatározásához OSLO szimulációkat végeztünk. A hibát a lokalizációs pontossággal és a Strehl-aránnyal jellemeztük. A **4.4.4 ábra** mutatja a felül- (A-D) és alul- (E-H) mintavételezett pontátviteli függvényét az optikai tengelytől $r=0\ \mu\text{m}$ (A, E), $r=50\ \mu\text{m}$ (B, F), $r=84\ \mu\text{m}$ (C, G), és $r=100\ \mu\text{m}$ (D, H) távolságra lévő pontforrásoknál. Kiseb távolság esetén ($r < 50\ \mu\text{m}$) a *PSF* torzulása nem jelentős, ám nagyobb távolság esetén a *PSF* aszimmetrikussá válik és a mellékmaximum hengersizmetriája torzul. Ezzel szemben az alul-mintavételezett képeken nem észlelhető a torzulás. Itt érdemes megjegyezni, hogy a STORM képek felvétele során az alul-mintavételezésnek köszönhetően az optikai leképezési hibák nehezen ismerhetők fel.



4.4.4 ábra: Felül (A-D) és alul (E-H) mintavételezett pontátviteli függvények az optikai tengelytől $r=0\ \mu\text{m}$ (A, E), $r=50\ \mu\text{m}$ (B, F), $r=84\ \mu\text{m}$ (C, G), és $r=100\ \mu\text{m}$ (D, H) távolságra lévő pontforrások esetén. (I) A lokalizációs pontosság és a Strehl-arány változása az optikai tengelytől mért távolság függvényében [133].

A szimuláció szerint $50\ \mu\text{m}$ alatt a lokalizációs pontosság lineárisan függ a távolságtól, és a torzulás jellege olyan, hogy a lokalizáció mindig közelebb van az optikai tengelyhez, mint a molekula tényleges helye. Nagyobb távolság esetén a magasabb rendű tagok válnak dominánssá. A maximális, $200\ \text{nm}$ -es pontatlanságot $\approx 84\ \mu\text{m}$ távolság esetén érjük el. A szimuláció eredménye jól alátámasztja azt a feltételezést, hogy a mikroszkóprendszerben alkalmazott optikai elemek hagyományos, diffrakció által korlátozott leképezéshez vannak optimalizálva. A lokalizációs mikroszkópiában ezek az apró torzulások is téves következtetésekhez vezethetnek erősen strukturált vagy periodikus rendszerek (szarkomer stb.) leképezése során, illetve megnehezítik a rendszer kalibrációját [134, 135]. Biológiai minták esetén az esetek döntő részében a monokromatikus hibák a STORM képeken térbeli feloldás csökkenést vezetnek be, a struktúrában történő torzulás nem detektálható.

Kromatikus leképezési hibák

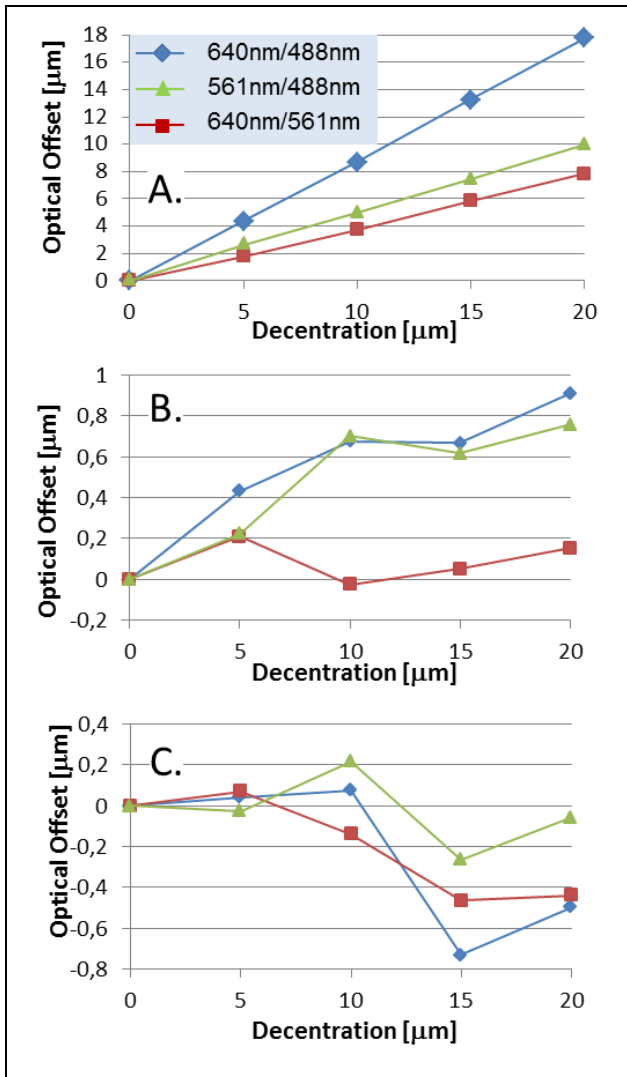
Biológiai és orvosi alkalmazások esetén gyakori igény a többszínű leképezés, amikor egyes sejtalkotókat vagy fehérjéket eltérő fluoreszcens festékekkel jelölnék meg. A különböző gerjesztési és emissziós hullámhosszak kromatikus hibához vezetnek, melynek kvantifikálása és kiküszöbölése elengedhetetlen a végső képek helyes értelmezéséhez.

A többszínű szuperrezolúciós képek pontos regisztrációjához különbséget érdemes tenni a mechanikai elmozdulás és az optikai offset között. Az $r_{drift}(t)$ mechanikai elmozdulás egy időtől függő, de spektrális és helyfüggést nem mutató hiba. Ezzel szemben az optikai offset független az időtől, de hely és hullámhosszfüggéssel bír $r_{offset}(x, y, \lambda)$. Az egyszínű leképezés során a lokalizációs technikákban az optikai offset által bevezetett hibáktól (lásd monokromatikus hiba) tipikusan eltekintünk, de a többszínű leképezésnél a hullámhosszfüggés miatt központi szerephez jut. Két szín esetén a $\Delta r_{offset}(x, y, \lambda_{1,2}) = r_{offset}(x, y, \lambda_1) - r_{offset}(x, y, \lambda_2)$ különbségi optikai offset mértéke jelentősen meghaladhatja a lokalizációs pontosságot és helytelen interpretációhoz vezethet. Az optikai offset mértékét szimulációval és kísérletileg is meghatároztuk. A szimulációkat az OSLO programmal végeztük. A szimuláció során feltételeztük, hogy a fluoreszcens molekulák pontszerűnek tekinthetők és emissziójuk független a gerjesztés módjától (kivilágítás szöge, polarizációs viszonyok stb.). Az objektívet egy apokromatikus immerziós objektív ($M=100$, $NA=1,41$, $f=1,8$ mm) modelljével adtuk meg [136]. A tubuslencsét egy 180 mm fókusz távolságú tökéletes lencsével modelleztük. A dikroikus tükröt és a spektrális szűrőket egy 1,1 mm és egy 3,5 mm vastag, az objektív és a tubuslencse közé helyezett üveglemezekkel ($n=1,4584$, $V=67,82$) modelleztük. A polikromatikus *PSF* kalkulációt használtuk $0,78 \mu\text{m}$ térbeli feloldással $0,2 \times 0,2 \text{ mm}^2$ kiértékelési ablakban. Az ablak középpontja durván megegyezik a geometriai optika által jósolt pozícióval (pontforrás távolsága az optikai tengelytől \times nagyítás). A pontos értéket az ablak középpontjának és a *PSF* lokalizációjának az összege adja meg. A szimulációk során három spektrális ablakot használtunk, amelyek jól illeszkedtek a mérések során alkalmazott dikroikus tükrök (Di01-R405/488/561/635-25x36) és az emissziós szűrők (FF01-446/523/600/677-25) transzmissziós spektrumához.

Gerjesztési hullámhossz	Emissziós szűrő transzmissziós sávjai	Alkalmazott hullámhosszak az OSLO programmal végzett szimulációk során		
		λ_1	λ_2	λ_2
488 nm	502-544 nm	523 nm	502 nm	544 nm
561 nm	582-617 nm	600 nm	582 nm	617 nm
640 nm	663-690 nm	676 nm	663 nm	690 nm

4.4.1 táblázat: A szimulációk során alkalmazott gerjesztési és emisszió hullámhosszak

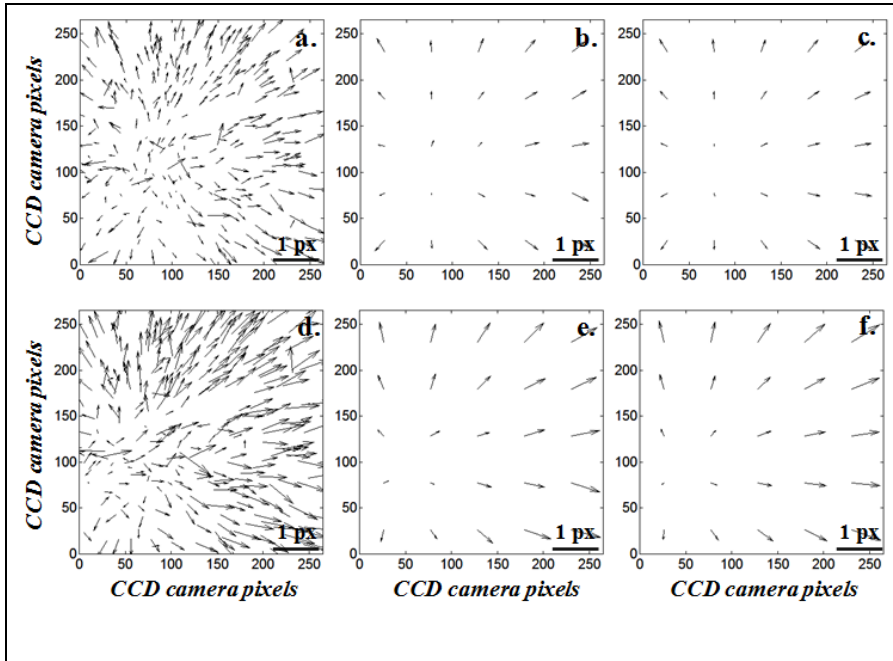
A számolt *PSF* függvények lokalizációval meghatározott helyei az eredeti pontszerű fényforrások optikai tengelytől mért távolságának függvényében a **4.4.5 ábrán** láthatók.



4.4.5 ábra: A lefókuszáláshoz használt objektív (A), egy 45° -ban elhelyezett dikroikus tükör (B) és egy $0,08^\circ$ -ban ékes emissziós szűrő járuléka az optikai offsethez és függése a decentráltástól [137].

A *PSF*-eket az emissziós hullámhosszakon számoltuk ki, de az eredmények könnyebb átláthatósága érdekében a gerjesztési hullámhosszakkal indexeltük őket. Az ábra a lokalizációk eltérését, azaz a különbségi optikai offsetet adja meg három hullámhossz párosítás esetén (kék: 640 nm/488 nm; zöld: 561 nm/488 nm; vörös: 640 nm/561 nm). A szűrő és a dikroikus tükör alkalmazása nélkül a tisztán az objektív által bevezetett hibát a **4.4.5 ábra A** grafikonja mutatja. A hiba lineárisan változik és $\Delta r_{offset}(x, y, \lambda_{1,2}) \approx 18 \mu\text{m}$ nagyságot ér el a $40 \times 40 \mu\text{m}^2$ méretű *FOV* szélén. Az optikai üvegek normál diszperziójának jellege miatt a várakozásoknak megfelelően a legnagyobb hiba a 640 nm/488 nm párosítás esetén lép fel és az infravörös tartomány felé haladva csökken a mértéke. A **B és C grafikonok** külön mutatják a 45° -ban döntött dikroikus tükör illetve a $0,08^\circ$ -ban ékes emissziós szűrő járulékát. Megállapítható, hogy ezen optikai elemek egy

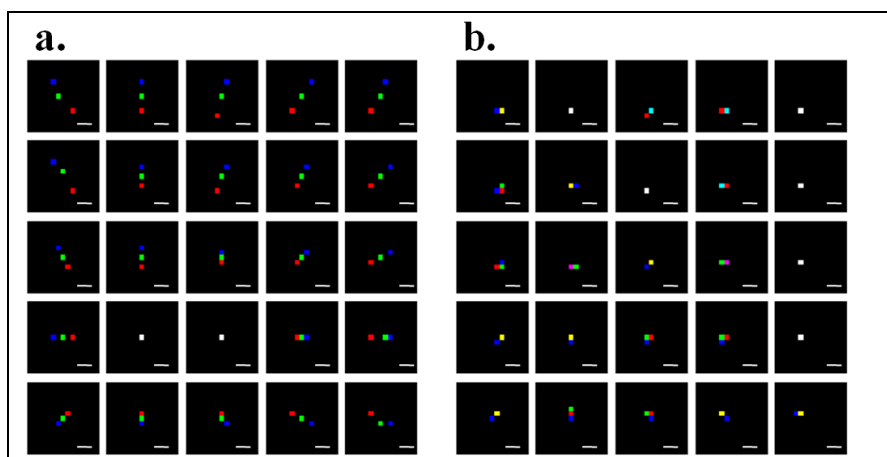
nagyságrenddel kisebb hibát vezetnek be, azaz a laterális kromatikus hiba legjelentősebb forrása a mikroszkópjobjektív. A számolásokat elvégeztük egy másik, nagy numerikus apertúrájú Nikon objektívet [138] szimuláló rendszerre is és hasonló eredményre jutottunk. A szimulációk arra a következtetésre vezettek, hogy a laterális kromatikus hiba legjelentősebb forrását a mikroszkópjobjektívek jelentik, így a gyártó cégek a diffrakció által meghatározott feloldási küszöbhez optimalizálják objektívjeiket.



4.4.6 ábra: Az optikai offset helyfüggésének kísérleti meghatározása fluoreszcens mikrogömbök segítségével 640 nm/561 nm (a, b, c) és 640 nm/488 nm (d, e, f) gerjesztési párok esetén. A nyers (a, d), az átlagolt (b, e) és az illesztett (c, f) adatok jól mutatják, hogyan nő a kromatikus hiba az optikai tengelytől távolodva [137].

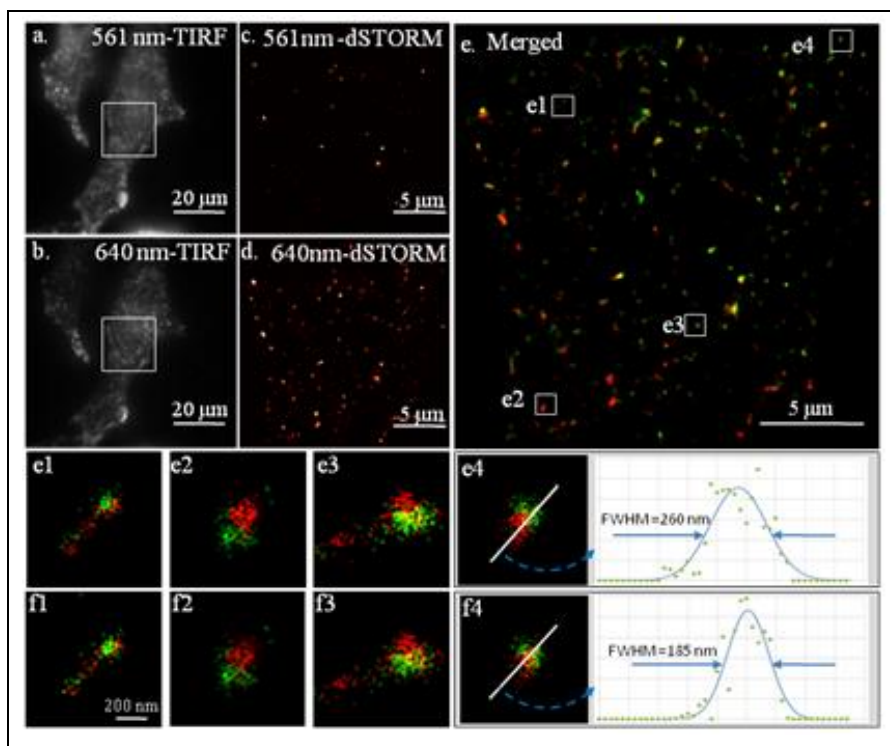
A szimulációs eredmények alátámasztására méréseket végeztem a laterális kromatikus hiba kísérleti meghatározására. A kísérletekhez az NPL-STORM rendszert használtam. Tesztmintaként több színben gerjeszthető, 100 nm átmérőjű fluoreszcens mikrogömbök (Invitrogen Molecular Probes, T7279) lettek kiválasztva. A mikrogömböket egy fedőlemezre (Thermo Fisher Scientific, Lab-Tek chamber, 155411) szárítottuk rá a mérések előtt. Az egyes mérések során 4×200 képkockából álló sorozatot vettünk fel. Az egymást követő gerjesztési hullámhosszak 640, 561, 488 és 640 nm voltak. Az első és utolsó 200 képkocka azonos gerjesztési hullámhosszal történt, hogy ki tudjuk zárni a rendszer mechanikai driftjét. Az expozíciós időt 100 ms-nak választottuk, hogy elérjük a 3-4 nm-es Thompson-féle lokalizációs pontosságot. A kísérletek megmutatták, hogy az első és utolsó 200 képkockán a lokalizációk távolsága a lokalizációs pontosságon belül van, azaz a rendszer mechanikai elmozdulása elhanyagolható a mérés ideje alatt. A további két gerjesztési hullámhosszon történt mérések azonban hely- és hullámhossz-függő relatív optikai offsetet is mutatnak, amelynek nagysága az FOV szélén meghaladhatja a 100 nm értéket. A **4.4.6 ábra** első sora a 640/561, a második a 641/488 párosítás mellett mutatja a mérési

eredményeket. Az **a** és **d ábrák** a ténylegesen nyers relatív offseteket mutatják a mikrogömbök helyein. A FOV 5×5 -ös egyenlő nagyságú területre lett felosztva, és az egyes területeken az átlagolt relatív offset értékeket a **b** és **e ábrák** mutatják. Az eredmények jól visszaadják a számolások során kapott laterális kromatikus hiba jellegét. A tökéletes hengerszimmetriától való eltérést az adott területen való alulmintavételezés (mikrogömbök alacsony átlagos száma) illetve a mikrogömbök elmozdulása is okozhatta. Az elméleti és tapasztalati megfontolások tökéletes hengerszimmetriát feltételezhetnek, ezért a mért értékek korrekciójára másodfokú polinomális transzformációt (polynomial cp2tform MATLAB) alkalmaztunk (**c** és **f ábra**) és az optikai rendszer által bevezetett laterális kromatikus hibát a polinom paramétereivel jellemeztük. A **4.4.7 ábra** a fent leírt 5×5 -ös területen mutatja a lokalizációkat 488, 561 és 640 nm gerjesztések mellett a kalibrálás előtt (**4.4.7 a**) és a korrekció után (**4.4.7 b**).



4.4.7 ábra: Többszínű fluoreszcens mikrogömb lokalizációjának függése a pozíciótól 488 nm (kék), 561 nm (zöld) és 640 nm (vörös) gerjesztő hullámhosszak esetén, korrekció előtt (a), és után (b). A teljes látótér $41 \mu\text{m} \times 41 \mu\text{m}$, a skála 50 nm méretű [137].

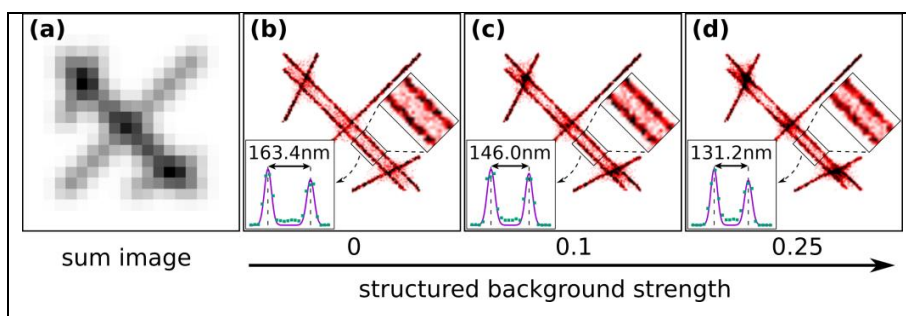
A kromatikus hiba korrekciós lehetőségét beépítettük a RainSTORM-ba, és fluoreszcens golyók segítségével kalibráltuk a mikroszkóp optikai leképezését. A módszert Alexa 647 és Alexa 568 festékekkel jelzett transzferin fehérjékkel teszteltük. A jelzett fehérjék a membránhoz kötődve endocitózissal kerültek be a vizsgált HeLa sejtekbe. A kialakuló vezikulákról kétszínű dSTORM felvételeket vettünk fel, először a 640 nm-es majd az 561 nm-es gerjesztés mellett. Csatornánként 10 000 képet rögzítettünk 20 ms expozíciós idő mellett és az AF647-re optimalizált GLOX pufferfolyadékot alkalmaztunk. A **4.4.8 ábrán** bemutatott mérési eredmények mutatják a két csatornán felvett képek összeillesztésének az eredményét. A kromatikus korrekció után a két csatorna átfedése jelentősen megnőtt.



4.4.8 ábra: Alexa 647 és Alexa 568 festékekkel jelzett vezikulák dSTORM képeinek regisztrációja [137].

4.4.3 Minta által bevezetett műtermékek

A dSTORM mikroszkópia a fluoreszcens minta gondos előkészítését követeli meg. A felvillanások időbeli és térbeli szétválasztása egy felső küszöböt szab a festési sűrűsége. A minta mélyebb rétegeinek leképezése során a szférikus aberráció csökkenti a Strehl-arányt, ami a lokalizációs pontosság romlását okozhatja. A kvantitatív kiértékelést a nem specifikus, illetve fókuszon kívüli fluoreszcens háttér is befolyásolja. A terjedelmi korlátok miatt itt csak ez utóbbit, a strukturált háttér hatását mutatom be röviden egy szimuláción keresztül.



4.4.9 ábra: A növekvő strukturált fluoreszcens háttér (b, c, d) hatása a párhuzamos vonalak szimulált dSTORM képének minőségére [120].

A szimulációban egymással párhuzamosan futó két vonal szuperrezolúciós képeit értékeljük ki a strukturált háttér növelése mellett. A **4.4.9 a ábrán** a hagyományos fluoreszcens képen a vonalak nem feloldhatók, mert a távolságuk kisebb, mint a feloldási küszöb. Ha a fluoreszcens háttérrel zérusnak választjuk, akkor a szuperrezolúciós képen (**4.4.9 b**) a két vonal távolságát

163,4 nm-nek mérjük. A strukturált háttér növelésével a két vonal távolságára kapott érték csökken. A részletes kiértékelés azt mutatja, hogy a strukturált háttér 1%-os növelése 1 nm-rel csökkenti a vonalak számolt távolságát. A csökkenés oka, hogy az egyes felvillanások egy strukturált háttérhez adódnak hozzá, amelynek gradiense a másik vonal felé mutat, ezért a lokalizációt is abba az irányba tolja el. A torzulás mértéke egy lineáris háttér illesztésével csökkenthető.

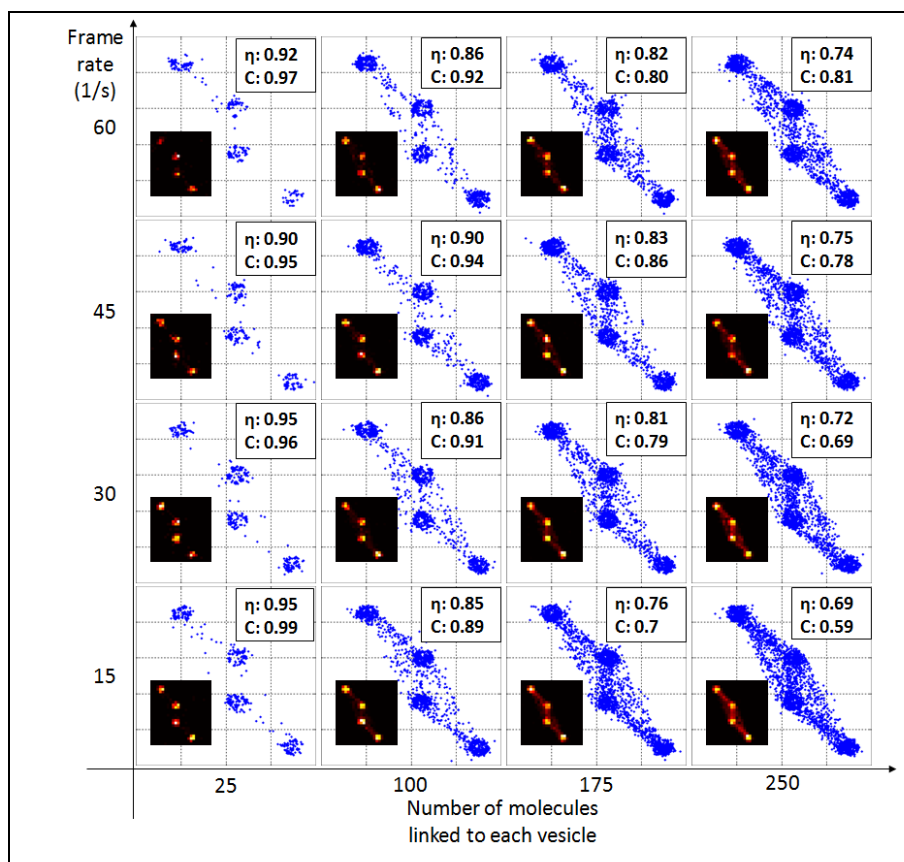
4.4.4 Algoritmusok által bevezetett műtermékek

A lokalizációs mikroszkópiában a kép minőségét a lokalizációs program is nagymértékben befolyásolhatja. A végső képet egy többlépcsős szűrési folyamat során elfogadott lokalizációk alakítják ki és ezek vesznek részt a kvantitatív kiértékelésben. A paraméterek helyes beállítása kulcsfontosságú, mert a nem valós pozitív lokalizációk a végső kép helytelen értelmezéséhez vezethetnek. Jó példa erre a **4.3.5 fejezetben** ismertetett vezikulák leképezése. A mérések kiértékelése során többször beleütköztünk abba a problémába, hogy az egymáshoz közel lévő vezikulákat hidak kötik össze. Felmerült a kérdés, hogy valós fizikai kapcsolatról, vagy műtermékről van-e szó. Ez a probléma egyike volt azoknak, amelyek a TestSTORM kifejlesztésére inspiráltak. A **4.4.10 ábrán** a TestSTORM-mal generált adatok szuperrezolúciós képei láthatók. A minta négy vezikulát tartalmazott és két független paramétert, a festési sűrűséget (a vezikulákon lévő festékek számát) és a képfelvétel frekvenciáját (\approx expozíciós idő reciproka) változtattuk. Az expozíciós idő vagy a festési sűrűség növelésével nő annak a valószínűsége, hogy egy felvételen a szomszédos vezikulákon egyszerre lesznek aktív (ON-state) állapotban molekulák. Ha a lokalizációs algoritmus nem képes ezeket a párokat megkülönböztetni az egyedi molekulák képétől, akkor egy nem valós pozitív lokalizációt kapunk a két valós pozíció, azaz a két vezikula között. A képminőség jellemzésére két jósági tényezőt vezettünk be. A lokalizáció hatásfoka (η) az egész képre vonatkoztatva adja meg a valós pozitív és az összes lokalizáció arányát. Ideális esetben az összes lokalizáció valós pozitív, azaz $\eta=1$. A vezikula-híd kontraszt (C_h) a középső kettő, egymáshoz legközelebbi vezikulákra vonatkozó jósági tényező:

$$C_h = \frac{M_v - M_h}{M_v},$$

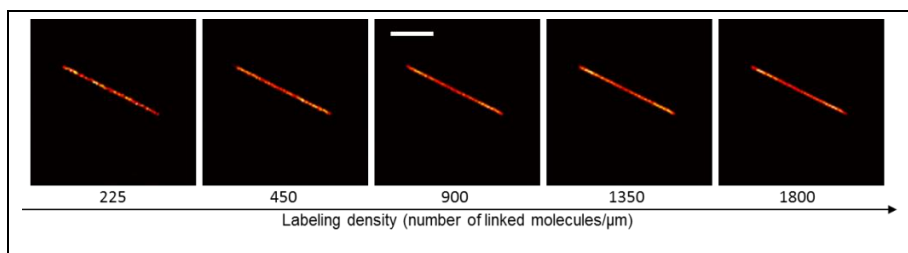
ahol M_v és M_h a vezikulákban, illetve a hídban lévő valós és nem valós pozitív lokalizációk száma. Mindkét jósági tényező jól mutatja a képminőség függését a két paramétertől. A **4.4.10 ábra**

segítségével például megbecsülhetjük az optimális festési sűrűséget a kísérletileg ideális 20 ms expozíciós időhöz.



4.4.10 ábra: Négy vezikula szimulált dSTORM képe az expozíciós idő és a festési sűrűség függvényében [119].

Az algoritmus homogén festés esetén is vezethet be műterméket. A **4.4.11 ábra** egy L hosszúságú fibrillumot szimuláló, TestSTORM-mal generált adatsor kiértékelését mutatja. Az adatsorok generálásánál a festési sűrűséget növeltük meg. Jól látszik, hogy alacsony festési sűrűségnél a szuperrezolúciós kép homogén eloszlást mutat. Ekkor az egyes képkockákon csak egy molekula aktív, a RainSTORM algoritmus a valós pozitív lokalizációkat ad vissza. A festési sűrűség növelésével a vonal két vége intenzívebbé válik. Ekkor egy képkockán több molekula is aktív. Ha egyszerre két molekula van fluoreszcens állapotban és az egyik a vonal közepéhez közel helyezkedik el, akkor a másik csak maximum $L/2$ távolságra lehet tőle. Nem kellően erős szűrés esetén a program ezt nem valós pozitív lokalizációnak érzékeli, azaz két felvillanás egy lokalizációt eredményez, vagy az elliptikus jellege miatt nem lokalizálódik. Ezzel szemben, ha az egyik aktív molekula a szál végén helyezkedik el, akkor a másik molekula elég távol villanhat fel ahhoz, hogy a program két valós pozitív lokalizációként tudja szétválasztani őket. A leképezési paraméterek helytelen megválasztása miatt a fibrillumok szuperrezolúciós képe inhomogén lesz, a két végén „forró pontok” jelennek meg.



4.4.11 ábra: *Fibrillum dSTORM képe homogén, de növekvő festési sűrűség esetén [119].*

Összefoglalva:

- Elsőként fejlesztettünk ki a teljes SMLM mikroszkóprendszer szimulációjára alkalmas kódot. A vezetéssel megírt TestSTORM az egyedi fluoreszcens molekulák képeit (*PSF*) skalár- vagy vektor-diffrakciós modellel számolja, 2D vagy 3D (asztigmias) esetben. Többszínű leképezésnél figyelembe veszi a spektrális áthallást. Magas autofluoreszcencia vagy nem specifikus jelölés figyelembevételéhez strukturált háttérrel terheli a képet. A minta mozgásának szimulációjához a drift paramétereit lehet megadni. A polarizáció-érzékeny detektáláshoz definiálni lehet a festékek kötési paramétereit (a linker hosszát és irányítottságát). A kód segítségével optimalizálhatók a kritikus paraméterek és meghatározható a végső kép paraméterfüggése (process window). A kód használata gyorsabbá, egyszerűbbé és olcsóbbá teszi az előkészületi munkát.
- Az SMLM mikroszkópiában megjelölő műtermékeket eredetük (minta, mikroszkóp és algoritmus) szerint három csoportba soroltam, majd elemeztem az egyes hibák hatását a végső nagy feloldású képekre. Megvizsgáltam és javaslatot tettem a lehetséges kompenzációs lehetőségekre.
- Szimulációkat és kísérleteket végeztem a rendszerben fellépő laterális kromatikus hiba eredetének és mértékének meghatározására. Megállapítottam, hogy a hiba elsődleges forrása a mikroszkópobjektív, mértéke kisebb, mint a diffrakciólimitált feloldási küszöb, de a látótér szélén meghaladhatja a 100 nm-t. Egy fluoreszcens mikrogömbök leképezésén alapuló kalibrációs eljárást adtam meg és építettem be a RainSTORM saját fejlesztésű lokalizációs kódba.

Releváns publikációk: [119, 120, 127, 129, 137, 139-141]

4.5 Multimodális lokalizációs mikroszkópiás eljárások fejlesztése és alkalmazása

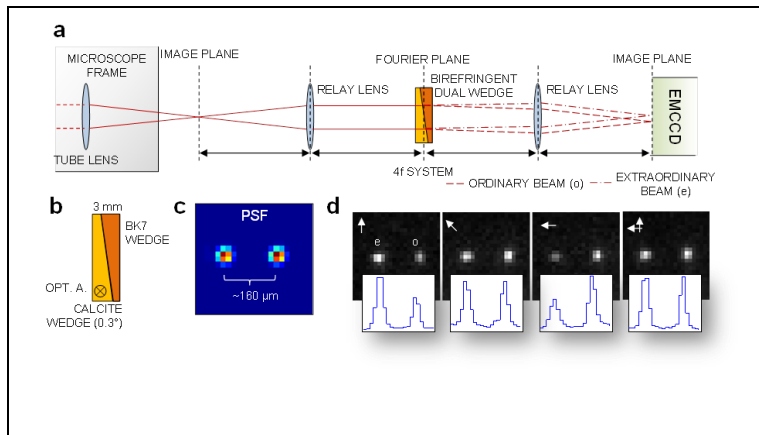
A lokalizációs mikroszkópiai módszerek 2006-os megjelenésük óta több fejlődési szakaszon mentek keresztül. Ezek során javultak a technikai (mechanikai stabilitás, fényerő stb.), a kiértékelési (illesztő algoritmusok, vizualizáció stb.) és a minta előkészítési protokollok (stabilabb és magasabb kvantumhatásfokú festékek, rövidebb linkerek stb.). E munkáknak köszönhetően a 2D SMLM napjainkra széles körben elterjedt módszernek tekinthető.

Hamar felmerült az igény további modalitások kifejlesztésére és alkalmazására. A bevezetőben ismertetett 3D, spektrális és polarizáció-érzékeny módszerek számos változatát javasolták a kutatók. E módszerek összehasonlító elemzése után egyértelmű sorrend ugyan nem állítható fel, de egy adott felhasználásra kiválasztható a legalkalmasabb. Ezért továbbra is fontos az alternatív megoldások kifejlesztése, tesztelése és összehasonlító elemzése.

Ebben a fejezetben két alternatív multimodális megoldást ismertetek. Az első egy könnyen implementálható és olcsó elrendezést javasol a polarizációs mérésekhez. A második egy összetettebb, két objektíven alapuló elrendezést használ, mely alkalmas mindhárom (3D, spektrális és polarizációs) modalitás megvalósítására.

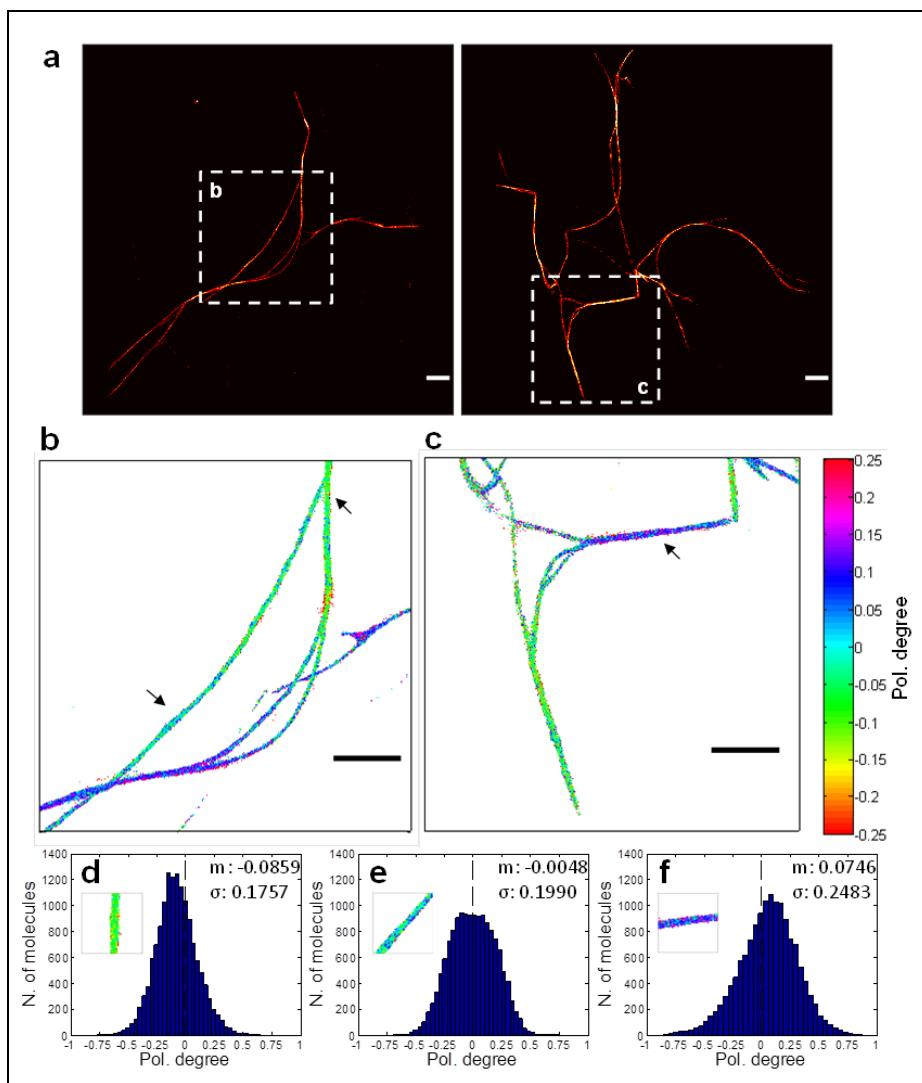
4.5.1 Kettőstörésen alapuló polarizáció-érzékeny STORM (bipolSTORM)

A SMLM módszerekben egy-egy felvillanó fluoreszcens molekula képe a rendszerre jellemző *PSF*, melynek középpontját azonosítjuk a molekula helyzetével. A bipolSTORM módszernél a detektorkarba egy megfelelő vastagságú és orientációjú kettősen törő lemezt helyezünk, amely az emissziós nyalábot ordinárius és extraordinárius nyalábokra bontja. Az optikai rendszert az OSLO optikai szimulációs programmal modelleztük és optimalizáltuk. A kettősen törő lemezt a mikroszkóp és a detektor közé épített 4f rendszer (SZTE_STORM) lencséinek közös fókusz síkjába terveztük (**4.5.1 a ábra**), mert itt kollimált nyaláb halad át rajta. A lemez valójában két ellentétes orientáltsággal összeragasztott ékes ($0,3^\circ$) ablak (**4.5.1 b ábra**). Az ablakok anyaga BK7 és kalcit, és a lemez teljes vastagsága 3 mm. A megtervezett lemezt a DÖHRER Elektrooptik GmbH egyedileg gyártotta le számunkra. A lemez segítségével kialakuló két folt távolságát a detektoron 10 pixelre ($=160 \mu\text{m}$) terveztük (**4.5.1 b ábra**).



4.5.1 ábra: bipolarSTORM módszernél a 4f rendszerbe (a) helyezett kettősen törő lemez (b) kettéválasztja az emittált nyalábot és a kamerán a két polarizációs állapotnak megfelelően egy kettő csúccsal rendelkező PSF keletkezik (c). Rendezetlen molekulák esetén a gerjesztő fény polarizációs állapota határozza meg a két folt relatív intenzitását (d) [23].

Ekkora szeparáció esetén lokalizálhatók az egyedi foltok. A módszer nem csökkenti a látóteret és a foltok ismert távolsága miatt a párkeresés is viszonylag egyszerű algoritmussal elvégezhető. További előny, hogy a megtervezett lemez jó közelítéssel egyenes látású, azaz ki- és betétele során nem kell a detektor pozícióját változtatni. A lemez pozicionálása is egyszerű, hiszen a keletkezett kép nem függ a lemez laterális irányú helyzetétől (a lemez eltolás-invariáns). A kettőzött lokalizációk miatt a minta festési sűrűségét általában csökkenteni kell, ami megnövelheti az adatfelvétel idejét. A lemezt eredetileg 647 nm-es gerjesztésre ($n_{BK7}=1,51$; $n_{kalcit}^e=1,48$; $n_{kalcit}^o=1,65$) terveztük, de a kísérletek során felmerült, hogy más hullámhosszokra is alkalmazni kellene. Ezért megvizsgáltuk a rendszer akromatikusságát. Az OSLO programmal kiszámoltuk az ordinárius és extraordiárius foltok távolságát a hullámhossz függvényében. A látható tartomány alsó határán (430 nm) 10,7 pixel, míg a felső határ közelében (740 nm) 9,9 pixel távolságot kaptunk. A távolság hullámhosszfüggésére kismértékben másodfokú összefüggést kaptunk ($távolság(pixel)=a\lambda^2+b\lambda+c$, ahol $a=6,24\times 10^{-6}$, $b=9,81\times 10^{-3}$; $c=13,74$ és a hullámhosszat nm-ben értjük). A szimulációs eredmények alapján a lemezt az egész látható tartományban tudjuk használni a kiértékelő programban a párkereső algoritmus kezdeti távolságértékének változtatása nélkül.

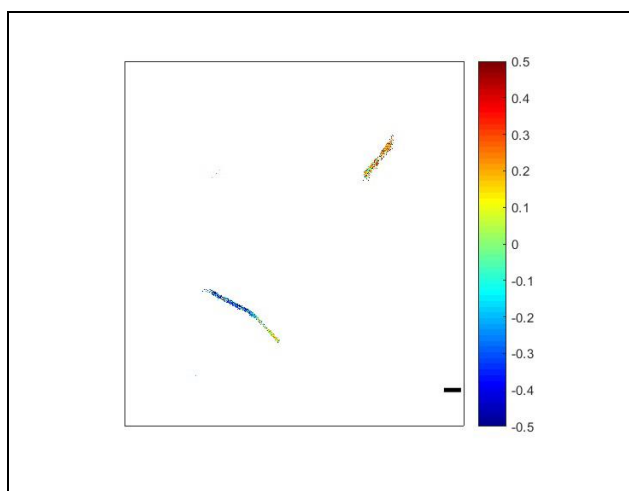


4.5.2 ábra: Aktinszálak dSTORM (a) és a kijelölt területek bipolarSTORM (b, c) képei. A histogramok (d-f) eltérő orientációjú szálak polarizációs fokait mutatják. Skála: 1 μm [23].

A módszer teszteléséhez fluoreszcens mikrogömböket világítottunk ki lineárisan polarizált nyalábbal. A gömbökön a festékmolekulák rendezetlenül állnak, a fotoszelekció miatt a kivilágító fény polarizációs síkjával párhuzamos dipólmomentummal rendelkező festékmolekulák gerjesztődnek a legnagyobb hatásfokkal. Mivel a festékek rögzítettek, ezért az emisszióban is ez a polarizációs komponens fog dominálni ($I_{\parallel}=3 \times I_{\perp}$). A **4.5.1 d ábra** a gerjesztő fény polarizációjának forgatása esetén mutatja a mért kettős csúcsok intenzitásváltozását. Cirkulárisan vagy 45° -ban lineárisan polarizált nyaláb esetén a két csúcs intenzitása azonos.

Rögzített kötés esetén a polarizáció-érzékeny egymolekula detektálás lehetőséget ad a molekulák, illetve a struktúra orientációjának a meghatározására. Mintaként Phalloidin-AF647 jelölt, fedőlemezre fixált F-aktin szálakat (**4.5.2 a ábra**), a gerjesztéshez pedig cirkulárisan polarizált nyalábot használtunk. A kötési pontok körüli forgás bizonytalanságot vezet be a polarizáció és végső soron az orientáció meghatározásában. A **4.5.2 b és c ábrákon** az egyes

pixeleken jelzett polarizációs fok az adott helyre lokalizált molekulák polarizációs fokainak a medián értéke. Jól látszik, hogy a polarizáció foka függ az F-aktin szál orientációjától, ami azt jelenti, hogy a festékmolekula orientációja a szálhoz kötött. A képen három, különböző orientáltságú szakaszt választottunk ki (**4.5.2 d-f ábra**) további feldolgozásra. A területenként 14 000 lokalizáció feldolgozásából készített hisztogramok jól mutatják a kapcsolatot az orientáció és a polarizáció foka között. A hisztogramok kiszélesedése a festékek szabad forgásának a következménye. Az eredmények jó egyezést mutatnak más kutatócsoportok méréseivel [26] és a jelenleg folyó molekuladinamikai számításokkal.



4.5.3 ábra: ThT-val direkt módon jelölt inzulin-szálak polarizáció-érzékeny bipolSTORM képe. Skála: 1 μm [142].

A jelölő fluoreszcens molekulák forgásának csökkentéséhez a minták direkt (linker nélküli) jelölésére van szükség. A Thioflavin-T (ThT) festéket gyakran használják Béta-redőket tartalmazó fibrillumok jelölésére [143, 144]. Folyadékban a szabadon mozgó festékmolekulát alkotó két gyűrűs szerkezet elfordul az őket összekötő kötés körül, ezért a festék fluoreszcencia határfoka alacsony [145]. A fibrillumok Béta-redőjéhez kötve a ThT festékek szabad forgását gátoljuk és a fluoreszcencia mérhetővé válik. Sophie Brasselet kutatócsoportja inzulint jelölt direkt módon ThT-val [146] és GLOX pufferben villogásra kényszerítette a festéket. Első lépésben célunk e kísérlet megismétlése volt a saját fejlesztésű bipolSTORM rendszerünkkel. Az SZTE_STORM rendszert módosítottuk és kiegészítettük a 450 nm-es gerjesztéssel. A **4.5.3 ábra** a kiértékelt polarizációs értékeket mutatja. Jól látszik, hogy az egymásra merőlegesen álló inzulinszálak polarizációs fokaik jelentősen eltérnek. Meglepő, hogy a 45 fokban álló inzulin kötegek átlagos polarizációs foka nem nulla, hanem majdnem a maximális $\pm 0,5$ értéket veszi fel. Ez azzal magyarázható, hogy a ThT molekulák dipólmomentuma közel 45° -ot zár be a fibrillum tengelyével, ami meglepő eredmény és további vizsgálatokat tesz szükségessé.

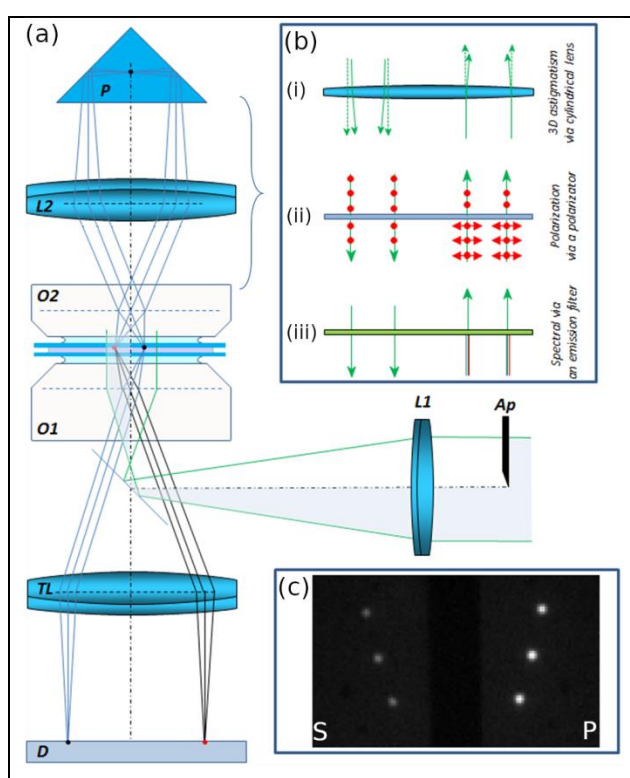
4.5.2 Kettős-objektív elrendezésű multimodális STORM (mmSTORM)

Az irodalomban javasolt 3D, polarizáció-érzékeny és spektrális bontáson alapuló módszerek tipikusan csak az egyik modalitásra optimalizálnak, és a többletinformáció megszerzése a 2D kép minőségének romlásával jár. Ennek legfőbb oka, hogy a jósági tényezők a fotonzámmal skálázódnak, ami állandó. Célunk egy olyan multimodális STORM rendszer (mmSTORM) kifejlesztése volt, amely mindhárom extra optikai modalitás mérésére alkalmas a 2D STORM kép minőségi romlása nélkül, és egy kamerát igényel.

A javasolt optikai elrendezés előnye, hogy egy standard inverz mikroszkóphoz úgy építhető hozzá, hogy az EPI fluoreszcens detektálási üzemmódot nem befolyásolja (**4.5.4 a ábra**). A gerjesztő lézernyalábot egy lencse (L1) a mikroszkóp elsődleges objektívjének (O1) hátsó fókusz síkjába fókuszálja. A nyaláb egyik felét egy apertúrával kitakarjuk, ezért a látótér egyik fele lesz csak gerjesztve. A hagyományos elrendezésben az O1 objektív a gerjesztett molekulák (vörös pont a mintán) által emittált fotonoknak csupán egy részét képes összegyűjteni. Azok a fotonok, amelyek „felfelé” indulnak, nem vesznek részt a képalkotásban. A legnagyobb numerikus apertúrájú TIRF objektíveket alkalmazva ($NA \approx 1,5$) a transzmissziós veszteségektől eltekintve a fotonok felét lehet összegyűjteni és a tubuslencse (TL) segítségével egy elsődleges képet (**4.5.4 ábrán** vörös pont a képsíkban) tudunk alkotni a detektoron (D). A kifejlesztett mmSTORM módszerben egy második segéd-objektívet is használunk, szembefordítva az elsővel, ami képes összegyűjteni a mintáról „felfelé” induló fotonokat. A kísérletek során immerziós, nagy numerikus apertúrájú objektíveket alkalmaztunk ($NA_{O1}=1,49$; $NA_{O2}=1,4$), ezért az emittált fotonokat az objektívek együttesen nagy hatásfokkal (>95%) tudták begyűjteni. A segéd-objektív egy tubuslencse és egy Porro-prizma segítségével egy másodlagos képet hoz létre a minta síkjában a kivilágítatlan oldalon. A másodlagos karban egy emissziós szűrő segítségével leválasztható a gerjesztő fény. Érdeemes megjegyezni, hogy TIRF és nagyszögű HILO kivilágítások esetén erre az extra szűrőre nincs szükség. A segéd-objektív által létrehozott képet az elsődleges objektív képezi tovább a detektorra, így azon végül a minta kettős képe keletkezik, melyek egymás tükörképei (**4.5.4 c ábra**). A másodlagos kép fényereje kb. 50%-a az elsődlegesnek az optikai elemeken való többszörös áthaladás során fellépő fényvesztés miatt. Mivel az elsődleges kép felvételét a másodlagos nem befolyásolja, a hagyományos 2D STORM képeket az elsődleges kép adataiból nyerjük, a másodlagos kép a multimodalitáshoz szükséges információt szolgáltatja.

A másodlagos kar egy optikailag nyitott rendszer, amelybe további optikai elemek építhetők be. A **4.5.4 b ábra** három lehetséges modalitást mutat be. A **b(i) ábra** az asztigmias 3D STORM-

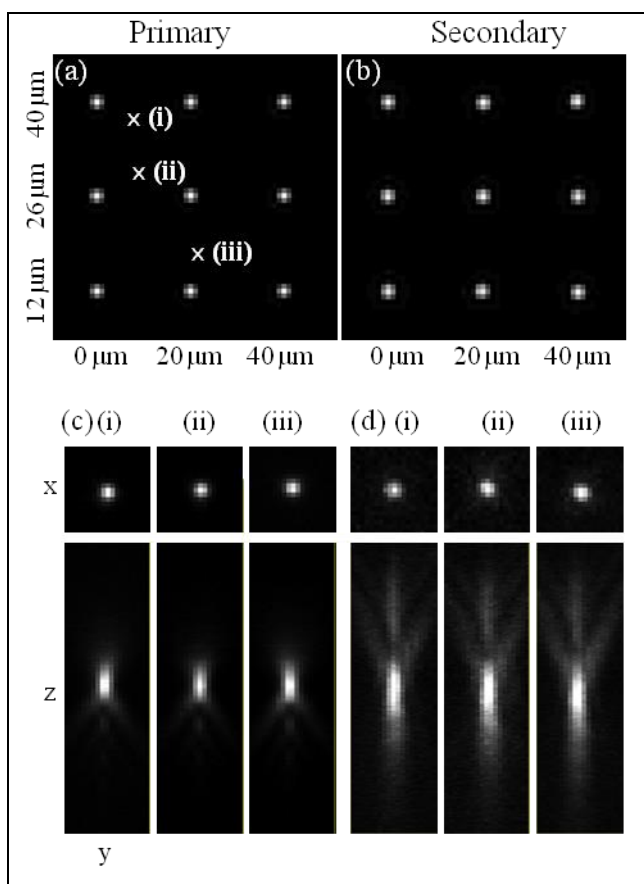
hoz szükséges hengerlencsét mutatja. Az mmSTORM előnye, hogy a laterális feloldás izotróp jellegét megtartva tudunk becslést adni a molekula axiális pozíciójáról. A **b(ii) ábra** a polarizáció-érzékeny STORM implementációját mutatja. Ebben az esetben egy polarizátort helyezünk a másodlagos karba. A detektoron az elsődleges kép a fluoreszcens molekula polarizálatlan (teljes intenzitású), míg a másodlagos kép a polarizált jelnek felel meg. Egy kalibrációs mérés után a képek intenzitásából meghatározható a polarizáció foka. A másodlagos karba helyezett spektrális szűrővel (**4.5.4 b(iii) ábra**) a kétszínű leképezés is megvalósítható. Ebben az esetben az egyik festék jele mindkét képen, a másik festék képe csak az elsődleges képen jelenik meg. Párkereséssel eldönthető, hogy melyik felvillanás melyik típusú festékhez tartozik.



4.5.4 ábra: Az mmSTORM optikai elrendezésének vázlata (a). Három modalitás megvalósításának lehetősége a másodlagos karba helyezett hengerlencse (b-i), polarizátor (b-ii) és spektrális szűrő (b-iii) segítségével. A detektoron a minta elsődleges és másodlagos képei jönnek létre (c) mint egymás tükörcsképei [128].

A kísérletekhez a mintát két fedőlemez közé helyeztük, melyek távolságát a lehető legkisebbre állítottuk a szférikus hiba csökkentése érdekében. Az optikai rendszert az OSLO szimulációs programmal modelleztük, és elvégeztük az elsődleges és másodlagos képet jellemző *PSF*-ek összehasonlító elemzését. Ezzel párhuzamosan a *PSF* alakját kísérletileg is meghatároztuk, a diffrakciós határnál kisebb fluoreszcens mikrogömbök segítségével. Az eredményeket a **4.5.5 ábra** mutatja. Ezek alapján elmondható, hogy a *PSF* félértékszélességét és elliptikusságát a molekula laterális helyzete nem befolyásolja. Az illesztett Gauss-görbék félértékszélessége karonként kismértékben (<2%) változott. A másodlagos képeken 15%-kal kiszélesedett és 50%-kal alacsonyabb intenzitású eloszlásokat kaptunk. A szimulációs és mérési

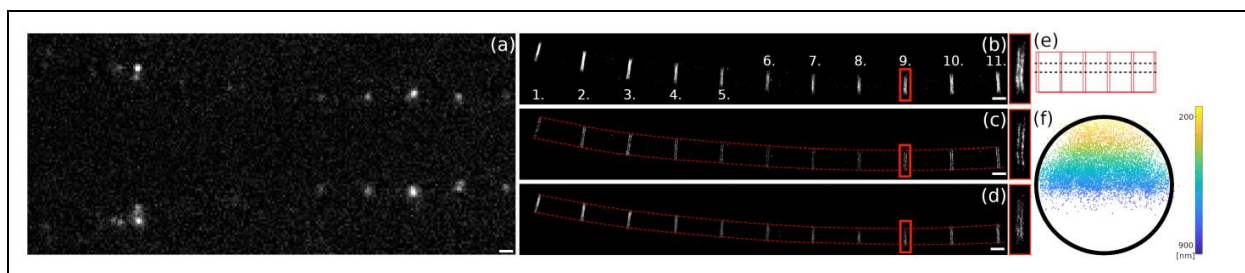
eredmények jó egyezést mutattak. A másodlagos karban fellépő degradáció legfőbb forrása a segéd-objektív volt, ami kétszer is részt vesz a képalkotásban. Az alkalmazott Nikon CFI Plan Apo Lambda objektív mért transzmissziója 80% körül volt.



4.5.5 ábra: Fluoreszcens molekulák szimulált elsődleges (a) és másodlagos (b) képeinek helyfüggése. Mért x - y és z - y intenzitásprofilok a három jelölt pozícióban (i, ii, iii) az elsődleges (c) és a másodlagos (d) képen. A pixelméret 160 nm [128].

A területi korlátok miatt dolgozatomban csak a 3D biplane módszer megvalósítását és a hozzá tartozó kísérleti eredményeket mutatom be részletesebben. A 3D biplane módszer a fluoreszcens molekuláról két képet hoz létre ismert defókuszálással. A tárgysíkok távolságának ismeretében meghatározható a molekula axiális pozíciója. Az mmSTORM módszerben a defókuszálás mértékét a másodlagos kar hosszával egyszerűen beállíthatjuk. Ebben a modalitásban a másodlagos karba nem kell extra optikai elemet rakni. A 3D modalitás kísérleti teszteléséhez Tmod fehérjét festettünk AF647 festékkel miofibrillumokban (**4.5.6 ábra**). Az elsődleges és másodlagos képek axiális távolságát 350 nm-nek állítottuk be. Az egyes molekulák elsődleges és másodlagos képei hengerszimmetrikus, de eltérő módon defókuszált PSF-je jól látható a **4.5.6 a ábrán** bemutatott egyik képkockán. A **4.5.6 b ábra** hagyományos, csak az elsődleges képet felhasználó 2D lokalizációval nyert képet mutatja. A Tmod fehérje jellegzetes 125 nm-es távolságú kettős vonala a H-zónában tisztán feloldható. A **4.5.6 c-d ábrák** a másodlagos képek segítségével nyert axiális koordináták felhasználásával ábrázolják a miofibrillum keresztmetszeti

képeit. A két kép 183 nm axiális távolságra volt egymástól (**4.5.6 e ábra**). A zónában lokalizált molekulák x-z keresztmetszeti képét a **4.5.6 f ábra** mutatja. A mért lokalizációkra illesztett 0,8 μm sugarú kör jó egyezést mutat más független, és a saját asztigmias mérések eredményeivel.



4.5.6 ábra: Tmod fehérjék 3D biplane STORM képe miofibrillumban. Egy tipikus képkocka (a) az elsődleges kép alapján rekonstruált 2D (b) és a másodlagos lokalizációk segítségével felvett 3D struktúra keresztmetszeti képei (c, d). A keresztmetszeti síkok helyei a miofibrillumban (e) és a H-zónában rekonstruált x-z keresztmetszeti kép. Skála: 1 μm [128].

Összefoglalva:

- Szakmai vezetéssel egy kettősen törő lemez alkalmazásán alapuló polarizáció-érzékes SMLM módszert fejlesztettünk ki. Az elrendezés akromatikus, a két fókuszpontot hullámhossztól függetlenül (<10% változás) szeparálja. A lemez eltolás-invariáns és egyenes látású, ezért könnyű beállítani, gyorsan lehet váltani a hagyományos 2D és a polarizáció-érzékes modalitások között. A módszer – más polarizációs eljárásokkal szemben – nem csökkenti a látóteret, az alkalmazott EMCCD kamera teljes detektorfelülete használható. A megépített rendszert phalloidin-AF647 festékkel jelölt aktin-, és ThT-vel jelölt inzulinszálak leképezésével teszteltük és ezek alapján állapítottuk meg a szálakhoz kötött festékmolekulák polarizációs fokát.
- Egy kettős-objektív elrendezésen alapuló eljárást javasoltam és dolgoztunk ki, amely az eredeti 2D SMLM képek minőségi romlása nélkül képes 3D, polarizáció-érzékes és többszínű leképezés megvalósítására. Fluoreszcens festékkel jelölt aktinszálak leképezésével kísérletileg is megmutattuk, hogy a másodlagos fotonok segítségével megfelelő minőségű szuperrezolúciós képeket lehet felvenni. A 3D asztigmias, a 3D biplane és a többszínű modalitások kísérleti megvalósíthatóságát szarkomer és fluoreszcens mikrogömböket alkalmazva mutattuk meg. A módszerhez szükséges kiértékelő (párkereső stb.) algoritmusokat és protokollokat (képfelvétel stb.) fejlesztettünk ki.

Releváns publikációk: [23, 128, 142]

4.6 Kvantitatív STORM

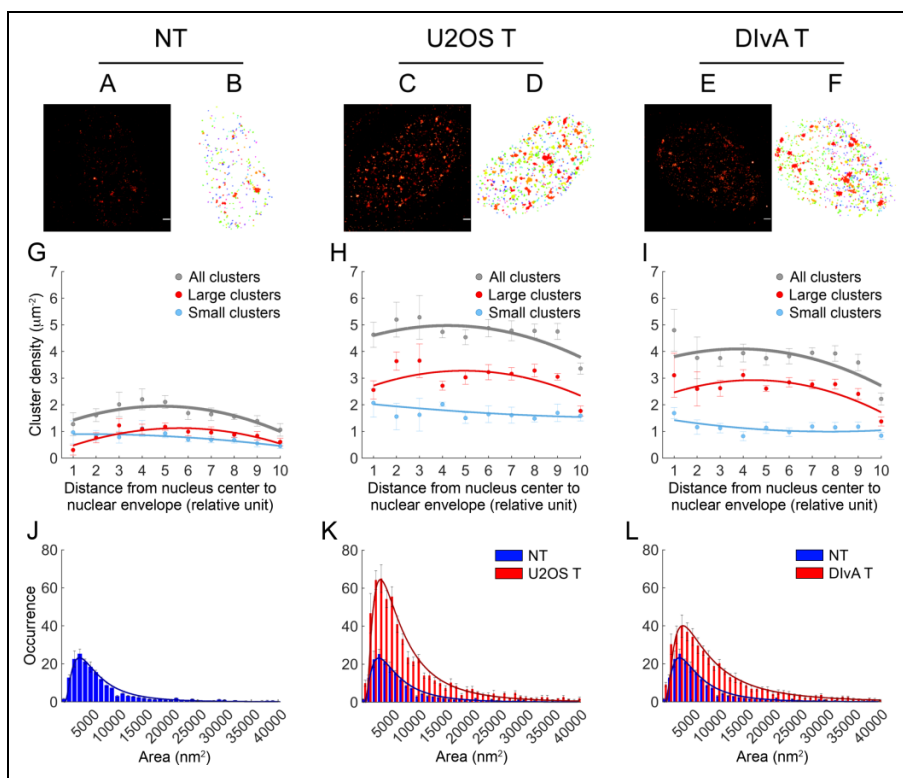
A SMLM módszerekkel felvett, nagy térbeli feloldású képek már önmagukban is jelentős többletinformációt tartalmaznak a mintáról. A tendenciák, szignifikáns változások, térbeli eloszlások és méretek meghatározásához szükséges a minta kvantitatív kiértékelése. Ezért a kezdeti „látványos” képek felvétele után hamar felmerült az igény a mérések számszerűsítésére. A lokalizációs módszerek „bottom-up” elven működő eljárások, ezért a kvantifikálás első látásra egyszerű feladatnak tűnik. A tényleges értékmérők és az SMLM képet alkotó lokalizációs adatok közötti összefüggés meghatározása azonban számos kérdést és problémát vet fel. Az alkalmazott eljárások (mintavétel, lokalizációs algoritmus stb.) pontosságának meghatározásához jól ismert tesztmintára van szükség. A SMLM-ben ilyen minta nem létezik. Az elmúlt években számos javaslat [135, 147] született, de különböző okok miatt széles körben egyik sem terjedt el. További probléma, hogy a végfelhasználók számára fontos értékmérők gyakran nagyon egyediek és erősen függenek a mintától [133]. A végső kép minősítésére egyedi értékmérőket vezethetünk be. A korábbi fejezetekben a vezikulák kiértékelésénél a TestSTORM-os szimulációknál könnyen szét lehetett választani a valós és a hibás lokalizációkat, és ezek ismeretében egy jósági tényezőt lehetett definiálni [133]. Ehhez hasonlóan, az egymást keresztező vonalakra is tudunk praktikus értékmérőt definiálni [133, 148]. A terjedelmi korlátok miatt ebben a fejezetben két reprezentatív példán keresztül szeretném bemutatni a kvantitatív kiértékeléssel kapcsolatos kutatásaimat. Az első példában a jelölt molekulák számszerűsítése, a másodikban a jelölt mintázat geometriai paramétereinek a megadása volt a célunk.

4.6.1 DNS kétszálú törési helyeinek klaszteranalízise

Az eukarióta sejtekben a DNS szálak ún. kromatinszerkezetben rendeződnek el. A 2x4 hisztonmolekula által alkotott nukleoszómkra tekerednek fel a DNS szálak, amelyek egy még magasabb rendű struktúrát alkotnak. A DNS szál kettős törése esetén a szerkezet kibomlik, és a H2AX hiszton foszforilálódik, γ -H2AX jön létre. A γ -H2AX fluoreszcens módon jelölhető, ezáltal a törési fókuszok fluoreszcens mikroszkóppal megfigyelhetővé válnak. A fókuszok nagysága $\approx 1 \mu\text{m}$, ezért a belső struktúra illetve az azt alkotó γ -H2AX molekulák száma hagyományos optikai módszerekkel nem határozható meg.

Célunk a DNS törések mentén kialakuló fókuszok kvantitatív elemzése volt. A fókuszok méretének és eloszlásának megadásához a klaszteranalízis módszerét választottuk. A DBSCAN eljárást beépítettük a RainSTORM kódba úgy, hogy több lépésben az egész sejtmagra kiterjedően

el tudjuk végezni az elemzést. A **4.6.1 ábra** a kezeletlen, illetve kezelt U2OS és DivA sejtek dSTORM képeit (**A, C** és **E ábrák**) és klaszteranalizált (**B, D** és **F ábrák**) eredményeit mutatja. A klaszteranalizált képek vizuális kiértékelése homogén eloszlást mutat. Az eloszlás pontos kiértékeléséhez a magot héjakra osztottuk. Ehhez először meghatároztuk a mag középpontját és a belőle húzott sugarakat tíz egyenlő részre osztottuk. Az így megszerkesztett, azonos sorszámú pontok képezik az egyes héjak határait. A klasztereket méretük alapján két csoportba osztottuk (5000 nm^2 -nél kisebbek, illetve nagyobbak) és ábrázoltuk a klasztersűrűséget az egyes héjakban. A vizsgált három minta esetén a klasztersűrűség nem mutatott jelentős inhomogenitást. A klaszterek területét is meghatároztuk, és azt kaptuk, hogy a kezelt minták esetén a nagyobb klaszterek száma megnő a kisebbekkel szemben. Az eredmények biológiai értelmezése túlmutat a dolgozatom témáján, az a kooperációban részt vevő biológus kollégák feladata volt.



4.6.1 ábra: Kezeletlen (NT) és kezelt sejtek dSTORM (**A, C, E**) és klaszteranalizált (**B, D, F**) képei. Klasztersűrűség radiális eloszlása a kisebb és nagyobb klaszterméretek esetén (**G, H, I**). A klaszterek átlagos mérete (**J, K, L**) megnőtt a kezelés során [149].

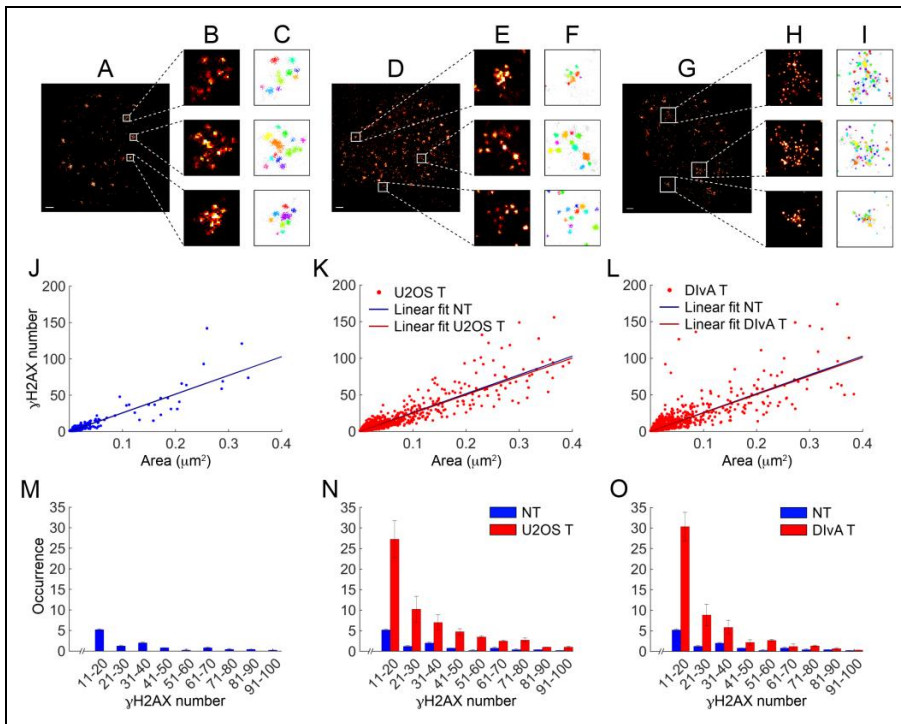
A fókuszokat kisebb egységek, ún. nanofókuszok (**4.6.2 A-I ábrák**) alkotják. A γ -H2AX molekulák számának megadásához tudnunk kell, hogy egy jelölt γ -H2AX hány darab felvillanást jelent a szuperrezolúciós képen. Ennek megválaszolásához ismernünk kell:

- (i) egy felvillanás tipikus élettartamát, azaz hány egymást követő képen detektáljuk ugyanazt a molekulát ($N_{\text{élettartam}}$);

- (ii) hány darab fluoreszcens molekula tartozik egy γ -H2AX molekulához ($N_{jelölés}$), azaz mekkorák a γ -H2AX/elsődleges antitest ($N_{elsődleges}$); elsődleges/másodlagos antitest ($N_{másodlagos}$) és másodlagos antitest/festékmolekula ($N_{festék}$) arányok;
- (iii) egy festékmolekula a mérés időtartama alatt hányszor kerül aktív állapotba ($N_{aktiválás}$).

A fentiek alapján egyetlen γ -H2AX molekulához köthető lokalizációk száma a dSTORM szuperrezolúciós képen:

$$N_{lokalizáció} = N_{élettartam} \times N_{jelölés} \times N_{aktiválás}, \text{ ahol } N_{jelölés} = N_{elsődleges} \times N_{másodlagos} \times N_{festék}.$$



4.6.2 ábra: Nanofókuszok kvantitatív kiértékelése kezeltlen (A-C) és kezelt U2OS (D-F) és DivA T (G-I) sejtekben. A γ -H2AX molekulák száma mindhárom esetben lineárisan függ a fókuszok méretétől (J-L), illetve eloszlásuk a fókuszok méreteloszlásához hasonló (M-O)[149].

Az $N_{lokalizáció}$ értékére csak statisztikus becslés adható. A becslésnél számos feltevést kell tennünk. A molekulák átlagos élettartamát a RainSTORM-ba épített ún. trajektória-illesztő algoritmussal határoztuk meg. Ez az algoritmus egymáshoz rendeli a szomszédos képeken egy meghatározott távolságnál közelebb lévő felvillanásokat, azaz úgy értelmezi, hogy azok egy molekula képei. A program megadja az így generált trajektóriák hosszának hisztogramját, amiből meghatározható az $N_{élettartam}$. Ideális esetben ennek az értéke 1-2 képkocka. Olyan méréseknél, ahol magas a hosszabb trajektóriák aránya, érdemes növelni az expozíciós időt. A γ -H2AX immunhisztokémiai jelölésénél az antitesteket gyártó céggel és a biológus kollégákkal egyeztetve feltételeztük, hogy 1 db elsődleges antitest köt 1 db hisztonhoz; egy elsődleges antitesten 1 vagy 2 db másodlagos antitest van; és 1 db másodlagos antitestet 4 db festékmolekula jelöl. Azaz a

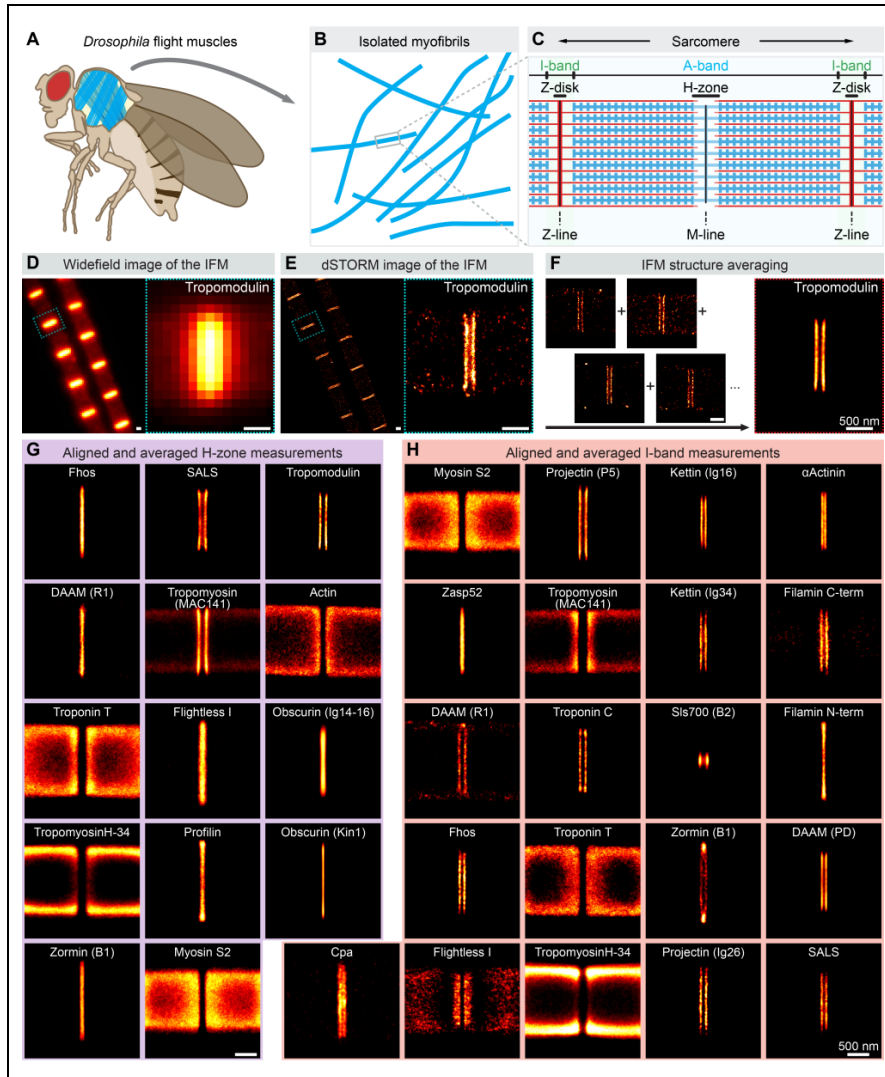
statisztikus modellben azt feltételeztük, hogy minden egyes jelölt γ -H2AX molekulán 4 vagy 8 db festékmolekula van. A fluoreszcens molekulák reaktivációjának számát mérésekből lehetett megbecsülni. Az alkalmazott modellt a terjedelmi korlátok miatt nem ismertetem, de eredményül azt kaptuk, hogy az adott mintánál ≈ 20 lokalizáció tartozott egy jelölt γ -H2AX molekulához. Ezt az értéket felhasználva tudtuk megadni az egyes fókuszokban található γ -H2AX számát és ábrázolni a klaszterméret függvényében (**4.6.2 J, K és L ábra**). Jól látszik, hogy a két paraméter között lineáris az összefüggés. Itt kell megemlíteni a módszernek azt az előnyét, hogy a kalibráció után a klaszterméretből vissza lehet következtetni a fókuszot alkotó γ -H2AX molekulák számára. A hisztorszám hisztogramos ábrázolása (**4.6.2 M-O ábrák**) jól mutatja, hogy a kezelés következtében hogyan változott az előfordulás gyakorisága a méret függvényében.

4.6.2 Szarkomer struktúrák geometriai kiértékelése

A szarkomer a harántcsíkt izomrost periodikusan ismétlődő alapegysége, amelynek átmérője

1-2 μm , hossza 2-3 μm . A közepén elhelyezkedő M-vonalak és a két végen lévő Z-korongok számos fehérjéből felépülő, erősen strukturált rendszert képeznek (**4.6.3 A-C ábra**). Célunk a szarkomert alkotó kulcsmolekulák térbeli pozíciójának feltérképezése volt dSTORM szuperrezolúciós mikroszkópiával. A módszer előnye, hogy a mintát nem kell kiszárítani (szemben az EM mérésekkel) ezért a szerkezet megtartja eredeti 3D szerkezetét. A kísérletek során muslicák repülőizmát vizsgáltuk és közel 30 fehérjét jelöltünk meg a szarkomeren belüli helyzetük meghatározására. A **4.6.3 G és H ábrák** összefoglalóan mutatják a felvett szuperrezolúciós képeket. A **4.6.3 D ábrán** a tropomodulin jelölésével felvett hagyományos fluoreszcens kép, míg az **E ábrán** ugyanennek a szuperrezolúciós képe látható. A hagyományos képen az egyetlen vonalnak látszó H-zóna a szuperrezolúciós képen két vonallá hasad fel. A mérések kiértékelésénél kihasználtuk a minta ismétlődését, és számos (általában >200) kép kiátlagolásával [147] javítottuk a kép kontrasztját (**4.6.3 F ábra**). A képek regisztrációját és átlagolását a RainSTORM lokalizációs programhoz írt kóddal végeztük el. A felvett képeket három típusba soroltuk: rés, egyes és kettős vonalak. A struktúrákat jellemző geometriai paraméterek (rés szélessége, vonal szélessége, vonalak távolsága) megadásánál figyelembe vettük a jelölésnél használt antitestek jellemző méretét és a lokalizációs pontosságot. Minden mérésnél Alexa Fluor 647 festéket és EPI kivilágítást használtunk. A dSTORM képek kiértékelésénél a szűrési feltételeket nagyon szigorúan határoztuk meg, és csak a 20 nm-nél pontosabb lokalizációkat fogadtuk el. Az erős szűrési

feltételeknek és az átlagolásoknak köszönhetően 5-10 nm pontosan tudtuk meghatározni a jelölt molekulák pozícióját a szarkomeren belül.



4.6.3 ábra: *Drosophila* (A) harántcsikolt izomrost preparátumának (B) alapegységét jelentő szarkomer (C) H-zónájában festett Tropomodulin hagyományos fluoreszcens (D) és dSTORM (E) képe. A képek átlagolásával nyert, javított kontrasztú kép (F). A szarkomert alkotó 27 főbb fehérje jelölésével készült átlagolt dSTORM képek (G, H) [151].

A jelölt molekulák pozíciójának ilyen pontosságú meghatározása lehetőséget adott a szarkomer molekuláris szintű szerveződésének a modellezésére. Ezt a feladatot biológus kollégáink végezték el, és ennek tárgyalása túlmutat a dolgozatom témáján.

Összefoglalva:

- A dSTORM képek kvantitatív kiértékelése mintafüggő jósági tényezők bevezetését követeli meg. A dolgozatomban két munkát ismertettem, amelyeken keresztül bemutattam a kvantitatív kiértékeléssel kapcsolatos kutatásaimat. Az első példában a jelölt molekulák számszerűsítése, a másodikban a jelölt mintázat geometriai paramétereinek a megadása volt a cél.

- Vezetéssel DNS szálak kettőtörési helyeiről felvett dSTORM szuperrezolúciós képek kvantitatív elemzését végeztük el. Az adott jelölési protokoll mellett kísérletek segítségével megállapítottuk, hogy egy jelzett γ -H2AX molekula átlagosan mennyi felvillanást eredményez a szuperrezolúciós adatsorban, azaz meghatároztuk a rendszer válaszfüggvényét. A kiértékeléshez szükséges algoritmusokat (trajektória-illesztés, klaszteranalízis) beépítettük a RainSTORM lokalizációs programba. A teljes sejtmagra kiterjedő klaszteranalízis lehetőséget ad a fókuszok és az azokat alkotó nanofókuszok térbeli eloszlásának, méretének és a bennük lévő γ -H2AX molekulák számának meghatározására. Megmutattuk, hogy az egyes fókuszokban lévő γ -H2AX molekulák száma egyenesen arányos a klasztermérettel, azaz a rendszer kalibrálásával a klaszterméretből (aminek a meghatározásához nem feltétlenül szükséges szuperrezolúciós mikroszkópia) meghatározható a γ -H2AX molekulák száma. TestSTORM szimulációk segítségével megmutattuk, hogy a 2D mérések kiértékelésével kapott eredmények jó egyezést mutatnak a tényleges 3D struktúrák valódi paramétereivel.
- A *Drosophila* repülőizmának alapegységét jelentő szarkomer 27 fontosabb fehérjéjének pozícióját határoztuk meg a szuperrezolúciós dSTORM módszerrel 5-10 nm pontossággal. A felvett képeket három típusba soroltuk: rés, egyes és kettős vonalak. A különböző struktúrákat jellemző geometriai paraméterek (rés szélessége, vonal szélessége, vonalak távolsága) megadásánál figyelembe vettük a jelölésnél használt antitestek jellemző méretét és a lokalizációs pontosságot.

Releváns publikációk: [149, 150, 151]

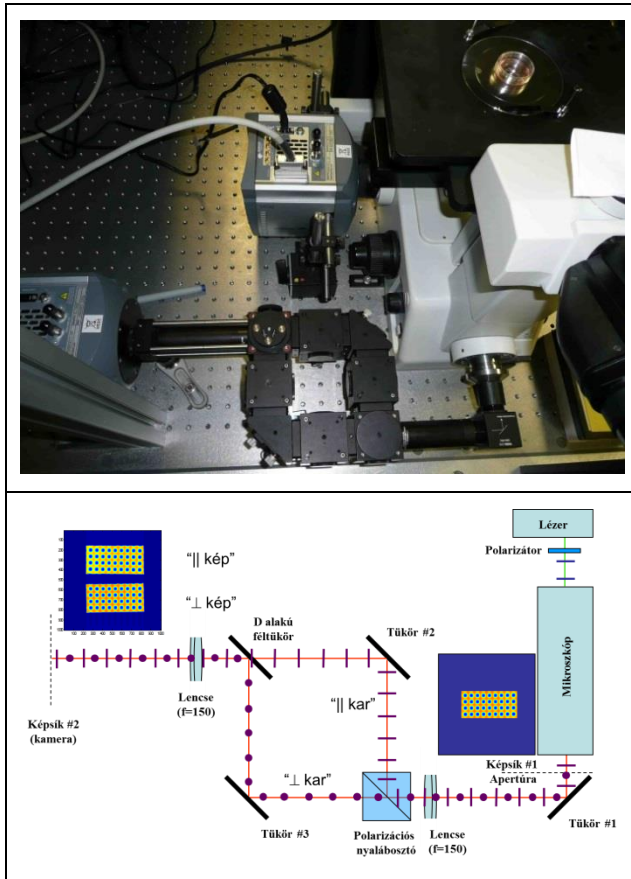
4.7 Fluoreszcencia anizotrópia mérésére alkalmas TIRF/EPI/HILO kivilágítású mikroszkóp fejlesztése és alkalmazása

Az előző négy fejezetben a lokalizációs mikroszkópia területén elért eredményeimet mutattam be. A módszer előnyeit és korlátait elemezve igyekeztem kiemelni, hogy számos esetben az SMLM csak más mikroszkópiás eljárásokkal kiegészítve képes választ adni a feltett kérdésekre. Ezt jól mutatja az is, hogy 2010-ben Cambridge-ben a STORM rendszer megépítésének elsődleges célja az amiloid aggregátumok FLIM méréseinek kalibrációja, vagyis a fluoreszcencia élettartam és az aggregátum mérete közötti összefüggés meghatározása volt. Mivel FLIM méréseket élő sejteken is lehet végezni, a dSTORM-nál viszont a mintát fixálni kell, a FLIM/dSTORM kalibráció lehetővé tenné az élő sejtekben az aggregátumok méretének kvantitatív leírását. Mivel az azonos jelölőmolekulák között fellépő HOMO-FRET esetén a fluoreszcencia élettartam nem változik, a projekt előrehaladásával úgy döntöttünk, hogy kifejlesztünk egy fluoreszcencia anizotrópia mérőegységet. A potenciális alkalmazásokat összegyűjtve egy EPI és TIRF kivilágítások közötti gyors váltásra képes rendszer megalkotását tűztük ki célul.

4.7.1 A mérőrendszer kifejlesztése

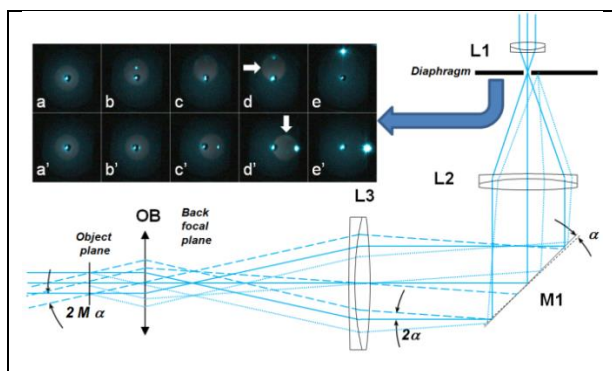
Az anizotrópiás feltétet a CAM_STORM mikroszkóp elülső detektor kimenetére (front port) terveztem meg és építettem fel. Az elrendezés fényképe és sematikus rajza a **4.7.1 a és b ábrákon** látható. A mikroszkóp tubuslencséjével létrehozott kép síkjában (képsík #1) egy apertúrával a látóteret a felére csökkentettük. A polarizációs nyalábosztó kettébontja az emissziós nyalábot és az optikai rendszer a két képet egymás mellett hozza létre az EMCCD kamerán. Mivel a mikroszkóp több modalításban is működik, a rendszert minden anizotrópiás méréssorozat előtt egy szigorú protokollt követve be kell állítani és kalibrálni. A terjedelmi korlátok miatt csak a legfontosabb lépéseket említem meg. A protokoll részeként kalibrálni kell a két kar relatív érzékenységét, azaz ki kell mérni a G-faktort. A tényleges mérésnél alkalmazott festék emissziós sávjához kell választani a kalibráló festéket (ideális esetben a kettő megegyezik) és belőle oldatot kell készíteni. A kalibrációs kép felvételénél a fedőlemeztől távoli ($>5 \mu\text{m}$) síkra kell fókuszálni, kihasználva, hogy folyadékban a festékmolekulák szabadon mozognak és forognak, ezért anizotrópiájuk zéró. A második lépésben egy finoman strukturált mintát kell leképezni, amelyen 6-8 karakterisztikus pont helyzete pixeles pontossággal meghatározható. Ha nincs ilyen mintánk, akkor az apertúra szélén is találhatunk megfelelő referenciapontokat. A tapasztalat azt mutatta, hogy a regisztráció pontosabb, ha a referenciapontok elszórtan a FOV belső területén

vannak. A rendszerhez fejlesztett Matlab-ben íródott anitrf.m kód ezen adatok alapján egymáshoz regisztrálja a két képet, illetve a G-faktor helyfüggő térképének felhasználásával kiszámítja az anizotrópia értékét. A kód segítségével a képeken tetszőleges területeket tudunk kijelölni, melyeken a program megadja az átlagos anizotrópiát és annak szórását.



4.7.1 ábra: A CAM_STORM rendszerre épített fluoreszcencia anizotrópia mérőegység fényképe és sematikus rajza. Az elülső kimeneten (front port) az anizotrópia mérőegység, az oldalsó kimeneten (side port) a dSTORM-hoz tartozó EMCCD kamera látható.

A rendszer beállításának egyik legnagyobb kihívását a gerjesztő nyaláb polarizációs síkjának a beállítása jelenti. EPI kivilágítás esetén a gerjesztő fény polarizációját úgy kell beállítani (polarizátorral vagy $\lambda/2$ retardációs lemezzel), hogy a gerjesztésre merőleges emissziós karban (statikus festékmolekulákat tartalmazó mintát feltételezve) a mért intenzitás minimális legyen. TIRF kivilágítás esetén a rendszer hengersizmetriája megszűnik, ezért a beállítás egy új protokoll kifejlesztését követelte meg, amellyel biztosítani tudjuk, hogy a minta s polarizációban legyen gerjesztve.



4.7.2 ábra: Gerjesztő nyaláb polarizációjának beállítása TIRF kivilágítás esetén [126].

A mikroszkóp gerjesztési oldalának optikai elrendezését, és az EPI/HILO/TIRF kivilágítások közötti váltást a **4.3.2 ábrán**, illetve a **4.3.1 fejezetben** tárgyaltam. Az anizotrópiás mérésekhez ugyanezt az elrendezést használtam, de a rendszer előtt használt Kepler nyalábtágítót úgy pozicionáltam, hogy a második lencsége (L2 lencse a **4.7.2 ábrán**) az M1 forgótükörtől a lencse fókusz távolságával egyenlő távolságra legyen. A nyalábtágítót alkotó lencsék közös fókusz síkjába egy diafragmát helyeztem, ami nem befolyásolta a lézertől a mikroszkóp irányába terjedő nyalábot, de blokkolta a mintáról visszavert, a tükör elforgatásával laterálisan elmozduló nyalábot. A visszaverődés a fedőlemez-minta felületén történik, és a visszavert fény intenzitását a Fresnel-egyenletekkel adhatjuk meg. A tükör mindkét tengelye mentén forgatható volt, azaz a mintát elvileg tetszőleges szögből lehetett gerjeszteni. A **4.7.2 ábra p (a-e)** és **s (a'-e')** polarizációk esetén a beesési szög függvényében mutatja a diafragmán felfogott, a fedőlemeztől visszavert gerjesztő fény képét. Precíz beállítás esetén elérhető, hogy a visszavert intenzitás zéró legyen (**c**). Belátható, hogy ekkor **p** polarizációjú nyalábbal Brewster szögben világítjuk ki a mintát. E pontot referenciapontnak használva be tudjuk állítani a mérések szempontjából ideális **s** polarizációs állapotot.

A pontos anizotrópiás mérésekhez a két (gerjesztéssel párhuzamos és arra merőleges) csatorna közötti minimális áthallásra van szükség. A depolarizáció egyik fő forrása a nagy numerikus apertúrájú objektívek által bevezetett áthallás [152, 153]. Az OSLO optikai rendszertervező programmal szimulációt végeztünk, hogy meghatározzuk, mekkora a depolarizáció nagy numerikus apertúrájú mikroszkópjelölés esetén. A gerjesztési oldalon az áthallás mértékét TIRF és EPI kivilágítás mellett 10^{-5} és 10^{-6} nagyságúnak találtuk, ezért azt a mérések kiértékelésekor a továbbiakban elhanyagoltuk. Az emissziós oldalon azonban 1,16%-os áthallást jósolt az OSLO. Érdeemes megemlíteni, hogy más számolások [154] az OSLO-s számolásoknál tipikusan nagyobb áthallás értéket (4,4%) jósolnak a nagy numerikus apertúrájú objektívekre. Megítélésünk szerint az eltérést az okozza, hogy az OSLO figyelembe veszi az objektívet felépítő lencsék felületén fellépő töréseket is. Mivel a saját és más kísérleti eredmények is az alacsonyabb depolarizációs értéket

támasztották alá [155], a kiértékelések során az OSLO-s eredményeket használtuk fel. A depolarizációból adódó áthallás miatt a két polarizációs állapotban mért intenzitások módosulnak:

$$\begin{aligned} I_{\parallel} &= (1 - \eta)I_{\parallel}^0 + \eta I_{\perp}^0 \\ I_{\perp} &= (1 - \eta)I_{\perp}^0 + \eta I_{\parallel}^0, \end{aligned}$$

ahol η az objektív depolarizációs foka, az I_{\parallel}^0 és I_{\perp}^0 pedig a zéró áthalláshoz tartozó intenzitáskomponensek. Ezek segítségével megadható a mért és a tényleges anizotrópia értékek közötti $f(r, \eta, G)$ korrekciós faktor:

$$r_0(r, \eta, G) = f(r, \eta, G) \times r = \frac{\eta(1-G^2)+r[3G(\eta-1)-\eta-2\eta G^2]}{\eta(1+3G+2G^2)+r\eta(4G^2-1)-3G}.$$

Méréseink során az emissziós oldalon fellépő depolarizációs korrekció az anizotrópia értékét tipikusan 2,4-2,8%-kal növelte meg. A detektoroldalon az alkalmazott polarizációs nyalábosztó $<10^{-3}$ jósági tényezővel (extinction ratio) választotta ketté az egymásra merőleges polarizációs komponenseket, ezért az általa bevezetett hibát ($<0,3\%$) elhanyagoltuk. Összefoglalva elmondható, hogy az emissziós oldalon a depolarizáció elsődleges forrása a mikroszkópjobjektív volt.

Az anizotrópiás egység alkalmazásában rejlő lehetőségeket három alkalmazáson keresztül mutatom be.

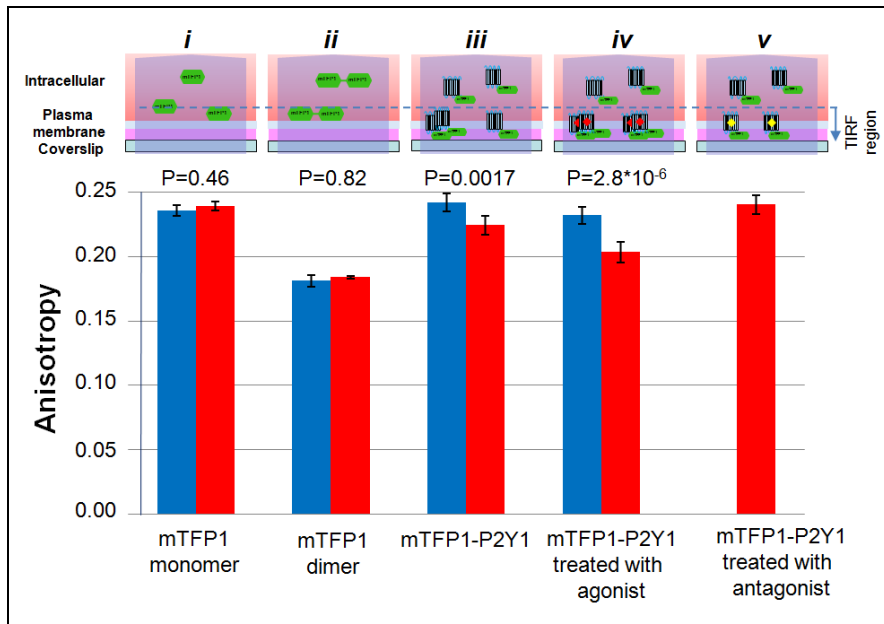
4.7.2 P2Y1 receptor fehérje dimerizációjának időbeli követése és kvantitatív elemzése

A feltételezések szerint a P2Y1 receptor fehérje a sejtben való expressziója után a citoplazmában monomer formában van jelen és csak a plazmamembránban dimerizálódik [156]. A membránból azután ismét visszakerülhet a sejt belsejébe, ezért a monomer-dimer koncentráció arány jelentősen eltér a membránban és a citoplazmában. Célunk ennek a koncentrációarányak meghatározása volt. A kísérletekhez HEK293T sejteket használtunk, amelyek DNS transzfekcióval a P2Y1 fehérjéhez kötött mTFP fluoreszcens fehérjét is expresszálták. Az mTFT [157, 158] abszorpciós maximuma 462 nm, emissziós maximuma 492 nm. A mérések során EPI és TIRF kivilágítások között váltottunk és vettünk fel képeket az anizotrópia megadásához. A feltételezések szerint a P2Y1 molekulához kötött mTFP fluoreszcens fehérjék mért anizotrópiája a dimerformálódás során megváltozik. A mérési eredmények értelmezését nehezítette, hogy két folyamatot is számításba kellett venni, amelyek hatása éppen ellentétes módon változtatja az

anizotrópia értékét:

- (i) A dimerek a megnövekedett méretük miatt lassabban forognak, ezért az anizotrópia értékének növekedését okozzák.
- (ii) A dimerekben az mTFP fluoreszcens fehérjék közel kerülnek egymáshoz, ezért a FRET energiatranszfer lehetősége megnő, ami csökkenti az anizotrópia értékét.

Annak eldöntésére, hogy melyik folyamat játszik döntő szerepet, előkísérletet végeztünk, amely során ún. „red-edge” gerjesztést alkalmaztunk [159, 160]. Red-edge gerjesztés során a gerjesztő lézer hullámhosszát úgy választjuk meg, hogy az abszorpciós spektrum maximumához képest a vörös (hosszabb hullámhossz) tartományba essen. Az mTFP esetén 488 nm Ar-ion lézert használtunk. A minta anizotrópiáját kezelés előtt és agonista hozzáadása után 0, 10 és 30 perccel mérve nem kaptunk kimutatható változást. Ez azt jelenti, hogy a rotációs diffúzióból származó anizotrópia növekedés nem játszik jelentős szerepet a folyamatban. A további kísérleteknél visszatértünk a 450 nm-es gerjesztéshez, és a mérési eredményeket a dimert formáló P2Y1 receptorokat jelölő mTFP molekulák FRET energiatranszferével magyaráztuk. A mérési eredményeket a **4.7.3 ábra** mutatja be. Minden sejtnél EPI (kék oszlop) és TIRF (vörös oszlop) kivilágítást alkalmaztunk, feltételezve, hogy EPI esetén a citoplazmában, TIRF esetén a plazmamembránban lévő mTFP molekulák emisszióját detektáljuk. Referenciaméréseket végeztünk az önállóan expresszált mTFP és a tisztán dimerként expresszált mTFP-20AA-mTFP kontroll mintákkal. A várakozásoknak megfelelően a monomer forma magas (0,24), míg a dimer alacsonyabb (0,18) anizotrópia értéket adott függetlenül a kivilágítás jellegétől. Az agonistával és antagonistával végzett mérések jól mutatták a citoplazmában és a plazmamembránban a monomer, illetve dimer koncentrációk változását. Az antagonist hatására pl. a dimerformálódás teljes mértékben blokkolva lett és az anizotrópia értéke megegyezik az mTFP monomerral mért referencia értékkel. A mérések során az anizotrópia értékét 2-4%-os relatív hibával tudtuk mérni. A kiértékelések után a dimer koncentrációját a membránban $45 \pm 20\%$ -nak becsültük, ahol a hibát az egyedi sejtek között mért értékek szórása okozta.



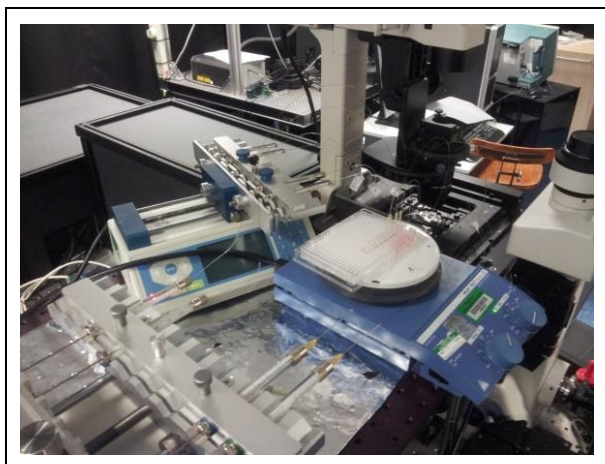
4.7.3 ábra: Mért fluoreszcencia anizotrópia mTFP monomer, dimer és jelölt P2Y1 fehérjék EPI (kék oszlop) és TIRF (vörös oszlop) kivilágítás esetén [126].

4.7.3 Centralspindlin motoros doménjeinek regulációja

A citokinézisben, azaz a citoplazma kettéosztódásában a centralspindlin fehérje komplex központi szerepet játszik [161-163]. Részt vesz a központi orsó és a különböző mikrotubulus kötegek kialakításában és szerveződésében. Heterotetramer szerkezetű, melynek két alegységét *C. elegans*-ban a ZEN-4 motoros és a CYK-4 nem motoros kettősök alkotják. Korábbi kutatások arra mutattak rá, hogy a CYK-4 a ZEN-4 nyakrészéhez kötődve képes annak mobilitását befolyásolni [164], de a molekuláris szintű folyamatok nem tisztázottak. Ezért a kifejlesztett anizotrópiás rendszer segítségével a CYK-4 bekötésének hatását kívántuk megvizsgálni a ZEN-4 motoros alegységének konfigurációjára. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy a CYK-4 úgy változtatja meg a konfigurációt, hogy az antiparallel mikrotubulusok kötegelését tudja segíteni.

A fluoreszcens anizotrópia mérésekhez a ZEN-4 mindkét motor doménjét sárga fluoreszcens fehérjére (VenusZ434-555) cseréltük. A 488 nm-es gerjesztésen bekövetkező anizotrópia csökkenést a fluoreszcens fehérjék közötti HOMO-FRET következményeként, azaz a két domén távolságának csökkenésével értelmeztük. Ebben a kísérletben is alkalmaztuk a red-edge gerjesztést (532 nm-es gerjesztés) a rotációs diffúzió hatásának kimérésére, a HOMO-FRET mérések korrekciójára és a FRET hatásfok [165] kiszámításához. A mérések a HOMO-FRET szignifikáns növekedését mutatták a CYK-4 jelenlétében. Mivel a ZEN-4-ben hiányzott a motor domén, arra lehetett következtetni, hogy a CYK-4 a ZEN-4 nyakrészéhez kötődve változtatta meg az egység geometriai konformációját.

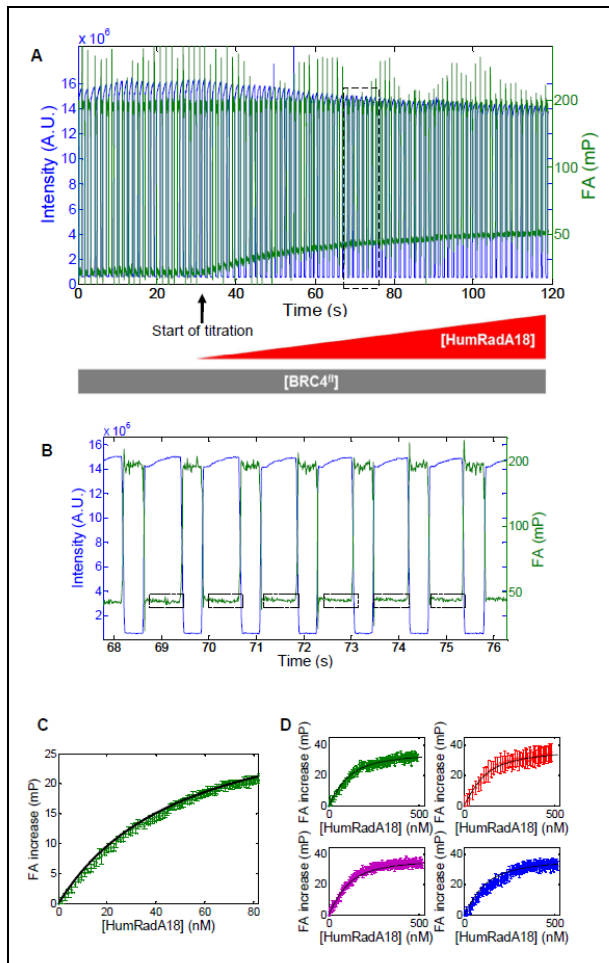
4.7.4 Kvantitatív fehérje-ligand kölcsönhatás mérése mikrofluidikai rendszerekben



4.7.4 ábra: Az anizotrópia-mérő mikroszkóphoz szerelt mikrocsatornás rendszer és annak adagoló/vezérlő egysége.

A megépített rendszer alkalmas képsorozatok felvételére, azaz időben lassan változó fluoreszcencia anizotrópia mérésére. Ezt kihasználva célul tűztük ki, hogy fehérje-ligand kötési affinitást határozzunk meg többcsatornás mikrofluidikai rendszerekben létrehozott nanoliter méretű cseppekben. A kísérletekhez a mikroszkópot nem kellett átalakítani, de a mikrofluidikai rendszert a lehető legközelebb kellett rakni a mintatartóhoz (**4.7.4 ábra**). A 150 μm széles és 220 μm magas mikrocsatornák egy fedőlemezen lettek kialakítva. A felvételek tipikusan 84 Hz-en, 10 ms expozíciós idővel készültek. Az olajban diszpergált vízcseppek áramlási sebességét úgy állítottuk be, hogy a látótéren percenként és csatornánként ≈ 50 csepp haladjon át.

A kísérletek során fluoreszcein [166] festékkel jelölt BRC4 fehérje kötését vizsgáltuk a RAD51 ligandhoz. A festett BRC4 jelentősen kisebb, mint a RAD1 ligand, ezért a szabad és a ligandhoz kötött fehérje rotációs diffúziójában változást kell látnunk: a kötött állapotban nőnie kell a fluoreszcencia anizotrópiának. A mérés során a festett BRC4 koncentrációját nem változtattuk, csak a ligand koncentrációját emeltük folyamatosan. A **4.7.5 ábra** egy 120 s hosszú mérés kiértékelését mutatja. Az **A** és **B** grafikonokon a magas intenzitású időtartományok mutatják a cseppekben mért fluoreszcencia intenzitást. A számolt fluoreszcencia anizotrópiát (FA) zöld színnel tüntettük fel. A ligand hozzáadása után a mért anizotrópia jelben bekövetkező változást az egy- és a négycsatornás rendszerben a **C** és **D** ábrák mutatják. A rendszer kalibrációja és modellezése után nM kötési koncentráció kimérése volt lehetséges.



4.7.5 ábra: *BRC4* fehérje – *RAD51* ligand kötési affinitását vizsgáltuk fluoreszcencia anizotrópia mérésével mikrocsatornában [164].

Összefoglalva:

- Időátlagolt fluoreszcencia anizotrópia mérésére alkalmas feltétet terveztem és építettem egy gyári mikroszkóphoz. A rendszert úgy terveztem, hogy gyors váltásra legyen alkalmas EPI és TIRF gerjesztési módok között. Protokollt fejlesztettem ki TIRF kivilágítás esetén az *s* polarizációs gerjesztés pontos beállítására, a rendszer G-faktorának kimérésére és a létrehozott képek regisztrációjára. Megbecsültem a polarizációs áthallásból származó depolarizáció fokát. Szoftvert fejlesztettem a polarizációs képek regisztrálására, a depolarizáltság és a G-faktor figyelembevételével a fluoreszcencia anizotrópia kiszámítására. A rendszert kísérletileg három mintán teszteltem.
- A kifejlesztett rendszerrel a P2Y1 fehérjék dimerizációjának időbeli követését vizsgáltam. A mérés során EPI és TIRF kivilágítások között váltva fluoreszcencia anizotrópiát mértem. A fehérjéket (P2Y1) fluoreszcens fehérjével (mTFP) lett jelölve. A „red-edge” gerjesztéssel külön tudtam választani a forgásból és a HOMO-FRET-ből eredő anizotrópia változást, és megmutattam, hogy a dimerekben az anizotrópia döntő részben a fluoreszcens molekulák között fellépő HOMO-FRET miatt csökken. E csökkenést térben szeparálva mértük a sejtmembránban (TIRF) és a sejten

belül (EPI). Az anizotrópiát 2-4%-os relatív pontossággal mérve a sejtmembránban a dimer/monomer arányt $45\pm 20\%$ -nak becsültük, ahol a hibát az egyedi sejtek között mért értékek szórása okozta.

- A kifejlesztett anizotrópiás rendszer segítségével a centralspindlin fehérjekomplexben a CYK-4 bekötésének hatását vizsgáltuk a ZEN-4 motoros alegység konfigurációjára. Red-edge gerjesztést használtunk a rotációs diffúzió hatásának kimérésére, a HOMO-FRET mérések korrekciójára. A fluoreszcens anizotrópia mérésekhez a ZEN-4 mindkét motordoménjét sárga fluoreszcens fehérjére (VenusZ434-555) cseréltük. A mérések a HOMO-FRET szignifikáns növekedését mutatták a CYK-4 jelenlétében. Mivel a ZEN-4-ben a motordomén hiányzott, arra lehetett következtetni, hogy a CYK-4 a ZEN-4 nyakrézséhez kötődve változtatta meg az egység geometriai konformációját.
- A megépített rendszerrel időben lassan változó fluoreszcencia anizotrópia méréseket végeztünk a fehérje-ligand kötési affinitás meghatározására, többcsatornás mikrofluidikai rendszerekben létrehozott nanoliter méretű cseppekben. Fluoreszcein festékkel jelölt BRC4 fehérje kötését vizsgáltuk a RAD51 ligandhoz. A rendszer kalibrációja és modellezése, továbbá a ligand hozzáadása után a mért anizotrópia jelben bekövetkező változás alapján nM kötési koncentrációt mértünk.

Releváns publikációk: [126, 167, 168]

5 Összefoglalás és távlati célok

A dolgozatomban igyekeztem felvázolni az elmúlt 15 évben az optikai szuperrezolúció terén elért elméleti és kísérleti munkám eredményeit. A kutatásokat megosztva végeztem a Szegedi Tudományegyetem Optikai és Kvantumelektronikai Tanszékén, Cambridge-ben a Chemical Engineering and Biotechnology tanszéken és Londonban a Nemzeti Fizikai Laboratóriumban (NPL). A dolgozat gerincét jelentő dSTORM szuperrezolúciós mikroszkópia olyan témának bizonyult, amit hazatérésem után 2013-ban folytatni tudtam. Nagy segítség volt ebben az akkor induló Nemzeti Agykutatási Program és egy elnyert Marie Curie „hazatérő” pályázat. A korábbi projektekből sokat tanultam, és a STORM mikroszkóp fejlesztésénél mindig szem előtt tartottam, hogy a végfelhasználó biológus/orvos partnert milyen konkrét probléma érdekli. Ezért igyekeztem mindig példákon keresztül bemutatni, hogy az elért fejlesztésekkel milyen konkrét kérdéseket válaszoltunk meg. Jelleműknél fogva a feladatok mindig megkövetelték a csapatmunkát. Szegeden gyakorló oktatóként mindig törekedtem arra, hogy egyetemi hallgatók csatlakozzanak a kutatásokhoz. Büszke vagyok arra, hogy a jelen dolgozat témájához csatlakozva témavezetésemmel négy PhD dolgozat és több tucat diplomamunka, szakdolgozat és TDK pályamű született. Hallgatóimnak lehetőségük volt részt venni tudományos konferenciákon és rövid tanulmányutakat tenni külföldi kutatóhelyeken.

A dolgozatban bemutatott eredmények jelentős része „pillanatfelvételt” ad a folyó kutatásokról. A fejlesztések és a kutatások folyamatosan zajlanak új kutatócsoportok, egyetemi és PhD hallgatók és együttműködő partnerek bevonásával. A teljesség igénye nélkül a kutatócsoport a következő évekre az alábbi célokat tűzte ki:

- i. A TestSTORM és a RainSTORM programok továbbfejlesztése és kiegészítése a kvantitatív kiértékelést támogató statSTORM alkalmazással
- ii. A minták direkt jelölésével a linkerek okozta műtermékek kiküszöbölése
- iii. Az mmSTORM módszer felhasználóbarát továbbfejlesztése
- iv. A fluoreszcens festékek paramétereinek közvetlen meghatározása a mintában
- v. A PAINT módszer optimalizálása és alkalmazása
- vi. Korrelált FRET-dSTORM mérések kalibrálása élő sejtes kísérletekhez
- vii. Nanotestek alkalmazása antitestek helyett

6 Köszönetnyilvánítás

A dolgozatban gyakran előforduló többes szám első személyű fogalmazás is arra utal, hogy az eredmények jelentős része csapatmunkának köszönhető. Csapatmunka alatt azonban nem csupán a szakmai segítséget és az együtt gondolkodást értem, hanem a megelőlegezett bizalmat, az önálló kutatás lehetőségét, a mindennapi munkához szükséges feltételek megteremtését, az őszinte beszélgetéseket és a megfogadott (és persze a figyelmen kívül hagyott) tanácsokat.

Köszönöm **Dr. Szabó Gábor** és **Dr. Bor Zsolt** professzor uraknak, hogy már egyetemi éveim alatt lehetőséget adtak arra, hogy bekapcsolódjak a tanszéken folyó kutatásokba és frissdiplomásként kijussak az Egyesült Államokba, ahol **Dr. Frank Tittel** és **Dr. Robert Curl** professzorok kutatócsoportjában dolgozhattam négy éven keresztül.

Külön köszönetet érdemel **Dr. Clemens Kaminski** professzor úr a Cambridge-i Egyetemről, és **Dr. Alex Knight** a londoni székhelyű Nemzeti Fizikai Laboratóriumból, akik kutatócsoportjaiban 2010 és 2012 között módomban volt megismerni a dSTORM szuperrezolúciós módszert. A kutatócsoportból külön meg kell említenem **Dr. Eric Rees** kollégámat, akivel együtt kezdtük a RainSTORM program írását, és aki mindig rámutatott a kódban az általam írt „interesting solution” részekre.

Köszönet illeti az összes hallgatót, akik a vezetésemmel írták/írják szakdolgozatukat, diplomamunkájukat és PhD dolgozatukat (**Dr. Kákonyi Róbert, Dr. Gajdáty Gábor, Dr. Dudás László, Dr. Sinkó József, Gajdos Tamás, Varga Dániel, Novák Tibor, H. Kovács Bálint, Bíró Péter**). A hosszadalmas közös kísérleti munkák, magyarázatok, irodalmi áttekintések, és végül a dolgozatok és a bennük szereplő ábrák végtelennek tűnő javítgatása során én is legalább annyit tanultam, mint ők.

Köszönöm az AdOptIm kutatócsoport összes tagjának, hogy 2013-tól lelkesen és teljes energiabefektetéssel segítettek az első magyarországi dSTORM rendszer megépítésében. Külön köszönet illeti **Dr. Tamás Gábor** professzor urat, hogy a szuperrezolúciós módszer fejlesztése és alkalmazása helyet kaphatott az induló Nemzeti Agykutatási Programban. Az együttműködő partnerek közül meg kell említenem **Dr. Pankotai Tibort, Dr. Mihály Józsefet** és **Dr. Szikora Szilárdot**, akik nem hátráltak meg a dSTORM gyermekbetegségei miatt és kitartó munkával megszülettek az első biológiai témájú közös cikkeink.

Köszönet illeti az Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék munkatársait azért, hogy a kutatáshoz szükséges adminisztratív munka jelentős részét levették a vállamról; **Dr. Hopp Béla** tanszékvezető professzor urat, hogy mindig igyekezett segíteni a kutatócsoport munkáját, és **Dr. Bozóki Zoltán** professzor urat, aki a közös kávézások alkalmával mindig ellátott néhány jó tanáccsal.

És végül, de nem utolsósorban köszönetet mondok családtagjaimnak, akik nélkül ez a dolgozat biztosan nem született volna meg. Külön köszönöm feleségemnek, hogy nemcsak a feltételeket biztosította ahhoz, hogy otthon *otthon* érezzem magam, hanem nyelvi lektorként olvashatóvá tette az összes dolgozatomat és cikkemet.

7 Felhasznált irodalom

1. M. G. Gustafsson, "Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy," *J Microsc* **198**, 82-87 (2000).
2. P. Kner, B. B. Chhun, E. R. Griffis, L. Winoto, and M. G. Gustafsson, "Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination," *Nat Methods* **6**, 339-342 (2009).
3. A. Markwirth, M. Lachetta, V. Mönkemöller, R. Heintzmann, W. Hübner, T. Huser, and M. Müller, "Video-rate multi-color structured illumination microscopy with simultaneous real-time reconstruction," *Nat Commun* **10**, 4315 (2019).
4. L. J. Young, F. Ströhl, and C. F. Kaminski, "A Guide to Structured Illumination TIRF Microscopy at High Speed with Multiple Colors," *J Vis Exp* **e53988**, (2016).
5. M. G. Gustafsson, "Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution," *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13081-13086 (2005).
6. S. W. Hell, and J. Wichmann, "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy," *Opt Lett* **19**, 780-782 (1994).
7. S. W. Hell, "Far-field optical nanoscopy," *Science* **316**, 1153-1158 (2007).
8. E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess, "Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution," *Science* **313**, 1642-1645 (2006).
9. S. T. Hess, T. P. Girirajan, and M. D. Mason, "Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy," *Biophys J* **91**, 4258-4272 (2006).
10. M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)," *Nat Methods* **3**, 793-795 (2006).
11. M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, and M. Sauer, "Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes," *Angew Chem Int Ed Engl* **47**, 6172-6176 (2008).
12. S. van de Linde, A. Löschberger, T. Klein, M. Heidbreder, S. Wolter, M. Heilemann, and M. Sauer, "Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes," *Nat Protoc* **6**, 991-1009 (2011).
13. J. K. G. Karlsson, A. Laude, M. J. Hall, and A. Harriman, "Photo-isomerization of the Cyanine Dye Alexa-Fluor 647 (AF-647) in the Context of dSTORM Super-Resolution Microscopy," *Chemistry* **25**, 14983-14998 (2019).
14. S. Stallinga, and B. Rieger, "Accuracy of the gaussian point spread function model in 2D localization microscopy," *Opt Express* **18**, 24461-24476 (2010).
15. R. E. Thompson, D. R. Larson, and W. W. Webb, "Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes," *Biophys J* **82**, 2775-2783 (2002).

16. D. Axelrod, "Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence," *J Cell Biol* **89**, 141-145 (1981).
17. M. Tokunaga, N. Imamoto, and K. Sakata-Sogawa, "Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells," *Nat Methods* **5**, 159-161 (2008).
18. C. Franke, M. Sauer, and S. van de Linde, "Photometry unlocks 3D information from 2D localization microscopy data," *Nat Methods* **14**, 41-44 (2017).
19. M. P. Backlund, M. D. Lew, A. S. Backer, S. J. Sahl, and W. E. Moerner, "The role of molecular dipole orientation in single-molecule fluorescence microscopy and implications for super-resolution imaging," *Chemphyschem* **15**, 587-599 (2014).
20. L. Holtzer, T. Meckel, and T. Schmidt, "Nanometric three-dimensional tracking of individual quantum dots in cells," *Applied Physics Letters* **90** (2007).
21. B. Huang, W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang, "Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy," *Science* **319**, 810-813 (2008).
22. S. Jia, J. C. Vaughan, and X. Zhuang, "Isotropic 3D Super-resolution Imaging with a Self-bending Point Spread Function," *Nat Photonics* **8**, 302-306 (2014).
23. **J. Sinko, T. Gajdos, E. Czvik, G. Szabo, and M. Erdelyi, "Polarization sensitive localization based super-resolution microscopy with a birefringent wedge," *Methods and Applications in Fluorescence* **5** (2017).**
24. S. Pavani, M. Thompson, J. Biteen, S. Lord, N. Liu, R. Twieg, R. Piestun, and W. Moerner, "Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 2995-2999 (2009).
25. M. F. Juetten, T. J. Gould, M. D. Lessard, M. J. Mlodzianoski, B. S. Nagpure, B. T. Bennett, S. T. Hess, and J. Bewersdorf, "Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples," *Nat Methods* **5**, 527-529 (2008).
26. C. Cruz, H. Shaban, A. Kress, N. Bertaux, S. Monneret, M. Mavrikis, J. Savatier, and S. Brasselet, "Quantitative nanoscale imaging of orientational order in biological filaments by polarized superresolution microscopy," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, E820-E828 (2016).
27. S. B. Mehta, M. McQuilken, P. J. La Riviere, P. Occhipinti, A. Verma, R. Oldenbourg, A. S. Gladfelter, and T. Tani, "Dissection of molecular assembly dynamics by tracking orientation and position of single molecules in live cells," *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E6352-E6361 (2016).
28. B. Dong, B. T. Soetikno, X. Chen, V. Backman, C. Sun, and H. F. Zhang, "Parallel three-dimensional tracking of quantum rods using polarization-sensitive spectroscopic photon localization microscopy," *Acs Photonics* **4**, 6 (2017).
29. C. M. Winterflood, E. Platonova, D. Albrecht, and H. Ewers, "Dual-color 3D superresolution microscopy by combined spectral-demixing and biplane imaging," *Biophys J* **109**, 3-6 (2015).

30. D. Baddeley, D. Crossman, S. Rossberger, J. E. Cheyne, J. M. Montgomery, I. D. Jayasinghe, C. Cremer, M. B. Cannell, and C. Soeller, "4D super-resolution microscopy with conventional fluorophores and single wavelength excitation in optically thick cells and tissues," *PLoS One* **6**, e20645 (2011).
31. G. Shtengel, J. A. Galbraith, C. G. Galbraith, J. Lippincott-Schwartz, J. M. Gillette, S. Manley, R. Sougrat, C. M. Waterman, P. Kanchanawong, M. W. Davidson, R. D. Fetter, and H. F. Hess, "Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure," *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3125-3130 (2009).
32. K. Xu, H. P. Babcock, and X. Zhuang, "Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton," *Nat Methods* **9**, 185-188 (2012).
33. I. Märki, N. L. Bocchio, S. Geissbuehler, F. Aguet, A. Bilenca, and T. Lasser, "Three-dimensional nano-localization of single fluorescent emitters," *Opt Express* **18**, 20263-20272 (2010).
34. Kotaka, F. and Maeda, T., Pioneer Corp, 1987. *Focus error detector*. U.S. Patent 4,695,158.
35. M. Badieirostami, M. D. Lew, M. A. Thompson, and W. E. Moerner, "Three-dimensional localization precision of the double-helix point spread function versus astigmatism and biplane," *Appl Phys Lett* **97**, 161103 (2010).
36. J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy* (Springer Science & Business Media., 2013).
37. S. Manakli, Y. Trouiller, P. Schiavone, P. Spinelli, O. Le-Borgne, J. Chollet, Y. Rody, and P. Goirand, "Combination multiple focal planes and PSM for sub 120 nm node with KrF lithography: study of the proximity effects," *Microelectronic Engineering* **61-2**, 123-132 (2002).
38. R. Hild, J. Escalera, M. Yzuel, and G. Nitzsche, "High focal depth imaging by beam shaping optical elements?," *Microelectronic Engineering* **35**, 205-208 (1997).
39. M. Hain, R. Glockner, S. Bhattacharya, D. Dias, S. Stankovic, and T. Tschudi, "Fast switching liquid crystal lenses for a dual focus digital versatile disc pickup," *Optics Communications* **188**, 291-299 (2001).
40. D. Dias, S. Stankovic, H. Haidner, L. Wang, T. Tschudi, M. Ferstl, and R. Steingruber, "High-frequency gratings for applications to DVD pickup systems," *Journal of Optics a-Pure and Applied Optics* **3**, 164-173 (2001).
41. F.M. Dickey, *Laser beam shaping: theory and techniques* (CRC Press, 2018).
42. O. Tzang, D. Feldkhun, A. Agrawal, A. Jesacher, and R. Piestun, "Two-photon PSF-engineered image scanning microscopy," *Optics Letters* **44**, 895-898 (2019).
43. A. Zharov, N. Zharova, R. Noskov, I. Shadrivov, and Y. Kivshar, "Birefringent left-handed metamaterials and perfect lenses for vectorial fields," *New Journal of Physics* **7** (2005).
44. X. Liu, X. Cai, S. Chang, and C. Grover, "Cemented doublet lens with an extended focal depth," *Optics Express* **13**, 552-557 (2005).

45. J. Davis, G. Evans, K. Crabtree, and I. Moreno, "Programmable birefringent lenses with a liquid-crystal display," *Applied Optics* **43**, 6235-6241 (2004).
46. S. Sanyal, P. Bandyopadhyay, and A. Ghosh, "Vector wave imagery using a birefringent lens," *Optical Engineering* **37**, 592-599 (1998).
47. **G. Gajdatsy, and M. Erdelyi, "Analysis of focus distortion based on birefringence," *Journal of Optics a-Pure and Applied Optics* **9**, 982-987 (2007).**
48. E. E. Wood, *Optical Crystallography* (New York, John Wiley & Sons, 1979).
49. M. Matsubara, Olympus Corp, 1977. Microscope objective. U.S. Patent 4,037,934.
50. Y. Suenaga, and M. Mizusawa, Nikon Corp, 1999. Microscope objective lens with variable correction of aberrations imparted by transparent body between the specimen and the objective lens. U.S. Patent 5,940,220.
51. F. J. Versteeg, Optische Industrie de Oude Delft NV, 1984. Catadioptric objective. U.S. Patent 4,487,483.
52. D. R. Shafer, Perkin Elmer Corp, 1982. Single element spherical surfaced optics insensitive to wavelength and temperature. U.S. Patent 4,344,676.
53. **M. Erdelyi, M. Bereznai, G. Gajdatsy, and Z. Bor, "Three-dimensional focus manipulation by means of a birefringent plate," *Optics Communications* **281**, 4807-4811 (2008).**
54. K. Youngworth, and T. Brown, "Focusing of high numerical aperture cylindrical-vector beams," *Optics Express* **7**, 77-87 (2000).
55. D. Ganic, X. Gan, and M. Gu, "Focusing of doughnut laser beams by a high numerical-aperture objective in free space," *Optics Express* **11**, 2747-2752 (2003).
56. J. Braat, P. Dirksen, A. Janssen, and A. van de Nes, "Extended Nijboer-Zernike representation of the vector field in the focal region of an aberrated high-aperture optical system," *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision* **20**, 2281-2292 (2003).
57. L. Helseth, "Optical vortices in focal regions," *Optics Communications* **229**, 85-91 (2004).
58. L. Helseth, "Smallest focal hole," *Optics Communications* **257**, 1-8 (2006).
59. L. Helseth, "Roles of polarization, phase and amplitude in solid immersion lens systems," *Optics Communications* **191**, 161-172 (2001).
60. R. Dorn, S. Quabis, and G. Leuchs, "Sharper focus for a radially polarized light beam," *Physical Review Letters* **91** (2003).
61. C. Sheppard, and A. Choudhury, "Annular pupils, radial polarization, and superresolution," *Applied Optics* **43**, 4322-4327 (2004).
62. W. Kimura, G. Kim, R. Romea, L. Steinhauer, I. Pogorelsky, K. Kusche, R. Fernow, X. Wang, and Y. Liu, "Laser acceleration of relativistic electrons using the inverse Cherenkov effect," *Physical Review Letters* **74**, 546-549 (1995).

63. Y. Liu, D. Cline, and P. He, "Vacuum laser acceleration using a radially polarized CO₂ laser beam," *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment* **424**, 296-303 (1999).
64. Q. Zhan, "Trapping metallic Rayleigh particles with radial polarization," *Optics Express* **12**, 3377-3382 (2004).
65. S. Tidwell, D. Ford, and W. Kimura, "Generating radially polarized beams interferometrically," *Applied Optics* **29**, 2234-2239 (1990).
66. S. Tidwell, D. Ford, and W. Kimura, "Transporting and focusing radially polarized laser-beams," *Optical Engineering* **31**, 1527-1531 (1992).
67. R. Oron, S. Blit, N. Davidson, A. Friesem, Z. Bomzon, and E. Hasman, "The formation of laser beams with pure azimuthal or radial polarization," *Applied Physics Letters* **77**, 3322-3324 (2000).
68. J. Tervo, and J. Turunen, "Generation of vectorial propagation-invariant fields by polarization-grating axicons," *Optics Communications* **192**, 13-18 (2001).
69. F. P. Schafer, Max-Planck-Gesellschaft zur Forderung der Wissenschaften, 1988. Method and device for polarizing light radiation. U.S. Patent 4,755,027.
70. Z. Bomzon, G. Biener, V. Kleiner, and E. Hasman, "Radially and azimuthally polarized beams generated by space-variant dielectric subwavelength gratings," *Optics Letters* **27**, 285-287 (2002).
71. M. Neil, F. Massoumian, R. Juskaitis, and T. Wilson, "Method for the generation of arbitrary complex vector wave fronts," *Optics Letters* **27**, 1929-1931 (2002).
72. T. Grosjean, D. Courjon, and M. Spajer, "An all-fiber device for generating radially and other polarized light beams," *Optics Communications* **203**, 1-5 (2002).
73. K. Toussaint, S. Park, J. Jureller, and N. Scherer, "Generation of optical vector beams with a diffractive optical element interferometer," *Optics Letters* **30**, 2846-2848 (2005).
74. A. Kohazi-Kis, "Cross-polarization effects of light beams at interfaces of isotropic media," *Optics Communications* **253**, 28-37 (2005).
75. B. Jia, X. Gan, and M. Gu, "Direct measurement of a radially polarized focused evanescent field facilitated by a single LCD," *Optics Express* **13**, 6821-6827 (2005).
76. B. Richards, and E. 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**, 21 (1959).
77. M. Born, and E. Wolf, *Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light* (Elsevier, 2013).
78. W. G. Driscoll, and W. Vaughan, *Handbook of optics. New York: McGraw-Hill, 1978.*
79. **M. Erdelyi, and Z. Bor, "Radial and azimuthal polarizers," *Journal of Optics a-Pure and Applied Optics* **8**, 737-742 (2006).**

80. **M. Erdelyi, and G. Gajdatsy, "Radial and azimuthal polarizer by means of a birefringent plate," *Journal of Optics a-Pure and Applied Optics* 10 (2008).**
81. F. Arecchi, G. Giacomelli, P. Ramazza, and S. Residori, "Vortices and defect statistics in 2-dimensional optical chaos," *Physical Review Letters* **67**, 3749-3752 (1991).
82. I. Basistiy, M. Soskin, and M. Vasnetsov, "Optical wave-front dislocations and their properties," *Optics Communications* **119**, 604-612 (1995).
83. **Sinkó J., "Fókuszpont intenzitás-eloszlásának manipulációja kettőtörő lemezzel," *Diplomamunka, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék (Szegedi Tudományegyetem, 2009).***
84. **Kákonyi R., "Nyalábprofil meghatározása a Computer Tomográfok képalkotó algoritmusának segítségével," *TDK dolgozat, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék (Szegedi Tudományegyetem, 2004).***
85. S. Quabis, R. Dorn, M. Eberler, O. Glockl, and G. Leuchs, "The focus of light - theoretical calculation and experimental tomographic reconstruction," *Applied Physics B-Lasers and Optics* **72**, 109-113 (2001).
86. J. Sharpe, U. Ahlgren, P. Perry, B. Hill, A. Ross, J. Hecksher-Sorensen, R. Baldock, and D. Davidson, "Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies," *Science* **296**, 541-545 (2002).
87. D. Nguyen, "Optical projection tomography for whole organ imaging," PhD. Thesis, à la Faculté des sciences et techniques de l'ingénieur Laboratoire d'optique biomédicale (Ecole Polytechnique, 2019), p. 116.
88. **G. Szabó, M. Erdélyi, G. Gajdatsy, and L. Dudás, Szegedi Tudományegyetem, 2014. Optical microscope system and method carried out therewith for reconstructing an image of an object. U.S. Patent 8,693,091.**
89. **Dudás L., "Laterális feloldás és képminőség javítása vonalpásztázó tomográfias optikai mikroszkópban," PhD dolgozat, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék (Szegedi Tudományegyetem, 2013).**
90. **Gajdatsy G, "Vonalpásztázáson alapuló tomográfias optikai mikroszkóp elméleti és kísérleti vizsgálata," PhD. Dolgozat, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék(Szegedi Tudományegyetem, 2010).**
91. **G. Gajdatsy, L. Dudas, M. Erdelyi, and G. Szabo, "Line-scanning tomographic optical microscope with isotropic transfer function," *Journal of Optics* 12 (2010).**
92. S. Kumazaki, M. Hasegawa, M. Ghoneim, Y. Shimizu, K. Okamoto, M. Nishiyama, H. Oh-Oka, and M. Terazima, "A line-scanning semi-confocal multi-photon fluorescence microscope with a simultaneous broadband spectral acquisition and its application to the study of the thylakoid membrane of a cyanobacterium *Anabaena PCC7120*," *Journal of Microscopy-Oxford* **228**, 240-254 (2007).
93. Kino, G.S. and Corle, T.R., 1996. Confocal scanning optical microscopy and related imaging systems. Academic Press.

94. G. Gullberg, B. Tsui, C. Crawford, and E. Edgerton, "Estimation of geometrical parameters for fan beam tomography," *Physics in Medicine and Biology* **32**, 1581-1594 (1987).
95. M. Karolczak, S. Schaller, K. Engelke, A. Lutz, U. Taubenreuther, K. Wiesent, and W. Kalender, "Implementation of a cone-beam reconstruction algorithm for the single-circle source orbit with embedded misalignment correction using homogeneous coordinates," *Med Phys* **28**, 2050-2069 (2001).
96. Y. Sun, Y. Hou, and J. Hu, "Reduction of artifacts induced by misaligned geometry in cone-beam CT," *IEEE Trans Biomed Eng* **54**, 1461-1471 (2007).
97. C. Mennessier, R. Clackdoyle, and F. Noo, "Direct determination of geometric alignment parameters for cone-beam scanners," *Phys Med Biol* **54**, 1633-1660 (2009).
98. T. Donath, F. Beckmann, and A. Schreyer, "Automated determination of the center of rotation in tomography data," *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* **23**, 1048-1057 (2006).
99. A. Sasov, X. Liu, and P. L. Salmon, 2008, September. Compensation of mechanical inaccuracies in micro-CT and nano-CT. In *Developments in X-ray Tomography VI* (Vol. 7078, p. 70781C). International Society for Optics and Photonics. (2008)
- 100. L. Dudás, G. Gajdáty, J. Sinkó, M. Erdélyi, and G. Szabó, "Correction of error motion in a line-scanning tomographic optical microscope," *Appl Opt* **51**, 6319-6324 (2012).**
101. Richardson, T.M., Northern Edge Assoc, 2002. Test slide for microscopes and method for the production of such a slide. U.S. Patent 6,381,013.
- 102. J. Sinkó, L. Dudás, G. Gajdáty, M. Erdélyi, and G. Szabó, "Map-free line-scanning tomographic optical microscope," *Opt Lett* **36**, 4011-4013 (2011).**
- 103. L. Dudas, J. Sinko, M. Erdelyi, and G. Szabo, "Confocal line-scanning microscope with modified illumination," *Opt. Letter* **37**(20), 4293-4295 (2012).**
- 104. J. Sinko, G. Szabo, and M. Erdelyi, "Ray tracing analysis of inclined illumination techniques," *Optics Express* **22**, 18940-18948 (2014).**
105. D. Sage, T. A. Pham, H. Babcock, T. Lukes, T. Pengo, J. Chao, R. Velmurugan, A. Herbert, A. Agrawal, S. Colabrese, A. Wheeler, A. Archetti, B. Rieger, R. Ober, G. M. Hagen, J. B. Sibarita, J. Ries, R. Henriques, M. Unser, and S. Holden, "Super-resolution fight club: assessment of 2D and 3D single-molecule localization microscopy software," *Nat Methods* **16**, 387-395 (2019).
- 106. E. Rees, M. Erdelyi, G. Schierle, A. Knight, and C. Kaminski, "Elements of image processing in localization microscopy," *Journal of Optics* **15** (2013).**
107. J. Grove, "Super-resolution microscopy: a virus' eye view of the cell," *Viruses* **6**, 1365-1378 (2014).
108. C. L. Freeman, G. Hesketh, and M. N. Seaman, "RME-8 coordinates the activity of the WASH complex with the function of the retromer SNX dimer to control endosomal tubulation," *J Cell Sci* **127**, 2053-2070 (2014).

109. H. Miller, Z. Zhou, A. J. Wollman, and M. C. Leake, "Superresolution imaging of single DNA molecules using stochastic photoblinking of minor groove and intercalating dyes," *Methods* **88**, 81-88 (2015).
110. E. Okeke, T. Parker, H. Dingsdale, M. Concannon, M. Awais, S. Voronina, J. Molgó, M. Begg, D. Metcalf, A. E. Knight, R. Sutton, L. Haynes, and A. V. Tepikin, "Epithelial-mesenchymal transition, IP3 receptors and ER-PM junctions: translocation of Ca²⁺ signalling complexes and regulation of migration," *Biochem J* **473**, 757-767 (2016).
111. L. Andronov, Y. Lutz, J. L. Vonesch, and B. P. Klaholz, "SharpViSu: integrated analysis and segmentation of super-resolution microscopy data," *Bioinformatics* **32**, 2239-2241 (2016).
112. **G. S. Kaminski Schierle, S. van de Linde, M. Erdelyi, E. K. Esbjörner, T. Klein, E. Rees, C. W. Bertocini, C. M. Dobson, M. Sauer, and C. F. Kaminski, "In situ measurements of the formation and morphology of intracellular β -amyloid fibrils by super-resolution fluorescence imaging," *J Am Chem Soc* **133**, 12902-12905 (2011).**
113. J. M. Levsky, and R. H. Singer, "Fluorescence in situ hybridization: past, present and future," *J Cell Sci* **116**, 2833-2838 (2003).
114. **C. Steuwe, M. Erdelyi, G. Szekeres, M. Csete, J. J. Baumberg, S. Mahajan, and C. F. Kaminski, "Visualizing electromagnetic fields at the nanoscale by single molecule localization," *Nano Lett* **15**, 3217-3223 (2015).**
115. **E. Esbjörner, F. Chan, E. Rees, M. Erdelyi, L. Luheshi, C. Bertocini, C. Kaminski, C. Dobson, and G. Schierle, "Direct Observations of Amyloid beta Self-Assembly in Live Cells Provide Insights into Differences in the Kinetics of A beta(1-40) and A beta(1-42) Aggregation," *Chemistry & Biology* **21**, 732-742 (2014).**
116. **E. Gyukity-Sebestyen, M. Harmati, G. Dobra, I. Nemeth, J. Mihaly, A. Zvara, E. Hunyadi-Gulyas, R. Katona, I. Nagy, P. Horvath, A. Balind, A. Szkalitsy, M. Kovacs, T. Pankotai, B. Borsos, M. Erdelyi, Z. Szegletes, Z. Vereb, E. Buzas, L. Kemeny, T. Biro, and K. Buzas, "Melanoma-Derived Exosomes Induce PD-1 Overexpression and Tumor Progression via Mesenchymal Stem Cell Oncogenic Reprogramming," *Frontiers in Immunology* **10** (2019).**
117. **M. Ahn, E. De Genst, G. S. Kaminski Schierle, M. Erdelyi, C. F. Kaminski, C. M. Dobson, and J. R. Kumita, "Analysis of the native structure, stability and aggregation of biotinylated human lysozyme," *PLoS One* **7**, e50192 (2012).**
118. **Steuwe, C., Erdelyi, M., Szekeres, G., Csete, M., Baumberg, J.J., Mahajan, S. and Kaminski, C.F., 2015, August. Visualisation of plasmonic fields at the nanoscale with single molecule localisation microscopy. In *Nanoimaging and Nanospectroscopy III* (Vol. 9554, p. 95540Q). International Society for Optics and Photonics.**
119. **J. Sinko, R. Kakonyi, E. Rees, D. Metcalf, A. Knight, C. Kaminski, G. Szabo, and M. Erdelyi, "TestSTORM: Simulator for optimizing sample labeling and image acquisition in localization based super-resolution microscopy," *Biomedical Optics Express* **5**, 778-787 (2014).**

120. **T. Novák, T. Gajdos, J. Sinkó, G. Szabó, and M. Erdélyi, "TestSTORM: Versatile simulator software for multimodal super-resolution localization fluorescence microscopy," *Sci Rep* 7, 951 (2017).**
121. H. Kogelnik, and T. Li, "Laser beams and resonators," *Appl Opt* 5, 1550-1567 (1966).
122. S. Gibson, and F. Lanni, "Experimental test of an analytical model of aberration in an oil-immersion objective lens used in 3-dimensional light-microscopy," *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision* 8, 1601-1613 (1991).
123. B. Valeur and M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* (John Wiley & Sons., 2012).
124. M. Lew, M. Backlund, and W. Moerner, "Rotational Mobility of Single Molecules Affects Localization Accuracy in Super-Resolution Fluorescence Microscopy," *Nano Letters* 13, 3967-3972 (2013).
125. K. Xu, G. Zhong, and X. Zhuang, "Actin, Spectrin, and Associated Proteins Form a Periodic Cytoskeletal Structure in Axons," *Science* 339, 452-456 (2013).
126. **M. Erdelyi, J. Simon, E. Barnard, and C. Kaminski, "Analyzing Receptor Assemblies in the Cell Membrane Using Fluorescence Anisotropy Imaging with TIRF Microscopy," *Plos One* 9 (2014).**
127. **J. Manetsberger, J. D. Manton, M. J. Erdelyi, H. Lin, D. Rees, G. Christie, and E. J. Rees, "Ellipsoid Localization Microscopy Infers the Size and Order of Protein Layers in Bacillus Spore Coats," *Biophys J* 109, 2058-2066 (2015).**
128. **T. Gajdos, Z. Cserteg, S. Szikora, T. Novak, B. Kovacs, G. Szabo, J. Mihaly, and M. Erdelyi, "mmSTORM: Multimodal localization based super-resolution microscopy," *Scientific Reports* 9 (2019).**
129. **H. Kovács B. B., "Diffúzió vizsgálata molekulakövetés és korrelációs technikákkal," *Diplomamunka, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék (Szegedi Tudományegyetem, 2019).***
130. S. Sehayek, Y. Gidi, V. Glembockyte, H. Brandao, P. Francois, G. Cosa, and P. Wiseman, "A High-Throughput Image Correlation Method for Rapid Analysis of Fluorophore Photoblinking and Photobleaching Rates," *Acs Nano* 13, 11955-11966 (2019).
131. B. Diederich, P. Then, A. Jugler, R. Forster, and R. Heintzmann, "cellSTORM-Cost-effective super-resolution on a cellphone using dSTORM," *Plos One* 14 (2019).
132. E. Hershko, L. E. Weiss, T. Michaeli, and Y. Shechtman, "Multicolor localization microscopy and point-spread-function engineering by deep learning," *Opt Express* 27, 6158-6183 (2019).
133. **M. Erdelyi, J. Sinko, R. Kakonyi, A. Kelemen, E. Rees, D. Varga, and G. Szabo, "Origin and compensation of imaging artefacts in localization-based super-resolution microscopy," *Methods* 88, 122-132 (2015).**
134. R. Jungmann, C. Steinhauer, M. Scheible, A. Kuzyk, P. Tinnefeld, and F. C. Simmel, "Single-molecule kinetics and super-resolution microscopy by fluorescence imaging of transient binding on DNA origami," *Nano Lett* 10, 4756-4761 (2010).

135. C. Steinhauer, R. Jungmann, T. L. Sobey, F. C. Simmel, and P. Tinnefeld, "DNA origami as a nanoscopic ruler for super-resolution microscopy," *Angew Chem Int Ed Engl* **48**, 8870-8873 (2009).
136. Y. Fujimoto, and T. Kasahara, Olympus Corp, 2007. Immersion objective lens system for microscope. U.S. Patent 7,199,938.
- 137. M. Erdelyi, E. Rees, D. Metcalf, G. Schierle, L. Dudas, J. Sinko, A. Knight, and C. Kaminski, "Correcting chromatic offset in multicolor superresolution localization microscopy," *Optics Express* **21**, 10978-10988 (2013).**
138. M. Mandai, and K. Yamaguchi, Nikon Corp, 2006. Immersion microscope objective lens. U.S. Patent 7,046,451.
- 139. M. Erdélyi, J. Sinkó, R. Kákonyi, A. Kelemen, E. Rees, D. Varga, and G. Szabó, "Origin and compensation of imaging artefacts in localization-based super-resolution microscopy," *Methods* **88**, 122-132 (2015).**
- 140. Varga D. "Kromatikus hiba hatása a nagyfeloldású lokalizációs mikroszkópiában", Diplomamunka, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék (Szegedi Tudományegyetem, 2016).**
- 141. 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, p. 100710X). International Society for Optics and Photonics.**
- 142. Bíró P., "Polarizációra érzékeny szuperrezolúciós mikroszkópia," Diplomamunka, Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék (Szegedi Tudományegyetem, 2019).**
143. K. Spehar, T. Ding, Y. Sun, N. Kedia, J. Lu, G. R. Nahass, M. D. Lew, and J. Bieschke, "Super-resolution Imaging of Amyloid Structures over Extended Times by Using Transient Binding of Single Thioflavin T Molecules," *Chembiochem* **19**, 1944-1948 (2018).
144. D. J. Lindberg, A. Wenger, E. Sundin, E. Wesén, F. Westerlund, and E. K. Esbjörner, "Binding of Thioflavin-T to Amyloid Fibrils Leads to Fluorescence Self-Quenching and Fibril Compaction," *Biochemistry* **56**, 2170-2174 (2017).
145. M. Biancalana, and S. Koide, "Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils," *Biochim Biophys Acta* **1804**, 1405-1412 (2010).
146. H. A. Shaban, C. A. Valades-Cruz, J. Savatier, and S. Brasselet, "Polarized super-resolution structural imaging inside amyloid fibrils using Thioflavine T," *Sci Rep* **7**, 12482 (2017).
147. A. Löschberger, S. van de Linde, M. C. Dabauvalle, B. Rieger, M. Heilemann, G. Krohne, and M. Sauer, "Super-resolution imaging visualizes the eightfold symmetry of gp210 proteins around the nuclear pore complex and resolves the central channel with nanometer resolution," *J Cell Sci* **125**, 570-575 (2012).
- 148. Rees, E.J., Erdelyi, M., Pinotsi, D., Knight, A., Metcalf, D. and Kaminski, C.F., 2012. Blind assessment of localisation microscope image resolution. *Optical Nanoscopy*, **1**(1), pp.1-10.**

149. D. Varga, H. Majoros, Z. Ujfaludi, M. Erdelyi, and T. Pankotai, "Quantification of DNA damage induced repair focus formation via super-resolution dSTORM localization microscopy," *Nanoscale* **11**, 14226-14236 (2019).
150. D. Varga, H. Majoros, Zs. Ujfaludi, T. Pankotai, and Miklós Erdélyi "Quantification of labelled target molecules via super-resolution dSTORM localization microscopy", *Proc. SPIE 11246, Single Molecule Spectroscopy and Superresolution Imaging XIII*, 1124612 (13 February 2020)
151. Szikora, S., Gajdos, T., Novák, T., Farkas, D., Földi, I., Lenart, P., Erdélyi, M. and Mihály, J., "Nanoscopy reveals the layered organization of the sarcomeric H-zone and I-band complexes" *The Journal of cell biology*, **219**(1). (2020)
152. J. Fisz, "Fluorescence polarization spectroscopy at combined high-aperture excitation and detection: application to one-photon-excitation fluorescence microscopy," *Journal of Physical Chemistry a* **111**, 8606-8621 (2007).
153. D. Jameson, and J. Ross, "Fluorescence Polarization/Anisotropy in Diagnostics and Imaging," *Chemical Reviews* **110**, 2685-2708 (2010).
154. D. Axelrod, "Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization," *Biophys J* **26**, 557-573 (1979).
155. J. Dix, and A. Verkman, "Mapping of fluorescence anisotropy in living cells by ratio imaging - application to cytoplasmic viscosity," *Biophysical Journal* **57**, 231-240 (1990).
156. R. C. Choi, J. Simon, K. W. Tsim, and E. A. Barnard, "Constitutive and agonist-induced dimerizations of the P2Y1 receptor: relationship to internalization and scaffolding," *J Biol Chem* **283**, 11050-11063 (2008).
157. R. Day, C. Booker, and A. Periasamy, "Characterization of an improved donor fluorescent protein for Forster resonance energy transfer microscopy," *Journal of Biomedical Optics* **13** (2008).
158. Sun, Y., Booker, C.F., Day, R.N. and Periasamy, A., 2009, February. Localization of protein-protein interactions among three fluorescent proteins in a single living cell: three-color FRET microscopy. In *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences IX* (Vol. 7183, p. 71832E). International Society for Optics and Photonics.
159. A. Squire, P. Verveer, O. Rocks, and P. Bastiaens, "Red-edge anisotropy microscopy enables dynamic imaging of homo-FRET between green fluorescent proteins in cells," *Journal of Structural Biology* **147**, 62-69 (2004).
160. A. P. Demchenko, "The red-edge effects: 30 years of exploration," *Luminescence* **17**, 19-42 (2002).
161. K. Lee, T. Davies, and M. Mishima, "Cytokinesis microtubule organisers at a glance," *Journal of Cell Science* **125**, 3495-3500 (2012).
162. E. White, and M. Glotzer, "Centralspindlin: At the Heart of Cytokinesis," *Cytoskeleton* **69**, 882-892 (2012).

163. S. Lekomtsev, K. Su, V. Pye, K. Blight, S. Sundaramoorthy, T. Takaki, L. Collinson, P. Cherepanov, N. Divecha, and M. Petronczki, "Centralspindlin links the mitotic spindle to the plasma membrane during cytokinesis," *Nature* **492**, 276-+ (2012).
164. E. White, H. Raghuraman, E. Perozo, and M. Glotzer, "Binding of the CYK-4 Subunit of the Centralspindlin Complex Induces a Large Scale Conformational Change in the Kinesin Subunit," *Journal of Biological Chemistry* **288**, 19785-19795 (2013).
165. Mayor, S. and Bilgrami, S., 2007. Fretting about FRET in cell and structural biology. *Evaluating Techniques in Biochemical Research*, Cell Press. Cambridge. <http://www.cellpress.com/misc/page>.
166. N. Klonis, and W. H. Sawyer, "Spectral properties of the prototropic forms of fluorescein in aqueous solution," *J Fluoresc* **6**, 147-157 (1996).
167. **F. Gielen, M. Butz, E. Rees, M. Erdelyi, T. Moschetti, M. Hyvonen, J. Edel, C. Kaminski, and F. Hollfelder, "Quantitative Affinity Determination by Fluorescence Anisotropy Measurements of Individual Nanoliter Droplets," *Analytical Chemistry* **89**, 1092-1101 (2017).**
168. **T. Davies, N. Kodera, G. Schierle, E. Rees, M. Erdelyi, C. Kaminski, T. Ando, and M. Mishima, "CYK4 Promotes Antiparallel Microtubule Bundling by Optimizing MKLP1 Neck Conformation," *Plos Biology* **13** (2015).**