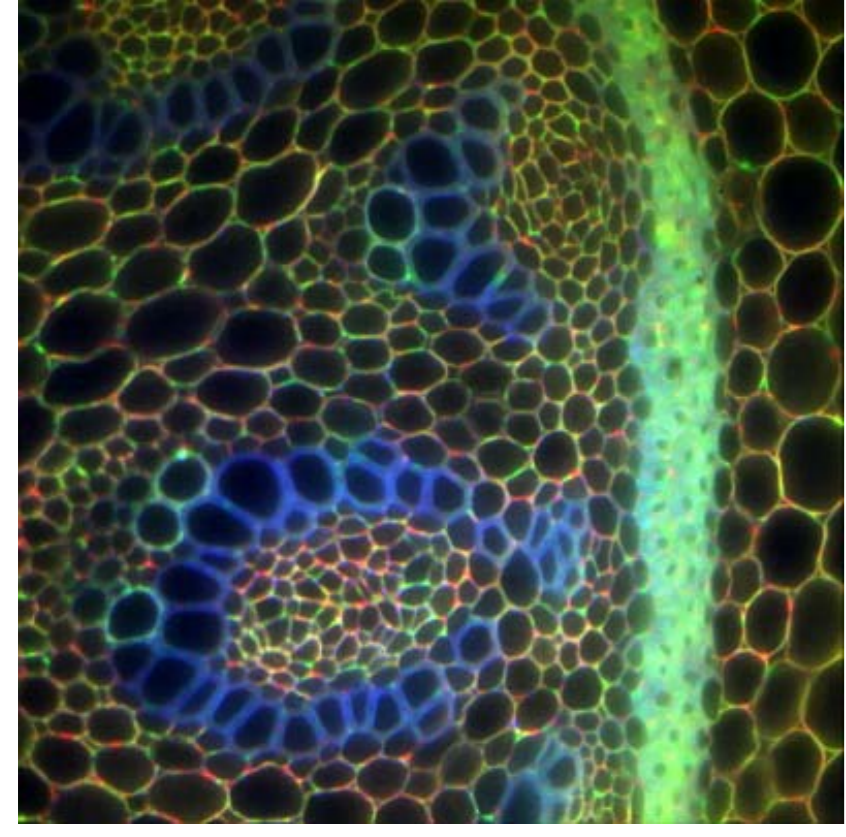
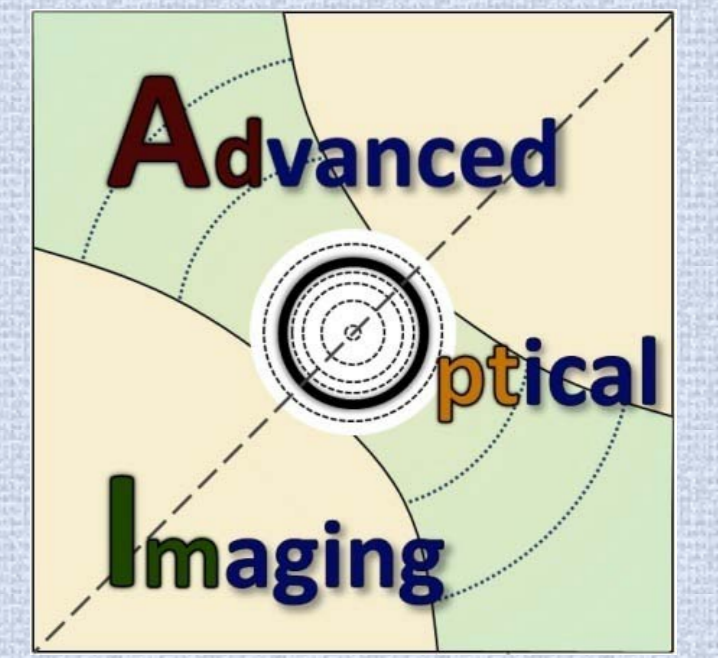


## Optikai mikroszkópiai kutatócsoport

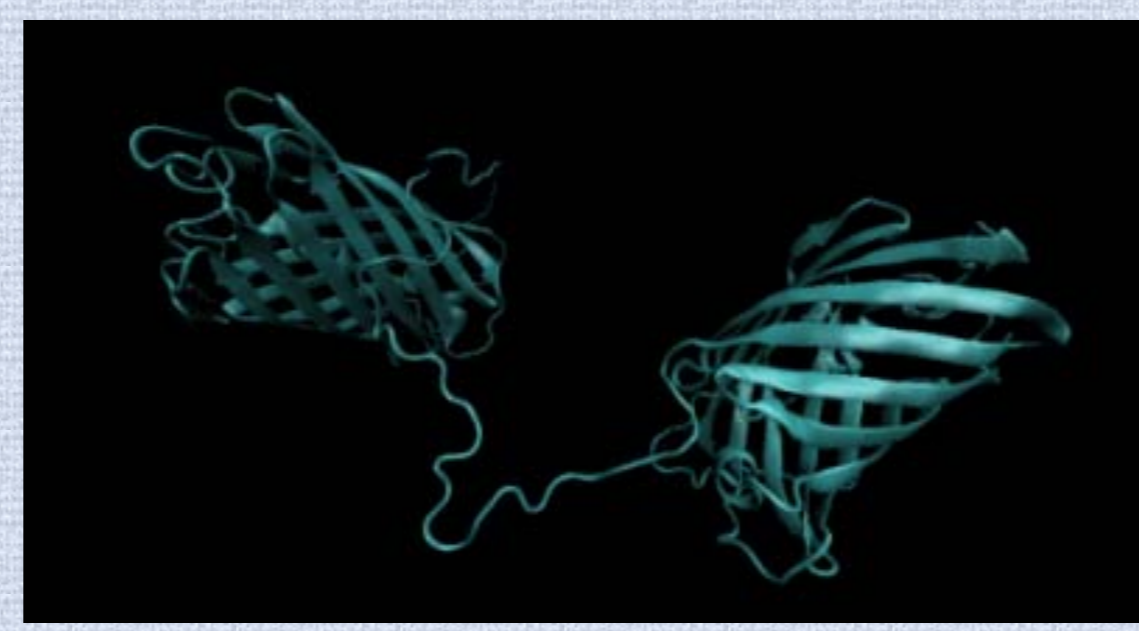


Az Optikai mikroszkópiai (Advanced Optical Imaging: AdOptIm) kutatócsoport modern optikai leképező módszerek és eljárások fejlesztésével, optimalizálásával és alkalmazásával foglalkozik. Fő kutatási irányunkat a biológiai minták nagy térbeli feloldású, polarizációra érzékeny leképezése jelenti, amely lehetőséget ad a sejtekben és szövetekben lejátszódó molekuláris szintű mechanizmusok követésére és megértésére. A módszerek fejlesztése összehangolt fizikai, informatikai és biológiai kutatásokat kíván meg.



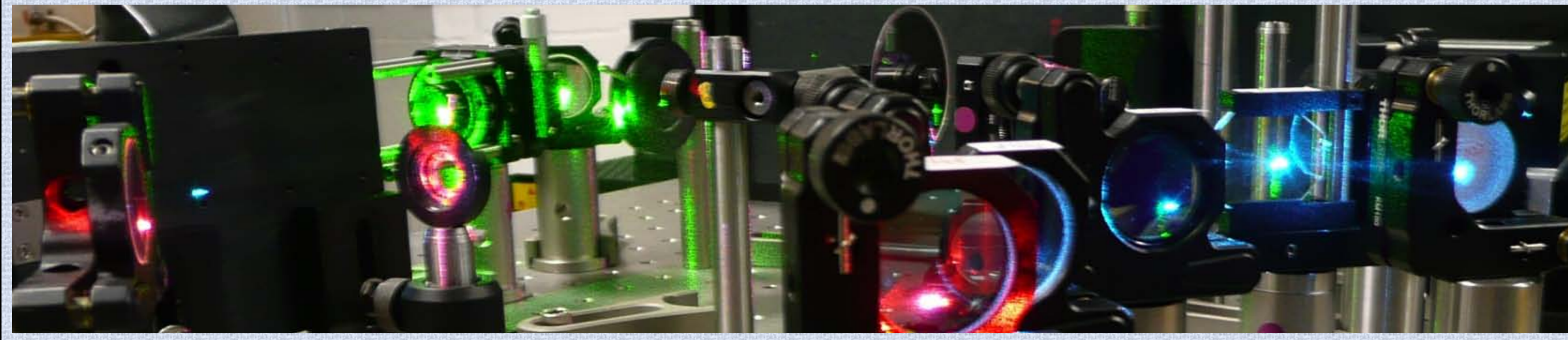
### Optikai mikroszkópia

A **fluoreszcens mikroszkópiai** eljárásokban a mintát specifikusan fluoreszcens fehérjével vagy festékkel jelöljük meg. E jelölő molekulákat lézerekkel gerjesztjük, és a hosszabb hullámhosszon emittált fotonokat a gerjesztő fénytől spektrálisan leválasztva összegyűjtjük. Az emittált fény intenzitásának, lecsengési idejének, polarizációs tulajdonságainak mérése alapján képet készíthetünk a mintáról.



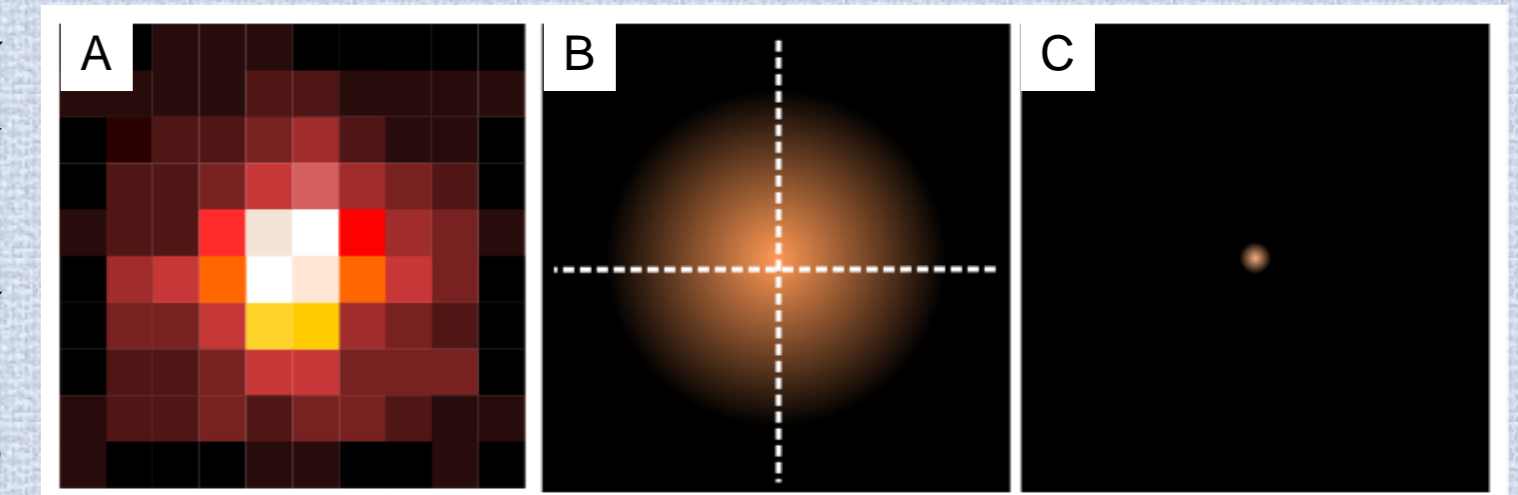
Linkerrel összekötött mTFP fluoreszcens fehérjék számítógépes modellje

A hagyományos módszerek (EPI fluoreszcens, konfokális, TIRF) térbeli feloldását a fény diffrakciója limitálja, ami a Rayleigh-kritérium alapján a térbeli feloldást  $\approx 250$  nm-ben határozza meg a látható tartományban. Ezért ezekkel a módszerekkel finom - feloldás alatti - struktúrák nem képezhetők le. Az elmúlt évtizedben számos nagyfeloldású eljárást fejlesztettek ki (STED, SIM, STORM, PALM stb.). Ezek közül a lokalizációs mikroszkópok  $<10$  nm térbeli feloldással a jelenlegi legnagyobb térbeli feloldású optikai mikroszkópok, amelyek alkalmasak molekuláris szintű leképezésre. A kutatócsoport fő témája egy ilyen elven működő mikroszkóprendszer megépítése, üzemeltetése, fejlesztése és alkalmazása.

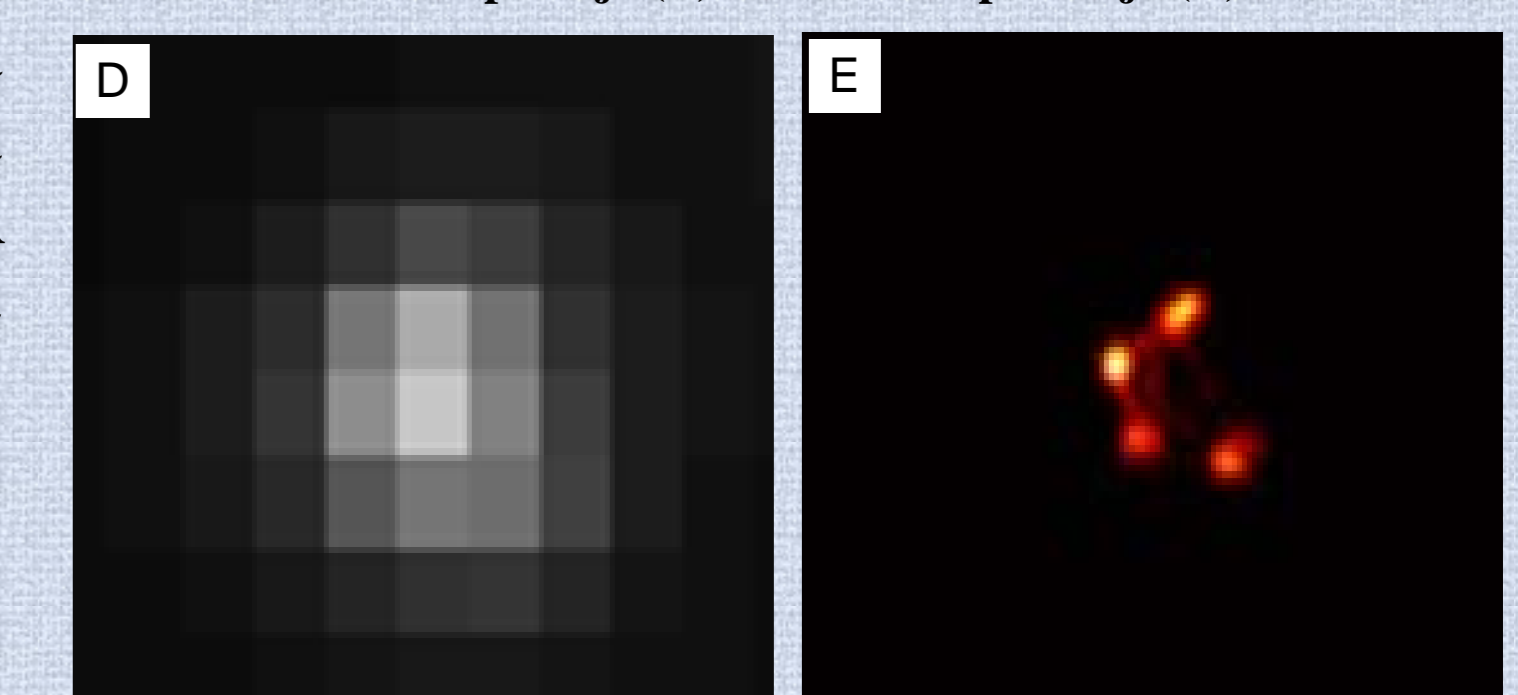


### Lokalizációs eljárás, az „Optikai Pointillizmus”

A **lokalizációs módszerek** lényege, hogy a mintát jelölő fluoreszcens festékeket időben és térben szétválasztva detektáljuk és így határozzuk meg nagy pontossággal a molekulák helyzetét. Ez tipikusan 10000-50000 kép felvételét jelenti, amelyeken az aktív molekulák jól szeparáltak helyezkednek el. Egy algoritmus kiválasztja a szeparált molekulákat, és illesztéssel meghatározza azok helyét. A lokalizáció pontossága függ a detektált fotonok számától és a zajszinttől. A módszer alkalmazható több színű leképezésre és kiterjeszhető a harmadik, axiális koordinátára is. A molekulák kapcsolási mechanizmusától függően a lokalizációs módszerek számos típusa különíthető el. (STORM, dSTORM, PALM, PAINT, NASCA stb.).



Egyetlen molekula detektált képe a kamerán (A), illesztett intenzitásprofilja (B) és lokalizált pozíciója (C)



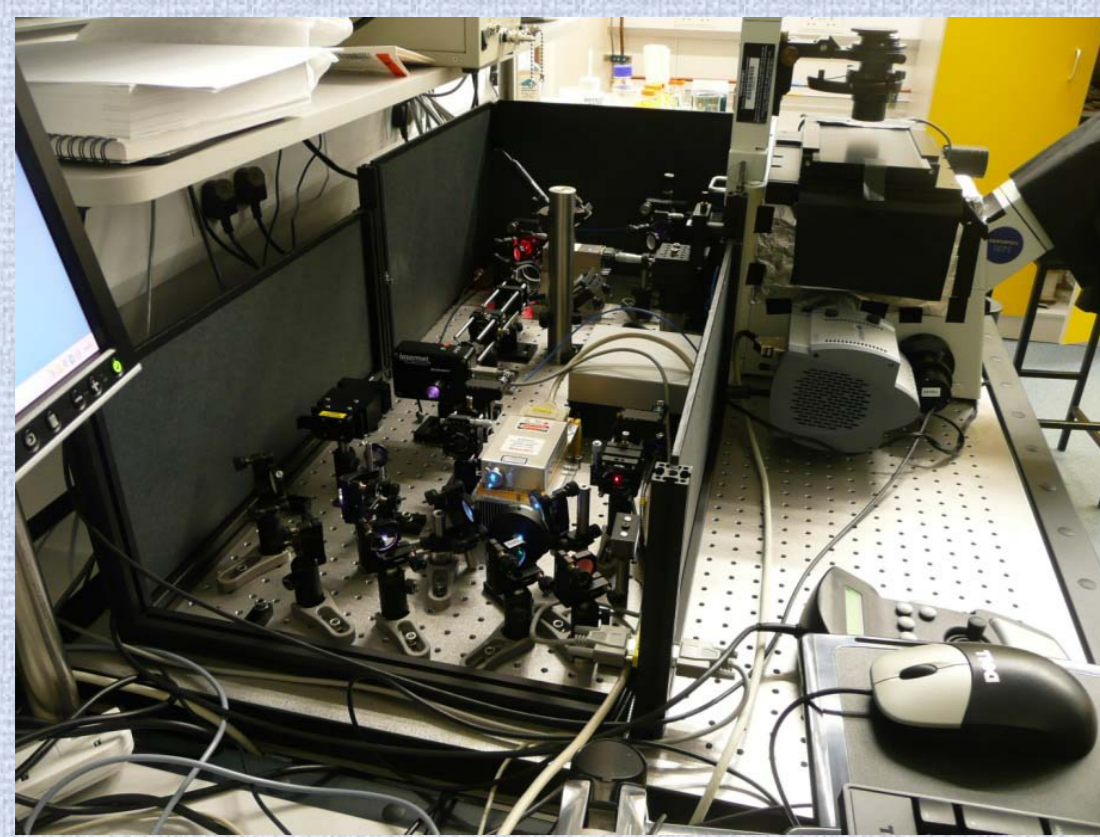
Négy vezikula hagyományos optikai mikroszkópos képe (D) és lokalizációs módszerrel felvett dSTORM képe (E)

A módszer jelenleg leginkább fixált sejtek és szövetek vizsgálatára alkalmas, mert a festékek villogtatása rendszerint toxikus pufferfolyadékok alkalmazását követeli meg, illetve a több perces adatgyűjtés alatt a minta elmozdulhat. A kutatások egyik fő iránya a módszer kiterjesztése élő minták vizsgálatára, ami az alkalmazott festékek, algoritmusok, optikai rendszerek fejlesztését követeli meg.

### Kutatási témák és eredmények

A kutatócsoport jelenleg a lokalizációs mikroszkóprendszer tervezésén és megépítésén dolgozik. Hasonló rendszer Szegeden még nem, és az országban is csak egy helyen működik lokalizációs mikroszkóp. A saját fejlesztésű szegedi rendszer előnye, hogy a felhasználói igényekhez alkalmazkodva tudjuk módosítani illetve továbbfejleszteni. Alkalmas nyújt alap- (optikai, plazmonikai, festékdinamikai) és alkalmazott (neurodegeneratív betegségek vizsgálata, fehérjék dimerizációja) kutatások folytatására itthoni és nemzetközi kutatócsoportokkal együttműködve.

#### Rendszerfejlesztés

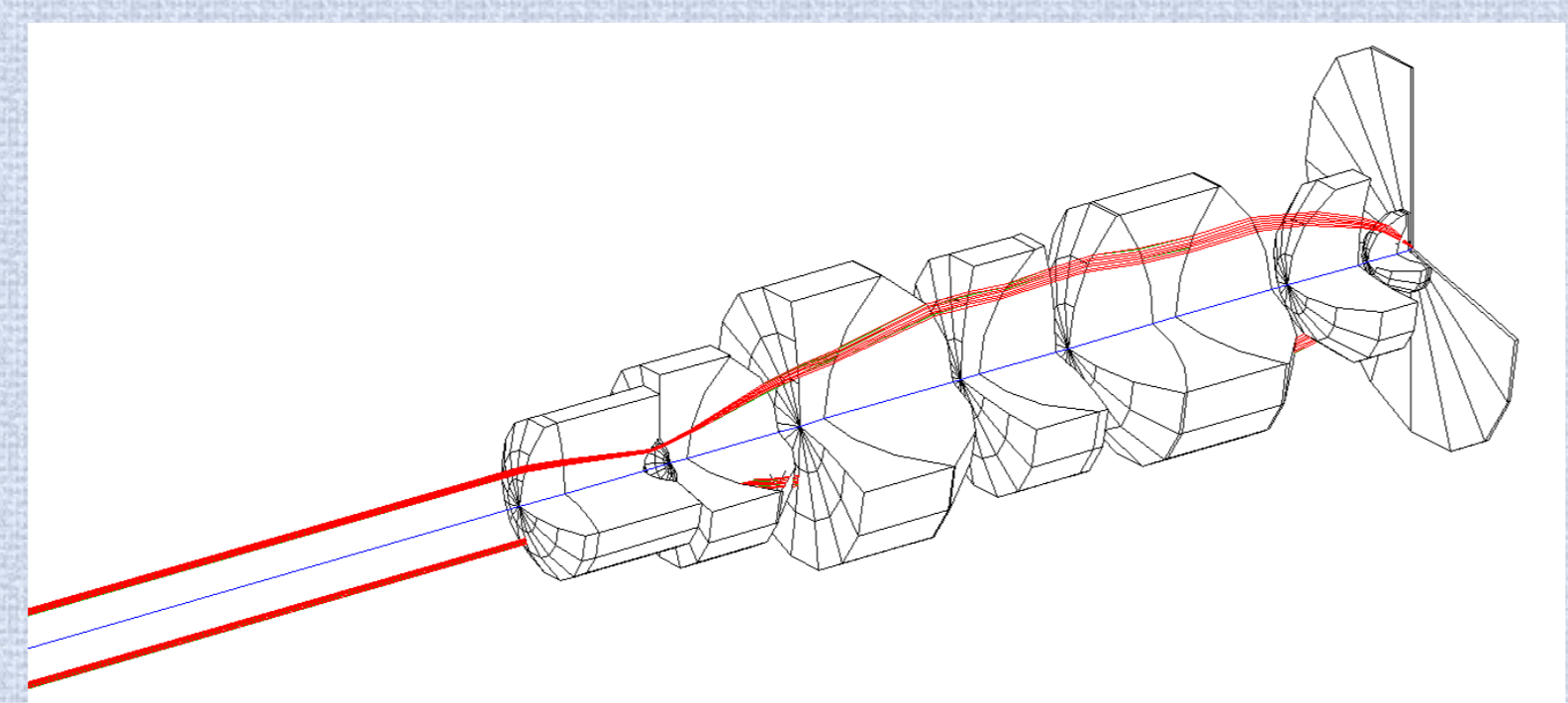


Az NPL-ben (London) megépített dSTORM rendszer

A rendszer egy fluoreszcens mikroszkópra épül, amelynek gerjesztési és detektálási oldalait a célokhoz megfelelően tervezzük és építjük meg. A minta kivilágítási szögét, orientációját, struktúráját és polarizációját is változtathatunk. 635 nm és 532 nm gerjesztési és 405 nm-es aktiválási hullámhosszakat használunk. A rezgésmentes asztalra épülő rendszer alkalmas lesz interferometrikus (SIM) mérések elvégzésére is. A mikroszkóp minden elemét (lézerek, polarizátorok, nyalábirányok) számítógép vezérli.

A  $<10$  nm alatti térbeli feloldás megköveteli a gondos tervezést és pontos beállítást. A tervezésben segítségünkre van az OSLO optikai rendszertervező program, amelynek segítségével pl. az objektív által bevezetett optikai leképezési hibák vizsgálhatók.

A rendszer használata és a mérési eredmények megbízható kiértékelése megköveteli a rendszer minden részletre kiterjedő ismeretét. A folyamatos tesztelés szükségessé teszi mérési protokollok és standardok kifejlesztését.

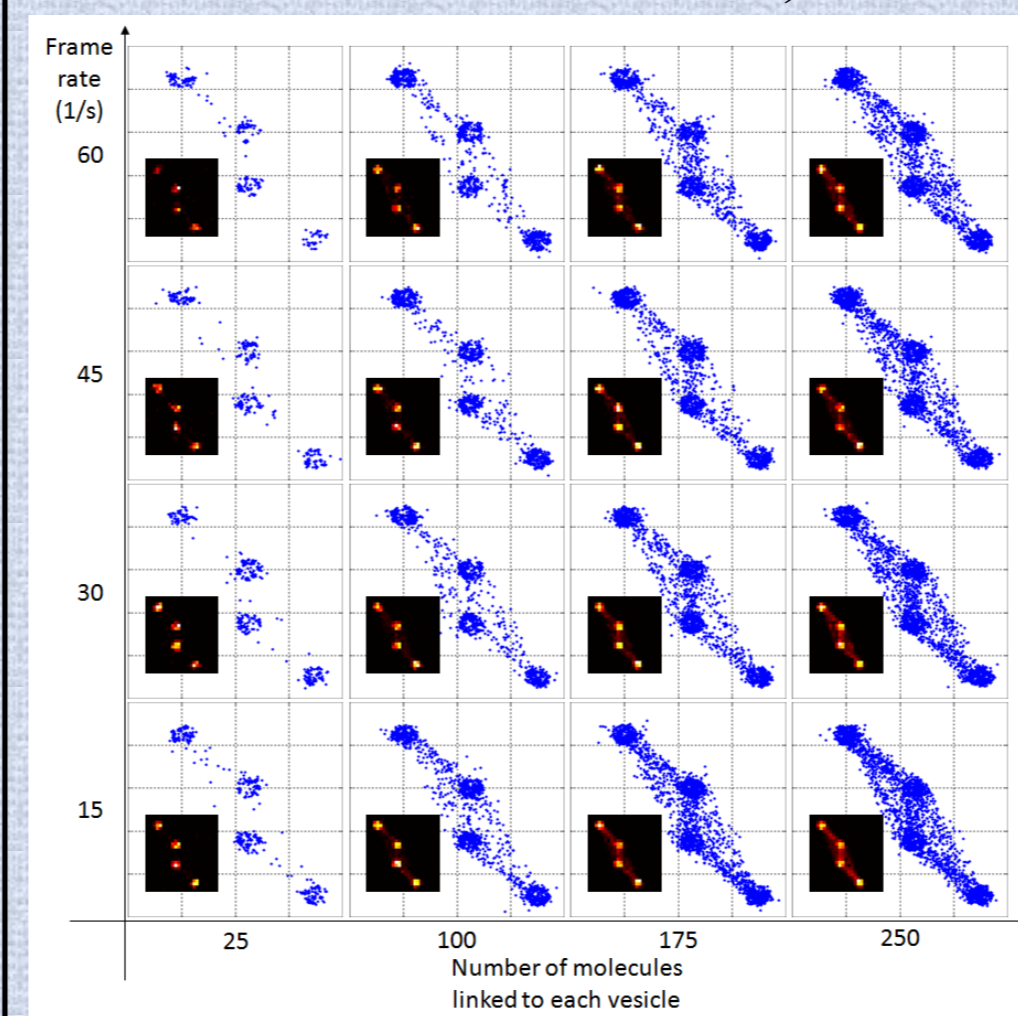


Optikai rendszertervező programmal optimalizált autofókuszáló rendszer részlete

#### Algoritmusfejlesztés

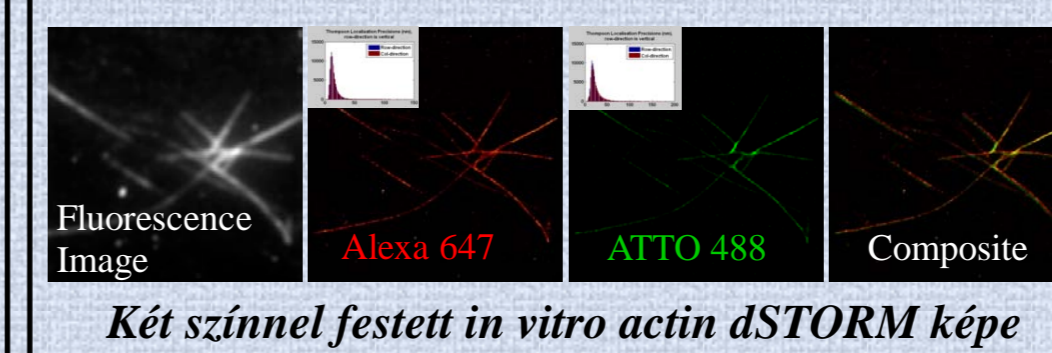
Az informatikai fejlesztések három fő célja:

- Mikroszkóp vezérlése (felhasználóbarát felület)
- Mikroszkóp szimulációja (kísérleti paraméterek optimalizációja)
- Adatok kiértékelése és megjelenítése (sűrűn festett mintákban az egymáshoz közel lévő molekulák mérése)



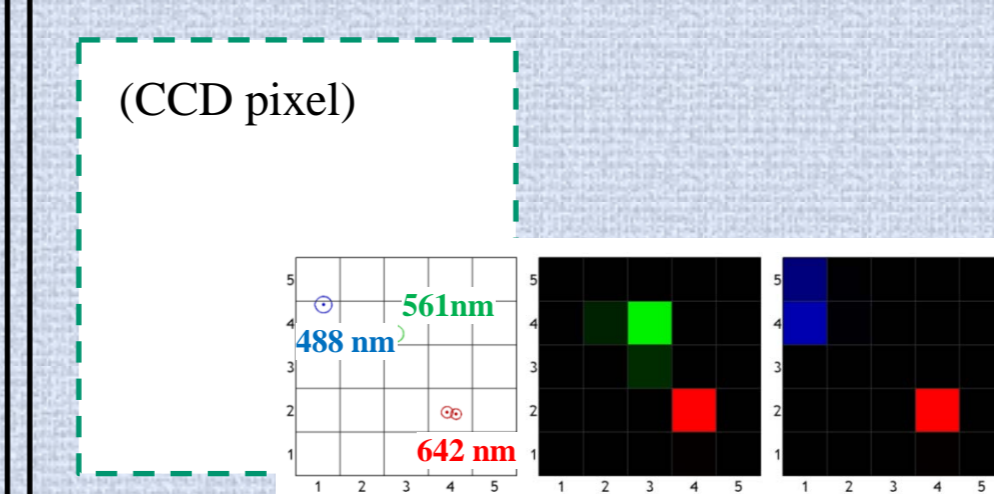
Négy vezikula szimulált STORM képe a festéksűrűség és az expozíciós idő függvényében

#### Többszínű leképezés



Két színnel festett in vitro actin dSTORM képe

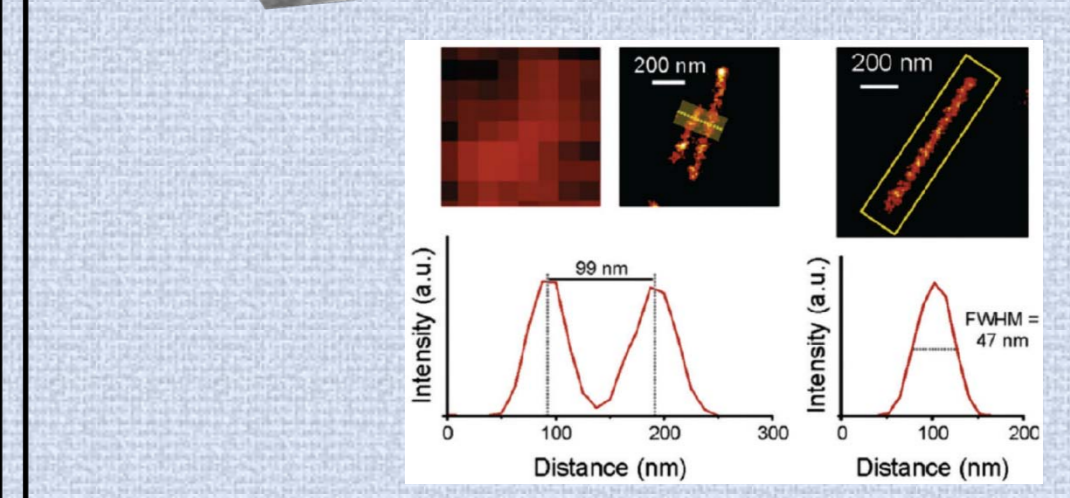
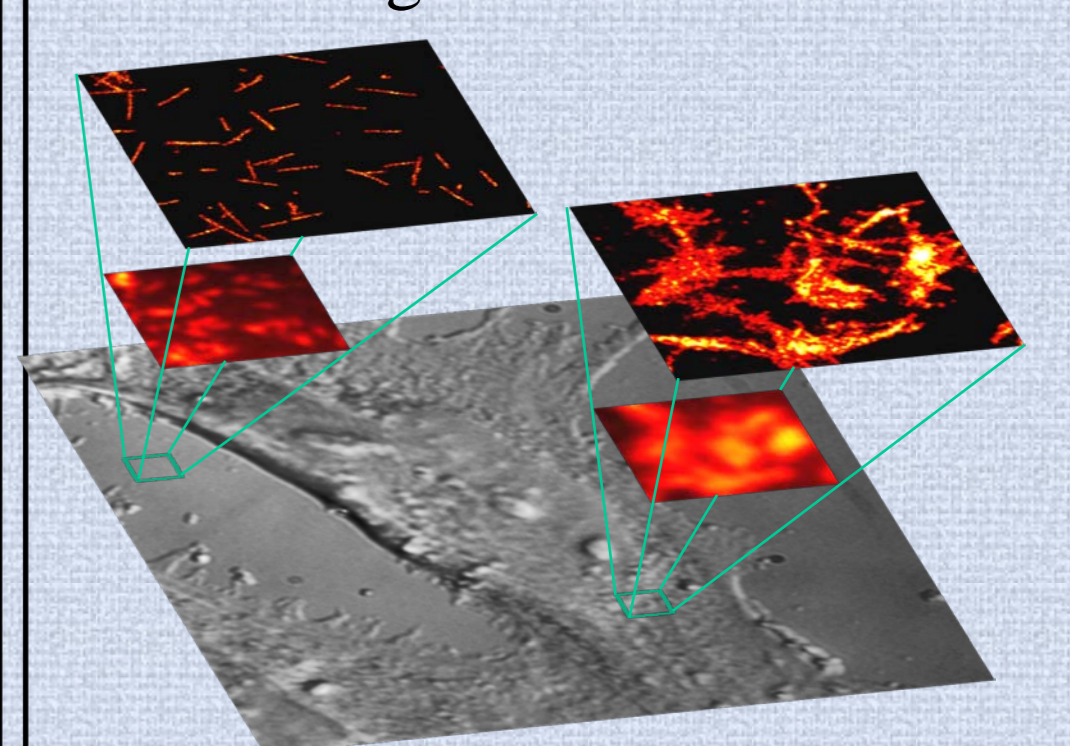
Gyakorlati szempontból fontos az egyszerre két vagy több festékkel jelölt minták leképezése. Alkalmazható pl. fehérjék kölcsönhatásának vizsgálatához vagy pontosabb térbeli lokalizációjukhoz. A többszínű leképezés azonban számos optikai eredetű hibaforrás kiküszöbölését követeli meg.



Három festékkel jelölt fluoreszcens gömbök kromatikus hibával terhelt dSTORM képe

#### Alkalmazások

A lokalizációs mikroszkópot elsődlegesen biológiai és orvosi alkalmazásokra fejlesztjük (agykutatás, sejtek energia- és anyagtranszportja stb.) szoros együttműködésben biológus és orvos kollégákkal.



Az Alzheimer-kór kialakulásában szerepet játszó  $A\beta_2$  aggregációja sejtet kívül és belül. A szálak mért átmérője 47 nm, ami a jelzőmolekulák méretét is figyelembe véve jó egyezést mutat a valósággal.

#### Együttműködések, projektek

A kutatócsoport hazai (SZBK, KOKI, stb.) és nemzetközi (University of Cambridge, National Physical Laboratory, stb.) kutatócsoportokkal együttműködve végzi tevékenységét. Ennek keretében lehetőség van rövidebb, hosszabb tanulmányutakat tenni a partnerekkel. A lokalizációs mikroszkópiai kutatásainkat jelenleg egy Marie Curie integrációs pályázat, egy Bolyai János Kutatási ösztöndíj, egy Apáczai János ösztöndíj, két TÁMOP-pályázat támogatja. Továbbá részt veszünk a 2014-ben induló Nemzeti Agykutatási Programban.



NPL  
National Physical Laboratory

#### Kutatócsoport-vezető

**Dr. Erdélyi Miklós**

e-mail: [meerdelyi@gmail.com](mailto:meerdelyi@gmail.com)

Honlap: <http://titan.physx.u-szeged.hu/~adoptim/>



University of Szeged • Department of Optics & Quantum Electronics  
**Advanced Optical Imaging (AdOptIm) Group**

**The vision:** The research group aims to develop, test and apply novel optical methods such as single molecule localization microscopy (STORM), optical beam engineering and tomographic reconstruction imaging. The main development direction is high-resolution, polarization sensitive microscopy. We are planning to apply the microscope in neuroscience and molecular cell biology. Due to the high spatial resolution ( $<20$  nm) we will be able to follow and monitor biochemical mechanisms in cells and tissues at single molecule level.

#### Our most important studies in the last years:

1. Miklos Erdelyi, Eric Rees, Daniel Metcalf, G. S. Kaminski, L. Dudas, J. Sinko, A. Knight, and Clemens F. Kaminski, Correcting Chromatic Offset in Multicolor Super-resolution Localization Microscopy, *Optics Express* 21(9), 10978-10988, 2013
2. M. Ahn, E. De Genst, G. Kaminski, M. Erdelyi, C. Kaminski, C. Dobson and J. Kumita Investigating the effect of a chemical probe on the native stability and misfolding of human lysozyme *Plos One*, 7(11) e50192, 2012
3. Kaminski SGS, van de Linde S, Erdelyi M, Esbjörner EK, Klein T, Rees E, Bertoncini CW, Dobson CM, Sauer M, and Kaminski CF: In Situ Measurements of the Formation and Morphology of Intracellular  $\beta$ -Amyloid Fibrils by Super-Resolution Fluorescence Imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, 133 (33), pp 12902-12905, (2011), DOI: 10.1021/ja201651

