

Výpočetní metody v jednomolekulové lokalizační mikroskopii

Abstrakt

Fluorescenční mikroskopie je jedním z hlavních nástrojů biomedicínského výzkumu díky tomu, že se jedná o neinvazivní nedestruktivní a vysoce specifickou zobrazovací metodu. Bohužel optický mikroskop je difrakčně limitovaný systém, což znamená, že nejvyšší dosažitelné rozlišení je přibližně 250 nm laterálně a 500 nm axiálně. Jelikož většina buněčných struktur, o které se výzkumníci zajímají, je menší, zvýšení rozlišovací schopnosti je velice důležité. V posledních letech bylo vyvinuto několik metod, které umožňují zobrazování za hranicí difrakce. Jednou z nich je jednomolekulová lokalizační mikroskopie, která dokáže rozlišit detaily až do 5nm. Tato metoda je však velmi výpočetně náročná. Vývoj metod pro zobrazování a analýzu dat z jednomolekulové lokalizační mikroskopie je předmětem této práce.

V lokalizační mikroskopii je obraz se superrozlišením zrekonstruován z dlouhé sekvence konvenčních obrázků jednotlivých řídce distribuovaných fotoaktivovaných molekul. Ty jsou systematicky lokalizovány se subdifrakční přesností. V této práci jsme navrhli, implementovali a experimentálně ověřili sadu metod pro automatické zpracování, analýzu a vizualizaci dat pořízených jednomolekulovou lokalizační mikroskopii. Tyto metody jsou dostupné ve formě otevřeného softwaru, který jsme nazvali ThunderSTORM. ThunderSTORM se stal jedním z předních softwarů v této oblasti.

Dále představujeme náš návrh nového dvouobjektového mikroskopu schopného superrozlišení, který zhruba zdvojnásobuje počet detekovaných fotonů. To dále zvyšuje dosažitelné rozlišení násobkem $\sqrt{2}$. Sestavili jsme funkční prototyp tohoto mikroskopu. Dále jsme vyvinuly a experimentálně ověřili metody pro kalibraci a pro analýzu obrazu z tohoto mikroskopu.

V poslední části této práce se zaměřujeme na to, že navzdory vysokému prostorovému rozlišení lokalizační mikroskopie, není tato metoda vždy vhodná pro zobrazování živých buněk z důvodu své špatné rozlišovací schopnosti v čase. Jednou ze strategií je zvýšit hustotu fotoaktivovaných molekul v každém obrázku. Nicméně takový přístup představuje další výzvu při analýze obrazu. Zde prezentujeme 3denseSTORM, nový algoritmus, který je schopný zrekonstruovat 2D nebo 3D obrazy se superrozlišením ze sekvence difrakčně limitovaných obrázků s vysokou hustotou fotoaktivovaných molekul. Tento algoritmus využívá metody komprimovaného snímání a používá Poissonův model šumu, což je velmi důležité v temných podmínkách. Odvodili jsme teoretický limit rozlišení této metody a ukázali obrazové rekonstrukce 2D a 3D dat pořízených simulací i snímáním reálných biologických vzorků. Vyvinutá metoda je vhodná pro rychlou akvizici obrázků hustě označovaných biologických vzorků, což zlepšuje možnosti studovat živé buňky pomocí jednomolekulové lokalizační mikroskopie.

Klíčová slova

Mikroskopie se superrozlišením, jednomolekulová lokalizační mikroskopie, zpracování obrazu, numerická optimalizace, řídké reprezentace.