

Light-sheet mikroszkópia és valós idejű képfeldolgozás új szemszögből

Balázs Bálint



Pázmány Péter Katolikus Egyetem

Információs Technológiai és Bionikai Kar

Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola

Témavezető: Rózsa Balázs, *M.D., Ph.D.*

A Ph.D. disszertáció tézisei

Budapest, 2017

1. Bevezető

A képképző eljárások, mint például a mikroszkópia, az egyik leggyakrabban használt eszközök az orvosi és biológiai kutatások során. Ennek az oka egyszerű: a puszta szem számára láthatatlan dolgok megjelenítése egy rendkívül hatásos módja annak, hogy betekintést kapjunk ezen rendszerek belső működésébe. Az agyunk úgy fejlődött ki, hogy rengeteg külső információt dolgozzon fel, és ezek közül vitathatatlanul a látás a legjelentősebb.

Az optika egyik ágaként a mikroszkópia (görög eredet, mikrosz, „apró” és szkopein „figyel” szavakból) a fény és vizsgált minta interakcióinak megfigyelésén alapul. Hogy láthassuk ezeket az interakciókat, a mikroszkóp optikája felnagyítja a minta képét, ami detektálható és rögzíthető egy erre alkalmas berendezéssel. A legelső mikroszkópoknál, a 17. században, ez egyszerűen a szem volt, a felvételt pedig a megfigyelt képekről készült rajzok alkották [1].

A mikroszkópia egy igazán multidiszciplináris tudományág: még a legegyszerűbb formájában, egy egyszerű lencsét használva, a fizika alapelveit kihasználva nyerhetünk mélyebb megértést a biológiáról és a természetről. Manapság a mikroszkópia felöleli a legtöbb természettudomány eredményeit, kiegészítve különféle technológiai fejlesztésekkel. Ugyan továbbra is a fizika és a biológia adják a kulcsszerepet, a kémia (fluoreszcens molekulák), mérnöki tudományok (automatizálás) és információs technológia (képfeldolgozás) eredményei közösen alkotják a modern mikroszkópia alapjait.

2. Kihívások az élő minták háromdimenziós képalkotásában

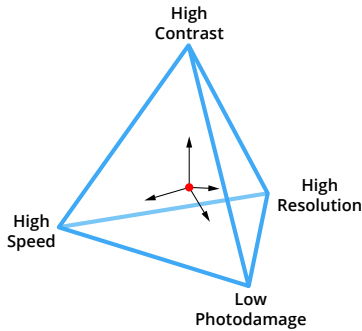
Kihívások a képalkotásban

Az élő mintákról történő képalkotás elengedhetetlen az embrionális fejlődés folyamatainak megértéséhez. Ideális esetben a mikroszkóp képes lenne egy folyamatos, háromdimenziós, többszínű felvételt készíteni bármely biológiai folyamatról, a lehető legnagyobb felbontással. Sajnos azonban ez nem lehetséges; a biológia és fizika határai miatt kompromisszumra van szükség. A fény diffrakciós természete, a fluoreszcens jelölők véges élettartama és az élő minták fényérzékenysége miatt a mikroszkópiának alkalmazkodnia kell az aktuálisan megválaszolandó kérdéshez. Annak érdekében, hogy valóban hasznos felvételek készülhessenek, meg kell találni az egyensúlyt a jel-zaj viszony növelése és a térbeni és időbeni felbontás javítása közt, mindeközben szem előtt tartva, hogy maga a képalkotás ne legyen befolyással a vizsgálandó folyamatokra (1a ábra) [2].

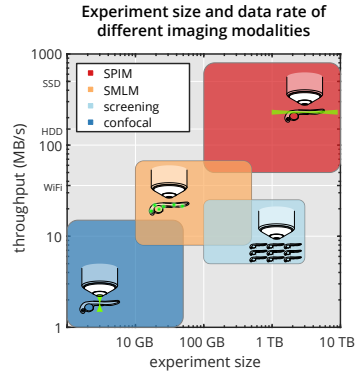
A light-sheet fluorescens mikroszkópia (LSFM), más néven egy-sík megvilágítású mikroszkópia (single plane illumination microscopy, SPIM) [3] egy viszonylag új tagja azon technikák arzenáljának, melyek a fénymikroszkópián alapulnak. Nagy előnye, hogy különösen alkalmas élő minták hosszantartó vizsgálatára nagy térbeni és időbeni felbontással [4–7]; továbbá könnyen adaptálható a vizsgálandó mintához, lehetővé téve számos különféle kísérletet, akár teljes szerveken [8], akár egyes sejtek belső folyamatait vizsgálva [9].

Ugyan a light-sheet mikroszkópia valódi optikai szelektelést tesz lehetővé, az axiális felbontása is rosszabb, mint a laterális, hasonlóan más

mikroszkópiákhoz. Izotróp 3D-s felbontás elérhető egyazon mintáról több irányból készült felvételek összeolvasztásával [10]. Ezt leggyakrabban úgy lehet megvalósítani, hogy a mintát egy víz alapú zselébe ágyazzuk, mely szabad hozzáférést ad minden irányból, és megfelelően stabilan tartja a mintát, mely így pontosan pozícionálható. Bizonyos érzékeny mintáknál azonban ez a módszer nem használható, például egér embriók esetében, melyek számára egy specifikusan kialakított környezet szükséges a megfelelő fejlődéshez [11]. Ilyen mintáknál a forgatás hiánya miatt más megoldásra van szükség a többnézetes képalkotás megvalósításához.



(a)



(b)

1. ábra. Kihívások a mikroszkópiában. (a) Kompromisszumok a fluoreszcens élő képalkotásban. A felvételi paraméterek optimalizálásánál kompromisszumra van szükség a magas felbontás, kontraszt és sebesség közt, elkerülve a minta károsítását [2]. (b) Kísérleti adatok méretei és az adatsebesség összehasonlítása egy-sík megvilágítású mikroszkópia (SPIM, piros), high-content screening (világoskék), lokalizációs mikroszkópia (SMLM, narancs) és konfokális mikroszkópia (kék) esetén.

Kihívások a képfeldolgozásban

A képfeldolgozás minden mikroszkópiát alkalmazó kutatásban kritikus részét képezi a munkafolyamatnak. Ez különösképp igaz a light-sheet mikroszkópiára, ahol egy adott minta több napon keresztül történő vizsgálatára is lehetőség van, jelentős mennyiségű adatot generálva ezáltal. Egy egyszeri *Drosophila* fejlődést célzó felvétel (ami egy tipikus példája a light-sheet mikroszkópia vizsgálatoknak) több terabyte adatot eredményez.

A light-sheet mikroszkópián kívül egyéb mikroszkópos eljárások is hasonló problémával szembesülhetnek. Olyan eljárások, mint a high content screening [12–14], ahol több ezer különböző genotípust vizsgálnak, vagy a loklizációs mikroszkópia (SMLM) [15–17], ahol a mintának egyetlen síkjáról készül több ezer felvétel a szuperrezolúció eléréséhez.

Ezek a módszerek nem csupán rendkívül gyorsan generálják az adatokat, hanem sokszor hosszú időn keresztül történik mindez, így egyes kísérletek a terabyte-os méretet is elérhetik (1b ábra). Ez a hatalmas mennyiségű adat könnyen akadályt állíthat az új felfedezéseknek, ami egyre gyakrabban jellemző a biológiai kutatásokban [18–20].

3. Új tudományos eredmények

Jelen munka az előzőekben vázolt kihívásokra nyújt lehetséges megoldásokat: érzékeny minták, például egérembriók nagyfelbontású vizsgálata élőben, és nagyméretű light-sheet adatok valós idejű feldolgozása.

Tézis I. *Megterveztem és megépítettem egy light-sheet mikroszkópot, ami érzékeny minták nagy felbontású vizsgálatára alkalmas. A két darab,*

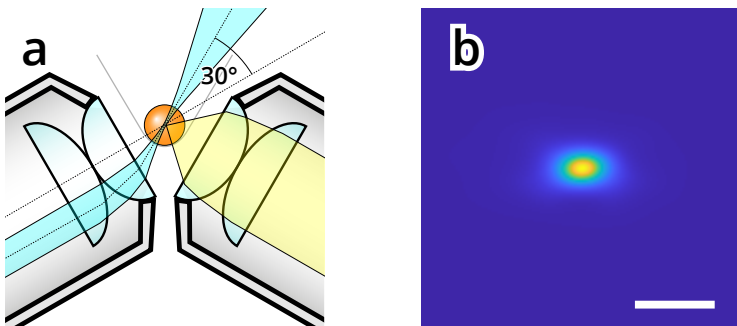
magas numerikus apertúrájú objektív 120 fokban történő elhelyezése, egy megdöntött light-sheettel kombinálva, izotróp 3D felbontású képalkotásra ad lehetőséget, miközben a fény begyűjtésének hatékonyságát kétszeresre növeli meg.

Kapcsolódó publikációk: [J1],[J2], [J3]

A Dual Mouse-SPIM egy újszerű megközelítést képvisel a light-sheet mikroszkópiában. A 120 fokban elhelyezett magas numerikus apertúrájú objektívek nemcsak a felbontás javítását eredményezi a hagyományos 90 fokos elrendezéssel szemben, hanem a nagyobb detektálási szögnek köszönhetően a fény begyűjtése kétszer hatékonyabban történik. Ez legfőképpen fényérzékeny minták, mint például egér embriók esetén lehet előnyös, mivel a fototoxikus hatások lecsökkenthetők, míg a kontraszt megmarad. Mindét objektív használható megvilágításra és detektálásra is, ami lehetővé teszi a forgatás nélküli többnézetes felvételt.

A mikroszkóp részeként megterveztem egy egyedi nyalábosztó egységet, ami lehetővé teszi csupán egyetlen galvo-szkenner használatát a light-sheet generáláshoz mindkét objektív esetén. Továbbá egy olyan testreszabott detektálás-összeolvasztó egységet is megterveztem, ami lehetővé teszi egyetlen kamera használatát mindkét nézetből.

Karakterizáltam a mikroszkóp optikai tulajdonságait, meghatároztam a megvilágítási profilt és a pontátviteli függvényt (PSF). A 95 μm -es látómező egy 3.6 μm vastagságú light-sheettel van egyenletesen megvilágítva. A mintaként használt gömböcskék két irányból történő képalkotása 314 nm laterális és 496 nm axiális felbontást eredményezett. Ez egy 2,67-szeres javulás egyetlen lencse axiális felbontásához képest. Ezen kívül demonstráltam a mikroszkóp képességét *Drosophila* embriókról és az egér zigótákról készült felvételekkel.

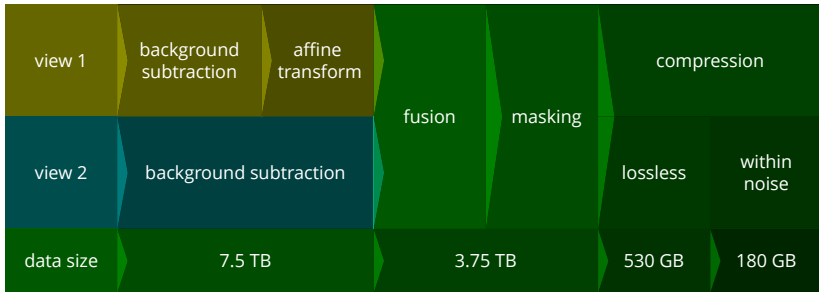


2. ábra. Dual Mouse-SPIM koncepció. (a) Objektívek elrendezése. Mindkét objektívet felváltva lehet hasynálni megvilágításra és detektálásra is. (b) A két nézet együttes PSF függvénye oldalnézetből. 12 fluoreszcens gömböcske átlaga. Lépték: $1\ \mu\text{m}$.

Tézis II. *Kidolgoztam egy GPU-alapú képfeldolgozási pipeline-t több-nézetes light-sheet mikroszkópiára, amely lehetővé teszi a szemközti nézetek valós időbeni összeolvasztását.*

Kapcsolódó publikációk: [C1], [C2], [C3]

Kidolgoztam egy GPU-alapú képfeldolgozási pipeline-t, mely közvetlenül integrálható a LabVIEW alapú univerzális mikroszkóp vezérlő rendszerünkbe. A pipeline jelenleg lehetővé teszi a háttér levonását és a háttér maszkolását, továbbá képes az azonos sík szemközti nézeteinek azonnali összeolvasztására. Megmutattam, hogy lehetséges a szemközti nézetek regisztrálásának 3D problémáját 2D problémára redukálni, anélkül, hogy ez negatív hatással lenne a képminőségre és a felbontásra. Ez jelentősen lecsökkenti a szükséges számítási kapacitást és lehetővé teszi a CUDA textúrák alkalmazását és a valós időbeni összeolvasztást. Ennek a megoldásnak a feldolgozási sebessége 138 fps, ami 18,3-szoros növekedés az egyszálú CPU verzióhoz képest.



3. ábra. Valós idejű képfeldolgozó pipeline többnézetes light-sheet mikroszkópiához.

Tézis III. Kifejlesztettem egy képtömörítési algoritmust, ami lehetővé teszi a fénymikroszkópokkal nyert képek zaj-függő veszteséges tömörítését és akár százszoros tömörítési arányt is elérhet, megőrizve a későbbi adatfeldolgozó lépések eredményeit. A gyors CUDA implementáció lehetővé teszi a nagysebességű kamerák képeinek valós idejű tömörítését.

Kapcsolódó publikációk: [J4], [C1], [C2], [C3]

Mivel a számos különféle nagysebességű mikroszkópia technikák hatalmas mennyiségű adatot generálnak, kísérletenként akár terabájtokat elérve, a képtömörítés kiemelt szerepet kap ilyen adathalmazok esetén. A jelenleg használt, mikroszkópos képekkel kompatibilis képtömörítési eljárások nem képesek a modern sCMOS kamerák nagy adatsebességével megküzdeni (~ 800 MB/s).

Kifejlesztettem a B³D nevű GPU-alapú párhuzamos képtömörítő algoritmust, amely képes 1 GB/s feletti átviteli sebességre, lehetővé téve a valós idejű képtömörítést. A méret további csökkentése érdekében kidolgoztam egy zajfüggő veszteséges tömörítési eljárást, amely determinisztikus módon módosítja az adatokat. A pixelenkénti megengedett

eltérés a kép zajszintjéhez képest választható, figyelembe véve a sörétzaj (shot noise) és a kamera kiolvasási zaj mértékét. A pixel prediktálásnak köszönhetően a szubjektív képminőség magasabb, mint más eljárások esetén, ahol egyszerűen a képek négyzetgyökének kvantálása történik.

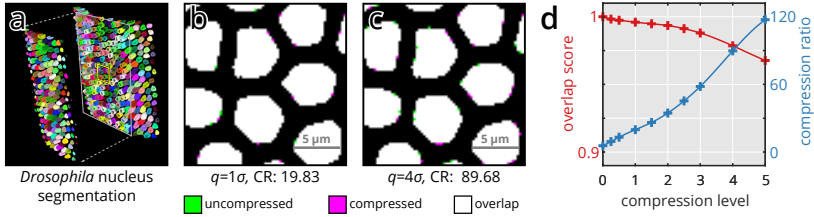
Tézis IV. *Megmutattam, hogy a zajszinten belüli tömörítés nem befolyásolja szignifikánsan a leggyakrabban használt képfeldolgozási feladatok eredményeit és a tömörítési arány 3,32-szeres átlagos javulását eredményezi a veszteségmentes tömörítéshez képest.*

Kapcsolódó publikációk: [J4], [C1], [C2], [C3]

Mivel az adatok integritása elengedhetetlen a megfelelő következtetések levonása érdekében, ezért a veszteséges tömörítés használata elmentmodnásos lehet. Megmutattam, hogy a B³D zajszinten belüli módja (within noise level, WNL) nem befolyásolja szignifikánsan a leggyakrabban használt képfeldolgozási feladatok eredményét.

Light-sheet mikroszkópos adatokra megmutattam, hogy a WNL tömörítés kisebb eltérést okoz a képben, mint a sörétzaj (shot noise). A felvételek szegmentálása esetén a szegmentált régiók átfedése *Drosophila* embrió sejtmagokra 99,6%, míg *Phallusia* embriók membránjára 94,5%. A tömörítési arány a két felvételre 19,3-szoros, illetve 40,01-szeres volt.

Lokalizációs mikroszkóp adatokra megmutattam, hogy a WNL tömörítés mindössze 4%-kal növeli a lokalizációs hibát, míg az átlagos tömörítési ráta 1,44-ről (veszteségmentes) 4,96-ra emelkedik. Megmutattam továbbá, hogy a lokalizációs hiba változása nem függ a felvételek jel-zaj viszonyától.



4. ábra. Zajsint függő veszteséges tömörítés hatása 3D sejtmag szegmentálásra. Egy H2Av-mCherry sejtmagi markert kifejező *Drosophila melanogaster* embrió MuVi-SPIM [21] felvételén 3D-ben szegmentáltuk a sejtmagokat. Az eltérések megjelenítéséhez egymásra vetítettük az eredeti (zöld) és tömörített (magenta) képekről készült szegmentálás eredményét (b, c; átfedés fehérrel jelölve). A szegmentálások átfedése és a tömörítési ráta a tömörítési szint függvényében a (d) alábbián látható.

4. Lehetséges alkalmazások

Mind a Dual Mouse-SPIM mikroszkópnak, mind a GPU-alapú képfeldolgozásnak közvetlen alkalmazási lehetőségei vannak az embrionális fejlődés vizsgálatában. Több potenciális együttműködő fejezte ki érdeklődését a Dual Mouse-SPIM használata iránt az egér embrionális fejlődésének vizsgálatában. A Hiiragi csoport, akik a pre- és poszt-implantációs fázis szimmetriatörő eseményeire összpontosítanak, szeretnék kipróbálni ezt az elrendezést a nagyobb minták több irányból történő képalkotására, ami a jelenleg használt mikroszkópjukkal nem működik és lehetőséget adhat eddig ismeretlen mechanizmusok feltárasára. Az Ellenberg csoport a kromoszóma szegregáció mechanizmusait vizsgálja az embrionális fejlődés első néhány osztódási fázisában. A nagyobb axiális felbontás lehetőséget ad minden egyes kromoszóma követésére az osztódási folyamat során, ami eddig nem volt lehetséges az axiális felbontás hiányosságai miatt.

A GPU-alapú képfeldolgozási pipeline-t, főképp a szemközti néze-

tek 2D fúzióját már most is használjuk laborunk nagyteljesítményű mikroszkopján, a MuVi-SPIM- en. A két szemközti objektív nézeteinek összeolvasztása a képalkotás közben nemcsak jelentős tárhely megtakarítást eredményez, de az adatelemzést is szignifikánsan felgyorsítja.

A B³D képtömörítési algoritmus először light-sheet mikroszkópia kihívásaira fókuszálva lett megtervezve, de sokkal széleskörűbb felhasználási lehetőséget nyújt. Bármilyen nagy teljesítményű, high-throughput fénymikroszkópián alapuló vizsgálat profitálhat a zajszenzen belüli tömörítési eljárásnak köszönhető jelentős adatcsökkenés adta előnyökből. Mivel a tömörítés a képalkotás alatt azonnal kivetelezhető, nemcsak a tárolási feltételek, de a szükséges sávszélesség is lecsökken, ami szükségtelessé teszi a nagyteljesítményű RAID tömbök használatát és 10 Gbit-es hálózat kiépítését tovább csökkentve a költségeket. A hasonlóan gyors kitömörítési sebességnek köszönhetően az adatbeolvasás is gyorsabb lesz, amiből a böngészési és 3D adatmegjelenítési alkalmazások profitálhatnak. Néhány cég már érdeklődését fejezte ki a tömörítés iránt, többek között a Bitplane AG (3D adatelemzés és megjelenítés), a Luxendo GmbH (light-sheet mikroszkópia) és a Hamamatsu Photonics K.K. (kamera es szenzor gyártás).

A szerző közleményei a témában

- [J1] Gustavo de Medeiros, Bálint Balázs, and Lars Hufnagel. “Light-sheet imaging of mammalian development”. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Mammalian development 55 (July 2016), pp. 148–155. DOI: 10.1016/j.semcd.2015.11.001 (cit. on p. 5).

- [J2] Petr Strnad, Stefan Gunther, Judith Reichmann, Uros Krzic, Balint Balazs, Gustavo de Medeiros, Nils Norlin, Takashi Hiiragi, Lars Hufnagel, and Jan Ellenberg. “Inverted light-sheet microscope for imaging mouse pre-implantation development”. *Nature Methods* 13.2 (Feb. 2016), pp. 139–142. DOI: 10.1038/nmeth.3690 (cit. on p. 5).
- [J3] Patrick Hoyer, Gustavo de Medeiros, Bálint Balázs, Nils Norlin, Christina Besir, Janina Hanne, Hans-Georg Kräusslich, Johann Engelhardt, Steffen J. Sahl, Stefan W. Hell, and Lars Hufnagel. “Breaking the diffraction limit of light-sheet fluorescence microscopy by RESOLFT”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.13 (Mar. 2016), pp. 3442–3446. DOI: 10.1073/pnas.1522292113 (cit. on p. 5).
- [J4] Balint Balazs, Joran Deschamps, Marvin Albert, Jonas Ries, and Lars Hufnagel. “A real-time compression library for microscopy images”. *bioRxiv* (July 2017), p. 164624. DOI: 10.1101/164624 (cit. on pp. 7, 8).

A szerző további közleményei

- [J5] Zoltán Jakus, Edina Simon, Bálint Balázs, and Attila Mócsai. “Genetic deficiency of Syk protects mice from autoantibody-induced arthritis”. *Arthritis and Rheumatism* 62.7 (July 2010), pp. 1899–1910. DOI: 10.1002/art.27438.

- [J6] Balázs Györfly, Zsombor Benke, András Lánckzy, Bálint Balázs, Zoltán Szállási, József Timár, and Reinhold Schäfer. “RecurrenceOnline: an online analysis tool to determine breast cancer recurrence and hormone receptor status using microarray data”. *Breast Cancer Research and Treatment* (July 2011). DOI: 10 . 1007/s10549-011-1676-y.
- [J7] Weiwei Shi, Balint Balazs, Balazs Györfly, Tingting Jiang, W. Fraser Symmans, Christos Hatzis, and Lajos Pusztai. “Combined analysis of gene expression, DNA copy number, and mutation profiling data to display biological process anomalies in individual breast cancers”. *Breast Cancer Research and Treatment* 144.3 (Mar. 2014), pp. 561–568. DOI: 10 . 1007/s10549-014-2904-z.

A szerző konferencia előadásai

- [C1] Bálint Balázs, Marvin Albert, and Lars Hufnagel. “GPU-based image processing for multiview microscopy data”. *Light Sheet Fluorescence Microscopy International Conference*. Sheffield, UK, Sept. 2016 (cit. on pp. 6–8).
- [C2] Bálint Balázs, Marvin Albert, and Lars Hufnagel. “GPU-based image processing for multi-view microscopy data”. *Focus on Microscopy*. Taipei, Taiwan, Mar. 2016 (cit. on pp. 6–8).
- [C3] Bálint Balázs, Marvin Albert, and Lars Hufnagel. “GPU-based image processing for multi-view microscopy data”. *Focus on Microscopy*. Bordeaux, France, Apr. 2017 (cit. on pp. 6–8).

Referenciák

- [1] Robert Hooke. *Micrographia: or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses. With Observations and Inquiries Thereupon*. London: J. Martyn and J. Allestry, 1665 (cit. on p. 1).
- [2] P. Philippe Laissue, Rana A. Alghamdi, Pavel Tomancak, Emmanuel G. Reynaud, and Hari Shroff. “Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging”. *Nature Methods* 14.7 (July 2017), pp. 657–661. DOI: 10.1038/nmeth.4344 (cit. on pp. 2, 3).
- [3] Jan Huiskens, Jim Swoger, Filippo Del Bene, Joachim Wittbrodt, and Ernst H. K. Stelzer. “Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy”. *Science* 305.5686 (2004), pp. 1007–1009 (cit. on p. 2).
- [4] Philipp J Keller and Ernst HK Stelzer. “Quantitative in vivo imaging of entire embryos with Digital Scanned Laser Light Sheet Fluorescence Microscopy”. *Current Opinion in Neurobiology* 18.6 (Dec. 2008). review, pp. 624–632. DOI: 10.1016/j.conb.2009.03.008 (cit. on p. 2).
- [5] Jan Huiskens and Didier Y. R. Stainier. “Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology”. *Development* 136.12 (June 2009), pp. 1963–1975. DOI: 10.1242/dev.022426 (cit. on p. 2).
- [6] Michael Weber and Jan Huiskens. “Light sheet microscopy for real-time developmental biology”. *Current Opinion in Genetics & Development* 21.5 (2011), pp. 566–572. DOI: 10.1016/j.gde.2011.09.009 (cit. on p. 2).

- [7] Raju Tomer, Khaled Khairy, and Philipp J Keller. “Shedding light on the system: studying embryonic development with light sheet microscopy”. *Current Opinion in Genetics & Development*. Developmental mechanisms, patterning and evolution 21.5 (Oct. 2011). Review from 2011, pp. 558–565. DOI: 10.1016/j.gde.2011.07.003 (cit. on p. 2).
- [8] Hans-Ulrich Dodt, Ulrich Leischner, Anja Schierloh, Nina Jährling, Christoph Peter Mauch, Katrin Deininger, Jan Michael Deussing, Matthias Eder, Walter Zieglgänsberger, and Klaus Becker. “Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain”. *Nature Methods* 4.4 (Mar. 2007), pp. 331–336. DOI: 10.1038/nmeth1036 (cit. on p. 2).
- [9] Bi-Chang Chen et al. “Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution”. *Science* 346.6208 (Oct. 2014), p. 1257998. DOI: 10.1126/science.1257998 (cit. on p. 2).
- [10] Stephan Preibisch, Fernando Amat, Evangelia Stamatakis, Mihail Sarov, Robert H. Singer, Eugene Myers, and Pavel Tomancak. “Efficient Bayesian-based multiview deconvolution”. *Nature Methods* 11.6 (June 2014), pp. 645–648. DOI: 10.1038/nmeth.2929 (cit. on p. 3).
- [11] Adam S. Doherty and Richard M. Schultz. “Culture of Pre-implantation Mouse Embryos”. *Developmental Biology Protocols*. Methods in Molecular Biology™. DOI: 10.1385/1-59259-685-1:47. Humana Press, 2000, pp. 47–52 (cit. on p. 3).

- [12] Anne E. Carpenter and David M. Sabatini. “Systematic genome-wide screens of gene function”. *Nature Reviews Genetics* 5.1 (Jan. 2004), pp. 11–22. DOI: 10.1038/nrg1248 (cit. on p. 4).
- [13] Christophe J. Echeverri and Norbert Perrimon. “High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user’s guide”. *Nature Reviews Genetics* 7.5 (May 2006), pp. 373–384. DOI: 10.1038/nrg1836 (cit. on p. 4).
- [14] Rainer Pepperkok and Jan Ellenberg. “High-throughput fluorescence microscopy for systems biology”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7.9 (Sept. 2006), pp. 690–696. DOI: 10.1038/nrm1979 (cit. on p. 4).
- [15] Eric Betzig, George H. Patterson, Rachid Sougrat, O. Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S. Bonifacino, Michael W. Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz, and Harald F. Hess. “Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution”. *Science* 313.5793 (Sept. 2006), pp. 1642–1645. DOI: 10.1126/science.1127344 (cit. on p. 4).
- [16] Samuel T. Hess, Thanu P. K. Girirajan, and Michael D. Mason. “Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy”. *Biophysical Journal* 91.11 (Dec. 2006), pp. 4258–4272. DOI: 10.1529/biophysj.106.091116 (cit. on p. 4).
- [17] Michael J. Rust, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. “Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)”. *Nature Methods* 3.10 (Oct. 2006), pp. 793–796. DOI: 10.1038/nmeth929 (cit. on p. 4).

- [18] Roy Wollman and Nico Stuurman. “High throughput microscopy: from raw images to discoveries”. *Journal of Cell Science* 120.21 (Nov. 2007), pp. 3715–3722. DOI: 10.1242/jcs.013623 (cit. on p. 4).
- [19] Emmanuel G. Reynaud, Jan Peychl, Jan Huiskens, and Pavel Tomancak. “Guide to light-sheet microscopy for adventurous biologists”. *Nature Methods* 12.1 (Jan. 2015), pp. 30–34. DOI: 10.1038/nmeth.3222 (cit. on p. 4).
- [20] Jeffrey M. Perkel. “The struggle with image glut”. *Nature* 533.7601 (Apr. 2016), pp. 131–132. DOI: 10.1038/533131a (cit. on p. 4).
- [21] Uros Krzic, Stefan Gunther, Timothy E. Saunders, Sebastian J. Streichan, and Lars Hufnagel. “Multiview light-sheet microscope for rapid in toto imaging”. *Nature Methods* 9.7 (July 2012). MuVi-SPIM, pp. 730–733. DOI: 10.1038/nmeth.2064 (cit. on p. 9).