

Lokalizációs mikroszkópiás mérések kvantitatív elemzése

Doktori értekezés

Szerző:

Varga Dániel

Témavezető:

Dr. Erdélyi Miklós



Fizika Doktori Iskola
Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék
Szegedi Tudományegyetem

2022
Szeged

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	7
2. Tudományos előzmények	8
2.1. Optikai mikroszkópia	8
2.2. Kontraszt-növelő eljárások	8
2.3. Konfokális mikroszkópia	10
2.4. Diffrakció limit	12
2.5. Nagyfeloldású mikroszkópia	14
2.6. SMLM technika	15
2.7. 3D SMLM technikák	17
2.8. SMLM felvételek kvantitatív elemzése	17
2.9. Molekulaszámlálás	19
2.10. Klaszteranalízis	23
2.10.1. Korreláció alapú módszerek	23
2.10.2. Statisztikus módszerek	23
2.10.3. Sűrűség alapú módszerek	26
2.10.4. Tesszeláció-alapú módszerek	26
2.10.5. Gráf alapú módszerek	28
2.10.6. Bayes-féle módszer	28
2.10.7. Gépi tanulásos módszerek	29
2.11. Geometriai paraméterek meghatározása	30
2.12. SMLM analízis eredményeinek hitelesítése	31
3. Célkitűzések	34
4. Módszerek és eszközök	35
4.1. Felső kivilágítás	35
4.2. Lézerek	35
4.3. AOTF	36
4.4. Mikroszkóp váz	36
4.5. Detektor karok	37
4.6. Mintaelőkészítés	38
4.7. Fáziskontraszt mikroszkópia	38
4.8. CLSM	39
4.9. dSTORM	39
4.10. Használt szoftverek	40
4.10.1. rainSTORM	40
4.10.2. TestSTORM	40

5. Új tudományos eredmények	42
5.1. Célmolekulaszám meghatározása dSTORM mérések során direkt kalibrációval	42
5.1.1. Fluoreszcens festékmolekulák fotofizikai modellezése	43
5.1.2. Aktivációk számának eloszlása tetszőleges számú fluorofór esetén . .	45
5.1.3. γ H2AX válaszfüggvényének kísérleti meghatározása U2OS és D1vA sejtekben	48
5.1.4. A fejezethez kapcsolódó téziseim	54
5.2. γ H2AX klaszterek kvantitatív tér- és időbontott vizsgálata	55
5.2.1. Biológiai objektumok szegmentálása az összeg képek felhasználásával	55
5.2.2. Röntgensugárzás indukált γ H2AX klaszterek időbeli dinamikájának vizsgálata U251 humán glioblasztóma sejtekben	57
5.2.3. Klasztereloszlások vizsgálata korrelatív dSTORM-konfokális mikroszkópiával	61
5.2.4. 2D-s dSTORM felvételek kiértékelési eredményeinek hitelesítése . .	67
5.2.5. A fejezethez kapcsolódó téziseim	70
5.3. Filamentális struktúra kvantitatív jellemzése fixált sejtekben	71
5.3.1. A minta jellemzése és a mérés menete	71
5.3.2. Szálak vastagságának mérése	74
5.3.3. Szálas hálózatok kvantitatív jellemzése	75
5.3.4. A fejezethez kapcsolódó téziseim	77
5.4. RNC klaszterek strukturális vizsgálata	79
5.4.1. RNC klaszterek térfüggésének vizsgálata	79
5.4.2. RNC klaszter paraméterek eloszlásának vizsgálata	84
5.4.3. RNC klaszterek alakú tényezőinek vizsgálata	86
5.4.4. A fejezethez kapcsolódó téziseim	89
6. Összefoglalás	90
6.1. Bevezetés	90
6.2. Célok és kutatási módszerek	91
6.3. Új tudományos eredmények	91
7. Summary	93
7.1. Introduction	93
7.2. Objectives and methods	94
7.3. New scientific results	94
8. Köszönetnyilvánítás	96
9. Publikációs lista	98
10. Irodalomjegyzék	101
11. Függelék	113

Rövidítések jegyzéke

AU. Airy unit, Airy egység

AOTF. Acousto-optic tunable filter, akusztó-optikai modulátor

CLSM. Confocal laser scanning microscopy, konfokális pásztázó mikroszkópia

CSR. Complete spatial randomness, térbeli randomitás

DBSCAN. Density-based spatial clustering of applications with noise, klaszteranalízis algoritmus

DIC. Differential interference contrast, differenciál interferencia kontraszt

(DNA-)PAINT. (DNS-)point accumulation for imaging in nanoscale topography, nagyfeloldású mikroszkópiás technika

DOF. Depth of field, mélységélesség

DSB. Double-strand breaks, kettős szálú DNS törés

(d)STORM. (direct) stochastic optical reconstruction microscopy, nagyfeloldású mikroszkópiás technika

(EM)CCD. (Electron multiplying) charge-coupled device, detektor

FOV. Field of view, látómező

FRC. Fourier ring korrelation, Fourier gyűrű korreláció

(f)PALM. (fluorescent) photoactivated localization microscopy, nagyfeloldású mikroszkópiás technika

GSDIM. Ground state depletion followed by individual molecule return, nagyfeloldású mikroszkópiás technika

MINFLUX. Minimal photon flux, nagyfeloldású mikroszkópiás technika

NA. Numerical aperture, numerikus apertúra

NND. Nearest neighbour distance, legközelebbi szomszéd távolsága

NPC. Nuclear pore complex, póruskomplex

- PAFP.** Photoactivatable flurescent protein, fotoaktiválható fluoreszcens fehérje
- PCF.** Pair correlation function, párkorrelációs függvény
- PDF.** Probability density function, valószínűségi sűrűség függvény
- PFS.** Percept focus system, fókusztartó rendszer
- PMF.** Probability mass function, valószínűségi tömegfüggvény
- PMT.** Photomultiplier tube, detektor
- PSF.** Point spread function, pontátviteli függvény
- RNC.** Ribosome-nascent chain complex, ribószóma-naszccens lánc komplex
- ROI.** Region of interest, érdeklődésre számot tartó terület
- (s)CMOS.** (scentific) complementary metal–oxide–semiconductor, detektor
- SIM.** Structured Illumination Microscopy, nagyfeloldású mikroszkópiás technika
- SNR.** Signal-to-noise ratio, jel-zaj viszony
- SMLM.** Single molecule localization microscopy, nagyfeloldású mikroszkópiás technikák gyűjtőneve
- SPP.** Spatial point pattern, térbeli pontmintázat
- STED.** Stimulated emission depletion, nagyfeloldású mikroszkópiás technika

1. Bevezetés

A szemünk által szabott feloldási határt mikroszkópok segítségével, nagyított kép létrehozásával léptük át. A nagyítás növelése azonban egy határon túl a fényelhajlás miatt nem fog több információt szolgáltatni. A diffrakció által megjósolt feloldási limitet viszont sikerült megkerülni [1–7]. Az erre alkalmas technikákat nagyfeloldású mikroszkópiának nevezzük. Ezen technikák közül a lokalizációs vagy SMLM (Single Molecule Localization Microscopy) módszerrel [4–7] lehet a legnagyobb feloldást elérni, tipikusan 20 nm-t laterálisan, ami számos biológiai struktúra vizualizációját tették lehetővé korábban példátlan feloldással [8]. A módszer kifejlesztéséért 2014-ben W. E. Moerner és E. Betzig megosztva kémiai Nobel-díjat kaptak [9, 10]. Az általános szemlélettől eltérően azonban a vizualizáció többnyire nem a cél a mikroszkópiában, hanem egy eszköz a releváns adatok kinyerésére. Ezért nagyfeloldású technikák megjelenése óta előtérbe kerültek a kvantitatív módszerek és a kvantitatív kiértékelés [11]. Minden adat magyarázatra szorul és ez igaz még a képekre is. A cél, hogy a sokszor kvalitatív, anekdotikus megfigyelésektől elmozduljunk a tényleges mérés irányba.

Történelmi források szerint Thomas Wedgwood (1771-1805) volt az első, aki felvetette a fotomikrográfia lehetőségét [12], vagyis hogy fénykép formájában a mikroszkóp által létrehozott képet megőrizhetjük és William Henry Fox Talboot (1800-1877) volt az első, aki ezt megvalósította. A mikroszkópos kép ilyen objektív, később analizálható formában való eltárolása volt az egyik legfontosabb lépés a kvantitatív mikroszkópia felé. Később a számítógépek és digitális képek megjelenésével még több lehetőség adódott a képek elemzésére. Rengeteg módszer fejlődött ki arra, hogy információkat nyerjünk ki a pixelizált képekből [13]. Az SMLM képalkotással viszont a hagyományos digitális mikroszkópok pixelizált felvételeitől alapvetően eltérően térbeli koordinátákat kapunk. Ilyen térbeli pontmintázatok (SPP) értelmezése eltérő, gyakran összetettebb statisztikai és analitikai eszköztárat igényel [14, 15]. Dolgozatomban áttekintést nyújtok a pontillista SMLM adat elemzéséről, illetve bemutatom az ezen téren elért eredményeimet.

2. Tudományos előzmények

2.1. Optikai mikroszkópia

A világról érzékszerveinken keresztül szerzünk információt és ezen érzékeink közül szemünk játssza az egyik legdominánsabb szerepet. Egyes mérések szerint agykérgünk 20 – 30 %-a vizuális információ feldolgozásával foglalkozik [16]. Valószínűleg ennek köszönhető, hogy a vizuális információt különösen könnyen és gyorsan tudjuk értelmezni (ld. infografika). Ezen szervünk feloldóképessége viszont jó esetben nagyjából 1 *szögperc* és a legkisebb tárgytávolság, aminél még fókuszált kép jön létre a retinánkon ~ 25 *cm*, így a $\sim 0,07$ *mm* alatti struktúrák rejtve maradnak előttünk.

Érzékszerveink által szabott határaink technikai úton történő javítása egy bevett módszer a természettudományokban. A szemünk által szabott feloldási határt mikroszkópok segítségével léptük át, amik lényegében nagyított kép létrehozására alkalmas eszközök. Az optikai mikroszkópok a tárgyak különböző pontjai által kibocsátott, vagy azokról szóródott fényt összegyűjtik és azt valamilyen ernyőre, vagy detektorra fókuszálják. Ha ezen fókuszfoltok között nagyobb a távolság, mint a hozzájuk tartozó tárgypontok között, akkor a kép nagyított, amin a szabad szem számára észrevehetetlen struktúrák tárulhatnak fel. A legkorábbi mikroszkópok egyetlen nagyító lencsét tartalmaztak és legalább a 13. századig visszavezethető a történetük [17]. Ilyen konstrukcióval az elérhető maximális nagyítás limitált. A jóval fejlettebb több lencsét tartalmazó összetett mikroszkópok megjelenése a 17. századra datálható [17]. Ezekkel már tetszőleges nagyítás elérhető.

2.2. Kontrasztnövelő eljárások

A fénymikroszkópok megjelenésének talán a biológiai ismeretekre volt a legnagyobb hatása. Az élő szervezetek alapvető egységei a sejtek, amelyek tanulmányozásához esszenciális a különböző sejtalkotók és azok egymáshoz viszonyított kapcsolatának a megértése. Ezek egymástól és környezetüktől való elkülönítése azonban a gyakran hasonló optikai tulajdonságok miatt kihívást jelent. A probléma orvoslására több optikai megoldás is született, amelyek közül most csak azokat említem meg, amelyekkel munkám során szorosabb kap-

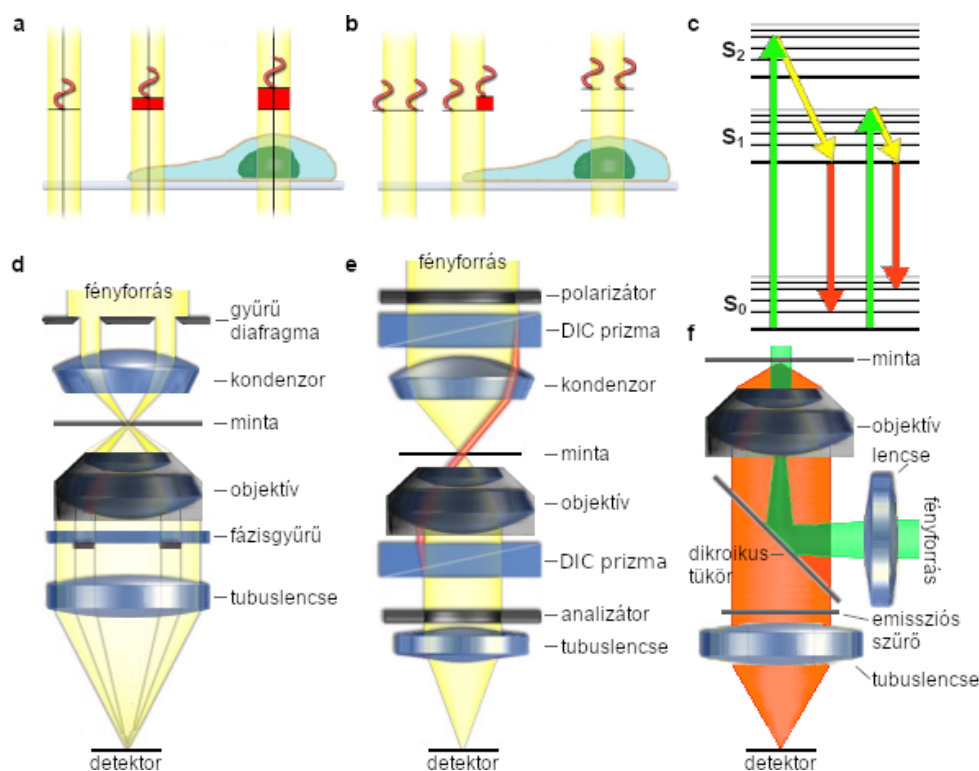
csolatba kerültem.

A fáziskontraszt mikroszkópia [18] egy olyan optikai mechanizmusra épül, ami a megvilágító fény mintában fellépő kicsiny fázisváltozásait alakítja át intenzitásbeli változássá (2.1.a ábra). Ennek megvalósításához egy hengerpalást alakú megvilágító nyalábra és egy ennek megfelelő fázisgyűrűre van szükség. Utóbbi lényegében egy negyed hullám lemez és egy szürke szűrő kombinációja (2.1.d ábra).

A differenciális interferencia kontraszt (DIC) mikroszkópia [19] az optikai úthossz gradienseket alakítja át intenzitásbeli változásokká (2.1.b ábra). Sztenderd konfigurációban ehhez a technikához egy polarizátor párra és két kettősen törő, ún. Wollaston vagy Nomarski prizma van szükség (2.1.e ábra).

A fáziskontraszt mikroszkópia és a DIC ma is népszerű technikák, azonban fluoreszcens mikroszkópok megjelenése áttörést jelentett a minta kontrasztjának növelése terén és hamar figyelem előterébe került. Fluoreszcencia akkor történik, amikor egy gerjesztett atom vagy molekula foton emissziója révén relaxálódik elektron spin változás nélkül. A fluoreszcencia szempontjából releváns állapotokat és átmeneteket a 2.1.c ábra szemlélteti. A legtöbb molekula alapállapota a szingulett állapot (S_0). Egy megfelelő energiájú foton abszorpciójával a fluoreszcens molekula gerjesztett állapotba kerül, általában szintén egy szingulett állapotba ($S_n, n > 0$). Oldatokban az S_n ($n > 1$) állapotok nem sugárzó átmenetek révén (belső konverzió, rezgési relaxáció) gyorsan relaxálódnak az S_1 legalacsonyabb rezgési szintre. Emiatt a fluoreszcencia leggyakrabban a néhány nanoszekundumos élettartamú S_1 állapotból történik. A nem sugárzó átmenetek miatt az emittált foton kisebb energiájú, mint a gerjesztő foton. Ezt az energia különbséget spektrális szeparálására használhatjuk fel pl. dikroikus tükrök és emissziós szűrők használatával (2.1.f ábra). A vizsgált sejtalkotók, biomolekulák (ún. célmolekulák) fluoreszcens molekulákkal szelektíven megjelölhetőek, amik ilyen módon nagy kontraszttal láthatóvá tehetőek. Többféle fluorofór használatával pedig a különböző célmolekulák jól elkülöníthetőek egymástól.

Gyakori technika a célmolekulák fluorofórokkal való megjelölésére az immunjelölés, amivel a méréseim során gyakran találkoztam. Immunjelölés során az immunrendszer sejtjeit, antitesteket használnak. Ún. elsődleges antitestekkel specifikusan megjelölik a



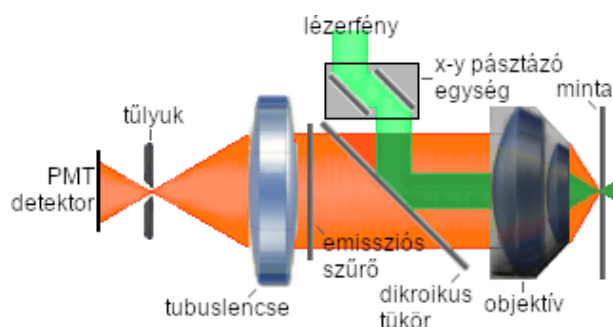
2.1. ábra. Kontraszt növelő eljárások mikroszkópiában. **a,** A minta által bevezetett fázisváltozások sematikus ábrázolása (pirossal), amit egy fáziskontraszt mikroszkóp intenzitásbeli különbségekké alakít. **b,** A minta által bevezetett optikai úthossz gradiensek sematikus ábrázolása (pirossal), amit egy DIC mikroszkóp intenzitásbeli különbségekké alakít. **c,** Egy fluoreszcens molekula fluoreszcenciában releváns állapotai és átmenetei Jablonski diagramon ábrázolva. A zöld nyilak gerjesztés hatására létrejövő átmeneteket, a sárga nyilak a belső relaxációk és rezgési relaxációk miatt bekövetkező állapotváltozásokat, míg a piros nyilak a fluoreszcenciához tartozó sugárzó átmeneteket jelölik. **d–f,** Egy fáziskontraszt mikroszkóp (**d**) egy DIC mikroszkóp (**e**) és egy fluoreszcens mikroszkóp (**f**) felépítésének sematikus ábrázolása.

célmolekulákat, amikhez aztán festékmolekulákkal megjelölt másodlagos antitest(ke)t kapcsolnak. Az epitóp a célmolekulának az a része, amit az ellene termelt antitestek felismernek és hozzákötődnek.

2.3. Konfokális mikroszkópia

Széles látóterű megvilágítás esetben az objektív látóterének teljes térfogatát kivilágítjuk a gerjesztő fénnel és a fókusz síkból jövő fényt a detektorra képezzük. Ez egy gyors és

viszonylag egyszerű módszer, de fluoreszcens mikroszkópia esetén nem mindig előnyös. Vastagabb ($\sim 2 \mu\text{m}$ feletti) minták fókuszsíkon kívüli kivilágított területéből jövő fluoreszcens jel ugyanis nagy mértékű háttérrel ad a képhez, ami a finom strukturális részleteket elfedi. A konfokális technikánál [20, 21] viszont a mintának csak egy kisebb térrészét gerjesztjük. A gerjesztő fényt, amit tipikusan lézerrel hozunk létre, az objektívvel a mintában fókuszáljuk és a detektor elé, a gerjesztett térrész konjugált síkjába egy tűlyukat helyezünk (2.2. ábra). Ezzel jelentősen lecsökkentjük a nem fókuszából jövő fluoreszcens jel detektorra jutását, ami az axiális feloldást is növeli. A fluoreszcens jelet leggyakrabban PMT detektorokkal mérjük. A fókuszfoltot a mintában mozgatva végigpásztázhatjuk a teljes térrészt, amire kíváncsiak vagyunk, a detektor jele alapján pedig rekonstruálhatjuk a minta 3D-s struktúráját. Ezt a folyamatot optikai szekcionálásnak, vagy szeletelésnek nevezzük.



2.2. ábra. Pásztázó lézeres konfokális mikroszkóp (CLSM) felépítésének sematikus ábrázolása. A konfokális technika során a gerjesztő fényt tipikusan lézer, amit a mintába fókuszálunk és egy pásztázó egységgel mozgatunk a mintában. A fluoreszcens jelet leggyakrabban PMT detektorokkal mérjük.

A konfokális technika intenzív fényforrást és speciális adatkezelést igényel, ami az 1955-ös feltalálása során még nem állt rendelkezésre [20]. Az 1970-es évek második felétől, illetve az 1980-as évektől a számítástechnikai és lézertechnológiai fejlődésével a konfokális mikroszkópia egyre nagyobb érdeklődésre tett szert, míg végül az egyik legnépszerűbb és legnagyobb hatású technikává vált az optikai mikroszkópiában.

2.4. Diffrakció limit

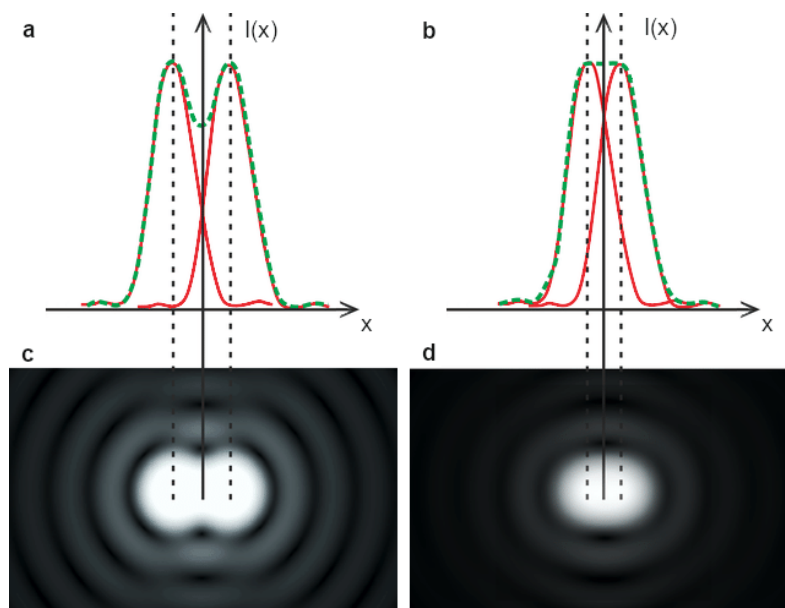
Összetett mikroszkópokkal elméletileg tetszőleges nagyítást elérhetünk, a detektálás érzékenysége pedig már 1989-ben egyedi fotonok észleléséig fejlődött [22, 23]. Ezek a felfedezések mégsem vezettek molekuláris szintű struktúrák vizsgálatához, ugyanis a nagyítást és érzékenységet meg kell különböztetni a feloldástól. A feloldás – jelen esetben térbeli – attribútumok elkülönüléséről szól.

Optikai mikroszkópiában a tárgypontok pozícióját az általuk kibocsátott, vagy róluk szóródó fény detektorra fókuszálásával határozzuk meg. Mivel a fotonok terjedését hullámmozgással lehet leírni, a leképező rendszer véges apertúrájából adódó fényelhajlási jelenségek miatt a fókuszfolt nem lesz pontszerű, hanem valamilyen kiterjedéssel fog rendelkezni. Egyedi pontforrás képének intenzitás eloszlása az optikai rendszer pontátviteli függvényével (PSF) adható meg. A PSF térbeli kiterjedéséből adódóan bizonyos távolságnál közelebbi pontforrások képe átfed és megkülönböztethetetlené válik. Ezt a távolság limitet nem a rendelkezésre álló technológia, hanem természeti törvények állítják fel [24]. A feloldást tehát azzal a távolsággal lehet definiálni, aminél két pontforrás még éppen megkülönböztethető egymástól. Ez egy hasznos, de a gyakorlatban nehezen megfogható megfogalmazás. Valójában csak önkényes formula alapján tudunk abszolút távolságot meghatározni. Ezen formulák tipikus alakja:

$$d_{min} = c \cdot \frac{\lambda}{NA} \quad (2.1)$$

ahol λ a detektált fény hullámhossza, NA a leképező rendszer numerikus apertúrája, c pedig egy konstans, aminek értékét többféle szempont alapján is megadhatjuk. Az egyik leginkább elterjedt, mikroszkópiában általánosan használt feloldási kritérium a Rayleigh-féle kritérium, ahol ennek a konstansnak az értéke $c_{Rayleigh} \approx 1,22$, ami kör alakú apertúrák esetén éppen annak felel meg, hogy az egyik PSF maximuma a másik PSF első minimumára esik [25] (2.3. ábra). Hozzá kell tenni, hogy ez az összefüggés azonos erősségű fényforrásokra vonatkozik.

A 2.1 képlet alapján a feloldás növelésére (R csökkentésére) két út van. Csökkenthetjük



2.3. ábra. A Rayleigh-féle feloldási határ szemléltetése. a–b, A Rayleigh-féle feloldási kritérium szempontjából éppen feloldható (a) és nem feloldható (b) pontszerű fényforrások intenzitás profilja. **c–d,** A Rayleigh-féle feloldási kritérium szempontjából éppen feloldható (c) és nem feloldható (d) pontszerű fényforrások detektoron létrehozott képe.

az alkalmazott fény hullámhosszát, vagy növelhetjük a leképezéshez használt lencserendszer numerikus apertúráját. A fény hullámhossz csökkentésének egyfelől a leképező lencserendszer szab határt, hiszen a lencsék anyaga gyakran abszorbeál az UV tartományban, illetve a kromatikus hiba szerepe is megnő. Másfelől alacsonyabb hullámhosszak esetén egyre jelentősebb a biológiai minták autofluoreszcenciája és a fototoxicitás mértéke. A numerikus apertúrát lényegében az immerziós közeg limitálja. A gyakorlatban 0,95 feletti numerikus apertúrát az objektív és a minta közötti közeg törésmutatójának növelésével lehet elérni. Az immerziós közeg törésmutatóját – a minta, a fedőlemez és az immerziós médium törésmutató eltéréseiből adódó aberrációk miatt – ritkán szokták 1,51 fölé állítani. Ezek alapján a diffrakció limitált (leképezési hibáktól mentes) optikai mikroszkópok feloldása laterálisan $\sim 250 \text{ nm}$, az axiális feloldás pedig tipikusan $500 - 700 \text{ nm}$, vagyis anizotropia van a képképzésben. A feloldás további növelésére léteznek dekonvolúciós eljárások, de ezek erősen érzékenyek a zajra és könnyen vezetnek be műtermékeket, ezért felhasználhatóságuk korlátozott.

A biológiai folyamatok vizsgálatánál a feladatokat elvégző gépezetek, a fehérjék mérete azonban néhány nanométertől néhány 10 nanométerig terjed, ami jóval a hagyományos optikai mikroszkópok feloldási határa alatt van. Elektron mikroszkópokkal viszont sokkal nagyobb feloldást tudunk elérni egészen egyedi molekulák méretéig [26]. Felvetődik a kérdés, hogy miért törődünk a fénymikroszkópokkal? Ennek legalább két nyomós oka van. Az egyik ok, hogy optikai mikroszkópokkal élő sejtek belsejébe tekinthetünk minimálisan invazív módon [27]. A másik ok pedig az, hogy fluoreszcens molekulákkal a különböző sejtalkotókat nagy kontraszttal tudjuk láthatóvá tenni [27]. Ennél fogva az élettudományokban a fénymikroszkópok az elektronmikroszkópok megjelenése után is jóval nagyobb népszerűségnek örvendenek [28].

2.5. Nagyfeloldású mikroszkópia

A 20. század során egy sor új jelenségre derült fény a fluoreszcencia kapcsán (stimulált emisszió, molekulák sötét állapotai, stb.). Ezen jelenségeket kihasználva megnyílt a világ a 100 nm alatti skálán a fénymikroszkópok előtt [29, 30], ami látványos biológiai felfedezésekhez vezetett [11]. A hagyományos mikroszkópiai technikák által elérhetőnél nagyobb feloldást kínáló módszereket összefoglalóan szuperrezolúciós vagy nagyfeloldású technikáknak nevezzük.

A nagyfeloldású technikákat három csoportra lehet osztani. Az egyik csoport, ami a SIM-et és ennek származékait tartalmazza [2, 3, 31–33], egy fizikai megoldás, a hullámoptikát és a képfeldolgozást használja fel a diffrakciós limit csökkentésére egy új optikai határig. Laterális feloldása a hagyományos optikai mikroszkópok feloldásának a fele (100–120 nm). A másik két csoport inkább kémiai megoldásokat tartalmaz.

A STED egy pásztázó eljárás, ami a kivilágító fókuszolt méretét csökkenti le [1, 34]. Ezt a fluoreszcensen gerjesztett molekulák alap állapotba való visszahozásán keresztül éri el. A technika laterális feloldása eléri a 60–100 nm-t.

A legjobb feloldást az SMLM technikával tudjuk elérni, aminek során egyedi molekulák pozícióját határozzuk meg [4–7, 35–44] (néha az előző csoport technikáival kombinálva [45]). A lokalizációs precizitás tipikusan 10–20 nm [46, 47]. Munkám során az SMLM

módszert használtam a nagyfeloldású technikák közül, ezért a későbbiekben ezt fejtem ki részletesen.

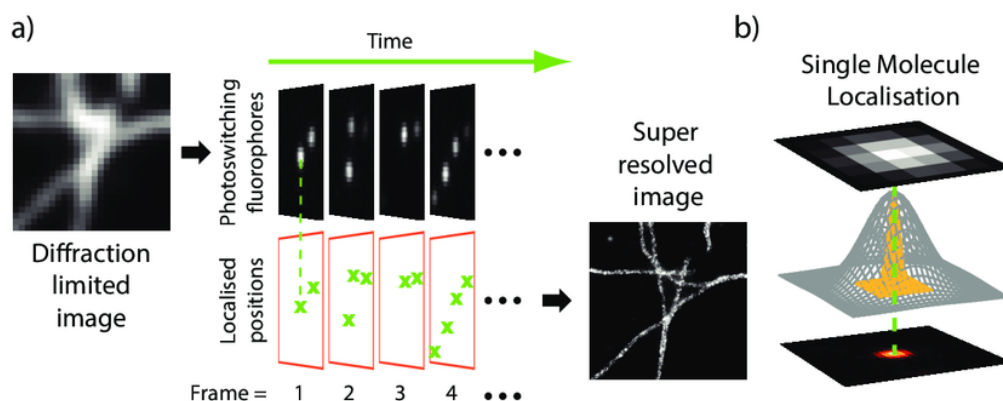
Megjegyzem, hogy az ExM [48] technikával bár feloldhatóvá tehetők diffrakció limit alatti struktúrák, de nem sorolom a nagyfeloldású mikroszkópai technikák közé, mivel ez egy mintaelőkészítési metódus.

2.6. SMLM technika

Az SMLM általában egy széles látóterű technika. A módszer lényegében azon a alapul, hogy egyedi fluoreszcens molekulák térbeli koordinátái precízen meghatározhatóak, ha a képük nem fed át egymással, még hozzá a hozzájuk tartozó PSF-ek középpontjának meghatározása által [46, 49, 50] (2.4.b ábra). Ezt a középpont meghatározást nevezzük lokalizációnak. A lokalizációs precizitást alapjában véve a jel-zaj viszony (SNR) fogja limitálni [51]. Az egyedi molekulákhoz tartozó PSF-ek átfedését időbeli szeparálással kerülhetjük el, aminek következtében a detektoron csak néhány molekula képe látszódik egy adott időben. A gerjesztett molekulák ilyen ritka eloszlását több módon is megvalósíthatjuk, például fotoaktiválható fluoreszcens fehérjékkel [4, 5, 35], fluoreszcens molekulák hosszú élettartamú sötét állapotaival [6, 7, 42, 52], vagy tranziens molekuláris bekötődéssel [36, 43, 53].

Az egyik leggyakoribb megközelítés a fotokapcsolás, aminek során a fluoreszcens molekulákat egy fluoreszcensen gerjeszthető, „bekapcsolt” és egy fluoreszcensen inaktív „sötét” vagy „kikapcsolt” állapot között kapcsolgatjuk. A fotokapcsolás egy sztochasztikus esemény, azonban a kapcsolási valószínűségek (sebességi állandók) szabályozhatók például a megvilágítással vagy a kémiai környezettel. A megfelelő feltételek mellett nagy valószínűséggel térben izolált, nem átfedő PSF-ek látszódnak egy felvételen (2.4.a ábra). A sötét és bekapcsolt állapotok közötti kapcsolódás a fluorofórok „villogásához” vezet. Ugyanazon FOV-ról készült videó felvétellel elérhető, hogy minden molekula képét legalább egy képkockán rögzítsük. A képkockák egymás utáni széles látóterű felvételek. Ezeken egy számítógépes algoritmus segítségével megkeressük a bekapcsolt molekulák képét és lokalizációval meghatározzuk azok koordinátáját, amikből aztán rekonstruálható a FOV

nagyfeloldású képe. A kép feloldását a lokalizációs pontosság, a lokalizációs precizitás és a lokalizált fluorofórok közötti távolság határozza meg. Utóbbi a Nyquist-Shannon féle mintavételi tétel szempontjából jelentős [54, 55].



2.4. ábra. Az SMLM képalkotási folyamat illusztrációja [56]. **a,** Amikor minden fluorofór egyidőben emittál fotonokat, a diffrakció miatt bizonyos struktúrák feloldhatatlanná válnak. Sztochasztikusan fotokapcsolt fluorofórokról készült felvételeken viszont csak néhány fluorofór képe fog látszódni, amelyekből a fluorofór tényleges pozíciója nagy pontossággal meghatározható. Ezen pozíciók együttes ábrázolása hozza létre a nagyfeloldású képet. Az adat elérhető: [57]. **b,** Izolált fluorofórok lokalizációja a diffrakció limitált képünk PSF-el való megillesztésén keresztül valósul meg.

SMLM technika alapvető fontosságú része a lokalizáció, ami a molekulák képének egy elméleti görbével való megillesztésén keresztül valósul meg. Ez az elméleti görbe jól közelíthető egy 2D-s Gauss függvényvel [46, 58]. A lokalizáció során az egyedi molekulák pozíciója mellett a egyéb adatok (pl. illesztési paraméterek, ellipticitás, stb.) is eltárolásra kerülnek [46, 59]. Ezek értékmérőként szolgálhatnak arra vonatkozóan, hogy egy lokalizációt elfogadjunk-e, hogy a végső rekonstruált kép részét képezze, vagy elvetjük. Az ilyen szűrési folyamatokkal nem csak a rosszabb lokalizációs bizonytalansággal rendelkező lokalizációkat hagyjuk figyelmen kívül, de különböző műtermékektől is mentesíthetjük a képet [60]. A lokalizációhoz használt szoftver csomagok egy átfogó listája megtalálható online [61].

2.7. 3D SMLM technikák

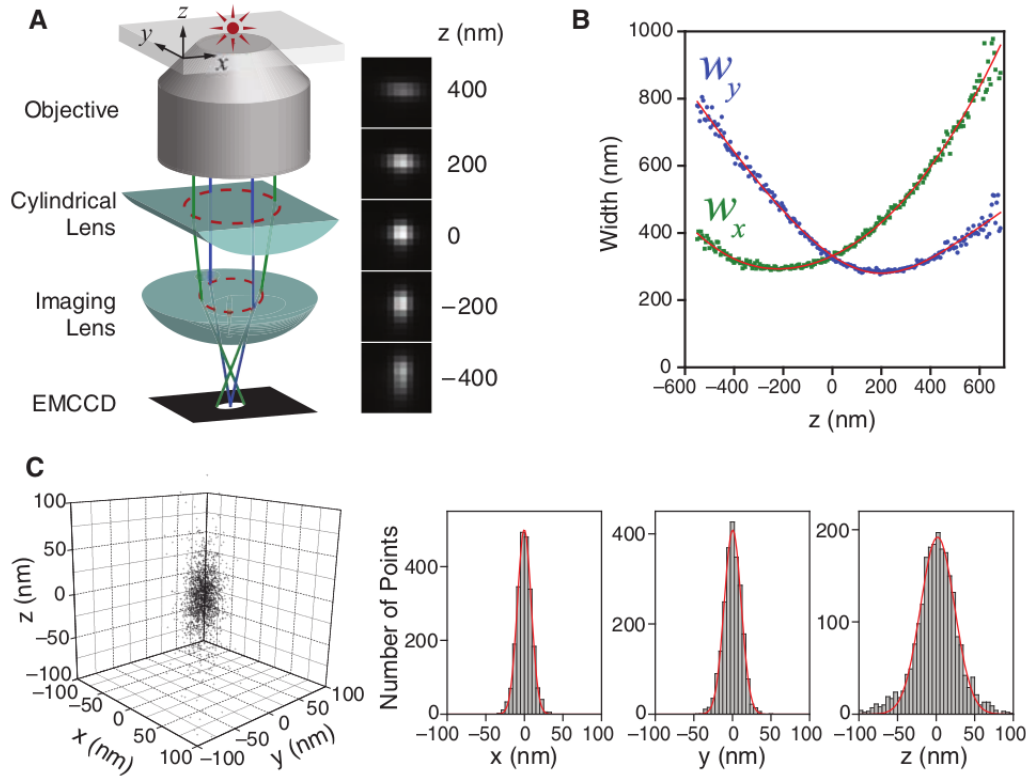
SMLM 3D-re való kiterjesztésére több módszer is született, például a PSF manipulálásával [62–66], egymással szembehelyezkedő objektívek jelének interferenciájával [67, 68] vagy szuperkritikus szögű fluoreszcencia helyreállítással [69].

Az egyik legegyszerűbb megoldás az asztigmias 3D [62], aminek során egy hengerlencse fénypontba helyezésével asztigmatizmust vezetünk be a leképezésbe. Ekkor a tárgyponthoz tartozó PSF a tárgypont fókuszsíktól való távolsága függvényében torzul (2.5. ábra). Az axiális koordinátákhoz egy elméleti PSF illesztésével jutunk hozzá. Ezen technika hátránya, hogy a leképezés anizotróp, az axiális lokalizációs precizitás rosszabb, mint a laterális (2.5.C ábra), ez azonban a többi SMLM 3D technikára is általánosan igaz.

A felsorolt technikák további hátránya, hogy csak a mélységélességen (DOF-on) belül adnak axiális információt és mivel az SMLM fotonlimitált technika, ezért nagy numerikus apertúrájú objektívvel történik, ami kis mélységélességet eredményez. Több fókuszsík felvétele pedig a gyakori széles látóterű kivilágítás mellett nem mindig megvalósítható, mert a fluorofórok sötét állapotba kapcsolása tipikusan nagy gerjesztő intenzitást igényel (néhány kW/cm^2), ami hozzájárul a gyors kifakulásához.

2.8. SMLM felvételek kvantitatív elemzése

A hagyományos fluoreszcens mikroszkópos eljárások mellett néhány nagyfeloldású technikával is (pl. STED, SIM, stb.) 2D-s pixelek vagy 3D-s voxelek tömbjét hozzuk létre. Ekkor a tömb elemei a tér adott pontjaiban mért fluoreszcens intenzitás értékét adják meg. Ezek az értékek a fluorofórok lokális sűrűségétől, a gerjesztési intenzitástól és az adott helyen uralkodó kémiai környezettől is függenek. Az SMLM technikákkal nyert felvételek azonban ettől alapvetően eltérően pontillisták, kimenetként a fluorofórok térbeli koordinátáit kapjuk meg valamilyen precizitással. Ilyen pontfelhők (SPP-k) elemzése gyakran eltérő megközelítéseket és összetettebb statisztikai és analitikai eszköztárat igényel, mint a pixel tömbök elemzése [14, 15, 70]. Természetesen a pontillista képek is pixelizálhatóak [71–75], azonban ez a konverzió információvesztéssel jár és a pontillista adatok számos kedvező tulajdonságát elveszítjük vele.



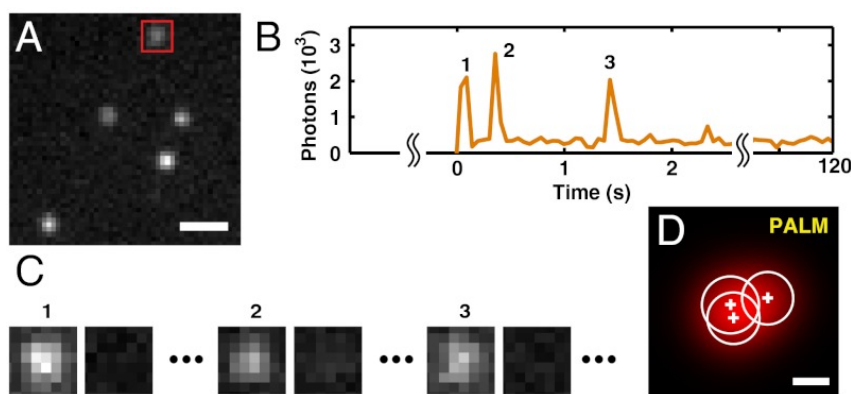
2.5. ábra. Asztigmias 3D STORM működési elve [62]. A, Az egyszerűsített optikai diagram a fluorofór axiális koordinátájának (z) meghatározását szemlélteti a PSF ellipticitásából, amit egy hengerlencse vezet be. A jobb oldali panel a PSF képét mutatja különböző z pozícióban. **B,** Kalibrációs görbe, ami a PSF szélességét (w_x és w_y) ábrázolja a z pozíció függvényében egyedi Alexa Fluor 647 fluoreszcens molekulák esetén. Az adatpontok mérésből származnak, a folytonos piros vonal pedig az adatra illesztett görbe. **C,** Egyedi fluorofórok 3D-s lokalizációs eloszlása. Minden molekula többször felvillan, ezért lokalizációk klaszterét hagyja maga után. A bal oldali ábra 145 ilyen klaszter lokalizációs eloszlását mutatja, míg a jobb oldalon ugyanezen eloszláshoz tartozó Gauss görbével megillesztett hisztogramokat láthatunk.

SMLM felvételek elemzésénél megkülönböztethetünk elő- és utófeldolgozási műveleteket. Az előbbi célja, hogy a nyers felvételtől az utólagos feldolgozáshoz, vagyis a tényleges adatelemzéshez megfelelő, műtermék minimalizált adathoz jussunk (pl. lokalizációk szűrése, aberrációk korrekciója, stb.). Az utóbbi a lényeges számadatok megszerzéséről szól (molekulák számának meghatározása, klasztereződés mértéke, geometriai méretek, stb.). Bár az előfeldolgozási lépéseket nem hagyhatom figyelmen kívül, dolgozatomban csak az

eredményeimhez kapcsolódó utófeldolgozási módszereket fejtem ki kellő részletességgel.

2.9. Molekulaszámlálás

Az SMLM mérések során minden egyes felvillanási esemény egyetlen fluorofórt jelöl, függetlenül a felvillanás egyéb tulajdonságaitól, mint például annak fényessége. A módszer ezen tulajdonsága felkeltette az érdeklődést az SMLM technika iránt, mint egy új, hatékony molekula számlálási módszer. Azonban a látszólag egyszerű feladat ellenére nehéz megbízható eredményeket kapni. Az emissziós események valóban a mögöttes molekulák számával vannak kapcsolatban [76], de a megfigyelt lokalizációk száma nem adja meg egy az egyben a molekulák számát. Egyik oldalról nem feltétlen minden célmolekula van megjelölve, illetve néhány fluorofór könnyen kifakul, mielőtt detektálva lenne. Másik oldalról a célmolekulák sok esetben több, mint egy fluorofórral vannak megjelölve, illetve egy fluorofór több alkalommal is felvillanhat [77–82], ezzel több lokalizációt hagyva maga után (2.6. ábra).



2.6. ábra. Fluorofór többszöri aktivációja a mérés során [83]. **A**, Térben elkülönülő mEos2 fluoreszcens fehérjék képe EMCCD kamerán. **B–C**, Az **A** területen vörös négyzettel bejelölt területen lévő fluorofór emissziójának időbeli lefutása (**B**) és az EMCCD kamerakép ugyanarról a területről (**C**). **D**, Lokalizált pozíciók („+” jel) a **C** képek alapján. A fehér körök a molekula képére illesztett függvény szórását jelzik. Skála: $1\mu\text{m}$ (**A**), 10nm (**D**).

A lokalizációk számát felhasználhatjuk ugyan relatív számok, fehérjeszám arányok megadására [84, 85], de ez feltételezi, hogy a kapcsolat a lokalizációk száma és a molekulák

száma között szigorúan lineáris, ami nem minden esetben teljesül. Nagy molekulásűrűségek esetén például a lokalizációs algoritmus nem tud minden egyes felvillanási eseményt különállóan azonosítani, valamint a közeli fluorofórok befolyásolni tudják egymás fotofizikáját [86]. A tényleges molekulaszám meghatározása tehát összetett feladat. A felsorolt tényezők ún. alulszámláláshoz, vagy túlszámláláshoz vezetnek, attól függően, hogy milyen irányba torzítják a mérési eredményt.

Hogy mennyi célmolekula maradt detektálatlan, az az alulszámlálás problémája, amit nehéz képfeldolgozás szempontjából megközelíteni. Ami nincs detektálva, arról általában nem is tudok semmit, ha csak nincs valami előzetes tudásom a mintáról. Ilyen *a priori* tudást fel lehet használni, ha nem is a detektálatlan jel pontos meghatározására, de legalábbis az alulszámlálás mértékének megbecslésére. Az alulszámlálás problémáját azonban leginkább a hatékonyabb jelöléssel lehet csökkenteni vagy eliminálni. Mivel dolgozatomban képelemzéssel foglalkozom, ezért a túlszámlálás problémáját tárgyalom részletesebben, azon belül is a (d)STORM, illetve az erre a technikára könnyen átemelhető PALM technikákban alkalmazott módszereket mutatom be.

Molekulaszámlálást meg lehet valósítani előfeldolgozási lépéssel, melynek során azok a lokalizációk, melyek egy célmolekulához tartoznak, valamilyen módon összevonásra kerülnek és egy koordinátával lesznek helyettesítve, vagy utófeldolgozással, aminek során a túlszámlálásból adódó lokalizációk is részét képezik az adatnak, amit aztán tovább lehet elemezni. A molekulaszámlálásra 5 megközelítést különítettem el az irodalom alapján:

i. Egyedi molekulákhoz tartozó lokalizációk összecsoportosítása. Egyedi molekulákhoz tartozó lokalizációk összecsoportosítása tipikusan egy előfeldolgozási lépés. Ilyen módszert mutat be Khater és mt. [87] akik a legközelebbi szomszédos klasztereket vonták egybe egészen addig, míg a lokalizációk közötti távolságok a lokalizációs precizitásnál kisebbek voltak. Ennek hatékonysága sűrű területek esetén megkérdőjelezhető. Egy másik népszerű megközelítés PALM mérések analízisének az ún. sötét állapot tolerancia időintervallum (τ_c) bevezetése. Minden felvillanás, ami a rendszer lokalizációs bizonytalanságán, és τ_c -n belül történt, egy molekulának van véve [77, 80, 83, 88–92]. A sötét állapot küszöbölésen alapuló koncepciók azonban nem alkal-

mazhatóak hosszabb ideig sötét állapotban tartózkodó fotokapcsolható fluoreszcens jelölőkre, ahol a fotokapcsolási ciklusok átfedhetnek [93].

ii. Egyedi molekulához tartozó lokalizációk átlagos száma. Egy másik megközelítés a célmolekulák számának meghatározására a hozzájuk tartozó lokalizációk számának megadása. Ezt a váltószámot a rendszer átviteli függvényének nevezik és tipikusan kalibrációs kísérletekkel határozzák meg az értékét. A kalibráció során viszont kritikus lehet, hogy a fluorofórok a tényleges méréskor uralkodó mikrokozmoszban legyenek, különben a viselkedésük jelentősen eltérhet attól, ahogy a mérés során viselkednek [86]. Az átviteli függvény meghatározható, ha izolált, elkülöníthető fluorofórokat vizsgálunk [94–97].

Ha egy mintára a molekulák abszolút száma más tanulmányokból ismert (pl. biokémiai kiértékelések, elektron tomográfia, stb.), ez a szám egy belső kalibrációként használható, hogy a szerzett lokalizáció számot átültessük fehérjeszámmá [98] [99–104].

Egy egyedi megközelítést alkalmaztak a problémára Zhang és mt. [105], akik különböző fehérjék számának megbecsléséhez egy szimulációt hajtottak végre néhány ésszerű feltételezéssel. A szimulációval klasztereket generáltak, és azok lokalizáció számának átlagát és szórását felhasználva kalibrációs görbét kreáltak, amivel aztán valós mérésekben határoztak meg abszolút számokat.

Immunjelölés esetén a molekulaszámlálást az ismeretlen sztöchiometria nehezíti. Ehmann és mt. [106] titrációs lépésekkel közelítették meg ezt a problémát. Különböző antitest koncentrációkat használva hoztak létre kalibrációs görbét célmolekula számláláshoz.

iii. Felvillanásszámok eloszlásának megillesztése. Egy lehetséges molekulaszámlálási stratégia, ha a felvillanásszámok eloszlását megillesztjük egy elméleti valószínűségi görbével. PAFP-k fotokinetikája például jól leírható egy négy állapotú rendszerrel, ami pedig azt jósolja, hogy egyedi PAFP-k felvillanásszámának eloszlását geometriai eloszlás adja vissza, oligomerizáció esetén viszont a megjelölt fehérje ún.

komplexekeket alkot és a felvillanási események száma egy negatív/inverz binomiális eloszlással illeszthető, a mögöttes molekulák száma pedig egy szabad pereméter lesz az illesztésben. [83, 85, 107]. Hummer és mt. demonstrálták, hogy a felvillanásszám eloszlás alakja nem túl erős feltételezések mellett független a fotofizikától [108]. Ehhez általános kifejezést származtattak a fluorofórok felvillanásszámának valószínűség eloszlására.

Karathanasis és mt. kiterjesztették a Hummer és mt. molekula számlálós módszerét szerves festékekre [109], amiknek komplexebb a fotokapcsolási mechanizmusuk [110]. Módszerüket DNA origami [103] segítségével validálták. Zanicchi és mt. szintén szerves festékeket használtak fehérjék számának meghatározásához egy DNA origami kalibrációs standard segítségével [104].

iv. Párkorrelációs függvény alkalmazása. A fluorofórok gyors aktivációja miatt a lokalizációk csoportosítása nem mindig alkalmazható. Ilyenkor egy alternatíva a párkorrelációs függvénnyel (PCF) számszerűsíteni a túlszámlálást [78, 81, 111]. A PCF megadja annak a valószínűségét, hogy egymást követő képkockákon két lokalizált jelet detektálunk egy megadott r távolságon belül. Érdekes eredmény, hogy a túlszámlálásnak köszönhető auto-korrelációval számolt látszólagos klasztereződés fordítottan arányos a jelölt molekulák felületi sűrűségével függetlenül attól, hogy mekkora a túlszámlálás mértéke [78].

v. Fourier gyűrű analízis alkalmazása. Az egy fluorofórhoz tartozó lokalizációk számának átlagos megbecslését Fourier gyűrű korreláció (FRC) is lehetővé teszi [112, 113]. Az FRC-t vagy annak 3D-s verzióját, a Fourier héj korrelációt eredetileg elektron mikroszkópiában használták a feloldás meghatározására [114]. A feloldást két független, azonos területről készült kép összevetésével lehet megkapni és ez könnyen megtehető SMLM méréseknél random módon felosztva két részre a lokalizációs pozíciókat [112, 115]. Viszont a többszöri lokalizáció/fluorofór hamis korrelációhoz vezet a két kép között, ami a feloldás felülbecsléséhez vezet. Ezt Nieuwenhuizen és mt. egy Q hamis korrelációs paraméterrel korrigálták. Q értéke meghatározható, amiből

lehetséges megadni a fluorofórok felvillanásának átlagos számát.

2.10. Klaszteranalízis

A sejtfunkciókat gyakran fehérjék tér- és időbeli elrendeződése szabályozza. Ennek a struktúra-funkció kapcsolatnak a tanulmányozása során szükség van objektív eszközökre, különösen, hogy erre a feladatra az emberi megfigyelő erősen alkalmatlan [116, 117]. Különböző matematikai módszerekkel kapcsolatot kereshetünk az elemek között és osztályozhatjuk azokat. Az ilyen algoritmusokat klaszteranalízisnek nevezem. SMLM felvételek nem csak a nagyobb feloldás, hanem a pontillista természet miatt is különösen alkalmasak ilyen analízisre.

Fehérje molekulák viszont számos módon tudnak összecsoportosulni (forma, méret, elemszám, elhelyezkedés, illetve az ezekben lévő variancia, stb.) így a megfelelő analitikai módszer problémaszpecifikus. A következőkben bemutatok hét különböző klaszteranalízis megközelítést, amikkel gyakrabban találkozhatunk SMLM adatelemzésben.

2.10.1. Korreláció alapú módszerek

A korrelációról már esett szó a molekulaszámlálási módszerek tárgyalásánál (alszakasz 2.9). Valójában korrelációs módszereket mind előfeldolgozás, mind utófeldolgozás céljából alkalmazni lehet SMLM adaton [78, 81, 118, 119], számos alkalommal valamilyen klaszteranalizálási céllal [81, 96, 119–123]. A módszer hátrányának sorolható be, hogy gyakran időigényes és jelentős tapasztalatot igényel mint a SMLM képalkotásnál, mind a statisztikai analízis végrehajtásánál [111].

2.10.2. Statisztikus módszerek

Egy ponthalmazban lévő klasztereződés kimutatására alkalmasak a Ripley függvények. A Ripley K -függvény értéke lényegében egy tetszőleges pont r sugarú környezetében lévő

pontok várható N számát adja meg a pontok sűrűségével normálva [124–126]:

$$K(r) = \frac{1}{\alpha} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^N I_r(i, j) \quad (2.2)$$

ahol α a normálási tényező, ami a lokalizációk átlagsűrűsége az adott sejten belül (lokalizációk száma/vizsgált terület, $\alpha = N/A$), N a lokalizációk száma, I_r pedig 1-et ad, ha a távolság a vizsgált i és j pontok között kisebb vagy egyenlő, mint r , és 0-t egyébként. Homogén Poisson folyamat által eredményezett SPP esetén, amit CSR-ként jelölök, ismert, hogy $K(r)$ várható értékét a következő egyenlet adja meg [125]:

$$K(r) = \pi \cdot r^2 \quad (2.3)$$

A CSR-től való eltérés mértéke a klasztereződés vagy diszperzió mértékét mutatja. A függvény alakja pedig a klaszterek átlagos méretéről is információt ad [126]. A K -függvényből más Ripley függvényeket lehet származtatni [125, 126]. Az L -függvény a K -függvény egy normalizált alakja [127]:

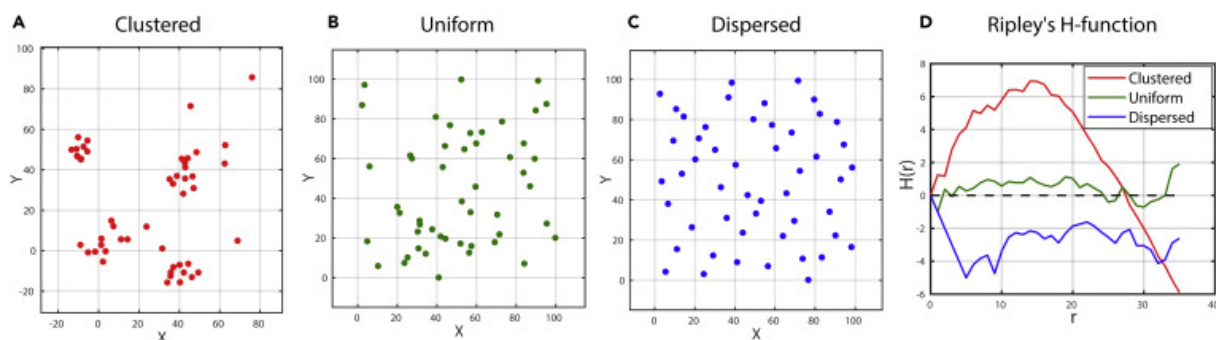
$$L(r) = \sqrt{K(r)/\pi} \quad (2.4)$$

A 2.4 függvény esetén a CSR leoszlás $L(r)=r$ egy egyenest ad. Az L -függvény normalizációja pedig a H -függvényt adja [128]:

$$H(r) = L(r) - r \quad (2.5)$$

A 2.5 képletből látható, hogy H -függvény értéke pozitív azon r értékeknél, amelyeknél az adatban valamilyen klasztereződés, aggregáció van jelen, negatív azon távolság értékeknél, amelyeknél az adatpontok elhelyezkedése diszperz, és zérus az értéke, ha az adathalmaz teljesen véletlenszerű értékeket tartalmaz (2.7. ábra).

A 2.2 egyenlet nem veszi figyelembe azoknak a pontoknak a hatását, amik a tanulmányozott terület határán vannak, ami a klasztereződés mértékének alulbecslését eredményezi [125, 130]. Ennek korrekciójára született pár javaslat [131–134]. Erre az egyik példa



2.7. ábra. A Ripley-féle H függvény ($H(r)$) viselkedése különböző pontfelhő eloszlásokra számolva [129]. A, Klaszterizálódott pontok. B, Uniform eloszlású (random) pontok. C, Diszperz pontok. D, A $H(r)$ függvény alakja az A (piros folytonos vonal), a B (zöld folytonos vonal) és a C (kék folytonos vonal) ábrán feltüntetett pontthalmazra számolva. Mindegyik pontthalmaz 50 ponttal lett legenerálva (A–C).

a következő egyenlet:

$$K(r) = \frac{1}{\alpha} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^N w_{ij} \cdot I_r(i, j) \quad (2.6)$$

Ami csak a w_{ij} paraméterben tér el a 2.2 képlettől. Ez a szélhatás korrekciós faktor, értéke pedig:

$$w_{ij} = \frac{C_m}{C_{ij}} \quad (2.7)$$

ahol C_{ij} az \overline{ij} sugarú kör kerülete az i lokalizáció körül, C_m pedig ezen a kör kerületének a vizsgált területtel vett metszetének nagysága. A szélhatás korrekciós faktort különösen akkor érdemes figyelembe venni, ha a vizsgált terület kicsi.

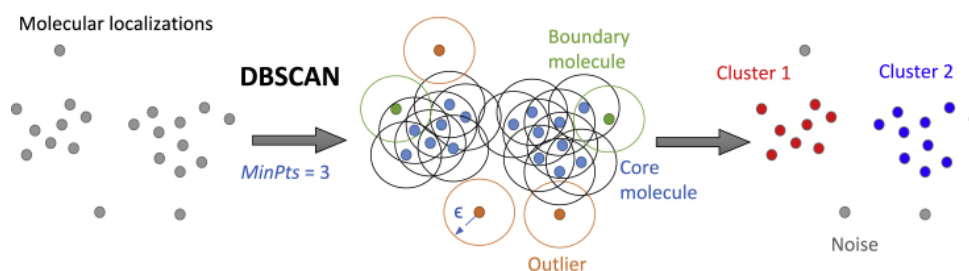
Pontfelhők tanulmányozásánál meg kell választani milyen skálán vizsgálom az adatot. Skála alatt azt a mérettartományt, illetve feloldást értem, amivel az adatra „rátekintek”. Néha több mérettartományban is rá kell néznünk az adatra a teljes képhez, pl. kis méret-skálán egy pont mintázat klasztereződést mutathat, míg nagyobb skálán vizsgálva kiderül, hogy ezek a sűrűbb domének diszperz módon helyezkednek el. Getis és Franklin egy másik $L(r)$ függvényt javasolt, a Ripley K -függvénynek egy változatát, aminek célja, hogy különböző térbeli skálákon számszerűsítse a pontok (SMLM kontextusában molekulák) klasztereződését [135].

A statisztikus módszerek előnye, hogy könnyen értelmezhető objektív adatokat szolgál-

tatnak, illetve nem igényelnek a felhasználótól bemenő paramétereket. Hátrányuk viszont, hogy egy átlagos klasztereződést mérnek az analizált területen belül, ezért a klaszterek különböző tulajdonságainak diverzitásáról nem mondanak semmit.

2.10.3. Sűrűség alapú módszerek

Az egyik legnépszerűbb sűrűség alapú klaszterező algoritmus a DBSCAN [136]. A klaszterek detektálása és szegmentálása két paraméter alapján történik: egy távolság érték (ϵ) és a minimum lokalizáció szám (N_{mag}) ϵ -n belül. A N_{mag} feltételnek a klaszter minden eleme körüli ϵ sugárban teljesülnie kell egészen a határoló lokalizációig. Az algoritmus ezen az elven keresi és bővíti a klasztereket, amíg minden adatpontot be nem sorolt egy klaszter elemének vagy zajnak (2.8. ábra).



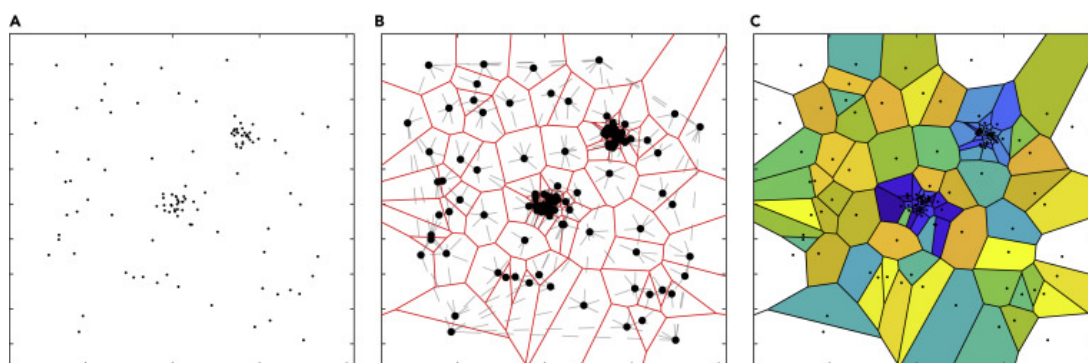
2.8. ábra. A DBSCAN alapú klaszteranalízis szemléltetése [129]. Jelen példában $N_{mag} = 3$. A jobb szélső részábrán két klaszter látszódik (piros és kék pontokkal jelölve), a szürke adatpontok pedig zajnak lettek besorolva.

A DBSCAN megfelelően beállított paraméterekkel képes tetszőleges méretű és formájú klasztereket megtalálni. Alkalmazható zajos adat esetén is, továbbá ki lett terjesztve 3D-re [137]. Az algoritmus hátránya, hogy a bemeneti paraméterek gyakran szubjektíven vannak megválasztva, ami erősen képes befolyásolni az analízis eredményét.

2.10.4. Tesszeláció-alapú módszerek

A tesszeláció, vagy mozaikozás az a folyamat, amikor egy síkot vagy teret valamilyen objektumokkal átlapolás és rések nélkül lefedünk. SMLM adatok elemzésénél gyakori módszer a Voronoi-tesszeláció, aminek során a lokalizációs teret ún. Voronoi-cellákra osztjuk

fel oly módon, hogy minden cella azokat a pontokat tartalmazza, amik egy adott lokalizációs koordinátaához a legközelebb vannak (2.9. ábra). A Voronoi-cellák élei így a két legközelebbi molekulához tartozó ekvidisztáns vonalak lesznek. A Voronoi-cellák területe a lokális molekuláris sűrűség reciprokéval lesz arányos. Molekuláris klasztereket a Voronoi-cellák geometriai tulajdonságai (pl. terület, forma) alapján lehet szegmentálni [138, 139], például azok a szomszédos cellák alkothatnak egy klasztert, amelyek területe egy megadott érték alatt van. A Delaunay háromszögelést szintén használták SMLM adat analíziséhez és kvantifikációjához [140, 141]. A Delaunay háromszögelés a Voronoi mozaikozás duális megfelelője. Azonban a Voronoi mozaikozás direkt becslést tud adni az ún. befolyási régióra [139] és ezért előnyösebb SMLM adat analíziséhez.

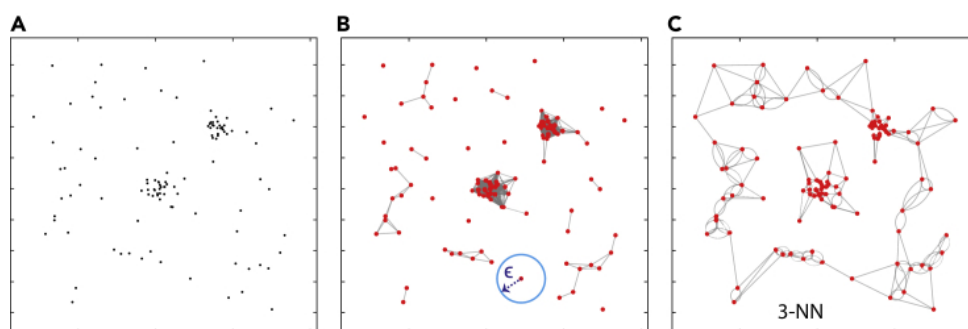


2.9. ábra. Voronoi tesszeláción alapuló klaszteranalízis szemléltetése [129]. A, Szimulált lokalizációk két klaszterrel és zajos háttérből adódó lokalizációkkal. **B,** A Voronoi cellák (vörös folytonos vonal) és Delaunay háromszögek (szürke szaggatott vonal) az A-n szemléltetett lokalizációkra. **C,** Voronoi cellák színekkel elkülönítve. A fehér cellák a nyitott régiókat jelölik.

A Voronoi mozaikozás egy meglehetősen gyors módszer és klaszterben lévő szub-klaszterek keresésére is könnyedén alkalmazható, valamint létezik 3D kiterjesztése is [139]. Ennél a módszereknél azonban számolni kell egy szélhatással, mivel a szegmentált klaszterek szélén lévő molekulákhoz nagyobb Voronoi cella tartozik, ami megakadályozza, hogy azok a lokalizációk hozzájáruljanak a klaszterezedőshez. Ennek kezelésére születtek megoldások [139], azonban néhány klaszterhatáron lévő valós klaszterelem kirekesztődhet a talált klaszter elemek közül.

2.10.5. Gráf alapú módszerek

A gráfok matematikai struktúrák, amik egy rendszer valamilyen objektumai között teremtenek kapcsolatot. Az objektumok a csomópontok, és a köztük lévő kapcsolatot az élek jelképezik [142]. SMLM adatok esetén a lokalizációs koordináták között keressük a kapcsolatot. Attól függően, hogy milyen szempont alapján húzunk be éleket a lokalizációk között, különböző gráf alakzatokat kapunk (2.10. ábra). Khater és mt. széleskörűen tanulmányozták a gráf elmélet alkalmazhatóságát SMLM adatra, megmutatva, hogy a módszert fel lehet használni előfeldolgozásra, mint az azonos molekulákhoz tartozó lokalizációk összecsoportosítása vagy a zaj eltávolítása, de utófeldolgozásra is, mint a minta strukturális vizsgálata [87, 143–145].



2.10. ábra. Gráf-alapú klaszteranalízis szemléltetése [129]. **A**, Szimulált lokalizációk két klaszterrel zajos háttéren. **B**, Hálózatok szemléltetése, amikben minden **A**-n jelölt lokalizáció össze van kötve az összes olyan lokalizációval, ami az ϵ sugarú környezetében van. **C**, Hálózatok szemléltetése, amikben minden **A**-n jelölt lokalizáció össze van kötve a 3 legközelebbi szomszédos lokalizációval.

2.10.6. Bayes-féle módszer

A Bayes-féle megközelítés fő célja, hogy csökkentse a felhasználó által választott önkényes paraméterek számát. Az analízis egy meghatározott modellt feltételezve kezdeti valószínűséget ad arra, hogy egy hipotézis igaz, majd minden újabb bejövő információ frissíti ezt a kezdeti valószínűséget. A *priori* modell lehet, hogy a molekuláris pozíciók egy klaszteren belül gömbszimmetrikusan Gauss-eloszlást követnek, a kezdeti valószínűség pedig ahhoz az állításhoz van rendelve, hogy egy molekula klaszterhez tartozik-e. Minden újabb pozíciót

megvizsgálva csökken vagy nő ez a kezdeti valószínűségünk. Az emberek gyakran hasonló módon tanulnak a mindennapi életünk során: frissítik az átmeneti következtetéseiket, ahogy új információt kapnak. Az irodalomban találunk példákat Bayes-féle alapú módszerek használatára SMLM adatok klaszteranalízisében [15, 146, 147], amit 3D-s adatsorra is kiterjesztettek [148].

A módszer egyik előnye, hogy a statisztikus módszerekkel szemben nem csak a klasztereződést képes kimutatni, hanem az egyedi klasztereket is detektálni lehet vele. Bár vannak megközelítések, melyek még képesek erre (DBSCAN, Voronj-tesszeláció), de a Bayes-féle módszer nem igényli bemenő paraméterek megadását a felhasználótól.

A módszer hátránya, hogy modellezési feltétellel él. Ha tehát a megfigyelt molekuláris eloszlást nem lehet egy modellel közelíteni, akkor a szegmentációs módszerek (mint amilyen a korábban említett DBSCAN vagy Voronj mozaikozás) megfelelőbbek lehetnek. Továbbá a módszer csak akkor generál kvantitatívan megbízható eredményeket, amikor a többszörös felvillanás korrigálva van, illetve az algoritmusuk detektálhatósági limitje 6 lokalizáció/klaszter körüli [146]. További hátrány, hogy az analízis meglehetősen nagy számítási igényrel rendelkezik.

2.10.7. Gépi tanulós módszerek

A gépi tanulás a mesterséges intelligencia egy gyorsan fejlődő ága. Egy számítógépes programra akkor lehet azt mondani, hogy „tanul”, ha egy feladatot bejövő tapasztalatok során egyre jobb teljesítménnyel végez el. Két fő ága van, a felügyelt és a felügyelet nélküli gépi tanulás.

Felügyelt gépi tanulás során ismert adattal tanítjuk az algoritmust. A tanítás után az algoritmus képes lesz hasonló mintázatok felismeri korábban nem látott, ismeretlen adatban. Gépi tanulás megvalósítására népszerű és hatékony eszközök a neurális hálózatok. Egy neurális hálózatban az ún. neuronok, mint önálló egységek valamilyen bemenő értékek alapján egy kimenő értéket generálnak, ami aztán egy másik neuron bemenetéül szolgálhat. A hasonló funkciókat betöltő neuronokat rétegekbe csoportosíthatjuk, a rétegek összecsoportosítása pedig maga a neurális háló. A tanítás során a rétegek belső

paramétereit hangoljuk oly módon, hogy optimalizáljuk a neurális háló teljesítményét, azaz a bemenetből előállítsuk a kívánt kimenetet. A neurális hálók SMLM adatokra való alkalmazásánál azzal a problémával szembesülünk, mint általában a többi létező adatfeldolgozási módszer esetén: a létező algoritmusokat tipikusan rasterizált képek vizsgálatára tervezték és egy diszkrét adatsort, pl. pixelértékeket igényelnek bemenő adatként. Williamson és mt. [149] legközelebbi szomszédos távolság (NND) értékeket használták, hogy megfelelő bemenetet hozzanak létre egy neurális hálónak, ami aztán hatékonyan tudta azonosítani a klaszterizálódott lokalizációkat.

Felügyelet nélküli gépi tanulás során az algoritmus előzetes információk nélkül képes mintázatokat, csoportokat, klasztereket felismerni az adatban. Khater és mt. klaszterek gráf struktúrái alapján sorolta be a klasztereket különböző csoportokba [87].

A gépi tanulás egyik hátránya, hogy az algoritmus tipikusan egy fekete doboz. Visszakövethetetlen, mi történt az adattal, hogyan jutott el az algoritmus a kimenettől a bemenetig, ami bizalmatlanságot eredményezhet az eredmények iránt. További hátránya, hogy a tanítás általában nagy mennyiségű ismert, ún. címkézett adatot igényel. Egy hatékony megközelítés lehet, ha szimulációkkal hozzuk létre a tanító adatot.

2.11. Geometriai paraméterek meghatározása

Egy sejtbeli struktúra méretének meghatározása tipikusan a keresztmetszeti projekció alapján történik [150, 151]. Ez a látszólagos keresztmetszet a fluorofórok által alkotott profil lokalizációs precizitással vett konvolúciójának eredménye. A struktúra alakjának előzetes ismerete felhasználható a valós struktúra dekonvolúciójára a látszólagos keresztmetszeti profilból (2.11.b ábra). A struktúra ismeretének hiánya esetén a mögöttes struktúra keresztmetszeti profilját gyakran közelíthetjük Gauss eloszlással. Gauss eloszlás esetén a mért látszólagos félértékszélesség ($FWHM_{app}$) a valós félértékszélességgel ($FWHM_{true}$) és a lokalizációs precizitással ($FWHM_{loc}$) van kapcsolatban a következőképpen [152]:

$$FWHM_{app} = \sqrt{FWHM_{loc}^2 + FWHM_{true}^2} \quad (2.8)$$

$FWHM_{true}$ -t gyakran közelítik $FWHM_{app}$ -al. Ahogy a 2.11. ábra illusztrálja, a $FWHM_{app}$ -nak a valós dimenziótól való eltérése a $FWHM_{loc}$ -al összemérhető. Az eltérés kisebb méreteknél jelentősebb.

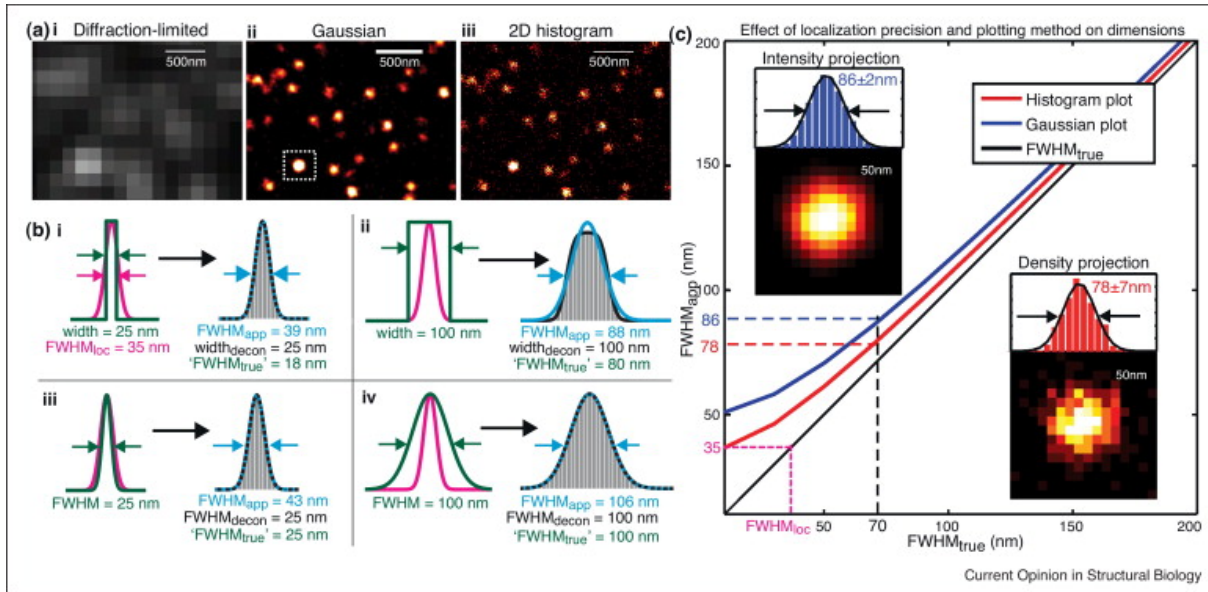
Lokalizációs adatsoroknál a strukturális dimenziók meghatározására több út is áll előttünk. Egyrészt a lokalizációk alapján létrehozhatunk egy nagyfeloldású képet. Ez történhet úgy, hogy a lokalizációs precizitás által meghatározott magvú Gaussos elmosást alkalmazunk a lokalizációs koordinátákon, vagy pixelizáljuk a lokalizációs adatsort (2.11.a ábra). Utóbbi esetben lényegében a lokalizációknak egy $2D$ -s hisztogramját hozzuk létre [153]. A pixelek értelmes méretét a lokalizáció precizitása szabja meg.

Ugyanakkor használhatjuk közvetlenül a lokalizációkat is méretmeghatározáshoz. Szikora és mt. a lokalizációkat használták fel szimmetrikus struktúrák (vonal, kettős vonal, sáv) különböző dimenzióinak megmérésére egy erre a feladatra íródott programmal [154, 155]. A szoftver a szimmetriatengelyt egy polinommal megilleszti, majd megméri a lokalizációk ettől való távolságát. Ezen távolságokból egy hisztogramot hoz létre, amit aztán a precizitás és linkerhossz figyelembe vételével megilleszt. Linkerhossz alatt a célmolekula és a fluorofór közötti távolságot kell érteni. A dimenziókat az illesztés paraméterei adják meg.

2.12. SMLM analízis eredményeinek hitelesítése

Az SMLM adatsorok kiértékeléséből kapott eredmények számos tényezőtől függhetnek, mint ahogy maga a kiértékelendő adatsor is számos tényezőtől függ [156, 157]. A minta előkészítéstől kezdve (fluorofórok, jelölési stratégia, pufferoldat összetétele, stb.) a mikroszkóp hardveres részein át (optikai elemek, detektor, stb.) egészen a leképezési és rekonstrukciós beállításokig (expozíciós idő, képkocka szám, rekonstrukciós algoritmus, stb.) minden hatással van a létrejövő adatsorra. A nem megfelelő paraméterek műtermékeket vezethetnek be, amik a kvantitatív kiértékelés eredményeit befolyásolják. A nem megfelelő kiértékelési módszer, illetve nem jól megválasztott kiértékelési paraméterek félrevezető vagy hamis eredményekhez vezethetnek. Fontos lenne tudni, hogy az eredmények megbízhatóak és a legmegfelelőbb kiértékelő algoritmust választottuk.

A minta ismeretét fel lehet használni SMLM adat hitelesítésre, legyen szó biológiai



2.11. ábra. Fizikai dimenziók mérése nagyfeloldású képeken [152]. **a,** Szimulált klaszterek diffrakció limitált képe ($FWHM = 70 \text{ nm}$) (i), a lokalizációk Gaussos elmosással létrehozott nagyfeloldású képe (ii) és 2D-s hisztogramja (iii). Az elmosás során használt σ (szórás) értéke az (ii) részábrán 15 nm . **b,** A mögöttes keresztmetszeti profilok (zöld) Gauss eloszlású lokalizációs precizitással konvolválva (magenta) a nagyfeloldású képen látható profilok (szürke) regenerálásához. A látszólagos profil Gauss görbével való megillesztéséből (cián) adódik $FWHM_{app}$. $FWHM_{true}$ értéke a a 2.8 összefüggésből származtatható, ami csak eredendően Gaussos eloszlású struktúrákra igaz (**a** részábrán iii és iv). A mögöttes struktúra előzetes ismeretével megszerezhető a valódi struktúra szélesség egy dekonvolúcióval (ahol a dekonvolúciós stuktúra szélessége $width_{decon}$, illetve $FWHM_{decon}$). **c,** Klaszterek valós és látszólagos mérete 2D-s hisztogrammal (vörös) és Gaussos elmosással kapott (kék) nagyfeloldású képeket használva. A grafikonon feltüntetett részábrák reprezentatív méréseket szemléltetnek 70 nm -es klaszterekről, amik fehér pontozott vonallal vannak jelölve a-n. Az y (ordináta) tengelymetszet a legkisebb mérhető $FWHM_{loc}$ értéket jelöli, amit a lokalizációs precizitás (magenta) határoz meg.

struktúrákról [97] vagy mesterséges objektumokról [158]. A különböző paraméterek kísérleti úton történő optimalizálása azonban időigényes és drága folyamat, továbbá erősen korlátozott is, hiszen az optimális paraméterek a leképezendő struktúrától függenek. A hitelesítéshez a szimulációs szoftverek nyújtják a legsokoldalúbb eszközt. Ilyen szoftverekben a minta paraméterei, a jelölés, valamint a felvétel paraméterei is szabadon variálhatóak *in silico*. Szimulációk persze nem adnak direkt kontrollt a végeredményre, de egyszerűbbé, olcsóbbá és gyorsabbá tudják tenni az optimalizálási folyamatot. Megvan bennük a lehe-

tőség, hogy tanulmányozzuk számos paraméter hatását és segít a végső nagyfeloldású kép magyarázatában, hitelesítésében, illetve a valós struktúrák és műtermékek megkülönböztetésében. A lényeg, hogy ebben az esetben pontosan tudjuk, hogy mi a „valós” struktúra és azzal tudjuk összevetni a különböző metódusokkal és paraméterekkel kapott eredményeinket. Néhány SMLM szimulációs szoftver a TestSTORM [159, 160], a SuReSim [161] és az SMeagol [162].

3. Célkitűzések

A nagyfeloldású mikroszkópai technikák új területet nyitottak meg a vizsgálatok előtt, mivel a fluoreszcens minta diffrakció limit alatti struktúráinak vizsgálatát tették lehetővé. SMLM során egyedi molekulák pozícióját határozzák meg mindössze néhány tíz nanométeres feloldással. A nyers lokalizációs felvétel viszont a korábbi mikroszkópos felvételektől alapvetően eltérő módon egy olyan adathalmaz, mely a lokalizált fluorofórok koordinátáit tartalmazza.

Céлом lokalizációs módszerrel nyert pontfelhők kvantitatív elemzése volt releváns biológiai kérdések megválaszolása érdekében, ami magában foglalta különböző kiértékelési eljárások kidolgozását, a szükséges mérések elvégzését, illetve az eredmények összevetését a biológiai kutatásokban széles körben elterjedt konfokális felvételek elemzéséből kapott eredményekkel. Különös hangsúlyt fektettem a molekulaszámlálásra, a klaszteranalízisre és a minta strukturális elemzésére. A kitűzött célokat az alábbi részfeladatokra bontottam:

- Célul tűztem ki klaszterek molekula tartalmának kvantitatív jellemzését közvetlenül a mérési fájl felhasználva, ami nem bonyolítja a mérési protokollt, valamint nem növeli meg a mérési időt.
- Olyan algoritmus létrehozását terveztem el, amellyel minél több szempontból tudom jellemezni a megtalált klasztereket, illetve amivel a klasztertulajdonságok eloszlását is meg tudom határozni. Célul tűztem ki, hogy ezen eredményeket összevegyem a konfokális technikával szerezhető eredményekkel, feltérképezve a korrelatív mérések lehetőségeit.
- Célul tűztem ki, hogy kvantitatív értékmérőket rendeljek filamentális szerkezetekről készült dSTORM felvételekhez, amik alkalmasak a szálas szerkezetek egymással való összevetésére.
- Motivációm volt pontfelhőkben lévő klaszterek strukturális jellemzése, beleértve a klaszterek alaki tényezőit, és azok egymással kialakított szerkezetét.

4. Módszerek és eszközök

Munkám során az AdOptIm csoport saját építésű mikroszkópján végeztem a méréseket. Ebben a fejezetben csak az általam használt módszerekre és eszközökre helyezem a hangsúlyt, nem teszek említést minden lehetőségről, amit a rendszer felkínál.

4.1. Felső kivilágítás

A mikroszkóp váz része egy 100 W-os D-LH/LC halogén lámpa, amit felső kivilágításra lehet használni. A rendszertovábbi szűrőkkel (ND, D, GIF és NCB), illetve a Köhler kivilágításhoz szükséges kollektor és kondenzor lencsékkel, valamint apertúra és mezőrekesssel.

4.2. Lézerek

A rendszerbe több látható tartományban működő lézer használható fluoreszcens gerjesztéshez. A későbbiekben csak a hullámhossz szerint utalok vissza rájuk.

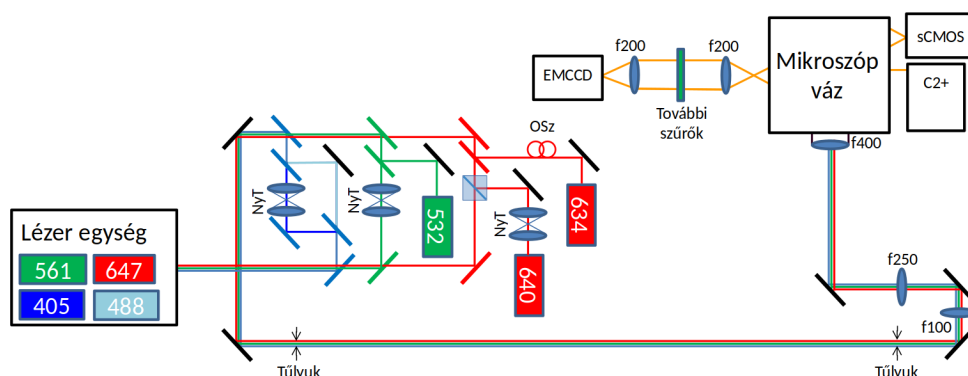
- 647 nm: MPB Communications Ltd. 2RU-VFL-P-300-647-B1, 300 mW.
- 640 nm: Cobolt Bolero, 300 mW.
- 634 nm: Thorlabs HL63133DG, 170 mW. A dióda egy Thorlabs TCLDM9 fejlben található, amit egy Thorlabs LDC500 vezérlő hajt meg.
- 561 nm: Cobolt Jive, 300 mW.
- 488 nm: Coherent Sapphire 488 LP-200, 200 mW.
- 405 nm: Nichia NDHV310APC, 70 mW. A dióda egy Thorlabs LDM9T fejlben található, amit egy Thorlabs LDC205C vezérlő hajt meg. A nyaláb polarizáció tartó optikai száalba van csatolva a térszűrés miatt.

A nyalábtágítás egy $3\times$ Galilei teleszkóppal történik.

4.3. AOTF

A rendszer része egy Nikon lézer egység, aminek része egy akusztó-optikai modulátor (AOTF). Az AOTF segítségével kényelmesen és gyorsan tudtam állítani a mintára eső lézerfény teljesítményét. A lézer egység két kimeneti porttal rendelkezik, egyik a széles látóterű, másik a konfokális megvilágításhoz.

Az általam használt rendszer felépítését a 4.1. ábrásematikusan ábrázolja. A széles látóterű megvilágítás esetén a különböző hullámhosszak a lézer egység után szét vannak választva, hogy mindegyik hullámhosszat egyedileg lehessen manipulálni (nyalábtágítás, polarizáció állítás, stb.), majd újra össze vannak fűzve. Bizonyos hullámhosszak (532 nm , 640 nm , 634 nm) csak ezen a szakaszon vannak felfűzve a nyalábútra, de ezeket az alábbiakban részletezett kísérletek során nem használtam.



4.1. ábra. Az AdOptIm labor mikroszkóp rendszerének sematikus ábrája. NyT: nyalábtágító, OSz: optikai szál, fxxx: xxx mm fókusz távolságú lencse.

4.4. Mikroszkóp váz

A mikroszkóp rendszer egy Nikon Eclipse Ti-E inverz vázra épül. A minta mozgatása egy motorizált xy asztallal és egy további z piezoval (MadCity Labs Nano-Zseries) lehetséges. A minta axiális irányú elmozdulását a Nikon Perfect Focus System-el lehet korrigálni.

A motorizált objektív tartóból azokat az objektíveket emelném ki, amelyeket a dolgozatomban részletezett eredményeim eléréséhez felhasználtam. A későbbiekben csak a nagyításuk szerint utalok az objektívekre.

- 20×: CFI S Plan Fluor ELWD 20XC, változtatható fedőlemez korrekciójú levegő immerziós, 0,45-ös NA objektív amit kereséshez használtam.
- 60×: CFI Plan Apo Lambda 60X Oil, képsík korrekciót tartalmazó, 1,4-es NA olaj immerziós objektív, amit elsősorban CLSM mérések esetén használtam.
- 100×: CFI Apo TIRF 100XC Oil, változtatható fedőlemez korrekciójú, 1,49-es NA, olaj immerziós objektív, főként dSTORM mérésekhez.

A mikroszkóp motorizált szűrő tartójában az alábbi dikroikus tükör és emissziós szűrő kombinációkat lehet választani:

- Semrock Di03-R405/488/561/635 + Semrock FF01-446/523/600/677
- Semrock Di01-R405/488/532/635 + Semrock FF01-446/510/581/703
- Semrock Di03-R635 + Semrock BLP01-647R
- Chroma ZT458rdc + Chroma EP460lp

4.5. Detektor karok

A mikroszkóp vázon összesen négy portra szerelhető detektor, de ebből csak három van használva:

- *E100*: Az okulár és az oldal port, amin egy Cairn OptoSplit II+Bypass rendszer található egy Andor Zyla 4.2 sCMOS kamerával. A detektor és a okulár között mechanikusan lehet váltani.
- *L100*: Ezen a porton található a Nikon C2+ konfokális pásztázó fej, benne egy 4 sávós dikroikus tükör, amely a lézer egységből érkező lézer hullámhosszaihoz lett választva.
- *R100*: Ezen a porton található a dSTORM mérésekhez használt Andor iXon Ultra 897 EMCCD kamera (512×512 pixel, $16\mu m$ -es pixel mérettel). A detektor előtt egy egyszeres nagyítású, két tubuslencséből (Thorlabs ITL200) álló $4f$ teleszkóp

található. Ez lehetőséget ad PSF módosító elemek (pl. az asztigmias 3D-s mérések során használt hengerlencse) és extra emissziós szűrők behelyezésére. Az R100 porton található 4f teleszkópban (a Fourier-síkban) egy további emissziós szűrőt lehetett beforgatni (Thorlabs FW102C).

4.6. Mintaelőkészítés

A mérések során a minták egy speciális pufferbe kerültek [163], amire a dSTORM-os mérések miatt volt szükség. A minta általában egy 170 μm -es fedőlemezen volt, amire 25 μl puffer oldat került. A puffer oldat PBS-ben feloldott vizes oldat volt, ami egy enzim-
atikus oxigén elnyelő rendszert (GloOx) tartalmazott: 2000 U/ml glukóz-oxidáz (Sigma-Aldrich, G2133-50KU), 40000 U/ml kataláz (Sigma-Aldrich, C100), 25 mM kálium-klorid (Sigma-Aldrich, 204439), 22 mM trisz(hidroximetil)aminometán (Sigma-Aldrich, T5941), és 4 mM trisz(2-carboxietil)foszfin (TCEP) (Sigma-Aldrich, C4706) 4 % (w/v) glukózzal (Sigma-Aldrich, 49139) és 100 mM β -merkaptotilaminnal (MEA) (Sigma-Aldrich, M6500). A pH 7,4-re lett állítva. A fedőlemez ezután a tárgylemezre lett fordítva és a két felület közötti, puffer oldattal telített térrészt egy kétkomponensű szilikon alapú ragasztóval zártuk le.

4.7. Fáziskontraszt mikroszkópia

A Köhler kivilágítás beállítása után a fáziskontraszt kép előállításához a kondenzor lencse elé, annak elülső fókuszába be kellett forgatnom a megfelelő gyűrűdiafragmát. Az apertúra rekeszt érdemes volt teljesen kinyitni, hogy a fény biztosan átjusson a diafragmán. Ekkor az E100-as porton az okulár kivétele után jól megfigyelhető egy fényes gyűrű, amit diafragma tartójában lévő csavarokkal a képtér közepére állítottam. Ezután az mikroszkóp vázán lehetőség volt betekerni a gyűrűdiafragmához igazított fázisgyűrűt az objektív után. Ennek képe is látszódott az E100-as porton. A fázisgyűrű sötétebb képet a gyűrűdiafragma képéhez igazítottam, amit szintén csavarokkal tudtam megtenni. Ekkor az okulár visszahelyezésével az E100-as porton fáziskontraszt képet lehetett megfigyelni.

4.8. CLSM

A CLSM felvételekhez az *L100*-as portra szerelt Nikon C2+ konfokális pásztázó fejet használtam. A konfokális és dSTORM méréseket szekvenciálisan hajtottam végre, gyakran ugyanazzal az objektívvel, hogy minimalizáljam a minta eltolódást a két mérés között és könnyítsem a képregisztrációt. A felvétel beállításait a Nikon NIS-Elements 5.02 szoftverrel vezéreltem és a felvett képeket az ImageJ-Fiji programmal jelenítettem meg [164]. A gerjesztés fényerejét a Nikon lézer egységen keresztül az AOTF-el állítottam be. A felvételek során arra figyeltem, hogy a pixelméret és a axiális lépések mérete az objektívnek megfelelőek legyenek. A konfokális túlyuk méretét tipikusan $1,2 AU$ -ra, a PMT detektorok érzékenységét pedig 100-as HV értékre állítottam. A felvételek során a zaj csökkentése érdekében minden fókuszsíkról két képet készítettem, és azokat átlagoltam.

4.9. dSTORM

A dSTORM mérések során a használt fluoreszcens jelölő tipikusan Alexa Fluor 647 volt. A gerjesztéshez ilyenkor $647 nm$ hullámhosszú széles látóterű kivilágítást alkalmaztam. Az intenzitás az AOTF segítségével $2 - 4 kW/cm^2$ -re állítottam a mintán. A reaktivációhoz a $405 nm$ -es hullámhosszú lézert használtam. A gerjesztési és emissziós fény spektrális szétválasztására a Semrock Di03-R405/488/561/635 és FF01-446/523/600/677 szűrőket használtam egy további AHF 690/70 H emissziós szűrővel. Detektornak az Andor iXon3 897 BV EMCCD kamerát használtam $20 - 30 ms$ -os expozíciós idővel és 200-as EM erősítéssel. A kamerát a mérések során $-75^\circ C$ -ra lehűtöttem. Egy nagyfeloldású kép elkészítéséhez $20 - 50$ ezer képkockát vettem fel. A fedőlemez fókuszban tartásához a Nikon PFS rendszer folyamatosan aktív volt. Az asztigmias $3D$ -s mérésekhez egy további $4 m$ fókusztávolságú hengerlencsét helyeztem a fényútba, az *R100* port után a $4f$ rendszer első lencsége elé, a váztól $14,2 cm$ -re.

4.10. Használt szoftverek

A munkám során megírt, illetve használt szoftvereket MATLAB környezetben futtattam. A pontfelhők kvantitatív elemzéséhez írt programkódokat részletesebben az eredményeim ismertetése során tárgyalom (szakasz 5), itt csak két olyan szoftvert mutatok be, amiket gyakran használtam.

4.10.1. rainSTORM

A nagyfeloldású képek rekonstrukciója a csapat által fejlesztett lokalizációs szoftverrel, a rainSTORM-mal [165, 166] történt. Az egyedi felvillanások megillesztése kétdimenziós Gauss-függvénnyel történt a legkisebb négyzetek módszerével. A szoftver a fluorofór koordinátájának a képre illesztett függvény maximumhelyét vette. Az egyes felvillanásokat lehetőség volt konstans vagy lineáris háttérrel, illetve szimmetrikus (2D-s mérések esetén) vagy elliptikus (asztingmiás 3D-s mérések esetén) Gauss-függvénnyel illeszteni. A rekonstrukció során a szoftver a lokalizációs koordinátákat és a hozzájuk tartozó meta adatokat egy CSV fájlba mentette el. Emellett létrehozott egy összeg képet, ami a felvétel során készült képkockák összegzésével, majd a pixelértékek valamilyen dinamikus tartományra történő lenormálásával hozott létre, illetve egy nagyfeloldású pixelizált képet, ami egy 2D-s hisztogram, amely az egyes szuper-pixelet úgy alakította ki, hogy az adott területre eső lokalizációk számát feleltette meg a beütésszámnak. A mechanikai mozgás vagy termális hatások miatt fellépő minta eltolódást egy kereszt korreláción alapuló algoritmussal analizáltam és csökkentettem le [167]. A rekonstrukcióhoz tipikusan a legalább 45 nm-es precizitással detektált lokalizációkat használtam.

4.10.2. TestSTORM

A TestSTORM [159, 160, 168] egy tesztminta generáló program, amellyel előre beállított mintával, jelöléssel és képkészítési paraméterekkel lehet szimulációs mérési fájlokat legenerálni, amik aztán rainSTORM-ban rekonstruálhatóak és kiértékelhetőek. A szoftver lehetőséget ad asztigmiás 3D-s mérések szimulációjára is. A TestSTORM jól használható eredmények hitelesítésére, műtermékek felderítésére és a méréshez optimális képkészítési

paraméterek megválasztására.

5. Új tudományos eredmények

Ennek a fejezetnek célja, hogy áttekintést adjon a kitűzött célokhoz kapcsolódó eredményemről. Az eredményeimet négy alfejezetben tárgyalom, melyekben részletesen kifejtem az alkalmazott mérési és kiértékelési eljárásokat, valamint a következtetéseimet. Az alfejezeteket a megfogalmazott tézispontjaimmal zárom, melyek tömör összefoglalását adják az eredményeimnek.

5.1. Célmolekulaszám meghatározása dSTORM mérések során direkt kalibrációval

A biológiai, illetve patológiai folyamatokat nem szigorúan a biomolekulák (fehérjék, nukleinsavak, stb.) jelenléte vagy hiánya irányítja, hanem az ezek számában bekövetkező változások. Az egyedi fluorofórok lokalizációja megnyitotta az utat arra, hogy kvantitatívan beszéljünk ezek mennyiségéről. Azonban a pontos számok meghatározása sok kihívást rejt magában. A fotokapcsolható fluoreszcens fehérjék (PAFP-k) ismert 1:1 jelölési sztöchiometriája miatt molekula számlálós problémáknál a PALM népszerű technika, de hátrányt jelent a PAFP-k gyenge jele, ami nem csak a detektálhatóság, hanem a precizitás szempontjából is limitáló tényező. A kis méretű szerves festékmolekulák jobb fotostabilitásuk és nagyobb fotonhozamuk miatt vonzó alternatívát jelentenek, azonban ezek sztochasztikus viselkedése és a gyakran elsődleges és másodlagos antitesteken keresztül megvalósuló jelölési technikával való párosítása nehezíti a molekula számlálós feladatokban való használatukat. Születtek javaslatok a túlszámlálás meghatározására ilyen peremfeltételek mellett, azonban ezek gyakran kalibrációs mérésekkel történnek, amik nem csak a mérés menetét bonyolítják, de a fluorofórok kémiai környezetre érzékeny viselkedése miatt is megkérdőjelezhetőek.

Célom olyan módszer kidolgozása volt, ami közvetlenül a dSTORM mérési fájlokat felhasználva a mintában tud becslést adni a túlszámlálás mértékére. Továbbá célul tűztem ki, hogy mindezt egy felhasználóbarát módon valósítsam meg, ami nem bonyolítja jelentősen a mérési protokollt és nem növeli meg a mérési időt. Motivációm volt továbbá kettős

szálú DNS törések (DSB-k) egyik jelző fehérjéjének, a γ H2AX hisztonnak [169] számszerű megbecslése. A DSB-k tanulmányozásának biológiai relevanciája jelentős. Ezek a legveszélyesebb DNS sérülések, mivel rosszul vagy lassan kijavított hibák tumoros folyamatok elindulásához vezethetnek [170].

5.1.1. Fluoreszcens festékmolekulák fotofizikai modellezése

A problémát a fotokapcsolási folyamat modellezésével közelítettem meg. Lokalizációs felvételek során a felvillanások (aktivációk) közvetlenül mérhetőek. Az egyedi fluorofórokhoz tartozó aktivációk számának és időfüggésének elméleti leírása érdekében a fotokapcsolási folyamatot Nieuwenhuizen és mt. [113] munkája alapján modelleztem. A fluorofórok fotokapcsolási mechanizmusának nem minden részlete letisztázott, de jól elkülöníthető három, kritikus fontossággal bíró állapot, ami alapján létre lehet hozni egy egyszerű modellt [171, 172]. Ezek az állapotok:

0: Kikapcsolt vagy sötét állapot, amikor a fluorofór hosszú élettartamú, nem gerjeszthető állapotában létezik.

1: Bekapcsolt vagy fluoreszcensen aktív állapot, amikor a fluorofór gerjesztés hatására fotonokat bocsát ki.

2: Kifakult állapot, amikor a fluorofór szerkezetében irreverzibilis változás jött létre és többé nem fluoreszcens.

Az állapotok közötti átmenetek valószínűségét sebességi állandókkal jellemezhetjük. Az általam használt modell leírásához négy sebességi állandóra volt szükség: $k_{01}(0 \rightarrow 1)$, $k_{10}(1 \rightarrow 0)$, $k_{02}(0 \rightarrow 2)$, és $k_{12}(1 \rightarrow 2)$. Ezek reciproka megadja az állapotok élettartamát. A folyamat modellezésénél a következő feltevésekkel éltem:

- Kifakulás a fluoreszcens és a sötét állapotból is lehetséges [113].
- A sebességi állandók a mérés során nem változnak. Ezt alátámasztja, hogy a mérés során használt pufferoldat 3–4 órán át használható volt, mielőtt észrevehető lett volna a villogás dinamikájának megváltozása.
- A mintában nincsenek olyan lokális különbségek, amelyek szignifikáns eltérést ered-

ményeznek az azonos intenzitással gerjesztett festékmolekulák között, mivel a minta permeabilizálása miatt a pufferoldat mindenhová eljut és a festékmolekulák mindig a másodlagos antitestekkel érintkeznek közvetlenül.

- A szerves festékmolekulák nagy fotonhozama miatt a kiértékelés során a felvillanások számát egyenlővé tettem a lokalizációs számmal, vagyis feltettem, hogy az összes bekapcsolt állapotot detektáltam a mérés során.

A fluorofórok nagy része gerjesztés hatására gyorsan bekerül a sötét állapotba és ott „megreked” (5.1.a ábra), mivel annak élettartama nagyságrendekkel nagyobb, mint a bekapcsolt állapot élettartama (a levezetést lásd a függelékben: F1 szakasz). Így a fluorofóroknak mindig csak egy kis százaléka lesz fluoreszcensen aktív. A kezdeti tranziens szakasz után beálló állapot a kifakulás miatt nem állandó (5.1.b ábra). A sötét állapot teljes kiürülési sebességi állandója: $k_0 = k_{01} + k_{02}$ és a fluoreszcens állapot teljes kiürülési sebességi állandója: $k_1 = k_{10} + k_{12}$. Érdekes bevezetni két fizikailag releváns sebességi állandót, a fotokapcsolási (k_{sw}) és a kifakulási sebességi állandót (k_{bl}) [113]:

$$k_{sw} = \frac{k_0 \cdot k_1}{k_0 + k_1} \quad (5.1)$$

$$k_{bl} = \frac{k_0 \cdot k_1 - k_{01} \cdot k_{10}}{k_0 + k_1} \quad (5.2)$$

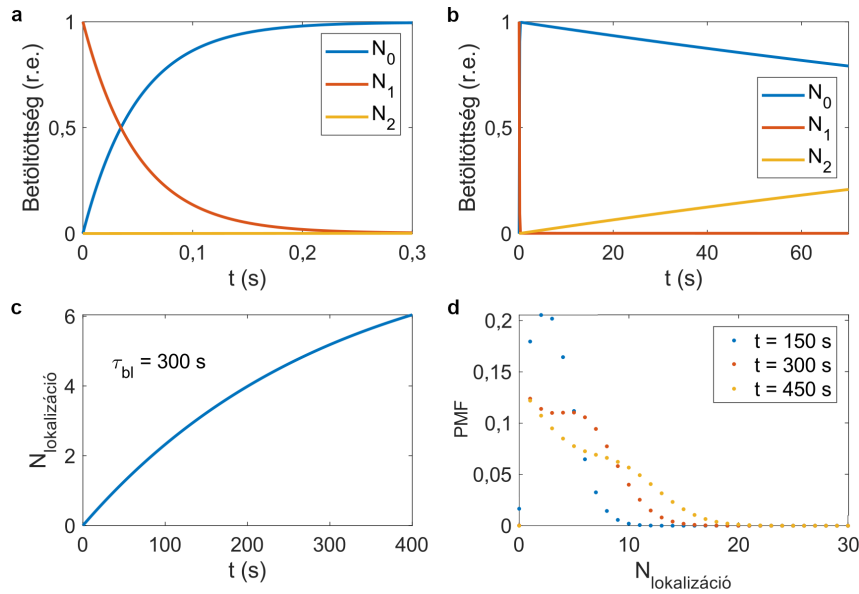
Ezeknek reciproka a kapcsolásra, illetve a kifakulásra jellemző időtartamokat adják meg ($\tau_{sw} = 1/k_{sw}$ és $\tau_{bl} = 1/k_{bl}$). Az aktivációk számának várható értéke ezek alapján [113]:

$$\langle N_{\text{lokalizáció}}(t) \rangle = \frac{k_{sw}}{k_{bl}} (1 - e^{-k_{bl} \cdot t}) \quad (5.3)$$

A lokalizációs szám változása direktén mérhető, ebből adódóan a lokalizációs szám időbeli változásának megillesztésével megkaphatjuk k_{bl} vagy τ_{bl} értékét (5.1.c ábra). Az illesztett függvény az 5.3 képletnek csupán konstansszorosa lesz. Egy festékmolekula m -szeri aktivációjának valószínűsége [113]:

$$P_m^1 = (1-b)^m \frac{r^m}{m!} e^{-r} + b \cdot (1-b)^{m-1} \sum_{n=m}^{\infty} \frac{r^n}{n!} e^{-r} \quad (5.4)$$

ahol $r = k_{sw} \cdot t$ és $b = k_{bl}/k_{sw}$. Látszik, hogy a valószínűségi eloszlás egy Poisson és egy geometriai eloszlásból tevődik össze. Ha $k_{bl} \cdot t \ll 1$, akkor a Poisson eloszlás dominál, ha $k_{bl} \cdot t \gg 1$, akkor a geometriai eloszlás dominál (5.1.d ábra).



5.1. ábra. Fluorofórok fotofizikai modellezése. a, Állapotok betöltöttsége az idő függvényében a tranziens tartományban. **b,** Állapotok betöltöttsége az idő függvényében a tranziens állapotok lecsengése után. **c,** Az aktivációk számának várható értéke az idő függvényében. **d,** Az aktivációk számának valószínűségi tömegfüggvénye egy festékmolekula esetén három időpillanatban. $k_{01}=1/41,6 \frac{1}{s}$; $k_{10}=1/0,05 \frac{1}{s}$; $k_{12}=1/300 \frac{1}{s}$; $k_{02}=1/300 \frac{1}{s}$ (a–d)

5.1.2. Aktivációk számának eloszlása tetszőleges számú fluorofór esetén

Immunjelölés esetén elsődleges antitestekkel specifikusan megjelölik a célmolekulákat, amikhez aztán a festékmolekulákkal megjelölt másodlagos antitestek kapcsolódnak. Ezek száma valamilyen eloszlással bír, de az egyszerűség kedvéért a várható értékeket írom fel. Így egyetlen célmolekulához tartozó fluorofórok várható száma:

$$N_{\text{jelölés}} = N_{\text{elsődleges}} \cdot N_{\text{másodlagos}} \cdot N_{\text{festék}} \quad (5.5)$$

ahol $N_{els\ddot{o}dleges}$ a célmolekulához kötött elsődleges antitestek várható száma, $N_{másodlagos}$ a másodlagos antitestek várható száma egy elsődleges antitesten, $N_{festék}$ pedig a másodlagos antitestekhez kapcsolt festékmolekulák várható száma. $N_{els\ddot{o}dleges}$ és $N_{másodlagos}$ értéke függ az antitestek számára hozzáférhető epitópok számától, illetve a jelölési protokolltól. $N_{festék}$ értéke az antitestekhez kapcsolt fluorofórok számától függ, amit a gyártási folyamat határoz meg. Összességében az egy célmolekulához tartozó lokalizációk száma:

$$N_{lokalizáció} = N_{jelölés} \cdot N_{aktiváció} \cdot N_{élettartam} \quad (5.6)$$

ahol $N_{lokalizáció}$ egy fluorofór fluoreszcensen aktív állapotának száma a mérés során, $N_{élettartam}$ pedig a bekapcsolt állapot élettartama expozíciós időben kifejezve. $N_{élettartam}$ abból adódik, hogy egy felvillanás több egymást követő képkockán is látszódhat, ezzel mindegyiken egy külön lokalizációt eredményezve. N darab egymástól független festékmolekula m kapcsolási ciklusának valószínűsége az összes lehetséges variáció valószínűségének az összege:

$$P_m^N = \sum_{x_1+x_2+\dots+x_N=m} P_{x_1}^1 \cdot P_{x_2}^1 \cdot \dots \cdot P_{x_N}^1 \quad (5.7)$$

ahol P_m^N annak a valószínűsége, hogy N db fluorofórhoz m db aktiváció tartozik, $x \cdots x_N$ pedig az $1 \cdots N$. festékmolekula fotokapcsolásainak számát jelöli. Az m kapcsolás N fluorofór közötti elosztása egy bijekciós probléma. A lehetőségek száma [173, 174]:

$$C_m^N = \binom{m+N-1}{N-1} \quad (5.8)$$

Megmutatható, hogy 30 aktivációt 8 festékmolekula több mint 10^6 -féleképpen tud produkálni (10295472 db lehetőség). Ennyi valószínűség kiszámítása nagy számítási kapacitást igényel, valamint minden lehetőségre külön egyenlet felírását, ezért a számoláshoz egy mátrixos reprezentációt használtam a hatékony kezelhetőség miatt. Ehhez az adott epitóphoz tartozó fluorofórokat független csoportokra osztottam. Tegyük fel, hogy N független festékmolekula tartozik a célmolekulához és m kapcsolási cikluson mennek keresztül. Más

szóval m felvillanást detektálunk, de nem tudjuk, hogyan oszlik el ez a fluorofórok között. Osszuk fel az epitóphoz tartozó N számú fluorofórt két független csoportra: K és $N - K$. Ha az első csoporthoz x_1 aktiváció tartozik, akkor a másikhoz $x_2 = m - x_1$, vagyis a valószínűség:

$$P_m^N = \sum_{x_1+x_2=m} P_{x_1}^K \cdot P_{x_2}^{N-K} \quad (5.9)$$

vagyis

$$P_m^N = \sum_{i=0}^m P_i^K \cdot P_{m-i}^{N-K} \quad (5.10)$$

A lehetséges eseteket egy \mathbf{P}_m^N $2D$ -s mátrix formájába rendezhetjük az alábbi módon, aminek m . mellékátlója mentén vett elemeinek összege megadja $m - 1$ kapcsolási ciklus valószínűségét (mivel 0 aktiváció is lehetséges):

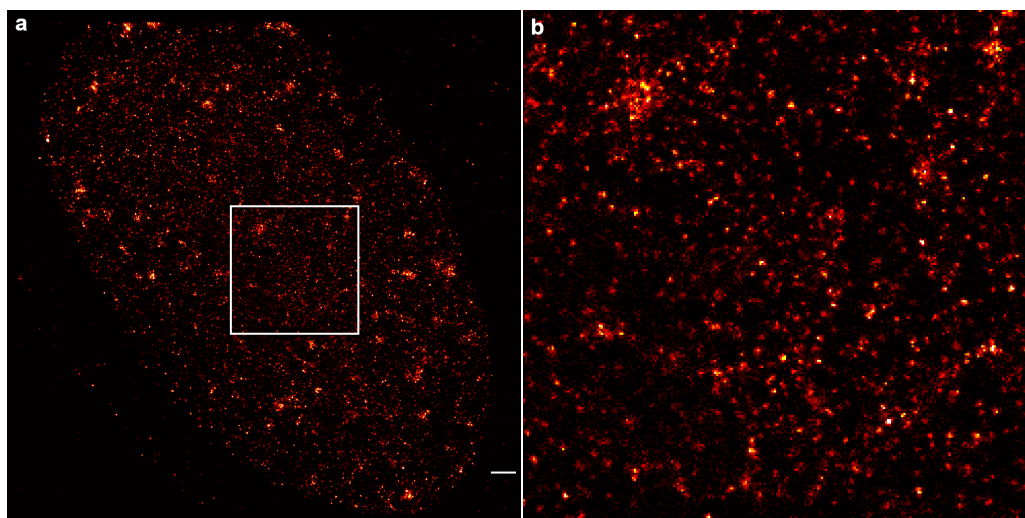
$$\mathbf{P}_m^N = \begin{pmatrix} P_{0,0}^N & \cdots & P_{0,m}^N \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ P_{m,0}^N & \cdots & P_{m,m}^N \end{pmatrix} \quad (5.11)$$

ahol $P_{j,k}^N$ annak a valószínűsége, hogy az egyik fluorofór j , a másik pedig k aktiváción megy keresztül. Az 5.11 képlet alapján belátható, hogy az aktivációk számának növelésével a valószínűség nullához tart. Továbbá mivel az eloszlás függvény alatti terület 1-hez tart, a sornak konvergensnek kell lennie, tehát a nagy kapcsolási ciklusokra nem szükséges kiszámolni a valószínűségeket. Ha m aktiváció valószínűségét akarjuk kiszámítani, akkor a mátrixot addig szükséges kitölteni, hogy $m + 1$ sora és $m + 1$ oszlopa legyen, ami egy négyzetes mátrix. A mátrix mellékátló alatti elemeinek kiszámítása redundáns, mivel a mátrix szimmetrikus. A mellékátlókban szereplő elemek összegei adják meg a kvantált valószínűségi tömegfüggvényt. Mivel az egy festékmolekulához tartozó eloszlás ismert (az 5.11 képlet), abból kiindulva az eloszlás néhány lépésben tetszőleges számú független festékmolekulát tartalmazó bekötési helyre megadható. A megoldandó egyenletek száma X molekula esetén $\lceil \log_2 X \rceil$. A dSTORM mérések során egy egyedi célmolekulához tehát egy klaszter rendelődik, aminek $N_{\text{lokalizáció}}$ elemszáma van. Ezt a klasztert nevezhetjük a célmolekula lábnyomának, $N_{\text{lokalizáció}}$ értékét pedig a rendszer válaszfüggvényének. A láb-

nyom méretét a lokalizációs precizitás és a szabadon körbeforduló linkerhossz (fluorofór és a célmolekula közötti távolság) fogja meghatározni.

5.1.3. γ H2AX válaszfüggvényének kísérleti meghatározása U2OS és DIvA sejtekben

A γ H2AX a kromatin strukturálásában szerepet játszó H2AX hiszton foszforilált változata és alapvetően a DSB sérülések biomarkere [175]. Ugyanakkor ez a módosulat kis arányban DSB nélkül is véletlenszerűen létrejöhethet [176], ami egyedi, jól elkülöníthető lábnyomokat eredményez a mérés során (5.2. ábra). Ez ideális célfehérjévé tette a válaszfüggvény tanulmányozására is.

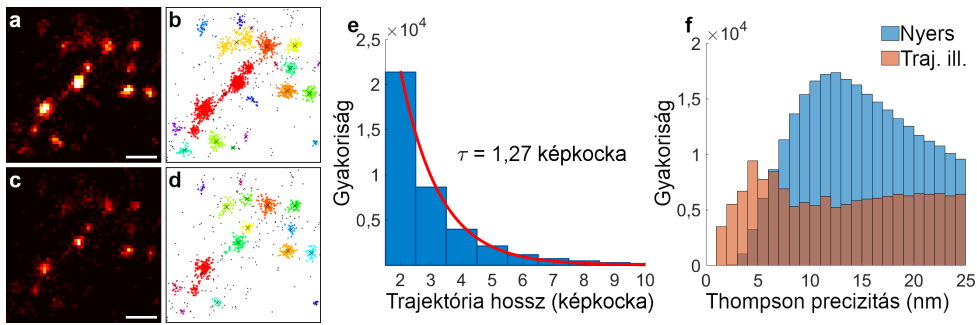


5.2. ábra. γ H2AX molekulák dSTORM felvétele U2OS sejtmagban. **a**, Egy kezeletlen sejtmag dSTORM képe. **b**, Az **a**-n fehér kerettel jelölt terület nagyított képe. Jól látszódnak az egyedi γ H2AX hisztonokhoz tartozó kis méretű foltok. A kinagyított terület oldalhosszúsága $5\ \mu\text{m}$. Skála: $1\ \mu\text{m}$ (**a**).

A válaszfüggvény kísérleti megállapításához dSTORM felvételeket készítettem kezeletlen (kontroll), illetve DSB indukáló karcinogén anyagokkal (Neocarzinostatin (NCS) és 4-Hidroxytamoxifen (4-OHT)) kezelt U2OS és DIvA sejtekről. A mérés során törekedtem az optimális expozíciós idő beállítására. Annak növelésével nagyobb eséllyel detektálok egy fluoreszcensen aktív állapotot egyetlen képkockán, vagyis több foton alkotja a molekula képet, ami az egyik legfontosabb paraméter a lokalizáció precizitásához. Ugyanakkor

megnövekedik a valószínűsége, hogy a molekulák képei átfednek, ami hamis vagy kiszűrt lokalizációkat eredményez, illetve növekszik a háttér, ami rontja a jel/zaj arányt. A fluorofórok egy része tehát elkerülhetetlenül több egymást követő képen is megjelenik, ezzel a nagy feloldású képen több lokalizációt is maga után hagyva, vagyis $N_{\text{élettartam}}$ értéke nagyobb lesz, mint 1. A mérési fájlokon a rainSTORM szoftverbe implementált algorit-mussal trajektória illesztést hajtottam végre, ami az egymást követő képeken az azonos fluorofórhoz tartozó lokalizációk társítását végezte el. Azokat a lokalizációs koordinátákat, melyek egymást követő képkockákon egymástól egy előre definiált R távolságnál közelebb voltak, az algoritmus egy darab beütésszámmal súlyozott átlag koordinátával helyettesítette. R értékét a lokalizációs precizitás alapján 25 nm -re állítottam. A trajektória hosszak ($N_{\text{élettartam}}$) eloszlása közelítőleg egy exponenciális eloszlás, aminek megillesztésével meghatározható a bekapcsolt állapot élettartama, ami fontos adat az optimális expozíciós idő beállításánál (5.3.c ábra). A trajektória illesztett adatsor kevesebb, de precízebb lokalizációkat eredményez (5.3.f ábra), ami segíti az egymáshoz közeli klaszterek különválasztást (5.3.b,d ábra). A trajektória illesztő algoritmust használata után az az 5.6 képletben lévő $N_{\text{élettartam}}$ lényegében 1-nek vehető.

A kezelés hatására létrejött DSB-k miatt a γH2AX hisztonok jól láthatóan klaszterizálódtak (5.4.a–c ábra). Ezeket a klasztereket fókuszoknak is nevezik. Ilyen fókuszok előfordultak ugyan a kontroll sejtekben is, azonban jelentősen kisebb számban. A trajektória illesztés után a γH2AX klaszterek detektálásához a DBSCAN algoritmust használtam. Ennek egyik oka az volt, hogy az algoritmussal a talált klaszterek különböző paramétereit (pl. terület, elemszám, stb.) egyedileg tudtam meghatározni és ezek a paraméterek alkalmasak voltak, hogy elkülönítsem a lábnyomokat a nagyobb fókuszoktól. A klaszterekhez egyedi paramétereket a Voronoi algoritmussal is lehetett volna rendelni, de a mozaikozásnál nehezen kezelhetőek a klaszterek szélén lévő lokalizációk, így könnyen kaphattam volna kisebb területű és elemszámú klasztereket, mint a valós érték, ami jelen esetben kritikus. A DBSCAN másik előnye az volt, hogy az ϵ paraméter adódott a precizitás és a linkerhossz értékéből, ezek az értékek pedig ismertek. Az általam beállított értékeket ezek alapján: $\epsilon = 15\text{ nm}$ és $N_{\text{min}} = 5$. A megtalált klaszterek területét a lokalizációk konvex

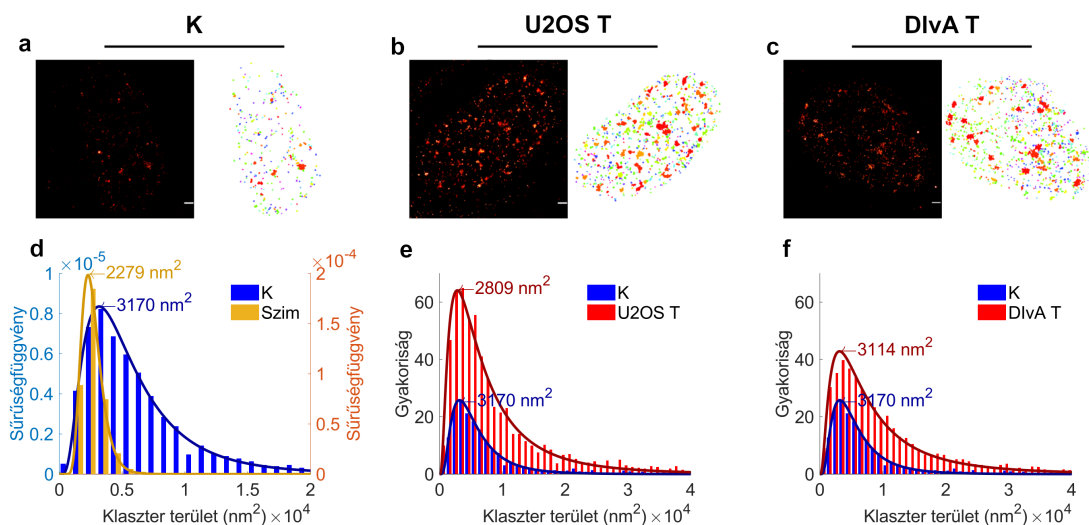


5.3. ábra. A trajektória illesztés eredménye. **a**, Egy sűrűbb terület dSTORM képe. **b**, Az **a** terület klaszteranalízisének grafikus reprezentációja. **c**, Trajektória illesztés utáni dSTORM kép az **a** területről. **d**, A **c** terület klaszteranalízisének grafikus reprezentációja ugyanazokkal a paraméterekkel lefuttatva az elemzést, mint **b** esetén. **e**, A trajektória illesztéssel talált fluoreszcensen aktív állapotok hosszának eloszlása és a rá illesztett elméleti exponenciális függvény. A τ paraméter az illesztésből lett meghatározva és a fluoreszcensen aktív állapot élettartamát jelöli. **f**, A nyers lokalizációk (kék) és a trajektória illesztett lokalizációk (narancs) Thompson precizitásának eloszlása. Jól látszódik, hogy a trajektória illesztés után kevesebb, de precízebb lokalizációkat kapunk. A különböző színek a klaszterek elkülönítését szolgálják. (**b,d**) Skála: 200 nm. (**a,c**).

burkolójának területével azonosítottam. Megállapítottam, hogy a sejtekben talált klaszterek méreteloszlása log-normál görbével jól illeszthető. A kontroll sejtekben az eloszlás módusza 3170 nm^2 -nek adódott (5.4.d ábra) és ez az érték nem változott jelentősen a kezelés hatására (5.4.e,f ábra). Az eloszlások átlaga azonban 18 %-kal (8750 nm^2 - U2OS T), illetve 55 %-kal (11550 nm^2 - DlvA T) növekedett a kezelést követően a kontrollhoz képest (7450 nm^2). Vagyis a kezelés hatására a terület eloszlás a nagy méretű ($\geq 5000 \text{ nm}^2$) klasztereknél módosult, ezektől a klaszterektől pedig elkülöníthetőek az egyedi, endogén is jelenlévő γH2AX hisztonok.

A hitelesítéshez a TestSTORM szoftverrel is szimuláltam egyedi megjelölt epitópokról készült felvételt. A szimulációban a linker hosszát 20 nm-re állítottam, ami a jelölés során használt antitestek hozzávetőleges mérete. A méréshez hasonló jel-zaj viszonyal létrehoztam egy tiff képköteget, amin aztán a rainSTORM szoftverrel lefuttattam a lokalizációs algoritmust. A szimulált epitópokhoz tartozó klaszterek területeloszlásnak módusza hasonló a mérés során meghatározott értéknek (5.4.b ábra). A szimuláció és a mérés egyaránt megerősítette, hogy az egyedi γH2AX hisztonokhoz tartozó klaszterek területének maxi-

mum $\sim 5000 \text{ nm}^2$, és a leggyakrabban előforduló érték $\sim 3000 \text{ nm}^2$.

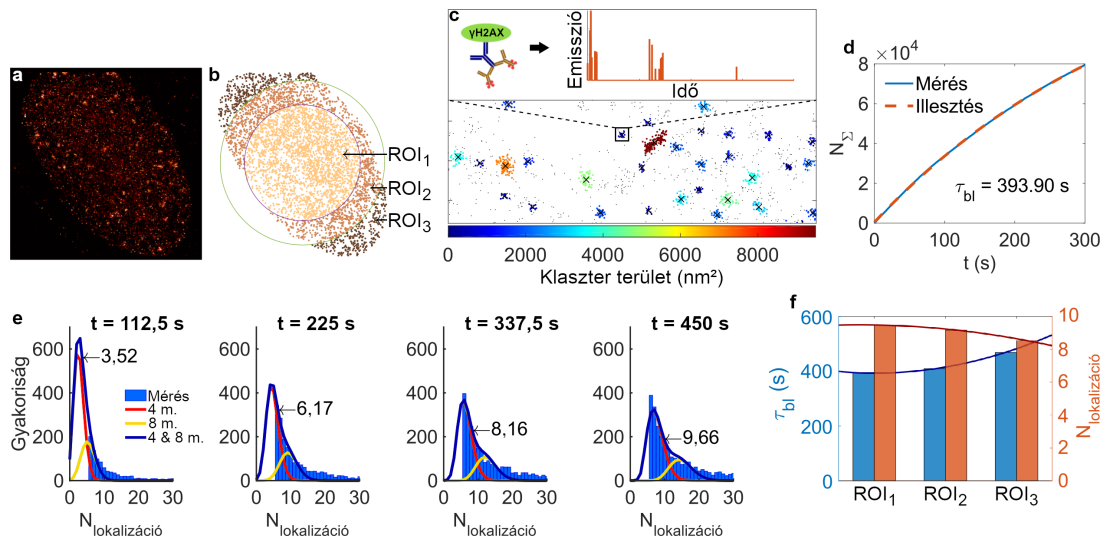


5.4. ábra. γH2AX klaszterek területeloszlásának vizsgálata. **a–c**, Kezeletlen (K), NCS-szel kezelt U2OS (U2OS T) és 4-OHT-vel kezelt DivA sejtek (DivA T) dSTORM és klaszteranalizált képe. **d**, A területeloszlások valószínűségi sűrűségfüggvénye kezeletlen U2OS sejtben és egy szimulált minta esetén (Szim). **e**, Kezeletlen és kezelt U2OS sejtben talált klaszterek területeloszlása. **f**, Kezeletlen és kezelt DivA sejtekben talált klaszterek területeloszlása. A nyilakkal jelölt értékek az eloszlások móduszait jelölik. (**d–f**) Az elemzés 5 db kezeletlen 4 db U2OS kezelt és 6 db DivA kezelt sejtben alapul. Skála: $2 \mu\text{m}$ (**a–c**).

Az egyedi epitópok válaszfüggvényének meghatározásánál figyelembe vettem, hogy a gerjesztési intenzitás hatással van a fluorofórok fotofizikai viselkedésére, ezért a dSTORM felvételeket intenzitás alapján 3 területre osztottam és külön vizsgáltam (5.5.b ábra). A gerjesztéshez használt megvilágítás centrális szimmetriája miatt a felosztáshoz koncentrikus köröket használtam és a létrejövő területeket külön vizsgáltam. A körök méretét úgy növeltem, hogy az epitópok száma mindegyik területen hozzávetőleg azonos legyen. Ehhez a sejtmagot ellipszissel közelítettem és Rámánudzsán közelítéssel [177] kiszámoltam a sejtmag kerületét. Ezután kiszámoltam a körök sugarát, hogy a terület 2-szer, illetve 3-szor nagyobb legyen a legkisebb sugarához képest, majd ezeket egy korrekció faktorral megszoroztam, ami az ellipszis területének és kerületének hányadosa volt. A sejtmag határát manuálisan rajzoltam körbe. Az adott régiókban klaszter terület alapján ($< 5000 \text{ nm}^2$) megkerestem az egyedi epitópokhoz tartozó klasztereket (5.5.c ábra). Minden terület-

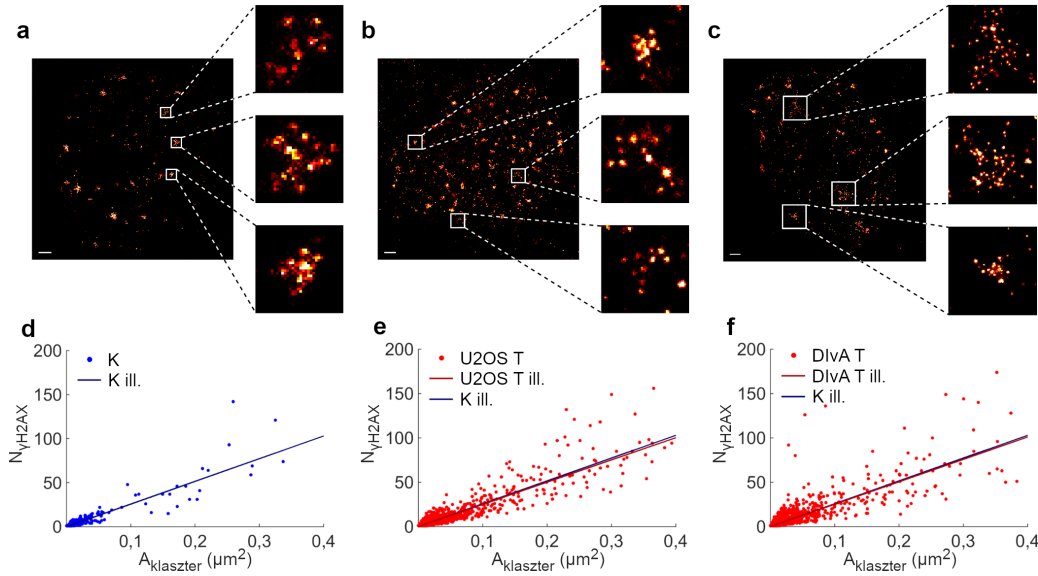
re meghatároztam a kifakulási rátát az összlokalizáció számára való illesztéssel az 5.11 képletet használva (5.5.d ábra). Az $N_{jelölés}$ meghatározásánál figyelembe vettem, hogy a hisztonok hozzáférhetősége miatt egyetlen elsődleges antitest tud hozzákötni a γ H2AX molekulához, a másodlagos antitest pedig két epitópot ismer fel az elsődleges antitestten [178]. A másodlagos antitesthez kapcsolt fluoreszcens molekulák száma a gyártóval való egyeztetésből adódóan 4. Következésképpen egy célmolekulához 4 vagy 8 festékmolekula tartozik, vagyis a válaszfüggvények illesztésénél ezen eloszlások lineárkombinációját használtam. Az illesztésnél figyelembe vettem, hogy a kezdeti 4 és 8 fluorofórhoz tartozó $N_{jelölés}$ arány nem változhat a mérés során (5.5.e ábra). A válaszfüggvények várható értékének meghatározásához a megtalált lábnyomok elemszám eloszlását megillesztettem az elméleti úton meghatározott görbével (5.5.e ábra). Az illesztésre a kis válaszfüggvények figyelembe vétele miatt volt szükséges, ugyanis ezeket – jelentős számuk ellenére – nem vagy nehezen lehet megtalálni klaszteranalízissel. DBSCAN esetén általános szabály, hogy a minimális klaszter elemszám az adat dimenziójának számából (D) adódik: $N_{min} = D + 1$, de a nagyobb számok tipikusan jobbak, ha az adat zajjal van terhelve [179, 180]. Az eloszlás időfejlődésének ismeretét is kihasználtam az illesztés során. A mérések időbeli feldarabolásával megfigyeltem, hogy az alkalmazott modell hogyan követi le az időfejlődést. Ehhez több időtartományra lefuttattam a klaszteranalízist és az illesztést, hogy megkapjam a válaszfüggvény eloszlásokat. Megfigyelhető volt, hogy az elemszám várható értéke az idő előrehaladtával nőtt, de ennek a növekedésnek mértéke egyre kisebb volt, ami jól megjósolhatóan a kifakulás hatására következett be. A vártaknak megfelelően τ_{bl} az intenzitás csökkenésével növekedett és ezzel együtt a fotokapcsolási sebességi állandó is megnőtt (5.5.f ábra). A két hatás közül a fotokapcsolási sebességi állandó növekedése volt jelentősebb, ami az aktivációs szám várható értékének növekedésében figyelhető meg.

Az epitópokhoz tartozó válaszfüggvényt felhasználva megbecsültem a fókuszok γ H2AX tartalmát. Ehhez lábnyomokra illesztett elméleti görbe várható értékével leosztottam a fókuszokkal azonosított klaszterek lokalizáció számát. Ha a jelölési hatékonyság megfelelő, akkor ez jó közelítést ad azok γ H2AX tartalmára. Azokban a sejtekben, ahol DNS törések lettek indukálva, a γ H2AX hisztonok számának megnövekedése és klaszterizálódása



5.5. ábra. Egyetlen epitóphoz tartozó válaszfüggvény meghatározása. **a**, Nagyfeloldású dSTORM felvétel egy kezeletlen U2OS sejtmagról γ H2AX jelölés esetén. **b**, A lokalizációk régiókba osztása a gerjesztési intenzitás alapján. **c**, Klaszter analizált kép a klaszter területtel színekódolva (lent) és sematikus ábrázolás egy egyedi γ H2AX hiszton immunjelöléséről és a hozzá tartozó emisszió időfüggéséről (fent). **d**, A mérés során detektált aktivációk száma az idő függvényében (kék görbe) és az erre illesztett elméleti görbe (piros szaggatott vonal). τ_{bl} az illesztésből lett meghatározva. **e**, Az 5000 nm^2 alatti klaszterek elemszámának eloszlása az idő függvényében és a rájuk illesztett elméleti modell. A nyilakkal jelzett értékek az illesztett görbe alapján meghatározott várható értékeket jelölik. **f**, A meghatározott τ_{bl} és $N_{lokalizáció}$ értékek a különböző régiókban.

volt megfigyelhető a kontroll sejthez képest (5.6.a–c ábra). A γ H2AX molekulák száma a fókuszokban egyenesen arányos volt a területtel és az illesztett egyenes meredeksége lényegében nem változott kezelés hatására (5.6.d–f ábra). Kezeletlen esetben a meredekség $(397 \pm 7) \gamma\text{H2AX}/\text{nm}^2$, kezelt U2OS esetben $(427 \pm 3) \gamma\text{H2AX}/\text{nm}^2$, és kezelt DIvA esetén $(412 \pm 4) \gamma\text{H2AX}/\text{nm}^2$. Az elemzés során $\epsilon = 50 \text{ nm}$ és $N_{min} = 8$ paramétereket használtam a fókuszok detektálásához.



5.6. ábra. γ H2AX klaszterek epitóp tartalmának méretfüggése. a–c, Reprezentatív kontroll, NCS kezelt U2OS és 4-OHT kezelt DIvA sejtek, valamint kiemelések a bennük található fókuszokról. d, Kezeletlen sejtekben található klaszterek γ H2AX tartalmának függése a klaszterek területétől és a rá illesztett egyenes. e, Kezelt U2OS sejtekben talált fókuszok becsült γ H2AX tartalma a klaszterek területének függvényében és a rá illesztett egyenes (piros vonal) összevetve a kontroll egyenessel (kék vonal). f, Kezelt DIvA sejtekben talált klaszterek γ H2AX tartalmának területfüggése és a rá illesztett egyenes összevetve a kontroll egyenessel. Az elemzés 5 db kezeletlen U2OS 4 db kezelt U2OS és 6 db kezelt DIvA sejten alapul. Skála: $1 \mu m$ (a–c).

5.1.4. A fejezethez kapcsolódó téziseim

A fluoreszcens molekulákat három állapotú rendszerrel modellezve meghatároztam egyedi megjelölt célmolekulához tartozó lokalizációk számának valószínűségi tömegfüggvényét tetszőleges jelölési arány esetén dSTORM mérések során. Számítógépes algoritmust fejlesztettem a mikroszkóp rendszer válaszfüggvényének meghatározására közvetlenül a lokalizációs adatsorból. Nagyfeloldású dSTORM méréseket végeztem U2OS és DIvA sejt-magokról és a kidolgozott módszerrel meghatároztam az általam használt rendszerben a kromatin szerkezetet felépítő alegységhez tartozó válaszfüggvényt.

Kapcsolódó publikációk: [A1, A2]

5.2. γ H2AX klaszterek kvantitatív tér- és időbontott vizsgálata

A biomolekulák elrendeződése fontos információt szolgáltat azok funkciójáról. Az elrendeződés tanulmányozásának egyik eszköze a klaszteranalízis. A klasztereződés kimutatása önmagában fontos és számos kérdés megválaszolásában segít, azonban a klaszterek kvantitatív jellemzése további összefüggések felfedezésére ad lehetőséget. A klaszterek különböző tulajdonságairól a leginformatívabb eloszlásokban beszélni, ezen eloszlások pedig tér- és időfüggőek lehetnek. A DNS kettős szálú töréseket jelező γ H2AX klaszterek időbontott vizsgálatát hajtottam végre röntgen sugárzással kezelt humán eredetű glioblasztóma (U251) sejteken. A mintákat az ELI-ALPS radiobiológiai kutatócsoportja hozta létre. A sugárkezelés hatásának tanulmányozása fontos a rákos betegségek kezelése szempontjából, hiszen az ionizáló sugarakkal szelektíven lehet elpusztítani a beteg sejteket.

5.2.1. Biológiai objektumok szegmentálása az összeg képek felhasználásával

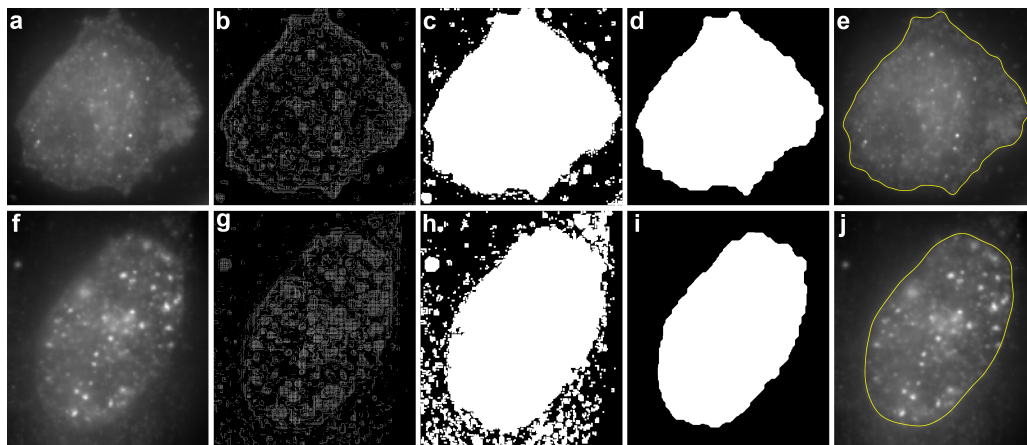
A klaszterek térfüggésének vizsgálatánál lényeges kontextusba helyezni azokat. Biológiai minták esetén lehet a maghártya vagy a sejtmembrán egy ilyen viszonyítási alap. Ezek a határok viszont – ha csak nem festődtek – a nagyfeloldású pontillista képeken láthatatlanok. A keresett struktúrák az autofluoreszcencia következtében kirajzolódhatnak ugyan egy fluoreszcens képen, de ennek jelét a lokalizációs algoritmus hatékonyan kiszűri. Azonban lokalizációs felvételekből is előállítható „hagyományos” fluoreszcens kép a mérés során készült képek összegzésével, majd a pixelértékek valamilyen dinamikus tartományra történő lenormálásával. Az így létrehozott képeket összegképeknek nevezem, amiket a keresett biológiai objektum szegmentálására használtam fel. A felvételekből 8 bites összegképeket hoztam létre. Ezeken a képeken a keresett objektum tipikusan fényesebb és kontrasztosabb volt, mint a háttér (5.7.a,f ábra). Ezt a két megfigyelést felhasználva az alábbi lépéseket hajtottam végre a szegmentáláshoz:

- I. Egy Sobel algoritmuson alapuló szélkeresést alkalmaztam az összeg képeken [181, 182], ami egy bináris képet hozott létre a éleket jelző vonalakkal. A szélkereső algoritmus a keresett biológiai objektum határvonalai mentén lévő nagy intenzitás

gradiens miatt jól kivehetően körbehatárolta a szegmentálandó területet. Ezen felül a vonalak a keresett biológiai objektum területen belül is sűrűbben voltak jelen (5.7.b,g ábra).

- II. Az objektumban lévő sűrűn elhelyezkedő vonalak közötti réseket két egymás után alkalmazott morfológiai dilatációs algoritmussal betöltöttem. A dilatációhoz használt strukturáló elemek 10 pixel hosszú vonalak voltak egymásra merőleges orientációval.
- III. Az objektum területén esetlegesen megmaradt lyukakat egy morfológiai rekonstrukciós algoritmussal betöltöttem [183, 184] (5.7.c,h ábra).
- IV. A dilatáció után a szegmentálandó objektum határai kitolódtak a valóshoz képest. Ezt egymás utáni eróziós algoritmusokkal korrigáltam, ami a háttérben lévő zajt is jelentős mértékben lecsökkentette. Az erózióhoz 10 pixel sugarú korong alakú strukturáló elemet használtam.
- V. Az erózió után egy morfológiai nyitást alkalmaztam, ami a háttérben megmaradt apróbb foltokat hatékonyan eltüntette, míg az ezeknél jóval nagyobb szegmentálandó objektum alakját és méretét jól megőrizte (5.7.d,i ábra). Ehhez 20 pixel sugarú korong alakú strukturáló elemet használtam.
- VI. A létrejött, objektumot jelző kép határán nem ritkán betüremkedések voltak megfigyelhetőek, amik nem a biológiai minta sajátosságai voltak. Ilyen struktúrák kitöltésére morfológiai zárást alkalmaztam. Strukturáló elemnek egy nagy méretű, 50 pixel sugarú korongot használtam.
- VII. A zárás után a bináris képen lévő alakzat már jól közelítette a keresett objektum alakját és méretét, határvonala azonban még természetellenesen töredezett volt, amit egy Gaussos maggal való szűréssel és újbóli binarizálással simítottam ki (5.7.e,j ábra).
- VIII. Az így szegmentált biológiai objektum határvonalát ezután a könnyebb matematikai kezelhetőség céljából egy sokszögű poligonnal közelítettem. Az objektumot határoló poligon csúcspontjait az összeg kép pixelkoordinátaiban adtam meg, amiket át

kellett konvertálnom, hogy megkapjam azok helyét a lokalizációs térben. Ezek után már ennek a határoló poligonnak a kontextusában tudtam vizsgálni a különböző klaszterparamétereket.

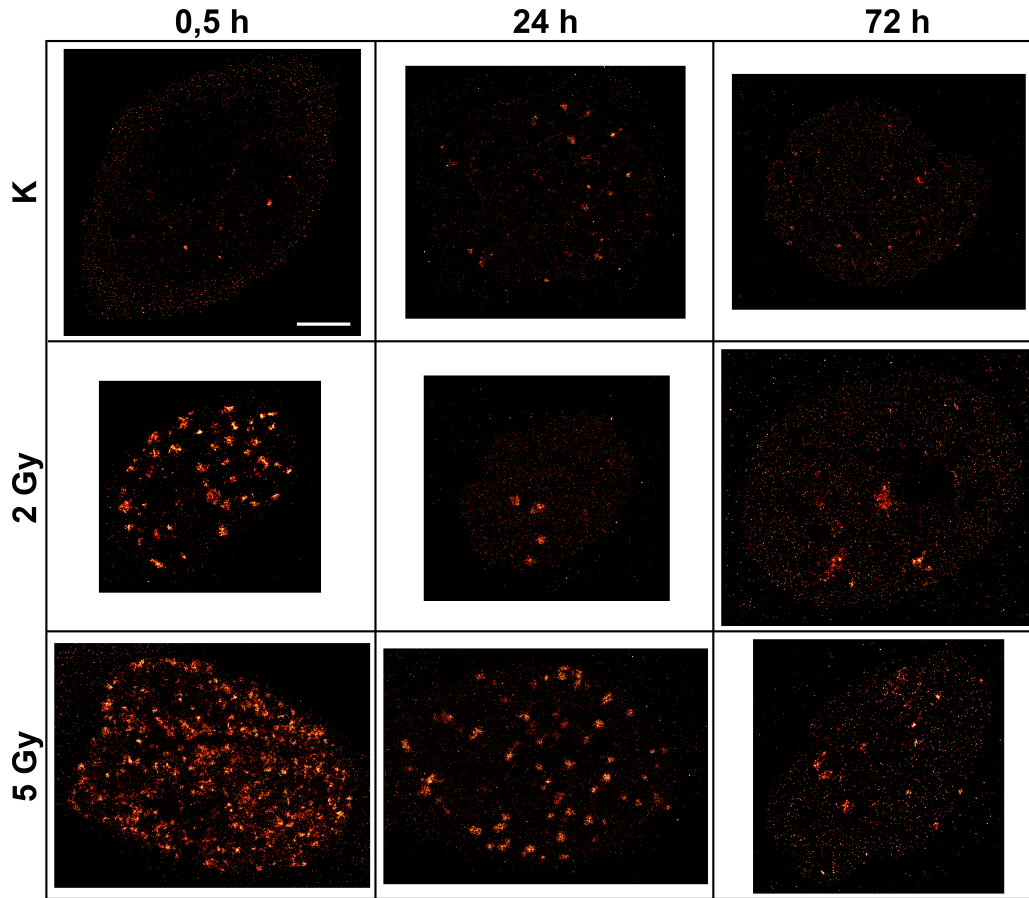


5.7. ábra. Sejtmembrán és maghártya meghatározása az összegképek felhasználásával. **a,f**, Humán tüdő eredetű A549 adenokarcinóma sejt (**a**) és U251 humán glioblasztóma sejtmag (**f**) összegképe. **b,g**, Sobel algoritmuson alapuló szélkereső algoritmus által létrehozott kép. **c,h**, A dilatáción és betöltésen átesett kép. **d,i**, Az erózió és nyitáson átesett kép. **e,j**, A zárással és simítással megkapott burkoló (sárga vonal) az összegképeken.

5.2.2. Röntgensugárzás indukált γ H2AX klaszterek időbeli dinamikájának vizsgálata U251 humán glioblasztóma sejtekben

Nagyfeloldású dSTORM felvételeket készítettem kontroll és 250 KeV energiájú röntgensugárzással kezelt U251 humán glioblasztóma sejtmagokról, amikben a γ H2AX hisztonok voltak megjelölve Alexa Fluor 647 festékkel (5.8. ábra). A sugárzást nem kapott kontroll minták a kezelt sejtekkel azonos időben lettek felszedve, majd azokkal egyszerre lettek lefotózva. A röntgensugárzás a sejten belül jól láthatóan kettős szálú DNS töréseket indukált, aminek következtében a γ H2AX fókuszok száma a kezelések hatására jelentősen megnőtt, majd idővel csökkenést mutatott. A γ H2AX fókuszok száma a vártaknak megfelelően nagyobb dózissal nagyobb volt.

A fókuszok kvantitatív elemzéséhez DBSCAN algoritmust használtam, ami lehetővé

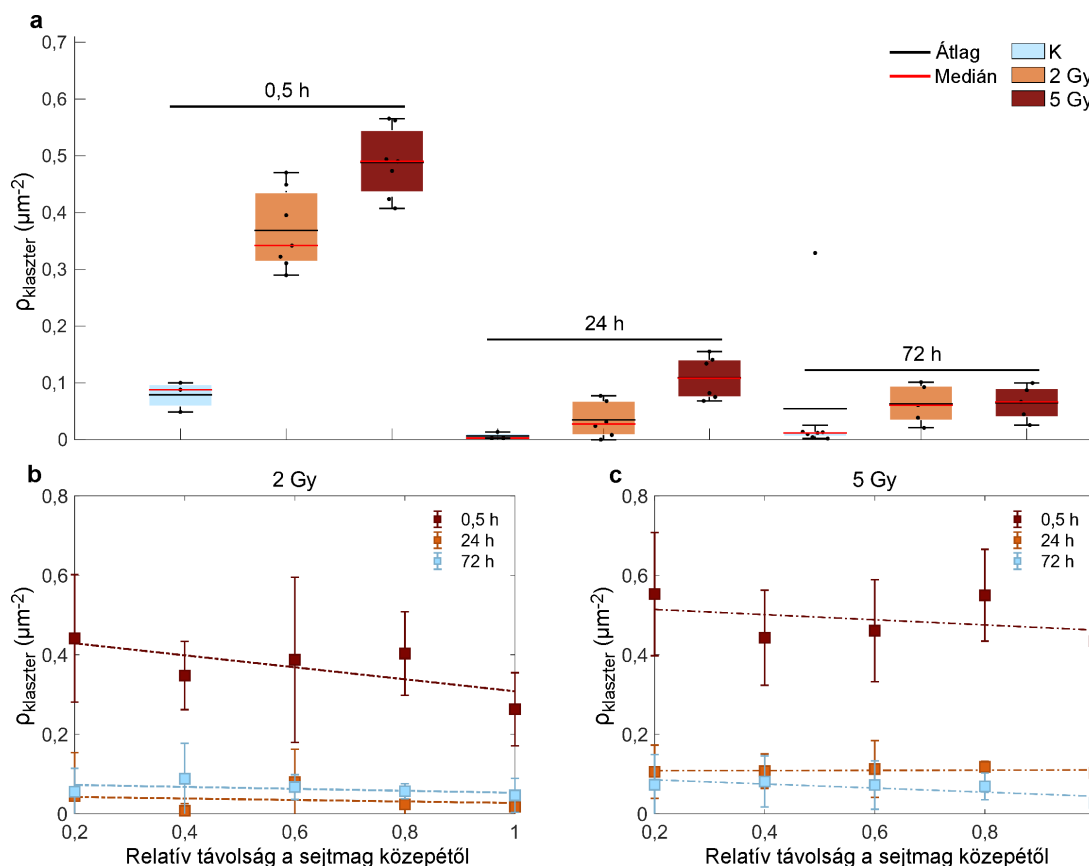


5.8. ábra. Reprezentatív dSTORM felvételek kontroll és röntgensugárzással kezelt U251 humán glioblasztóma sejtmagokról. A mérés során a γ H2AX volt megjelölve. Kontroll (K), 2 Gy és 5 Gy dózisú röntgensugárzással kezelt sejtmagok láthatóak fél, 24, illetve 72 órával a besugárzás után. Skála: $5\ \mu\text{m}$

tette, hogy a talált klaszterekhez egyedileg rendeljek hozzá mérőszámokat. A későbbiekben az algoritmussal detektált fókuszokat csak klasztereknek nevezem. Módosításokat hajtottam végre egy nyílt forráskódú DBSCAN analízáló programkódon [185], hogy a definiált mérőszámok eloszlását az egész ROI-n tudjam vizsgálni, ugyanis a nagy számú (akár milliós) lokalizációs koordináta adatkezelési problémákhoz vezetett. A program memóriaigényének csökkentése érdekében az algoritmussal az egyes lokalizációknak mindig csak az ϵ sugarú környezetüket vizsgáltam és nem határoztam meg minden lokalizáció közötti távolságot. A mérés során a klasztereken belüli lokalizációs sűrűségnek megfelelően $\epsilon = 50\ \text{nm}$ -t és $N_{\min} = 8$ értékeket állítottam be. A sejtmag szegmentálása után megha-

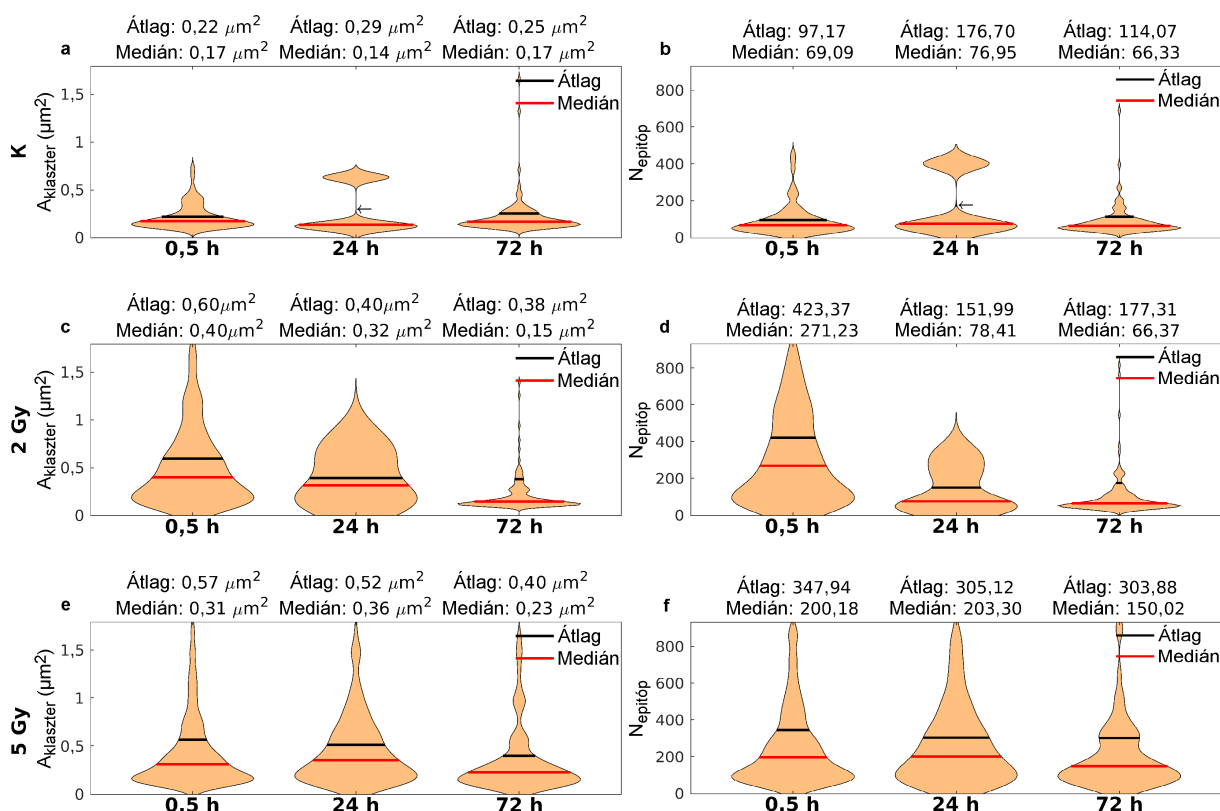
táraztam a klaszterek sűrűségét a maghártyától való távolság függvényében. A klaszterek sűrűségét az egységnyi területen lévő számukkal határoztam meg, a klaszterek pozícióját pedig a klasztert alkotó lokalizációs koordináták átlagával definiáltam. Fél órával a röntgen besugárzás után 4,7-szeresére (2 Gy esetén), illetve 6,2-szeresére (5 Gy esetén) növekedett a γ H2AX klaszterek sűrűségének medián értéke a kontroll szinthez képest (5.9.a ábra). 2 Gy besugárzás esetén ezek az értékek 24 órán belül visszaálltak az endogén szintre, míg 5 Gy besugárzás esetén ez a folyamat lényegesen lassabb volt. Megállapítottam, hogy a klaszterek minden mintánál jó közelítéssel homogén módon helyezkednek el és többi klaszterparaméter eloszlásában sem tapasztaltam térfüggést (5.9.b,c ábra). A $0,1\text{ }\mu\text{m}^2$ -nél kisebb területű ($\sim 360\text{ nm}$ -nél kisebb átmérőjű) klasztereket, mivel azok méretük miatt nem lehettek javító fókuszok, kiszűrtem a későbbi statisztikai elemzésekből.

A klaszterek területét a hozzájuk tartozó lokalizációk konvex burkolójának területével azonosítottam. A területek medián értéke a vártakkal ellentétben fél órával az 5 Gy dózisu besugárzás után kisebbnek adódott, mint a 2 Gy -es kezelés után, az átlag értékek pedig nagyjából azonosak voltak a két kezelés esetén (5.10.a–c ábra). Egy nap elteltével viszont már mind az átlag, mind a medián terület érték az 5 Gy -jel kezelt mintákban volt a legnagyobb. Mivel az 5 Gy -es kezelés esetén nagyobb a klasztersűrűség (5.9.a ábra), ez az eredmény azt sugallta, hogy az 5 Gy -jel kezelt sejtekben nem tudott több H2AX hiszton foszforilálódni, mint a 2 Gy -jel kezelt sejtekben, így a rendelkezésre álló γ H2AX hisztonnak több fókuszban kellett eloszlania. A jelenség pontosabb karakterizálás érdekében megbecsültem a klaszterek γ H2AX tartalmát a korábban tárgyalt módon (alszakasz 5.1). Az 5 Gy dózisu besugárzás után 30 perccel a klaszterekben kevesebb epitópot lehetett mérni, mint a kisebb dózis esetén, viszont 24 h múlva, mikor a klaszterek sűrűsége már jelentősen lecsökkent, jóval több epitóp volt mérhető klaszterenként. Ez az eredmény részben alátámasztja a feltételezést, miszerint az 5 Gy dózisu besugárzás esetén a javításban szerepet játszó enzimek kapacitása elérte a maximumot, majd a 24 h elteltével a DSB-k körül felszaporodnak a DNS sérülések számának csökkenése miatt már rendelkezésre álló javító egységek. Ennek megállapítása azonban már a biológus kollégák feladata és érdeme. A klaszterek epitópszámának átlag és medián értékei 300 %-kal nőttek fél órával a 2 Gy -es



5.9. ábra. γH2AX klaszterek sűrűségének vizsgálata. a, Fókuszok sűrűsége a dózis és a kezelés óta eltelt idő függvényében. A téglalapok alja és teteje a 25. és 75. percentiliseket jelzik, a hibasávok pedig a 25. és 75. percentilisek közötti differencia másfélszeresével nyúlnak túl a téglalapok szélein. **b–c,** Sűrűségeloszlás a sejtmagokon belül 2 Gy (**b**) és 5 Gy (**c**) dózisu besugárzás esetén. A hibasávok a szórást jelölik. Az analizált sejtek száma az egyes kezeléseknél átlagosan 5,44. (**a–c**)

besugárzás után (5.10.d–f ábra). Ez a magas érték 72 h után visszatért az endogén szintre, ami azt jelzi, hogy voltak sejtek, melyek túléltek a besugárzást és teljesen helyreállították a sérüléseket. A nagyobb, 5 Gy dózist használva a klaszteranalízissel mért tulajdonságok egyike sem állt vissza az eredeti értékre még 3 nappal a kezelés után sem, vagyis az 5 Gy-es besugárzás túl nagy lehetett a sejtek teljes felépüléséhez, ami fontos adat a sugárzás hatásának felmérésénél. Az átlag minden esetben nagyobb volt, mint a medián, ami azt jelenti, hogy az eloszlások pozitív oldalán kiugró értékek szerepelnek.

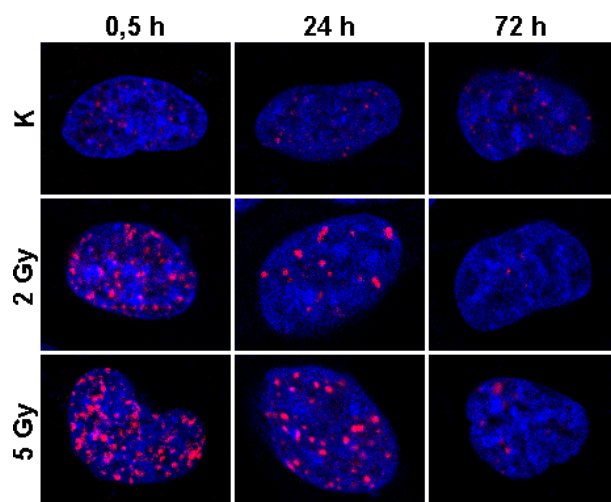


5.10. ábra. Klaszterek terület és epitópszám eloszlása. a–f, A grafikonok a klaszterek területének (a,c,e) és epitópszámának (b,d,f) eloszlásait mutatják a dózis és a kezelés óta eltelt idő függvényében. A 24 órás kontroll eloszlásoknál az átlagot fekete nyíl jelöli. Az analizált sejtek száma az egyes kezeléseknél átlagosan 5,44. (a–f)

5.2.3. Klasztereloszlások vizsgálata korrelatív dSTORM-konfokális mikroszkópiával

A dSTORM technikával a felvételek idő és memóriagényessége miatt kihívás volt nagy mennyiségű felvételt készítenem. A konfokális mikroszkópia ezzel szemben egy széles körben elterjedt technika, amivel azonos idő alatt jóval több sejtről készíthetők felvételt, ráadásul a sejtek teljes térfogatukban rutinszerűen leképezhetők. A módszer hátránya azonban a diffrakció limitált feloldás. A két módszer előnyeit felismerve korrelatív méréseket végeztem és megvizsgáltam az ebben rejlő lehetőségeket, illetve a karakterizáltam a korlátozó tényezőket. Konfokális felvételeket készítettem a korábban bemutatott mintákról (5.11. ábra). A legjobb feloldás érdekében nagy numerikus apertúrájú (1,4) objektívet

használtam. A nagyobb látótér (FOV) érdekében egy kisebb nagyítású objektívet használtam, amivel $215 \times 215 \mu m$ -es területet tudtam felvenni. Így egy mintán belül ~ 100 sejtet tudtam rutinszerűen felvenni. Az axiális dimenziót $\sim 13 \mu m$ -re állítottam, ami a sejtmagok teljes térfogatát tartalmazta. A szkennelés során $1,2 AU$ -t és $210 \times 210 \times 300 nm$ -es voxel méretet állítottam be. A felvételeket két spektrális csatornában készítettem el. Az Alexa Fluor 647 továbbra is a $\gamma H2AX$ hisztonokat jelölte, míg a DNS DAPI-val volt megjelölve, ami jól kitöltötte a sejtmag teljes területét. A várakozásnak megfelelően a javító fókuszok szubstruktúrája nem volt feloldható, de a klasztereződés és a tendenciák kvalitatívan megfigyelhetőek voltak.

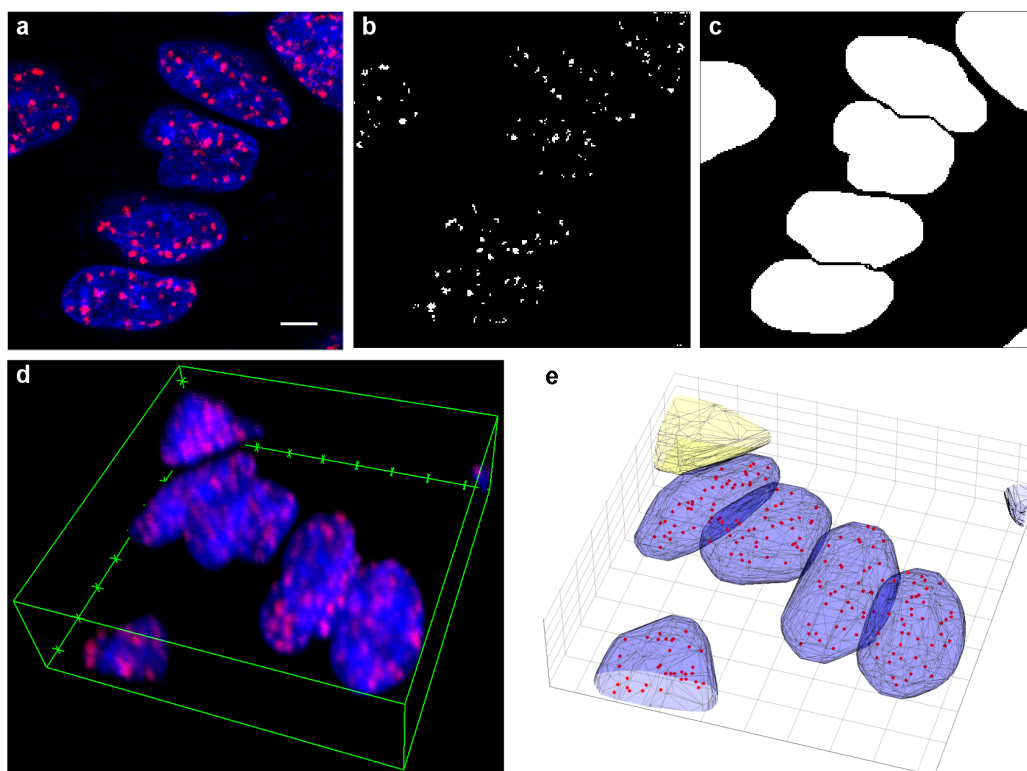


5.11. ábra. Konfokális felvételek U251 humán glioblasztóma sejtekről. Kontroll (K), illetve sugárkezelt sejtek (2 Gy és 5 Gy dózissal besugározva) különböző kezelés utáni időpontokban. A sugárzást nem kapott kontroll minták a kezelt sejtekkel együtt lettek felszedve és lefixálva. A kék szín a DNS-t jelöli (fluorofór: DAPI), vörös pedig a $\gamma H2AX$ hisztonokat (fluorofór: Alexa Fluor 647).

A konfokális felvételek klaszteranalíziséhez egy küszöbölést hajtottam végre a javító fókuszokról készült képeken (5.12.b ábra), majd az érintkező voxeleket klasztereknek tekintve meghatároztam azok centrumát és térfogatát. A küszöbérték meghatározásához a maximum entrópia módszerét használtam [186], amivel jól elkülönültek a háttértől a fókuszok. Ezt a küszöbértéket csak egy megfelelő képsíknál határoztam meg és azt globálisan alkalmaztam a teljes képtérfogat binarizálásánál. A kis méretű klasztereket (\leq

$\leq 5 \text{ voxel} = 0,06615 \mu\text{m}^3$) zajként jelöltem meg és a későbbi statisztikáknál nem vettem őket figyelembe. A γ H2AX klaszterek kontextusba helyezéséhez a DAPI jelét felhasználva a sejtmagokat egy ún. vízválasztó szegmentálással [187] behatároltam (5.12.c ábra). Előfeldolgozásként egy kontraszt beállítás után 2 pixel standard deviációjú Gaussos simító maggal szűrtem a képsíkokat, majd binarizáltam azokat. A binarizáláshoz egy globális küszöbértéket állítottam be a legmagasabb jelértéket (pixel értékek összege) tartalmazó képsík alapján (a Bradley módszerrel [188] számolt lokális szélsőértékek átlagát vettem). A binarizált képeken egy 2 pixel sugarú korong alakú strukturáló elemet használva egy dilatációs algoritmussal láthatóbbá tettem a sejtmagokat. A sejtmagokban esetlegesen előforduló lyukakat egy rekonstrukciós algoritmussal [183] betöltöttem. Egy morfológiai nyitást is elvégeztem 10 pixel sugarú korong alakú strukturáló elemmel, hogy eltüntessem a kis méretű foltokat a képről. Egy fast algoritmuson [189] alapuló távolság transzformációval a sejtmagok helyén lokális intenzitás minimumokat kaptam. Ezen alkalmazva a vízválasztó algoritmust megkaptam a gerinc vonalakat, amiket fel tudtam használni az érintkező sejtmagok szétválasztásához. Azonban a vízválasztó transzformáció jellemzően túlszegmentált, ezért a MATLAB *imextendedmin* [183, 190] és *imimposemin* [191] parancsát felhasználva eltüntettem az apró lokális minimumokat. Az *imextendedmin* parancs ideális esetben kis foltokat produkál a szegmentálandó sejtmagok közepén, ezt felhasználva pedig az *imimposemin* paranccsal úgy módosítottam a távolság transzformációt, hogy annak csak a sejtmagok közepén legyen minimuma. Hatékonynak bizonyult, ha ilyen módon minden képsíkon szegmentáltam a sejtmagokat, majd a $3D$ -s képtérfogatokon (5.12.d ábra) megismételtem a protokollt. Ezek után az érintkező voxelek már jó közelítéssel a sejtmagoknak feleltek meg, tulajdonságaik (térfogat, felület stb.) alapján pedig szűrhetőek is voltak (pl. túl kicsi, túl nagy vagy nagyon szabálytalan alak (felület/térfogat arány nagyon nagy)). Azokat a sejtmagokat is kiszűrtem az analízisből, melyek kilógtak a felvett képtérfogatból (5.12.e ábra: sárga sejtmag).

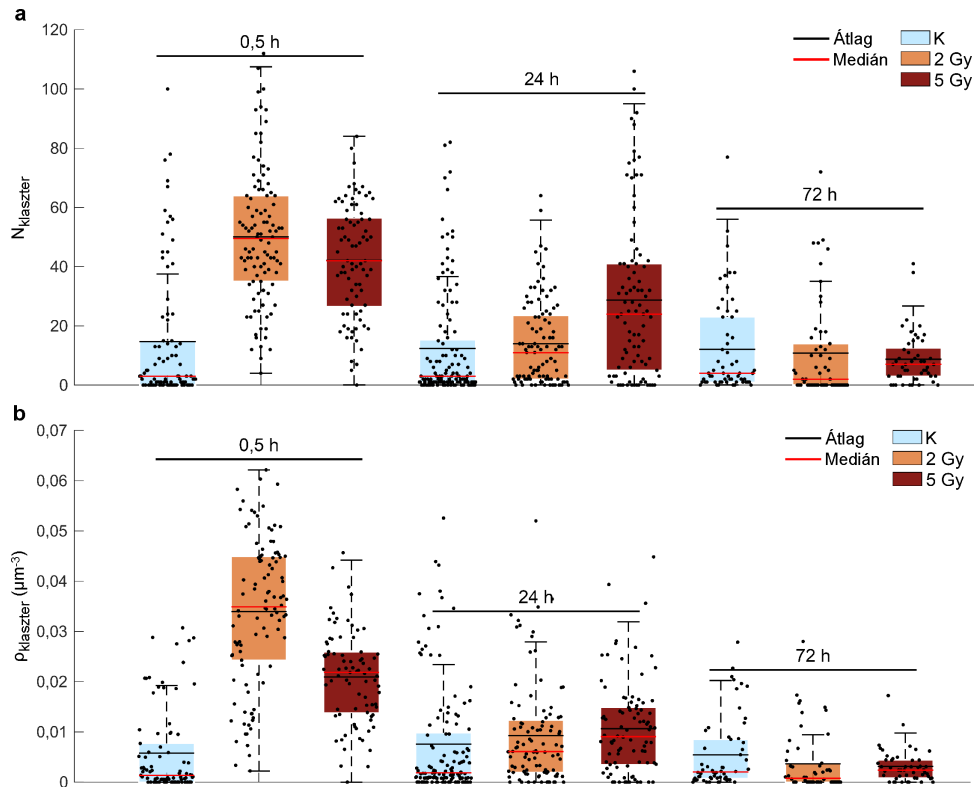
A szegmentálás után társítottam a megtalált γ H2AX klasztereket a sejtmagokhoz és meghatároztam a sejtekben lévő klaszterszámokat (5.13.a ábra), illetve klasztersűrűségeket (5.13.b ábra). Az eredményeket összevettem a dSTORM felvételek kiértékelésével



5.12. ábra. Konfokális felvételek kiértékelésének menete. **a,** Egy kiválasztott terület egy adott képsíkja. A vörös szín a γ H2AX hisztonokat jelzi, a kék pedig a DNS-t. **b,** A szegmentált γ H2AX klaszterek **a**-n. **c,** A szegmentált sejtmagok **a**-n. **d,** Az **a** terület teljes képtérfogatának térbeli ábrázolása. **e,** A **d**-n szegmentált sejtmagok. A kék térfogatok az elfogadott sejtmag felületek, a sárga térfogatok a kiszűrt sejtmag felületek. Ebben az esetben a sárga sejtmag kilóg a felvételtől. (A többi nem egész sejtmag csak az **a**-n jelölt területből lóg ki, nem a teljes felvételtől.) A γ H2AX klaszterek pozícióját a piros pontok jelölik. Skála: $5\ \mu\text{m}$. (**a**)

és eltéréseket tapasztaltam. A 30 perces mintáknál az algoritmus a nagyobb, $5\ \text{Gy}$ dózisi besugárzás után kevesebb klasztert talált, mint $2\ \text{Gy}$ -es besugárzás után (5.13.a ábra). A klasztersűrűség ezzel megegyező trendet követett (5.13.b ábra).

Az ellentmondásos jelenségre az volt a hipotézisem, hogy a konfokális felvételek rosszabb térbeli feloldása miatt a nagy klasztersűrűségű 30 perces mintákban az egymás közelében lévő klaszterek a kiértékelés szempontjából megkülönböztethetetlené váltak és egybeolvadtak, ami jelentősen lecsökkentette a detektált klaszterek számát, különösen az $5\ \text{Gy}$ -el kezelt mintákban. Mivel ez jelentős méretbeli növekedéssel jár, ezért megvizsgáltam a klaszterek térfogateloszlását is (5.14.a ábra). A detektált klaszterek térfogatainak átlá-



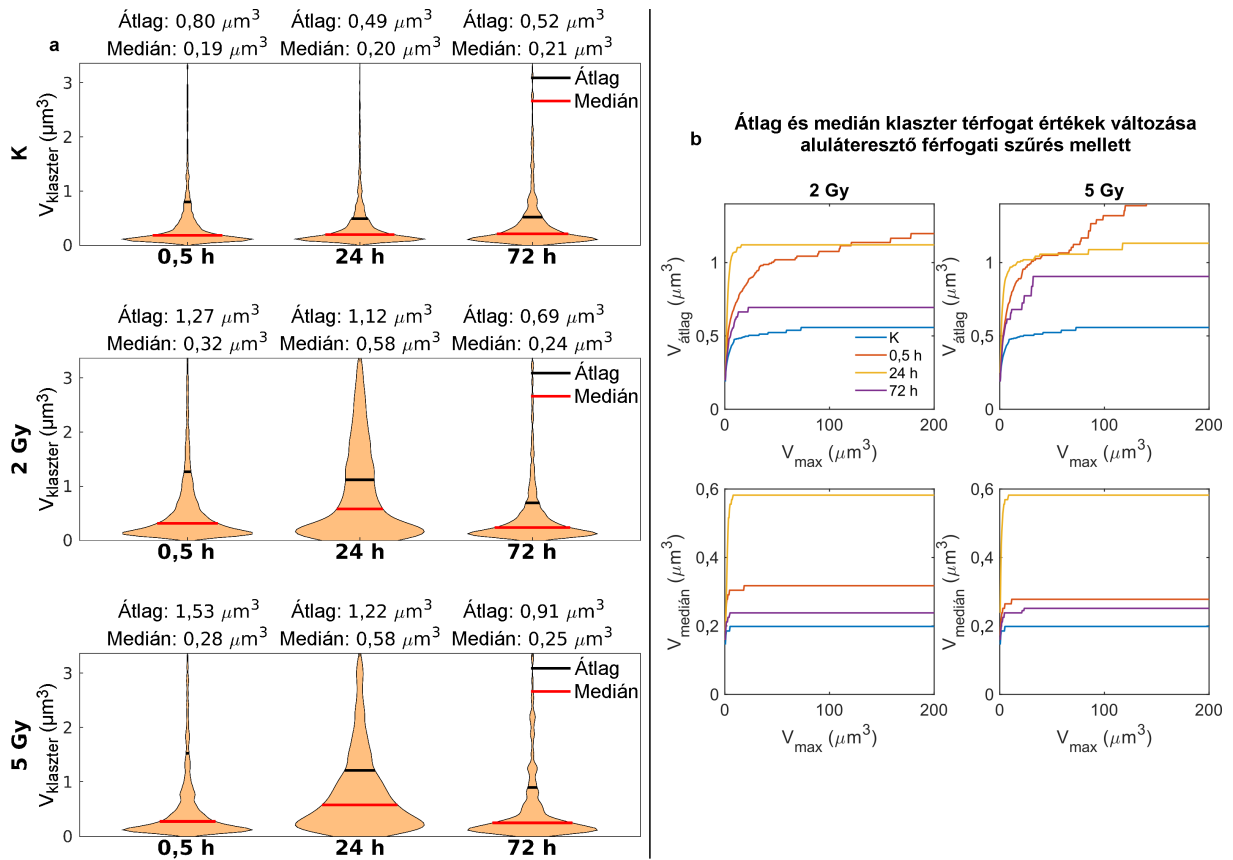
5.13. ábra. Klaszterek száma/sejt és klasztersűrűség értékek a konfokális felvételek alapján. a, A klaszterek száma/sejt a dózis és a kezelés óta eltelt idő függvényében. **b,** Klasztersűrűség értékek/sejt a dózis és a kezelés óta eltelt idő függvényében. A téglalapok alja és teteje a 25. és 75. percentiliseket jelzik, a hibasávok pedig a 25. és 75. percentilisek közötti differencia másfélszeresével nyúlnak túl a téglalapok szélein. **(a,b)** Sejtszámok: 41 – 142, átlag: 128 **(a-b)**.

ga a kezelésre fél órával az 5 Gy dózisú besugárzás esetén valóban nagyobb volt, mint a 2 Gy dózisú kezelés esetén, ami ellentmondott a pontosabb dSTORM-os mérések eredményeinek (5.10.a ábra). A medián érték ugyanakkor nagyobb volt a kisebb besugárzási dózisonál, ami konzisztens volt a dSTORM-os mérések eredményeivel. Kevés, de nagy méretű klaszter tudja jelentősen növelni az átlagot úgy, hogy közben a medián értéke nem változik szignifikánsan, vagyis az eredmények a kezdeti hipotézisemet támasztották alá. Ugyanakkor a medián érték a 24 órás mintáknál volt a legmagasabb (mindkét kezelés esetén $0,58 \mu\text{m}^3$), amit viszont a dSTORM mérések nem támasztottak alá. A térfogatok eloszlásában tapasztalt anomális eredményeinek vizsgálata érdekében ábrázoltam az átlag és a medián klaszter térfogat értékeket egy aluláteresztő térfogati szűrés függvényében,

vagyis aszerint, hogy mi volt az a V_{max} térfogat érték, aminél nagyobb klasztereket kiszűrtem (5.14.b ábra). Azt tapasztaltam, hogy az átlag és medián értékek $\sim 10 \mu m^3$ -ig gyors növekedéssel beállnak egy fix értékre és ez alól mindössze a klaszterekben legsűrűbb (fél óra, 2 Gy és 5 Gy, ill. 24 h, 5 Gy) minták átlagos térfogat értékei kivételek. Ezeknél a mintáknál ahogy növeltem a V_{max} -ot, úgy az átlag érték monoton és lépcsőzetesen növekedett. Feltételezhetően újabb és újabb nagy méretű, valószínűleg összeolvadt klaszterek kerültek a számításba. Ez az összeolvadás a nagyobb méretű klaszterek számát csökkenti, ami csökkenti a medián térfogat értékeket. Az, hogy a folyamatos lépcsőzetes növekedés a medián értékekben nem, csak az átlag értékekben volt tapasztalható, szintén arra utalt, hogy kisebb számú, de nagyobb méretű klasztereket detektáltam a konfokális mikroszkóppal. Ez magyarázattal szolgál arra, hogyan lehetséges, hogy konfokális felvételek elemzése során nagyobb medián klaszter méreteket kapunk a 24 h-s esetben és további alátámasztásul szolgál arra, hogy a közeli klaszterek konfokális mikroszkópiával nem lesznek megkülönböztethetőek, amiknek száma jelen esetben nem elhanyagolható.

Ezzel együtt a klaszterek átlagos térfogata mindössze 107 %-os (2 Gy dózisonál) és 150 %-os (5 Gy dózisonál) növekedést mutatott a kontrollhoz képest, ami kisebb mértékű, mint a dSTORM-os kiértékeléseknél tapasztalt klaszterméret növekedések. Bár a 2D-s dSTORM méréseknél csak klaszter területekről beszélhetünk, de belátható, hogy azonos mértékű terület növekedés nagyobb mértékű térfogat növekedést kell, hogy eredményezzen. Ha gömb alakú klasztereket feltételezünk, illetve hogy a dSTORM mérések során a gömbök olyan vetületét látjuk, ami megegyezik annak legnagyobb metszetével, akkor 2 Gy dózis után 30 perccel a dSTORM mérésekből adódó 173 %-os területnövekedés ($0,22 \mu m^2$ -ről $0,60 \mu m^2$ -re) a térfogatban 351 %-os növekedést jelentene ($0,08 \mu m^3$ -ról $0,35 \mu m^3$ -re). Ha viszont ezeket a gömböket konvolváljuk egy $a = b = 0,15 \mu m$ és $c = 0,3 \mu m$ főtengelyekkel rendelkező ellipszoid alakzattal (a konfokális mikroszkóp pásztázó fókuszoltjával), akkor $\sim 0,41 \mu m^3$ és $\sim 1,06 \mu m^3$ térfogatokat kapunk, amik már sokkal közelebb vannak a konfokálissal mért értékekhez és a térfogat növekedés is 162 %-nak adódik, ami már csak 11 %-kal tér el a dSTORM-al mért értéktől.

A konfokális mérések eredményeinek összevetése a dSTORM-os mérések eredményeivel



5.14. ábra. A konfokális felvételek alapján kapott klaszter térfogatok eloszlásának kvantitatív vizsgálata. **a**, Kontroll, illetve sugárkezelt mintákban meghatározott klaszter térfogatok eloszlása a dózis és a kezelés óta eltelt idő függvényében. **b**, Átlag és medián térfogatértékek a V_{max} szűrési paraméter függvényében. Sejtszámok: 41 – 142, átlag: 128 (**a–b**).

rávilágított a konfokális technika határait a γ H2AX klaszterek vizsgálatában. Megállapítottam, hogy a konfokális technika felülbecsli a klaszter méreteket és a túl sűrűn lévő klasztereket nem tudja különválasztani. A technika széleskörű használata miatt azonban a mérési eredmények lokalizációs technikával történő kalibrációja nagy érdeklődésre tarthat számot.

5.2.4. 2D-s dSTORM felvételek kiértékelési eredményeinek hitelesítése

A bemutatott kiértékelésekhez 2D-s dSTORM felvételeket használtam, noha a vizsgált struktúra 3D-s. Ennek több praktikus oka is volt. Egyrészt mélységi információt dSTORM

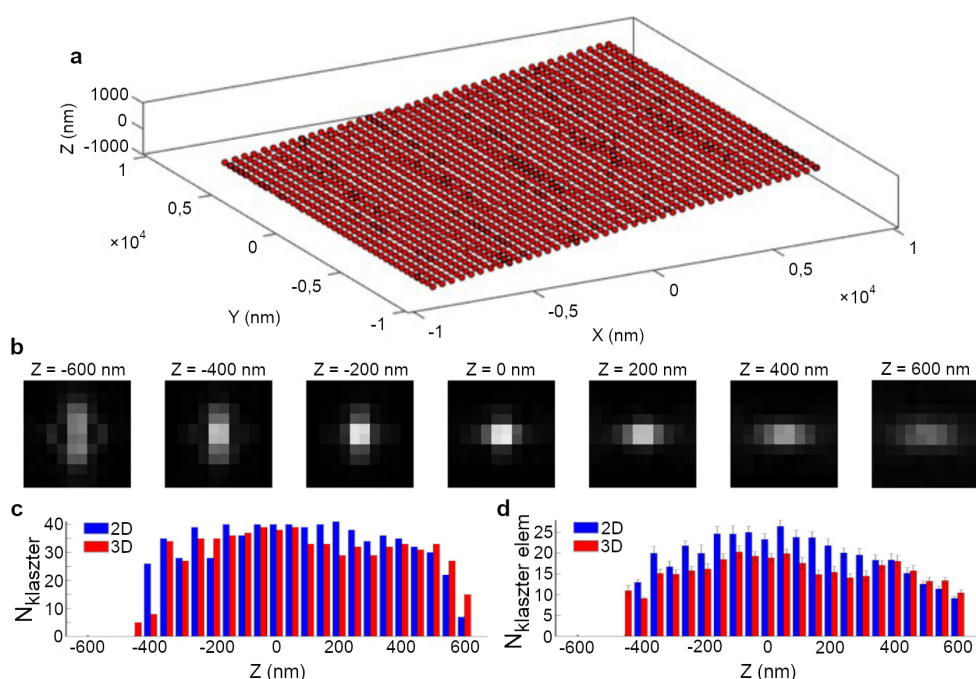
felvételek esetén tipikusan csak a mélységélességgel (DOF) összevethető tartományon belül nyerhetünk, ami a nagy NA miatt jobb esetben is $1\mu m$ körüli. Ez az érték pedig az U251-es sejtmagok teljes vastagságának ($\sim 5\mu m$) csupán töredéke. A dSTORM-ban használatos nagy gerjesztési intenzitások miatt a festék kifakulása jelentős, ezért általában nem kivitelezhető több képsík felvétele. Ezen felül a mélységi információ megszerzéséhez nem ritkán a laterális precizitás csökkenése árán lehet hozzájutni, ami nem minden esetben megengedhető, sőt egyes esetekben a $3D$ technika műtermékek forrása is lehet (a kifejtést lásd a függelékben: F2 szakasz). Szintén nem elhanyagolható szempont, hogy egy $3D$ -s mérés nem kívánt módon bonyolítja a mérési protokollt a felhasználók szintjén. Érdeemes tehát megfontolni a $2D$ -s méréseket, viszont ez esetben fel kell térképezni alkalmazhatóságának határait. Ennek érdekében a TestSTORM segítségével összehasonlító kiértékeléseket hajtottam végre, amiben $2D$ -s és asztigmias $3D$ -s lokalizációs méréseket szimuláltam le és értékeltem ki ugyanabból a szempontból (klaszterek száma és átlagos klaszter elemszám). A vizsgálathoz kiterjesztettem a DBSCAN klaszteranalízist $3D$ -s adatsor elemzésére. Mivel a feloldás anizotróp (axiálisan rosszabb), ezért a lokalizációk számát nem egy ϵ sugarú gömbön belül, hanem egy $a = b = \epsilon/2$ és $c = \epsilon$ főtengelyekkel rendelkező ellipszoidon belül vizsgáltam a klaszterizálás során. A teszt minta epitópokat tartalmazott, amik különböző axiális koordinátájú sorokban helyezkedtek el (5.15.a ábra). A mintát az 5.1. táblázatban feltüntetett paraméterekkel definiáltam.

Az eredmények alapján a $2D$ -s és $3D$ -s leképezéssel hasonló DOF tartományok adód-

minta törésmutatója (n)	1,331
epitópok átlag mélysége a fedőlemeztől	$5\mu m$
axiális távolság az egymás mellett, különböző síkban lévő epitópok között	$50nm$
laterális távolság az epitópok között	$400nm$
epitópok száma egy sorban/oszlopban	41
egyetlen epitóphoz kötődött festékmolekulák száma	8
linker hossza (festékmolekula és epitóp közötti távolság)	$7nm$

5.1. táblázat. A TestSTORM szoftverben beállított szimulációs paraméterek.

tak (5.15.c–d ábra), amik kis mértékben el vannak tolódva egymáshoz képest. A megtalált klaszterek számában nem mutatkozott jelentős eltérés (kb. 7 %-kal kevesebb a 3D-s esetben), viszont a klaszter elemszámokban átlagában 20 % eltérést tapasztaltam. Ez önmagában nem módosítja a kiértékelések során mért trendeket, de rávilágít az eltérő kalibráció szükségességére az epitópszám megbecslése során. Az eltérés valószínűleg annak köszönhető, hogy a 3D-s esetben kiszélesedett PSF képeket kapunk (5.15.b ábra), ami rontja a lokalizálhatóságot.



5.15. ábra. 2D-s és 3D-s kiértékelés összevetése. **a**, Az epitópok elhelyezkedése a szimulációs mintában. **b**, A PSF képe a Z pozíció függvényében a szimuláció során. **c–d**, A megtalált klaszterek száma (**c**) és azok átlagos elemszáma (**d**) 2D-s és 3D-s mérés esetén. A hibasávok a szórást jelölik. (**d**)

A 3D-s mérés egyértelműen több adatot szolgáltat, ugyanakkor a szükségességét az adott probléma nem minden esetben indokolja. γ H2AX fókuszok terület és eloszlás értékeit például nem változtatja szignifikánsan. γ H2AX klaszterek időbontott vizsgálatában, amikor a kijavítódási idő az egyik legkritikusabb kérdés, nem szükséges 3D-s méréseket végezni.

5.2.5. A fejezethez kapcsolódó téziseim

Kifejlesztettem egy DBSCAN alapú algoritmust lokalizációs adatsorok klaszteranalíziséhez. A programmal kvantitatívan jellemeztem a klaszterek tulajdonságait, valamint meghatároztam ezen paraméterek eloszlását a vizsgált területen belül. Nagyfeloldású dSTORM és konfokális (CLSM) méréseket végeztem U251 humán glioblasztóma sejtekről röntgen besugárzás után és időbontott vizsgálatot hajtottam végre a kettős szálú DNS töréseket jelző γ H2AX klasztereken. A két technikával nyert eredményeket összevetettem, valamint karakterizáltam a korrelatív mérések lehetőségeit. TestSTORM teszt minta generátorral végzett szimulációk alapján feltérképeztem a $2D$ -s és $3D$ -s kiértékelések alkalmazhatóságának határait és hitelesítettem a $2D$ -s dSTORM mérésekkel kapott eredményeimet.

Kapcsolódó publikációk: [A3]

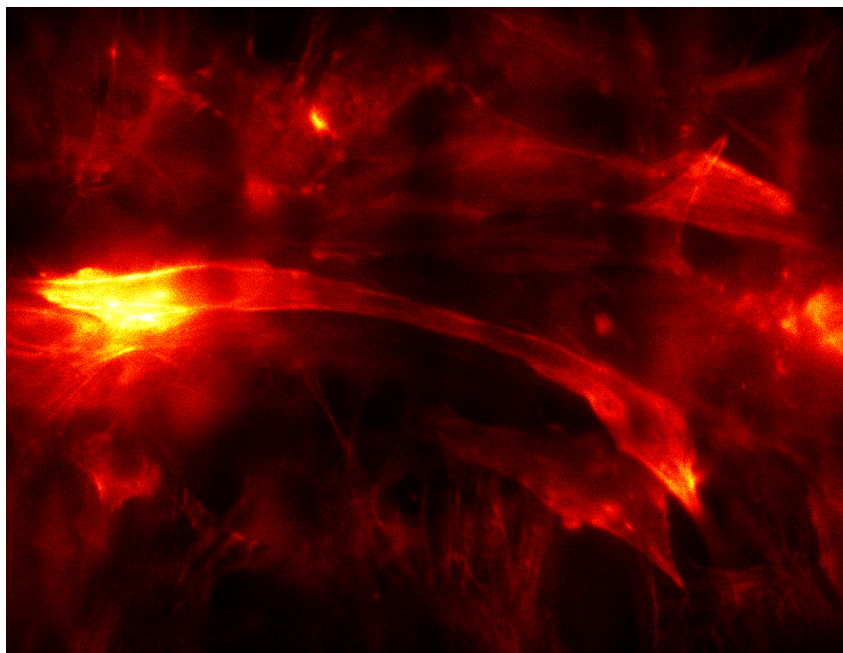
5.3. Filamentális struktúra kvantitatív jellemzése fixált sejtekben

Egy fizikai minta struktúrájának kvantitatív jellemzése összetett feladat és a megfelelő értékmérők kiválasztása nagyban függ a minta jellegétől. Biológiában gyakran találkozunk szálas szerkezetekkel, ezért az ilyen jellegű minták karakterizálása, jellemzőinek számszerűsítése fontos feladat. Ilyen jellemző lehet egy szál szélessége vagy hossza. Geometriai paramétereket leggyakrabban valamilyen keresztmetszeti profil alapján határoznak meg, amik közvetlenül adódnak a hagyományos intenzitás alapú képekből. A lokalizációs felvételek pontillista adatsora azonban itt is eltérő megközelítéseket igényel. Együttműködő partnereimmel syndecan-4 fehérje aktin szerkezetre gyakorolt hatását vizsgáltuk fúzionáló mioblaszt (C2C12) sejtekben. A feladatom a mikroszkópiás felvételek elkészítése és a szálas szerkezettel rendelkező minta kvantitatív jellemzése volt.

5.3.1. A minta jellemzése és a mérés menete

Négyféle mintáról készítettem konfokális, illetve dSTORM felvételeket. A minta egér izomsejtekből állt. Két sejtvonalban a syndecan-4 csendesítve volt (shSDC4#1, ill. shSDC4#2) amik két kontroll sejtvonallal lettek összevetve (transzfektálatlan és kevert). A transzfektálatlan sejteken nem volt semmilyen kezelés végrehajtva, kevert sejteknél pedig a sejtek véletlenszerű nokleotid szekvenciájú shRNS-el lettek transzfektálva. Az aktin struktúra Alexa Fluor 647-tel volt megjelölve falloidinen keresztül. A falloidines jelölés a térbeli dimenziók meghatározásánál előnyös, hiszen ez a molekula kis méretű és nagyon szorosan kötődik az aktinhoz, vagyis a linkerhossz elhanyagolhatóan kicsi [192]. A sejtmagok DAPI, illetve Hoechst33258 fluoreszcens festékekkel lettek láthatóvá téve (mindkét festék a DNS-t jelöli meg). A magfestésre azért volt szükség, hogy be tudjuk azonosítani a több sejtmaggal rendelkező, fúzió után létrejövő elnyúlt hengeres alakú miotubulusokat (később csak tubulusok). Az első kísérletek alkalmával a fúzionált sejtcsoportokra jellemző dezmin is meg lett jelölve Alexa Fluor 594 festékekkel, de ezt a jelölést a későbbiekben el tudtuk hagyni, mivel a megfelelő sejteket enélkül is megtaláltuk. A keresés tehát az aktin szerkezet és a sejtmagok száma alapján történt. A fúzióhoz szükséges volt, hogy a sejtek egymással szorosan érintkezzenek, ezért a minta meglehetősen sűrű volt, a sejtek több

rétegben terültek el a fedőlemezen (5.16. ábra). Ennek következtében a minta felhelyezése után várnom kellett néhány percet a mérés előtt, hogy a dSTORM méréshez használt puffer folyadék teljesen bediffundáljon a mintába.

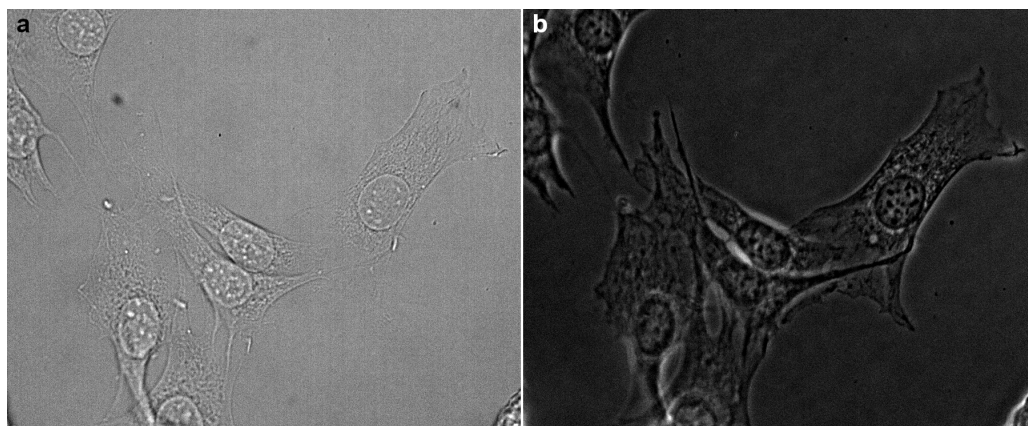


5.16. ábra. Mozaik felvétel egy transzfektáltalan miotubulusról. A kép 3×4 széles látóterű fluoreszcens képből áll össze. Az aktin struktúra volt megjelölve Alexa Fluor 647-tel falloidinen keresztül. A képek regisztrációját a NIS szoftver ND Acquisition Large Image funkciójával végeztem el és a képeket 40 %-os átfedéssel készítettem el.

A mérések során a felvett területek számára, illetve a lokalizációk mennyiségére kellett maximalizálnom. A képkockák számát 40 – 50 ezerre állítottam, a 405 nm hullámhosszú lézerrel pedig többször is reaktiváltam a fluorofórokat. A mintákról ~ 4 óráig tudtam egyhuzamban felvételeket készíteni, ennyi idő után viszont a festékek fotofizikája láthatóan megváltozott és puffert kellett volna cserélnem a folytatáshoz. A pufferoldat cseréje során viszont a sejtek könnyen leváltak a fedőlemezről, emiatt csupán néhány óra állt rendelkezésemre, hogy kellő számú felvételt készítsek. Ez a feladat több szempontból is kihívást jelentett. Egyrészt a minta oldaláról, mivel a kis számban jelenlévő fúziós eseményeket kellett megkeresnem egy meglehetősen sűrű mintában. Másrészt a rendszer oldaláról, mivel a dSTORM mérések során $100\times$ olajimmerziós objektívet alkalmaztam és az immerziós mé-

dium miatt nem tudtam kisebb nagyítású objektívekre váltani a kereséshez. Ezen felül a dSTORM technikához szükséges $2-4 \text{ kW/cm}^2$ -es gerjesztési intenzitás elérése érdekében a gerjesztő lézernyaláb be lett szűkítve, ami miatt a megvilágított terület $\sim 40 \text{ } \mu\text{m} \times 40 \text{ } \mu\text{m}$ -es volt. A fényútba könnyen be tudtam ugyan helyezni, illetve ki tudtam venni egy $3\times$ -os nagyítású teleszkópot, azonban a detektor mérete miatt a kitágított nyalábbal is maximum $80 \text{ } \mu\text{m} \times 80 \text{ } \mu\text{m}$ -es területet láttam be (5.16. ábra). Mindez egy megfelelő mérési protokoll kidolgozását igényelte. Ez a módszer két részből tevődött össze, egyrészt a mintaelőkészítés oldaláról, másrészt a leképezés oldaláról. A mintaelőkészítésnél a sejtek rácsozott fedőlemezen lettek tenyésztve, amin a fedőlemez különböző területei szám és betűk kombinációjával volt megjelölve. Ezen az együttműködő partner a lokalizációs mérések előtt megkereste azokat a területeket, amik érdekeseeknek bizonyultak. A megfelelő területek beazonosításához a okuláron keresztül vizsgáltam a mintát, ami nagyobb látótérrel rendelkezett. A sejtek kereséséhez viszont a Nikon rendszer biztonság technikai okokból nem engedélyezi a lézerek alkalmazását az okulár használata során. Emiatt felső kivilágítást alkalmaztam. Azonban egyszerű Köhler-féle megvilágítás mellett a sejtek kontrasztja közel nulla volt (5.17.a ábra). Fluoreszcens gerjesztés hiányában két kontraszt növelő módszert tett lehetővé a rendszerünk: DIC és fáziskontraszt. A DIC kép létrehozásánál problémát okozott, hogy az objektív utáni kettősen törő éket nehéz volt az objektív (és a minta) megmozdítása nélkül behelyezni, valamint a megfelelő terület megtalálása után a dSTORM mérés előtt ki kellett volna venni az éket, ami tovább nehezítette volna a mérést. A Nikon váznak viszont megvolt az a nagy előnye, hogy a fáziskontraszt technikához nem feltétlen kellett fáziskontraszt objektívet használnom, hanem az általam használt objektív után be tudtam forgatni a gyűrűdiafragmához megfelelő fázisgyűrűt a fényútba. Ilyen módon az okuláron keresztül nagyobb kontrasztot tudtam elérni (5.17.b ábra) és a megfelelő területeket gyorsabban megtaláltam, valamint egyszerűen tudtam váltani a fáziskontraszt, a konfokális és a dSTORM mérések között.

Figyelembe kellett vennem, hogy a felső kivilágításhoz használt halogén lámpa a keresés során fűtötte a mintát, ami növelte a dSTORM mérések során fellépő hőtágulásból adódó mechanikai eltolódást. A fáziskontraszt technika ezen önmagában segített, mivel



5.17. ábra. A minta kontrasztjának növelése. **a**, Transzmissziós mikroszkóppal készült felvétel C2C12 mioblaszt sejtekről. **b**, Fáziskontraszt felvétel az **a** területről.

csökkentette a mintára jutó fény intenzitását. Ezen felül egy további NCB (neutral color balance) szűrőt is használtam, ami a megvilágító fény spektrumának nagyobb hullámhosszakhoz tartozó részét nagyrészt kiszűrte. Az érdekes területek beazonosítása után konfokális technikával felvételeket készítettem különböző fókuszsíkokról. A 3D-s felvételből az együttműködő partnerrel meghatároztuk, hogy a vizsgált tubulus valóban több sejtmaggal rendelkezik-e, illetve hogy melyik a megfelelő fókusz sík amiről érdemes nagyfeloldású képet készíteni. Ezután dSTORM felvételeket készítettünk a sejtek aktin hálójáról a fedőlemez közelében is, ahol az arra kitapadt sejtek miatt egy nagyobb aktin szerkezet látszódott azonos fókusz síkban. A mérések során mindent egybevéve több, mint 279 mérési fájl és 624 *GB* adat keletkezett.

5.3.2. Szálak vastagságának mérése

A képek elemzése során az egyik feladatom a kortikális aktin köteg vastagságának a meghatározása volt a tubulusokban. A kortikális aktin a sejtmembrán alatt feszül ki, ezért egyfajta körvonalként jelezte a tubulusok alakját a képeken (5.18.a–b, ábra). A kiválasztott területek lokalizációs információit (lokalizációs koordináták, precizitás, stb.) raInSTORM segítségével exportáltam, majd az IFM Analyser [193] program segítségével elemeztem [154, 155]. Az IFM Analysert eredetileg muslicák indirekt repülőizom szarko-

merjeinek kvantitatív elemzésére fejlesztették, de ehhez a feladathoz is hatékonyan tudtam használni. A program először automatikusan behatárolta az aktin szál érdekes részét és irányultságát (5.18.c,d, i. ábra). Ezt a lokalizációs koordinátákra illesztett egyenes alapján határozta meg (5.18.c,d, ii. ábra). Ha szükséges volt, akkor a kiválasztott területen az egyenes illesztési paramétereit manuálisan korrigáltam. Ezután a program létrehozta a lokalizációs sűrűségfüggvényt az adott területről, amit egy Gaussos simító maggal szűrt (5.18.c,d, iii. ábra). A mag méretét $40 - 80 \text{ nm}$ -re állítottam be a lokalizációs sűrűségtől függően. Erre a lépésre a struktúra szimmetriatengelyének meghatározása miatt volt szükség, ami a sűrűségfüggvény maximumára való polinom illesztésen keresztül valósult meg. Tipikusan harmadfokú polinomot kellett beállítanom, hogy a függvény jól kövesse az aktin köteg vonalát. A program ezután numerikusan meghatározta minden lokalizációs koordináta távolságát az illesztett görbétől és egy hisztogramon ábrázolta (5.18.c,d, iv. ábra). Az így meghatározott eloszlás egy Gauss függvénnyel lett megillesztve, ami aztán a lokalizációs precizitás [46] és a beállított linkerhossz felhasználásával dekonvolválva lett. A dekonvolúciós lépésnél a linker hosszát 0 nm -re állítottam a falloidin kis mérete és annak kötési geometriája miatt [194]. Az így létrehozott eloszlásoknak a félértékszélességét ($FWHM$) az aktin kötegek vastagságának vettem. A felvett tubulusokat elemeztem, majd ábrázoltam a mérési eredményeket (5.18.e ábra).

5.3.3. Szálas hálózatok kvantitatív jellemzése

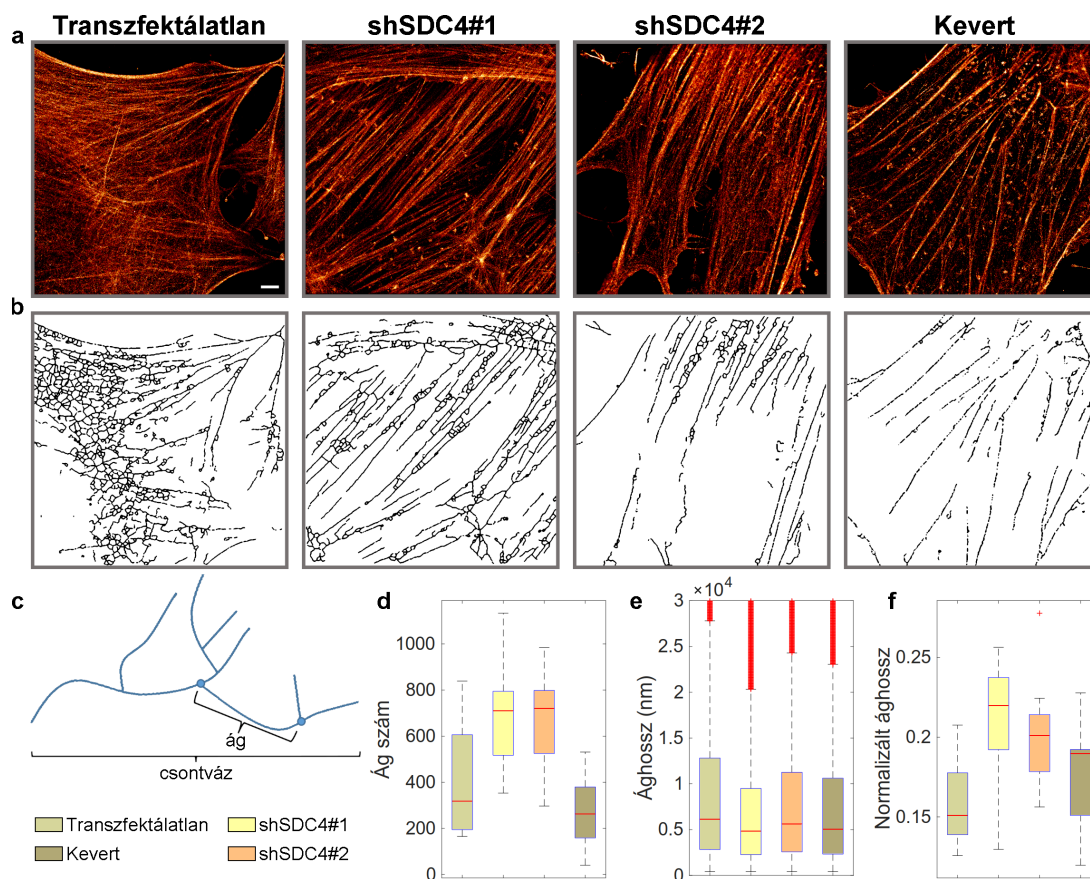
Feladatomban volt, hogy kvantitatívan jellemezzem a mioblaszt sejtek aktin hálózatát. Ehhez olyan mérőszámokat kellett találnom, amik azt jól jellemzik és a különböző sejtvonalak objektív összevetésére adnak lehetőséget. A kvantitatív jellemzéshez a felvételeken egy csontvázasító (skeletonization) algoritmust használtam, ami egy matematikailag jól kezelhető alakzatot (csontvázat) hozott létre (5.19.b ábra). A csontváz ebben az esetben azon pontok halmaza egy objektumban, amelyek legalább az objektum két oldalától azonos távolságra helyezkednek el. Két dimenziós objektumok esetén ezek vonalakat alkotnak. Ehhez az analízishez egy MATLAB kódot írtam. Első lépésben létrehoztam a lokalizációk 2D-s hisztogramját $20 \times 20 \text{ nm}$ -es rekeszméretekkkel. A pixelizált képeket Otsu módszerrel

rével [195] vagy az ImageJ-Fijivel beállított manuális küszöbértékkel binarizáltam, attól függően, hogy mennyire volt nagy a képen a háttér. Az így létrejövő képeket egy Gaussos simító maggal szűrtem (a mag standard deviációja: $3-4 \text{ pixel}$, vagyis $60-80 \text{ nm}$). Erre azért volt szükség, mert a lokalizációs képen a folytonos szálak gyakran különálló foltokból tevődtek össze, amiket viszont jól homogenizált a Gaussos simítás. Az így létrehozott képeket újra binarizáltam Otsu módszerével. Beépített MATLAB függvények (*bwskel* [196], *bwmorph* [197] és *bwdistgeodesic* [198]) segítségével létrehoztam a csontvázakat és meghatároztam az ágak számát és hosszát. Az ágak a csontvázat alkotó vonalak elágazódásai vagy végpontjai közötti szakaszok (5.19.c ábra). A rövid ($\leq 120 \text{ nm}$) ágakat kihagytam a kiértékelésből. A különböző struktúrák összevetéséhez meghatároztam az ágak számát (5.19.d ábra), azok hosszát (5.19.e ábra) és egy normalizált ághosszat (5.19.f ábra). A normalizált ághossz meghatározásához kiszámoltam a csontváz teljes méretét (az összes ág hossza pixelben) és azt elosztottam az ágak számával. Így olyan mérőszámot kaptam, ami független attól, hogy a sejt aktin vázának mekkora részét sikerült felvenni egy képen. Ez a szám végeredményben a szálak „szerteágazódását”, elágazódásra való affinitását jellemzi.

5.3.4. A fejezethez kapcsolódó téziseim

Csontvázasztáson alapuló, lokalizációs felvételekre alkalmazható számítógépes algoritmust fejlesztettem ki fixált sejteken belüli filamentális hálózatok kvantitatív jellemzésére. A lokalizációs koordinátákat felhasználva a filamentális szerkezet vastagsága is meghatározható. A módszereket a konfokális (CLSM) és nagyfeloldású dSTORM technikával végzett sejtbiológiai vizsgálatok kiértékeléséhez sikerrel alkalmaztam.

Kapcsolódó publikációk: [A4]



5.19. ábra. Mioblaszt sejtek aktin hálójának jellemzése. a–b, Reprezentatív dSTORM (**a**) és csontvázolt képek (**b**) a kontroll (Transzfektálatlan, Kevert) és csendesített (shSDC4#1, shSDC4#2) mintákról. **c,** Sematikus ábra egy csontvázról és annak ágairól. **d–f,** Az ágak szám (**d**), az ághossz (**e**) és a lenormált ághossz (**f**) eloszlása a négy minta esetén. A piros vonalak a mediánt jelölik, a beszínezett négyzetek alja és teteje a 25. és 75. percentiliseknek felelnek meg, a hibaszávok pedig a percentilisek közötti differencia másfélszeresével nyúlnak túl a téglalapok szélein. A kiugró értékek piros „+” szimbólummal vannak jelölve. Sejtszámok: 7–17, átlag: 12 (**d–e**). Skála: 2 μm (**a**).

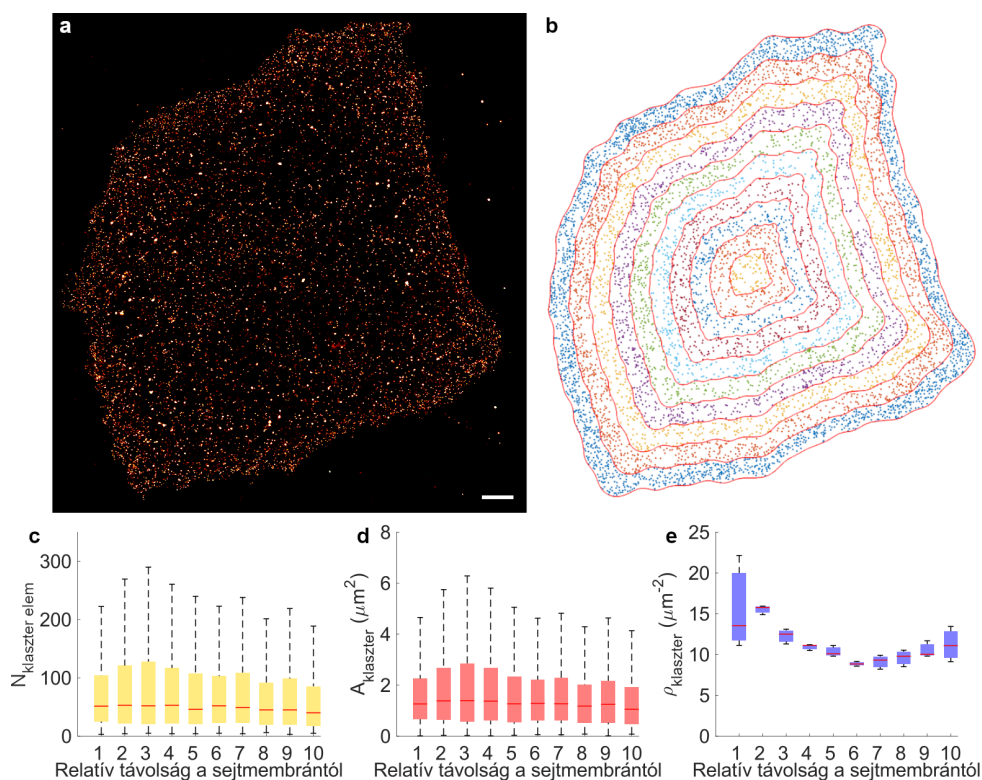
5.4. RNC klaszterek strukturális vizsgálata

Korábbi kutatások szerint a riboszóma – naszcens fehérje lánc komplexek (RNC-k) bizonyos esetekben fázisszeparálódott granulumokat alkotnak, ami egy genotoxikus stressz válasz [199]. A granulum védelmet jelent a lebontó folyamatokkal szemben a transzlációban elakadt, stressz válaszban szerepet játszó fehérjék számára, hogy azok expressziója szükség esetén gyorsan újra beindulhasson. Ez a folyamat még kevésbé ismert, noha a jelenség tanulmányozásának nyilvánvaló relevanciája van a radiorezisztens tumorok kezelésében. A riboszómák nagyjából 30 nm-es átmérője lehetővé teszi az RNC-k nagyfeloldású mikroszkópiás vizsgálatát. Feladatom a granulumokat alkotó RNC klaszterek strukturális vizsgálata, illetve kvantitatív jellemzése volt.

5.4.1. RNC klaszterek térfüggésének vizsgálata

Lokalizációs dSTORM felvételeket készítettem Rpt1-RNC expresszáló humán tüdő eredetű A549 adenokarcinóma sejtekről (5.20.a ábra). A kísérlet során a riboszómákból kilógó rendezetlen N-terminális volt megjelölve Alexa Fluor 647 fluorofórral. Az RNC klasztereket a sejtmembrántól való távolságuk szerint különböző csoportokba (zónákba) osztottam (5.20.b ábra). A sejtmembrán helyét a korábban ismertetett módon határoztam meg (alszakasz 5.1). A mintában lévő trendek megállapításához kritikus volt az adott statisztikai jellemzőket megfelelő feloldással vizsgálni. Ha a megválasztott zónák mérete túl kicsi volt, akkor az abban lévő klaszterek száma annyira lecsökkent, hogy nem lehetett valós eloszlást rendelni hozzájuk. Ha viszont a zónák mérete túl nagy volt, a valós trend eltűnt az alacsony feloldás miatt. Az általam vizsgált esetben a sejt 10 zónára osztása megfelelőnek bizonyult. Kimutattam, hogy míg az RNC klaszterek elemszámában és méretében nem volt szignifikáns térfüggés, addig a klasztersűrűség a membrán felé haladva jelentősen megnőtt (5.20.c–e ábra).

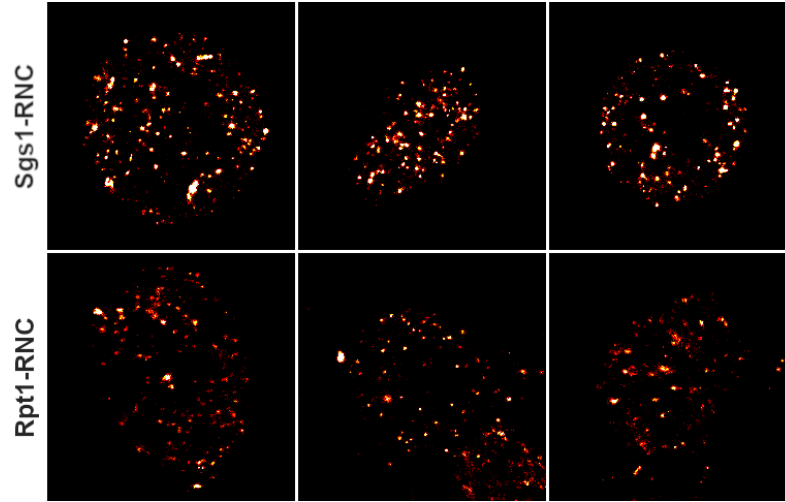
Ez a térfüggés élesztő sejtekben nem volt megfigyelhető. Élesztő sejteknél Rpt1-RNC-t és Sgs1-RNC-t expresszáló sejtekről készítettem felvételeket (5.21. ábra). Munkám során főként ezen felvételek elemzésével foglalkoztam. A nagyfeloldású képeken jól megfigyelhető volt a megjelölt RNC-k csomós struktúrája mind a két sejtípus esetén, azonban további



5.20. ábra. Klaszterparaméterek eloszlása humán tüdő eredetű A549 adenokarcinóma sejtekben. **a**, Nagyfeloldású dSTORM felvétel egy Rpt1-RNC jelölt A549 sejtről. **b**, A vizsgált területek határolói folytonos vonalakkal látszódnak, a pontok pedig a sejtben talált klaszterek középpontjai. **c–e**, Klaszterek elemszám (**c**), terület (**d**), illetve sűrűség (**e**) eloszlása a sejtmembrántól való távolság függvényében három sejtet elemezve. A sejtmembránhoz legközelebbi területrészt 1-gyel, a sejtmembrántól legtávolabbi területrészt pedig 10-zel jelöltem. A piros vonalak a mediánt jelölik, a beszínezett négyzetek alja és teteje a 25. és 75. percentiliseknek felelnek meg, a hibasávok pedig a legszélsőségesebb értékeket jelölik, amik még nem lettek kiugró értéknek megjelölve. Skála: $2 \mu\text{m}$ (**a**).

következtetések levonása kvantitatív kiértékeléseket igényelt. A lokalizáció axiális pozíciójának meghatározása érdekében asztigmias 3D-s méréseket végeztem, így az egymás közelében elhelyezkedő klasztereket hatékonyabban külön tudtam választani.

Az RNC klaszterek egymáshoz viszonyított helyzetét az alaszakasz 2.10.2 fejezetben bemutatott Ripley-féle H függvénnyel (továbbiakban H függvénnyel) vizsgáltam meg. A 2.7 képletben definiált szélhatás korrekciós faktort az élesztők kis mérete miatt figyelembe vettem. Ahogy az alaszakasz 2.10.2 fejezetben is leírtam, hogy a H függvény értéke pozitív azon r értékeknél, amelyeknél az adatban valamilyen klasztereződés, aggregáció

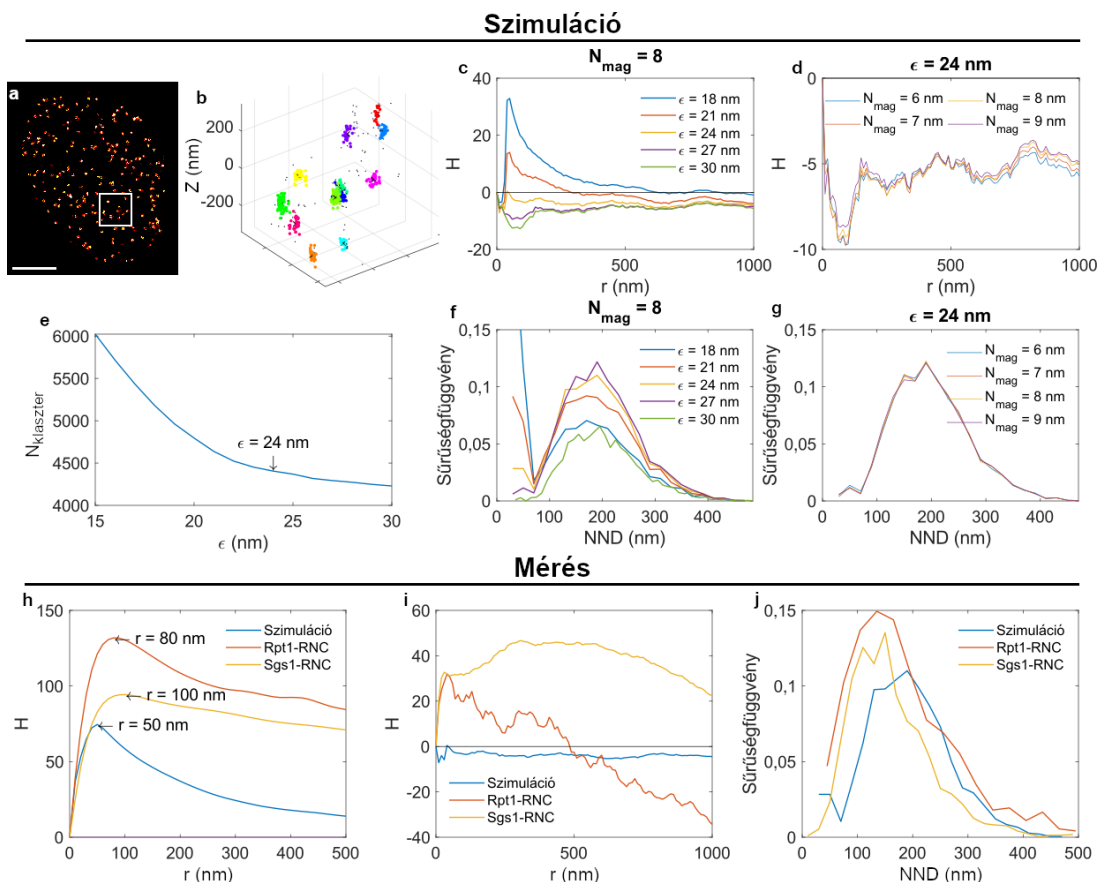


5.21. ábra. Reprezentatív Sgs1-RNC és Rpt1-RNC expresszáló sejtek dSTORM képe. A képeken jól látszódnak megjelölt RNC-k csomós szerkezete.

van jelen, negatív azon távolság értékeknél, amelyeknél az adatpontok elhelyezkedése diszperz, és zérus az értéke, ha az adathalmaz teljesen véletlenszerű értékeket tartalmaz. A függvény maximumának helye pedig a klaszterek méretéről ad információt. A 2.2 képletben lévő I_r kiszámításánál csak a laterális koordinátákat használtam, mivel azop precízebbek és a teljesen véletlenszerű (CSR) eloszlástól való eltérés ilyen módon is kimutatható. Az egyedi RNC-k egymáshoz viszonyított helyzetének vizsgálatához a hozzájuk tartozó lábnyomokat DBSCAN algoritmussal kerestem meg. A klaszteranalízishez optimális paramétereket a TestSTORM teszt minta generáló program segítségével határoztam meg. Egy szimulált mérési fájlt hoztam létre, amiben a szimulációs paramétereket (minta, festék és képkészítési paraméterek) a valós méréseknek megfelelően állítottam be. A szimulált minta 20 db élesztő sejtből állt, amelyekben véletlenszerűen, egymástól átlagosan 200 nm-es távolsággal helyezkedtek el az egyedi RNC-ket imitáló epitópok (5.22.a ábra). A klaszteranalízist többféle paraméterrel lefuttattam és megvizsgáltam azok hatását a H függvényre, a legközelebbi szomszédos távolságok (NND) eloszlásának alakjára, illetve a megtalált klaszterek számára (5.22.c–g ábra). N_{mag} állandó értéken tartásakor kisebb ϵ értékeknél két anomális jelenség figyelhető meg. Egyrészt a megtalált klaszterek közép-pontjainak eloszlása kis távolság értékeknél ($r = \sim 50$ nm) klasztereződést mutat (5.22.c

ábra). Másrészt az NND eloszlás egy határozott csúcsot mutat kis távolság értékeknél (5.22.d ábra). Megállapítottam, hogy ez a két jelenség műtermék és annak tudható be, hogy kisebb ϵ értéknél az analízis nagyobb felbontásban vizsgálja a lokalizációs teret és külön klaszterekként reprezentálja egy klaszter lokális sűrűsödéseit. Ezek a több részre osztott klaszterek térben egymáshoz közeli csoportokat eredményeznek. Ezt a magyarázatot támasztja alá, hogy az ϵ érték növelésével a két jelenség eltűnik. Egy kritikus ϵ értéken túl azonban a klaszteranalízis az egymáshoz közeli klasztereket egybeolvasztja, ami diszperz eloszlást eredményez és a H függvény negatívba hajlik (5.22.c ábra), illetve az NND eloszlásból eltűnnek a kis távolságértékek és az eloszlás elkezd eltolódni pozitív irányba (5.22.d ábra). Azt tapasztaltam, hogy az N_{mag} paraméterre kevésbé érzékenyek az általam vizsgált értékek (5.22.d,g, ábra). A klaszteranalízis során tehát azt a paraméterteret – 5.22.d,g, ábraalapján azt az ϵ értéket – kellett kiválasztanom, ahol a fentebb tárgyalt anomális jelenségek hatása minimális. Ezt az ideális értéket $\epsilon = 24 \text{ nm}$ -nek határoztam meg. Úgy találtam, hogy ennél az ϵ értéknél a megtalált klaszterek számának gyors csökkenése megáll és egy kisebb meredekségű lineáris csökkenésbe megy át (5.22.e ábra). Ilyen módon megállapítottam egy ökölszabályt a DBSCAN paraméterek beállítására, a szimulációs fájlok kiértékelésével pedig meghatároztam egy referencia H görbét, amihez tudom viszonyítani a mérési fájlokat. A mérési fájloknál a lokalizációkra számolt H függvény értékei rendre nagyobbak voltak a CSR eloszlású szimulációhoz képest (5.22.h ábra). A H függvény csúcsa a szimulációs fájlok esetén a lokalizációs precizitás és a beállított linkerhossznak megfelelően $r = 50 \text{ nm}$ -nél volt, míg az Rpt1-RNC és Sgs1-RNC expresszálo sejtekre rendre $r = 80 \text{ nm}$ és $r = 100 \text{ nm}$ -es értékeket kaptam. DBSCAN klaszteranalízist hajtottam végre a korábban részletezett módszerrel meghatározott paraméterekkel ($\epsilon = 24 \text{ nm}$; $N_{mag}=8$), majd meghatároztam a H függvény értékeit a klaszterközéppontokra számolva (5.22.h ábra). Az élesztő sejteknél néhány száz nm -es tartományon határozott klasztereződést figyeltem meg a referencia görbéhez képest. Az Sgs1-RNC expresszálo sejteknél számolt H függvényének nem volt határozott maximuma, vagyis a klasztereződés több méretskálán megvalósult. Az NND eloszlások lefutása hasonló karakterisztikájú volt, mint a szimulált minta esetén, de az eloszlás maximuma a mérési fájloknak esetén

kisebb volt (5.22.j ábra). Az eredmények arra a következtetésre vezettek, hogy az RNC-k valamiféle klasztereződése a vizsgált sejttípusokban jelen van, aminek mértéke az Sgs1-RNC expresszálo sejteknél jelentősebb, mint az Rpt1-RNC expresszálo sejteknél. Főként az utóbbinál a klaszterek mérete nem állandó.



5.22. ábra. Az RNC klaszterek vizsgálata szimulált és valós élesztő sejtekben.

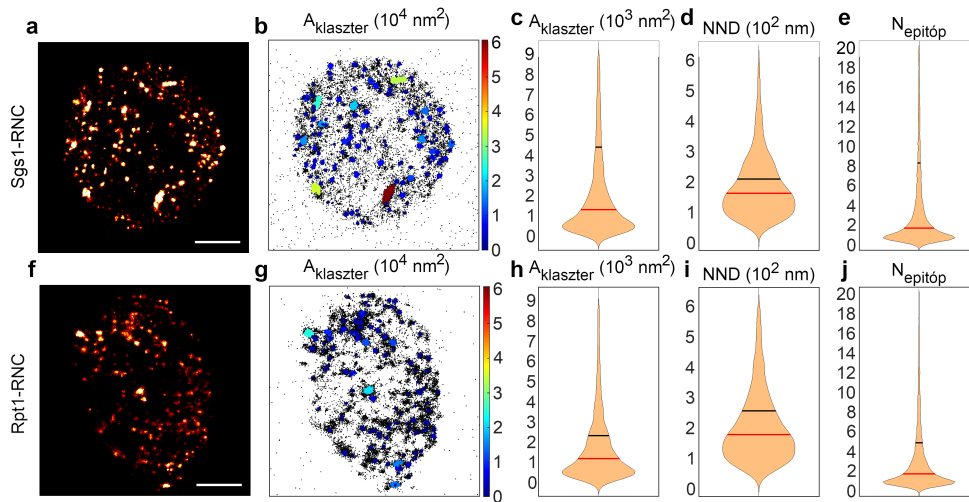
a, Egy szimulált, CSR epitóp eloszlású élesztő sejt nagyfeloldású képe. **b**, A megtalált klaszterek térbeli ábrázolása az **a**-n fehér négyzettel bejelölt régióban. A színezés csak a klaszterek megkülönböztetését szolgálja. **c–d**, A szimulált élesztő sejtekben megtalált klaszterközpontok Ripley-féle H függvénye különböző DBSCAN paramétereknél. **e**, A DBSCAN algoritlussal megtalált klaszterek száma ϵ paraméter függvényében. **f–g**, Az RNC klaszterek NND eloszlása különböző DBSCAN paraméterek esetén. Jól látszódik, hogy az N_{mag} paramétertől nem függ jelentősen az analízis eredménye (**d,g**). **h**, A mérési fájlok lokalizációinak Ripley-féle H függvényei összevetve a szimulációs referencia görbével. **i**, A mérési fájlokban talált klaszterek Ripley-féle H függvényei összevetve a szimulációval kapott referencia görbével. **j**, A mérési fájlokban talált klaszterek NND eloszlása összevetve a szimulációval kapott referencia görbével. Skála: 1 μm (**a**).

Az Sgs1-RNC expresszálo sejteknél a lokalizációkra számolt H függvényben a nagyobb r értékeknél felvett maximum jelenthet nagyobb mértékű riboszóma csoportosulást, de nagyobb méretű linkerhosszt is, ami nagyobb klaszterméreteket eredményezhet. A kérdés megválaszolása érdekében megvizsgáltam a felvillanásokra illesztett függvények szélességét. Jelentősen eltérő linkerhosszak esetén az illesztett függvények szélességében különbség van, ugyanis a fluorofórok a bekötési helyük körül szabadon és gyorsan mozognak és így egy „elkent”, kiszélesedett képet hagynak maguk után. A rainSTORM lokalizációs program asztigmias 3D-s mérések esetén két irány mentén illeszt Gauss-görbét a felvillanások intenzitás profiljára, amiket x és y irányoknak nevezek. Az illesztések szélességét a σ paraméter jellemzi. Megállapítottam, hogy az illesztett görbék szélességében nem volt szignifikáns különbség, sőt az Rpt1-RNC expresszálo sejtekről készült méréseknél kis mértékben nagyobb átlag értéket kaptam ($\sigma_x = (174,5 \pm 29,3) \text{ nm}$; $\sigma_y = (173,9 \pm 29,8) \text{ nm}$), mint az Sgs1-RNC expresszálo sejtek esetén ($\sigma_x = (170,2 \pm 28,9) \text{ nm}$; $\sigma_y = (170,7 \pm 28,0) \text{ nm}$) (az ábrát lásd a függelékben: F3 szakasz). A mérési eredmények alátámasztották, hogy az Sgs1-RNC egységek esetén valóban jelentősebb mértékű klasztereződés van jelen a sejten belül.

5.4.2. RNC klaszter paraméterek eloszlásának vizsgálata

A DBSCAN klaszteranalízissel ($\epsilon = 24 \text{ nm}$; $N_{mag} = 8$) talált RNC klasztereket további szempontok alapján is megvizsgáltam (5.23. ábra). Az analízis 36 db Sgs1- és 68 db Rpt1-RNC expresszálo sejtet foglalt magába. A sejtek nagy számú, egyedi RNC-t tartalmaztak és az ezekhez tartozó klasztereket hatékonyan ki tudtam választani, amivel lehetőségem nyílt az RNC klaszterek epitóp számának megbecslésére az alszakasz 5.1 fejezetben bemutatott módszerrel. A nagy számú egyedi RNC miatt a klaszterek terület, NND és epitópszám eloszlásának medián értékei mindkét sejttípusnál hasonlóknak bizonyultak (5.23.c–e,h–j, ábra). A több RNC-ből álló klaszterek viszont szignifikáns hatással tudtak lenni az átlagértékekre, ezért az átlagérték jó értékmérőnek bizonyult a két sejttípus összehasonlítására. Az Sgs1-RNC klaszterek területének átlaga (4398 nm^2) 86 %-kal nagyobb volt, mint az Rpt1-RNC klasztereké (2363 nm^2) (5.23.c,h, ábra). Hasonlóan az

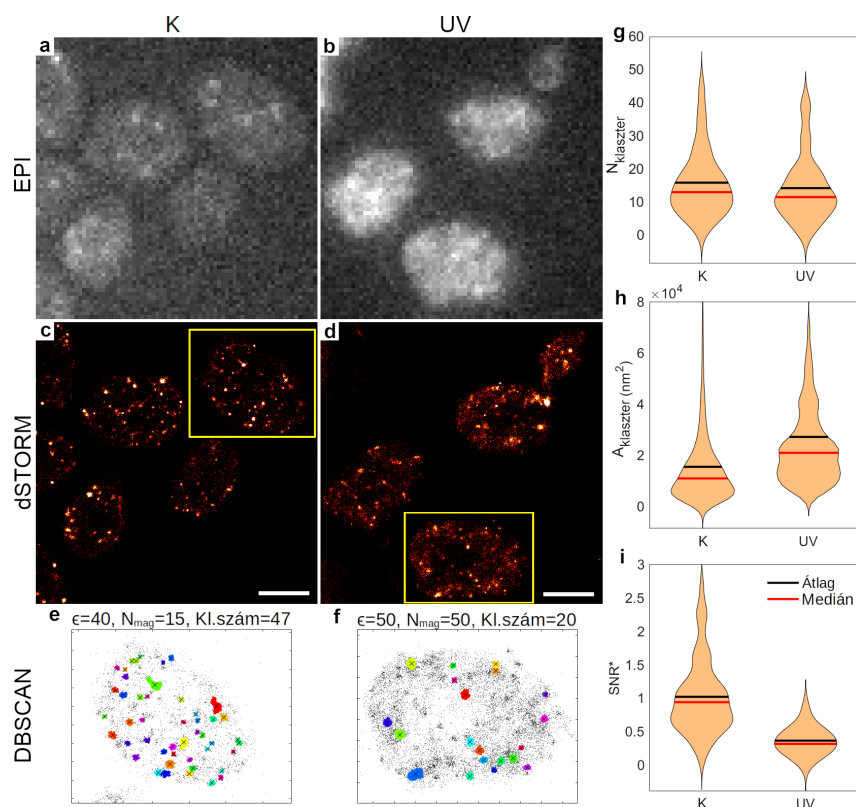
Sgs1-RNC klaszterek epitópszámának átlagát (8,30) 71 %-kal nagyobbak mértem, mint az az Rpt1-RNC klasztereket (4,85) (5.23.e,j, ábra). A klaszterek sűrűségében is különbséget tapasztaltam a két sejttípus között, amit az *NND* eloszlás reprezentál (5.23.d,i, ábra). A legközelebbi szomszédos klasztertávolság Sgs1-RNC expresszálo sejt esetén 17 %-kal kisebb, mint az Rpt1-RNC expresszálo sejtekben: 210,3 nm, illetve 252,3 nm. Mindez jó egyezést mutat a Western-blot kísérletekkel, amik az indukált Rpt1- és Sgs1-RNC-k abszolút mennyiségét állapították meg [T4]. Az eredmények alátámasztották, hogy a vizsgált Sgs1-RNC, illetve Rpt1-RNC expresszálo élesztő sejtekben az RNC-k klaszterizálódnak, és hogy az Sgs1-RNC expresszálo sejtekben ennek mértéke jelentősebb.



5.23. ábra. RNC klaszterparaméterek eloszlása. **a,f**, Reprezentatív dSTORM képek a kétféle sejttípusról. **b,g**, Az **a**, és **f**, sejt klaszteranalizált képe. A klaszterek a terület méretével vannak színekódolva. **c–e**, illetve **h–j**, Klaszter terület (**c,h**), legközelebbi szomszédos klaszter távolság (**d,i**) és epitóp szám (**e,j**) eloszlások az összes vizsgált Sgs1-RNC és Rpt1-RNC expresszálo sejtre vonatkoztatva. A piros vonalak a medián értékeket jelölik, a feketék pedig az átlag értékeket. Sejtszámok: 34 (**a–e**), 70 (**f–j**). **Skála:** 1 μm (**a,f**).

Rpt1 és Rpt2 fehérjék tartalmazzák az ún. Not1 alegységet. A Not1-et tartalmazó granulumok létrejötte UV kezelés hatására már leírt jelenség [199]. Az UV kezelés hatásának megvizsgálása érdekében felvételeket készítettem 64 kontrol és 14 UV kezelt Not1 expresszálo élesztő sejtről, amikben a Not1 lett megjelölve Alexa Fluor 647 fluorofórral (5.24.a-d, ábra). A klaszteranalízis kimutatta, hogy az UV kezelés előtt több, kisebb méretű klaszter volt jelen a sejteken belül, majd UV kezelés hatására a klaszterek száma

lecsökkent és méretük megnőtt (5.24.e-h, ábra). Ezen felül megfigyelhető volt, hogy a klaszterekhez tartozó lokalizációk és az egyéb lokalizációk aránya jelentősen csökkent UV kezelés után, vagyis több Not1 volt szabadon a citoplazmában, melyek nem tartoztak klaszterekhez (5.24.i, ábra).



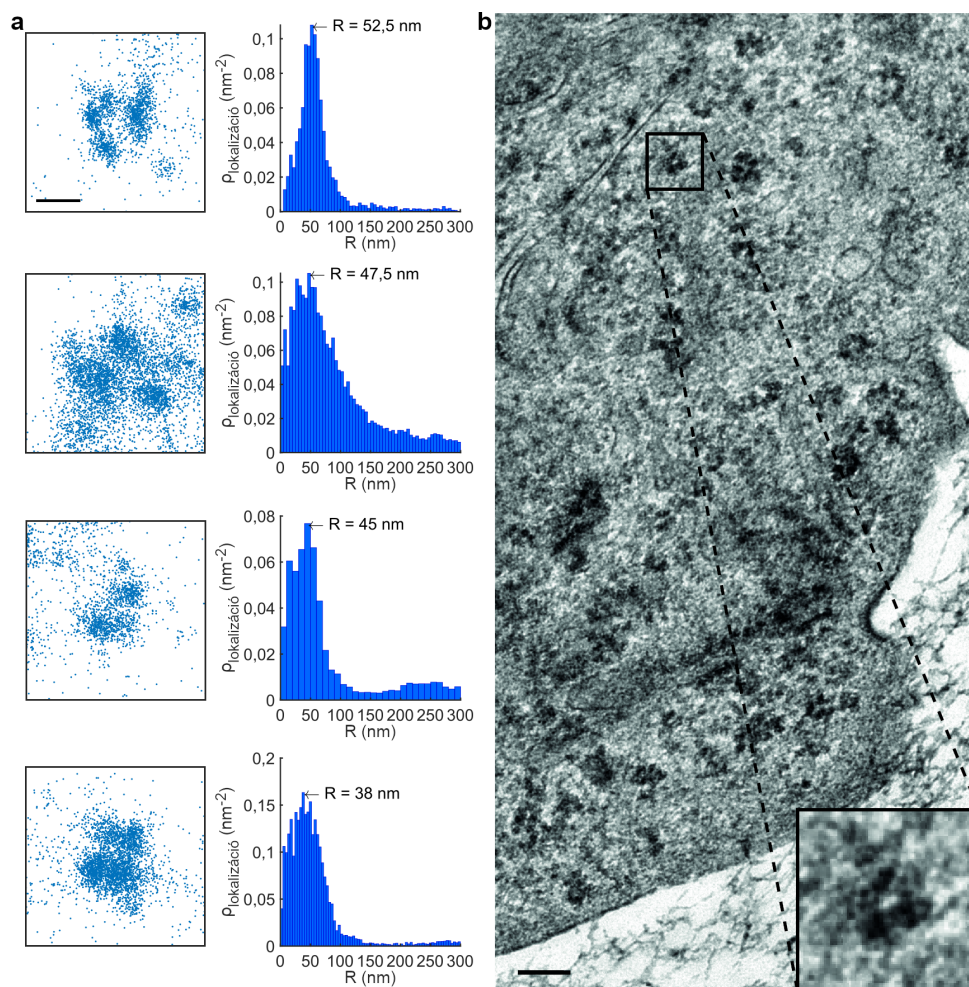
5.24. ábra. Not1 klaszterek vizsgálata UV kezelés hatására. a-b, Epifluoreszcens mikroszkópiás felvételek kezeletlen (CTL: **a**) és UV kezelt (UV: **b**) fixált Not1-et expresszáló élesztő sejtekről. A Not1 lett megjelölve Alexa Flour 647 fluorofórral. **c-d**, dSTORM felvételek ugyanazokról a sejtekről, mint az **a** és **b** ábrákon. **e-f**, Klaszteranalizált képek az **c** és **d** ábrán sárga négyzettel kijelölt területekről. **g-i**, Klaszterek száma/sejt (**g**), klaszterek mérete (**h**) és jel-zaj viszony (klaszterekhez tartozó lokalizációk száma/egyéb lokalizációk száma) (**i**). Skála: 2 μm (**c-d**).

5.4.3. RNC klaszterek alaki tényezőinek vizsgálata

A nagy számú RNC indukció miatt létrejöhetnek olyan aggregátumok is, amelyeknek nincs köze a stressz válaszhoz. Céлом az előbbieket pontosabb karakterizálása volt, ezért a $2 \cdot 10^5 \text{ nm}^2$ alatti területű ($\sim 500 \text{ nm}$ átmérő alatti) klasztereket kiszűrtem a további

elemzésből. Feltételeztem, hogy a granulumok térbeli dimenziója izotróp, vagyis a morfológiai információkat a lokalizációk radiális sűrűségeloszlása ($\rho_{\text{lokalizáció}}$) egyértelműen magában hordozza. A klaszterek szimmetriaközéppontját a hozzájuk tartozó lokalizációk súlypontjával azonosítottam és a radiális szimmetria miatt csak a laterális koordináták ettől való távolságát vizsgáltam. Ez abból a szempontból előnyös volt, hogy laterális irányban nagyjából háromszor precízebb koordinátákkal rendelkeztem. Megállapítottam, hogy a $\rho_{\text{lokalizáció}}$ maximuma az ilyen mérettartományba tartozó Sgs1-RNC klaszterek esetén 28,2 %-ban, az Rpt1-RNC klaszterek esetén pedig 26,5 %-ban a középponttól távolabb helyezkedik el, attól: $R_{\text{sgs1}} = (39,09 \pm 25,79) \text{ nm}$ -re, és $R_{\text{rpt1}} = (54,25 \pm 23,20) \text{ nm}$ -re. Mindez rámutatott, hogy a lokalizációk eloszlásának sűrűségében néhány 10 nm-es tartományon fluktuációk vannak. Ez a radiális szimmetria miatt üreges, gyűrűszerű alakzatokat sejtet. Az ilyen konstrukciók egy viszonylag egyszerű, az mRNS izolációjára alkalmas szerkezetek lehetnek. Az üreges szerkezet alátámasztására viszont további bizonyítékokra volt szükség. Ennek során két problémát kellett megoldanom. Az egyik probléma az volt, hogy ezek a klaszterek gyakran sűrűn helyezkedtek el és a DBSCAN algoritmussal nem mindig lehetett szeparáltan analizálni őket. A másik megoldandó probléma pedig abból adódott, hogy a lokalizációs sűrűség inhomogenitása és a jelölés esetleges alulmintavételezése miatt a lokalizációk súlypontjának megadása pontatlan módszer volt az RNC klaszterek középpontjának meghatározásához. Ezért egy keresztkorreláción alapuló üreges struktúra kereső algoritmust hoztam létre MATLAB környezetben. Korrelációs maszknak a korábban megállapított sugárértékek alapján megtervezett gyűrű alakzatot használtam ($R_{\text{külső}} = 70 \text{ nm}$; $R_{\text{belső}} = 22 \text{ nm}$), amivel számításaim szerint jó közelítéssel megtalálható az üreges struktúráknak a középpontja abban az esetben is, ha azok rossz mintavételezése aszimmetrikus, vagy különálló klasztereket eredményez. A lokalizációkat és a korrelációs maszkot 5 nm-es pixelmérettel raszterizáltam és minden pixelhez hozzárendeltem a keresztkorrelációs értéket. Az így létrejövő korrelációs térképen a MATLAB *findpeaks* beépített függvényét felhasználva megkerestem a lokális maximumokat. A korrelációs helyek megkeresés után megvizsgáltam ezeken a területeken a lokalizációk eloszlását. Az analízis során több gyűrűszerű alakzatot is találtam (5.25.a, ábra). Érdekes, hogy ilyen gyűrűszerű

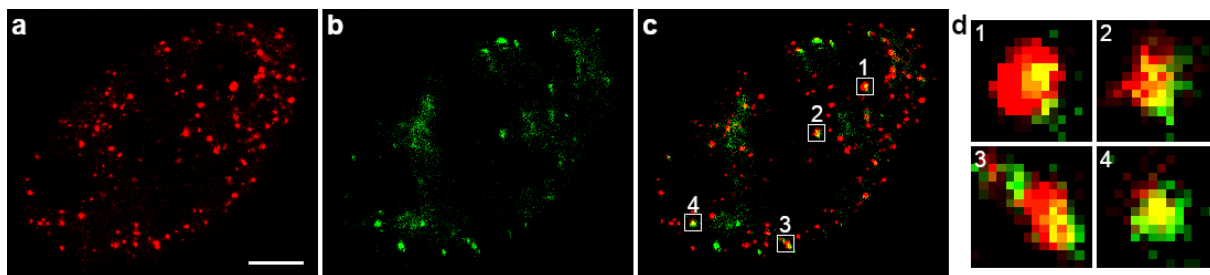
struktúrák, teljesen hasonló méretben A549 sejtekről készült TEM képeken is detektálhatóak voltak (5.25.b, ábra).



5.25. ábra. Gyűrű alakú struktúrák detektálása dSTORM felvételeken és TEM képen. a, Korrelációs algoritmussal talált gyűrűszerű alakzatok és a radiális lokalizációs sűrűségeloszlás a korrelációs maszk közepétől számítva. **b,** TEM kép egy A549 sejtről, a riboszómák fekete foltokként látszódnak. A TEMfelvételt Rázga Zsolt készítette az SZTE - ÁOK Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Patológiai Intézetében. Skála: 100 nm (a). 200 nm (b).

A lokalizációs képeken a lokális minimummal rendelkező klaszterek számát csökkenthetik az RNC-k szoros együttléte miatt megnövekedett számú átfedő felvillanás, ami a klaszterek középpontja felé megnövekedett számú hamis lokalizációt eredményezhet [60]. Az átfedő felvillanások műtermékek bevezetése mellett a felvillanások képének rosszabb

megilleszthetősége miatt az elvetett lokalizációk számát is megnövelik, ezért megvizsgáltam a kolokalizáció mértékét a nagyfeloldású képek és az elvetett lokalizációkból rekonstruált képek között (5.26. ábra). A nagyobb RNC klaszterek pozíciójában jelentős számú elvetett lokalizációt tapasztaltam, ami valóban ronthatja egy üreges struktúrák láthatóságát.



5.26. ábra. Kolokalizáció vizsgálata az RNC klaszterekben. **a**, Egy Sgs1-RNC expresszáló élesztő sejt dSTORM képe. **b**, Az elvetett lokalizációk ábrázolása az **a** területen. **c**, Az elfogadott (vörös) és elvetett (zöld) lokalizációk ábrázolása egy képen. **d**, Négy kinagyított terület **c**-ről. A kolokalizációt a sárga szín jelöli. Skála: 1 μm (**a**).

5.4.4. A fejezethez kapcsolódó téziseim

Lokalizációs felvételek elemzésével megmutattam, hogy az Rpt1-RNC klaszterek sűrűsége az A549 humán adenokarcinóma sejtekben a sejtmembránhoz közeledve növekszik, míg hasonló tendencia élesztő sejtekben nem volt megfigyelhető. A TestSTORM teszt minta generáló program segítségével kidolgoztam egy módszert a DBSCAN paraméterek optimális beállítására a klaszterek elemzéséhez. Megállapítottam, hogy az Rpt1 és az Sgs1 fehérje transzlációjában elakadt riboszóma-naszcnés-lánc komplexek élesztő sejtekben klaszterizálódnak és ennek mértéke Sgs1-RNC expresszáló sejtekben jelentősebb. DBSCAN algoritmussal karakterizáltam az UV kezelés hatását Not1 tartalmú klaszterekre. Egy keresztkorreláción alapuló klaszter kereső algoritmussal megállapítottam, hogy a megtalált klaszterek egy jelentős része üreges struktúrával rendelkezik.

Kapcsolódó publikációk: [A5]

6. Összefoglalás

6.1. Bevezetés

A fluoreszcens mikroszkópia megjelenése lehetővé tette biológiai minták nagy kontrasztú vizsgálatát nem invazív módon. A feloldási határt azonban a diffrakció limitálta, ami miatt a néhány száz nanométer alatti tartomány rejtve maradt. A nagyfeloldású mikroszkópai technikák viszont új területet nyitottak meg a kutatások előtt, mivel a fluoreszcens minta diffrakció limit alatti struktúráinak vizsgálatát tették lehetővé [8]. Ezen technikák közül a lokalizációs mikroszkópai módszerek (SMLM) nagy népszerűsége tettek szert, melynek során egyedi molekulák pozícióját határozzuk meg mindössze 10–20 nm-es feloldással [4, 6, 7]. Ebből a megközelítésből adódóan a nyers lokalizációs fájl a hagyományos pixelizált mikroszkópos képektől eltérő módon egy olyan adathalmaz, mely a lokalizált fluorofórok koordinátáit tartalmazza. Az ilyen pontfelhők elemzése új megközelítési módokat igényel [70].

Mivel egy lokalizáció egyetlen fluorofór koordinátáinak feleltethető meg, az SMLM technika felkeltette az érdeklődést a célmolekulák számának kvantitatív jellemzése szempontjából. A molekulák számának meghatározása rendkívül releváns, azonban a fluorofórok sztochasztikus fotofizikai viselkedése és a gyakran ismeretlen jelölési sztöchiometria megnehezíti ezt a feladatot. Az SMLM által generált pontfelhők új lehetőségeket adtak klaszteranalízisre is. Mivel a sejtfunkciókat gyakran fehérjék tér- és időbeli elrendeződése szabályozza, ennek tanulmányozása fontos kérdések megválaszolásához segíthet hozzá. A klasztereződés kimutatása önmagában fontos feladat, azonban a klaszterek kvantitatív jellemzése további felfedezésekre ad lehetőséget. A klaszterek különböző tulajdonságait eloszlásokkal lehet a legjobban leírni és ezek tér- és időfüggőek lehetnek. Biológiai releváns kérdések megválaszolásához a célfehérje által képzett klaszterek egymáshoz viszonyított helyzetének, illetve alaki tényezőjének meghatározása is hozzásegíthet. Lokalizációs adat-sorok esetén a felvételek strukturális vizsgálata is új analitikai eszközöket igényel. A fizikai dimenziók meghatározása tipikusan a vizsgált struktúra keresztmetszeti profiljára való elemleti görbe illesztésével történik. Bár a lokalizációs koordináták alapján létrehozhatunk

egy hagyományos, pixelizált képet, amin már alkalmazhatóak a hagyományos képelemzésben megszokott módszere, de egy ilyen kép létrehozása információvesztést eredményezhet, ezért tanácsos közvetlenül a lokalizációs koordinátákat használni méretmeghatározáshoz.

6.2. Célok és kutatási módszerek

Céлом volt, hogy értelmezsem és kvantitatív információkat nyerjek ki az SMLM technikával kapott pontfelhőkből, különös tekintettel a megjelölt molekulák számára, a klasztereződés kimutatására valamint a klaszterek és a minta geometriai paramétereinek jellemzésére. Terveim között szerepelt, hogy az eredményeket összevegyem a biológiai kutatásokban széles körben elterjedt konfokális mikroszkópiás (CLSM) felvételek elemzéséből kapott eredményekkel, feltérképezve a korrelatív mérések lehetőségeit. A mikroszkópiás mérések elvégzése szintén a feladataim között szerepelt. Célul tűztem ki, hogy az alkalmazott analitikai módszerek ne bonyolítsák a mérési protokollt, valamint ne növeljék meg a mérési időt.

Célkitűzéseimet olyan fontos biológiai problémák motiválták, mint a DNS kettős szálú töréseket jelező γ H2AX hisztonok számának kvantitatív megbecslése, a γ H2AX klaszterek időbontott vizsgálata röntgen besugárzás után, az aktin szálak szerkezetében bekövetkező változások, vagy RNC klaszterek kvantitatív jellemzése genotoxikus stressz hatás után. A kísérletek elvégzéséhez az AdOptIm kutatócsoport dSTORM és CLSM rendszerét használtam. Az adatok számítógépes elemzése során MATLAB-ot, illetve Python programozási nyelvet használtam.

6.3. Új tudományos eredmények

T1: A fluoreszcens molekulákat három állapotú rendszerrel modellezve meghatároztam egyedi megjelölt célmolekulához tartozó lokalizációk számának valószínűségi tömegfüggvényét tetszőleges jelölési arány esetén dSTORM mérések során. Számítógépes algoritmust fejlesztettem a mikroszkóp rendszer válaszfüggvényének meghatározására közvetlenül a lokalizációs adatsorból. Nagyfeloldású dSTORM méréseket végeztem U2OS és D4A sejt-magokról és a kidolgozott módszerrel meghatároztam az általam használt rendszerben a

kromatin szerkezetet felépítő alegységhez tartozó válaszfüggvényt. [A1, A2]

T2: Kifejlesztettem egy DBSCAN alapú algoritmust lokalizációs adatsorok klaszteranalíziséhez. A programmal kvantitatívan jellemeztem a klaszterek tulajdonságait, valamint meghatároztam ezen paraméterek eloszlását a vizsgált területen belül. Nagyfeloldású dSTORM és konfokális (CLSM) méréseket végeztem U251 humán glioblasztóma sejtekről röntgen besugárzás után és időbontott vizsgálatot hajtottam végre a kettős szálú DNS töréseket jelző γ H2AX klasztereken. A két technikával nyert eredményeket összevettem, valamint karakterizáltam a korrelatív mérések lehetőségeit. TestSTORM teszt minta generátorral végzett szimulációk alapján feltérképeztem a 2D-s és 3D-s kiértékelések alkalmazhatóságának határait és hitelesítettem a 2D-s dSTORM mérésekkel kapott eredményeimet. [A3]

T3: Csontvázasításon alapuló, lokalizációs felvételekre alkalmazható számítógépes algoritmust fejlesztettem ki fixált sejteken belüli filamentális hálózatok kvantitatív jellemzésére. A lokalizációs koordinátákat felhasználva a filamentális szerkezet vastagsága is meghatározható. A módszereket a konfokális (CLSM) és nagyfeloldású dSTORM technikával végzett sejtbiológiai vizsgálatok kiértékeléséhez sikerrel alkalmaztam. [A4]

T4: Lokalizációs felvételek elemzésével megmutattam, hogy az Rpt1-RNC klaszterek sűrűsége az A549 humán adenokarcinóma sejtekben a sejtmembránhoz közeledve növekszik, míg hasonló tendencia élesztő sejtekben nem volt megfigyelhető. A TestSTORM teszt minta generáló program segítségével kidolgoztam egy módszert a DBSCAN paraméterek optimális beállítására a klaszterek elemzéséhez. Megállapítottam, hogy az Rpt1 és az Sgs1 fehérje transzlációjában elakadt riboszóma-naszcnes-lánc komplexek élesztő sejtekben klaszterizálódnak és ennek mértéke Sgs1-RNC expresszáló sejtekben jelentősebb. DBSCAN algoritmussal karakterizáltam az UV kezelés hatását Not1 tartalmú klaszterekre. Egy keresztkorreláción alapuló klaszter kereső algoritmussal megállapítottam, hogy a megtalált klaszterek egy jelentős része üreges struktúrával rendelkezik. [A5]

7. Summary

7.1. Introduction

The appearance of fluorescent microscopy has made possible the investigation of biological samples with high contrast in a non-invasive way. However, the resolution was limited by diffraction, therefore structures below a few hundred nanometers remained hidden. Super-resolution microscopy techniques in turn opened new ways to research, because these methods have made it possible to analyze structures of fluorescent samples below the diffraction limit [8]. Among these techniques localization microscopy (SMLM) has become popular. In SMLM, the positions of individual molecules are determined with a resolution of $10 - 20 \text{ nm}$ [4, 6, 7]. As a result of this approach the raw localization file, unlike the pixelated nature of the conventional microscopical images, is a data set, which contains the localization coordinates of the fluorophores. The analysis of such point clouds requires new approaches [70].

Since a localization corresponds to the coordinates of a single fluorophore, the SMLM technique aroused interest in terms of the quantitative characterization of target molecules. The determination of the number of molecules is extremely relevant, but the stochastic photophysical behavior of the fluorophores and the often unknown labeling stoichiometry makes this task difficult. The point clouds generated by SMLM also gave new opportunities to cluster analysis. Since cell functions are often regulated by the spatial and temporal organization of proteins, studying these organizations could help answering important questions. Detecting clusterization is an important task on its own, but the quantitative characterization of the clusters can lead to further findings. The best way to describe different cluster properties is to determine the distribution of the properties which can have a spatial and a temporal dependence. The spatial structure of the clusters formed by the target proteins and the shape factor of these clusters could help answering relevant biological questions. In case of localization data sets, structural investigations require new approaches. Determination of physical dimensions usually happens through a theoretical curve fitting to the cross sectional profile of the examined structure. There are multiple

ways to produce this profile. On the one hand a super-resolution image can be created based on the localization coordinates on which the familiar methods of conventional image analysis can be used. While on the other hand the generation of such an image can result in information loss, so it is advisable to use the localization coordinates directly.

7.2. Objectives and methods

My goal was to interpret the point clouds generated by the SMLM technique and obtain quantitative information from them, in particular the number of labeled molecules, the detection of clusterization as well as the characterization of the clusters and the geometrical parameters of the sample. It was among my plans to compare these results with results obtained from the analysis of confocal images to explore the possibilities of correlative measurements. It was relevant, because confocal laser scanning microscopy (CLSM) is a prevalent technique in biological research. Performing the necessary measurements was also among my tasks. It was my purpose to not complicate the measurement protocol and to not increase the measurement time with the employed analytical methods.

My objectives were motivated by important biological problems, such as estimating the number of γ H2AX histones (which are signaling proteins of DNA double-strand breaks), the time resolved analysis of γ H2AX clusters after X-ray irradiation, the changes in the structure of actin filaments or the quantitative characterization of RNC clusters after a genotoxic stress. I used the dSTORM and CLSM system of AdOptIm research group to conduct the measurements and I mainly used MATLAB and Python to analyze measurement data.

7.3. New scientific results

T1: I determined the probability mass function of the localization numbers corresponding to a single target molecule in case of any labeling ratio during dSTORM measurements by modeling the fluorescent molecules with a three state system. I developed a computer algorithm for the determination of the response function of the used microscope system directly from the localization data set. I performed super-resolution dSTORM measure-

ments on U2OS and DlvA cell nuclei and determined the response function corresponding to the subunit of the chromatin structure. [A1, A2]

T2: I developed an algorithm based on the DBSCAN method to cluster analyze localization data sets. I quantitatively characterized the properties of the clusters and determined the distributions of these parameters within the region of interest. I performed super-resolution dSTORM and confocal (CLSM) measurements on U251 human glioblastoma cells after X-ray irradiation and performed a time resolved investigation on the DNA double-strand breaks signaling γ H2AX clusters. I compared the results obtained with the two techniques and characterized the possibilities of correlative measurements. I explored the limits of the applicability of *2D* and *3D* analysis via TestSTORM simulations and validated my *2D* dSTORM measurement results. [A3]

T3: I developed a computer algorithm based on skeletonization to quantitatively characterize filamental networks of fixed cells based on the localization data set. Using the localization coordinates, the thickness of the filamentary structure can also be determined. The methods have been successfully applied to the evaluation of cell biological studies using confocal (CLSM) and high-resolution dSTORM techniques. [A4]

T4: By analyzing the localization measurements I showed that the density of Rpt1-RNC clusters is increasing toward the cell membrane of A549 adenocarcinomic human cells, while the same phenomenon was not observable in yeast cells. Using TestSTORM test sample generator, I have developed a method to set the optimal DBSCAN parameters to analyze clusters. I found that the ribosome-nascent chain complexes, which are paused during the translation of Rpt1 and Sgs1 proteins, show clustering in yeast cells and this clustering is more significant in Sgs1-RNC expressing cells. I characterized the effect of UV treatment on Not1 containing clusters with DBSCAN algorithm. I developed a cluster finding algorithm based on cross-correlation and found that a significant portion of the clusters have a hollowed structure. [A5]

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni őszinte hálám és mély elismerésem témavezetőm, Dr. Erdélyi Miklós felé, akinek támogatása és útmutatása végigkísért az évek során, aminek csak egy rész-eredménye az itt bemutatott dolgozat. Személyisége és hozzáállása szemléletformáló volt számomra. Munkám során abban a kiváltságban is részem volt, hogy együtt dolgozhattam az AdOptIm kutatócsoport tagjaival, akiknek külön név szerinti kiemeléssel is tartozom.

Gajdos Tamáshoz gyakran fordultam kérdéseimmel és mindig segítőkészen fordult hozzám. Ő volt az első, akit megtaláltam, ha valami nem működött és én nem találtam meg a hibát, vagy ha olyan információra volt szükségem, amit nem találtam meg magamtól.

Novák Tibor az évek során több jó ötletet is adott. A fluorofórok három állapotú rendszerrel való modellezése során az állapotok betöltöttségének kiszámításához ő javasolta a Laplace-transzformációt és a DBSCAN algoritmus memóriaigényének csökkentése során felhasználtam olyan kódrészletet is, amiben neki sok munkája volt. Nem csak mint kolléga, de mint barát is végig kísérte munkámat.

Köszönettel tartozom H. Kovács Bálintnak, aki a röntgensugárzással kezelt sejtek, illetve az RNC expresszálo sejtek dSTORM-os lemerése során nagy terhet vett le a vállamról és sok időt spórolt meg nekem. Az asztigmián alapuló 3D-s mérések során különösen nagy segítségemre volt, hiszen annak ő a szakértője. Szintén szeretném megemlíteni, hogy a korrelációs klaszter kereső algoritmus első verziója egy LabView kód volt, amit ő készített.

Bár ennek a dolgozatnak nem képezik részét Förster-féle rezonáns energiaátadássos (FRET) vagy fluoreszcencia élettartam (FLIM) mérések, de amikor ilyen méréseken vettem részt, Bíró Péter volt segítségemre.

Szeretném kiemelni Ponyeczkiné Czvik Elvirát, aki a mintaelőkészítés során mindig segítségemre volt. Szakértelme sokat segített a sikeres mérések elvégzésében. Sok egyedi kérésem is volt, amikhez ő segítőkészen állt hozzá.

Köszönöm a Szegedi Tudományegyetemnek is, hogy környezetet teremtett kutatásaimhoz.

Szeretném megragadni az alkalmat, hogy köszönetet mondjak családtagjaimnak, ba-

rátainnak és tanárainnak, akik közel sem elhanyagolható módon hozzásegítettek ahhoz, hogy eljussak idáig.

Doktori tanulmányaim során munkám a következő pályázati források támogatták: Nemzeti Agykutató Program (KTIA-13-NAP-AI/14, 2017-1.2.1-NKP-2017- 00002); GINOP-2.3.2-15-2016-00036; EFOP-3.6.1-16-2016-00008; Nemzeti Tehetség Program (NTP-NFTÖ-20-B-0354, NTP-NFTÖ-21-B-0197); Innovációs és Technológiai Minisztérium (TKP2021-NVA-19); Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (MEC R 141389); University of Szeged Open Access Fund.

9. Publikációs lista

MTMT azonosító: 10048719

Tézispontokhoz kötődő publikációk

- [A1] D. Varga, H. Majoros, Zs. Újfaludi, M. Erdélyi, T. Pankotai (2019). *Quantification of DNA damage induced repairfocus formation via super-resolution dSTORM localization microscopy*. *Nanoscale*, **11**(30), 14226-14236. **Q1** IF: 7,312 (2020); 10.1039/C9NR03696B
- [A2] D. Varga, H. Majoros, Zs. Újfaludi, T. Pankotai, M. Erdélyi (2020, február) *Quantification of labelled target molecules via super-resolution dSTORM localization microscopy*. *Single Molecule Spectroscopy and Superresolution Imaging XIII* (11246. kötet, 1124612. oldal). International Society for Optics and Photonics. 10.1117/12.2545099
- [A3] Sz. Brunner, D. Varga, R. Bozó, R. Polanek, T. Tóké, E. R. Szabó, R. Molnár, N. Gémes, G. Szébeni, L. G. Puskás, M. Erdélyi, K. Hideghéty (2021). *Analysis of ionizing radiation induced DNA damage by superresolution dSTORM microscopy*. *Pathology and Oncology Research*, **27**, 13 p. **Q2** IF: 3,201 (2020); 10.3389/pore.2021.1609971
- [A4] K. Szabó, D. Varga, A. G. Vegh, N. Liu, X. Xiao, L. Xu, L. Rovo, L. Dux, M. Erdélyi, A. Keller-Pinter (2022). *Syndecan-4 affects myogenesis via Rac1-mediated actin remodeling and exhibits copy-number amplification and increased expression in human rhabdomyosarcoma tumors*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **79**(2), 1-21. **Q1** IF: 9,261 (2020); 10.1007/s00018-021-04121-0
- [A5] O. Szatmári, Á. Györkei, D. Varga, B. H. Kovács, N. Igaz, K. Német, N. Bagi, B. Nagy-Mikó, D. Balogh, Zs. Rázga, M. Erdélyi, B. Papp, M. Kiricsi, A. Blastyák, M. A. Collart, I. M. Boros, Z. Villányi (2022). *Phase separated ribosome nascent chain complexes paused in translation are capable to continue expression of proteins playing role in genotoxic stress response upon DNA damage*. *bioRxiv*, 10.1101/2022.03.16.484567

Tézispontokhoz nem felhasznált publikációk

- [B1] M. Erdélyi, R. Kákonyi, A. Kelemen, E. Rees, D. Varga, G. Szabó (2015). *Origin and compensation of imaging artefacts in localization-based super-resolution microscopy*. *Methods*, **88**, 122-132. **Q1** IF: 3.608 (2020); 10.1016/j.ymeth.2015.05.025
- [B2] O. Szatmári, Á. Györkei, D. Varga, B. H. Kovács, N. Igaz, K. Német, N. Bagi, B. Nagy-Mikó, D. Balogh, Zs. Rázga, M. Erdélyi, B. Papp, M. Kiricsi, A. Blastyák, M. A. Collart, I. M. Boros, Z. Villányi (2022). *Validation of an in silico approach to identify new components of assemblyosomes*. submitted to *RNA*. **Q1** IF: 4,389 (2020);
- [B3] V. Szegedi, E. Bakos, S. Furdan, D. Varga, M. Erdélyi, P. Barzo, A. Szücs, T. Gabor, K. Lamsa (2022). *Somatic HCN channels accelerate the input-output kinetics of*

human cortical fast-spiking interneurons. submitted to PLOS Biology, **Q1** IF: 7.494 (2020);

Konferencia előadások és posztterek

- [E1] D. Varga (2022) *Quantitative analysis of SMLM data*. Second Symposium on Super-resolution and Advanced Fluorescence Microscopy and István Ábrahám Memorial Workshop, **2022.04.01-02.**, Pécs, Magyarország
- [E2] D. Varga, T. Novák, P. Bíró, S. Szikora, J. Mihály, M. Erdélyi (2022) *Segmentation of sarcomeric structures in SMLM with machine learning*. FOM2022, **2022.04.10-13.**, Online
- [E3] D. Varga (2021) *Quantification of DNA Damage Induced Repair Focus Formation via dSTORM Localization Microscopy*. 7th NANO Boston Conference, **2021.10.18-20.**, Boston, MA, Amerikai Egyesült Államok
- [E4] D. Varga, H. Majoros, Zs. Újfaludi, T. Pankotai, M. Erdélyi (2019) *Quantification of DNA double-strand breaks via dSTORM localization microscopy*. MMT Konferencia, **2019.05.23-25.**, Siófok, Magyarország
- [P1] H. Majoros, D. Varga, Zs. Újfaludi, M. Erdélyi, T. Pankotai (2020) *Quantification of DNA damage induced repair focus formation via super-resolution dSTORM localization microscopy*. EMBO Workshop, **2020.12.7-10.**, Online
- [P2] D. Varga, H. Majoros, Zs. Újfaludi, T. Pankotai, M. Erdélyi (2019) *Quantification of DNA damage induced repair focus formation via super-resolution dSTORM localization microscopy*. III. Sejt-, Fejlődés-, és Össejtbiológusok Éves találkozója, **2019.10.30.**, Gödöllő, Magyarország
- [P3] D. Varga, H. Majoros, Zs. Újfaludi, T. Pankotai, M. Erdélyi (2019) *Quantification of DNA double-strand breaks via storm localization microscopy*. FOM2019, **2019.04.14-17.**, London, Egyesült Királyság
- [P4] D. Varga, H. Majoros, Zs. Újfaludi, T. Pankotai, M. Erdélyi (2019) *Protein counting in localisation microscopy*. QBI2019, **2019.01.9-11.**, Rennes, Franciaország
- [P5] D. Varga, H. Majoros, Zs. Újfaludi, T. Pankotai, M. Erdélyi (2018) *Dissolving single DNA repair foci by super-resolution STORM microscopy*. FEBS3+ Meeting; From molecules to living systems, **2018.11.2-5.**, Siófok, Magyarország
- [P6] D. Varga, H. Majoros, Zs. Újfaludi, T. Pankotai, M. Erdélyi (2018) *Kvantitatív lokalizációs mikroszkópia*. Kvantumelektronika 2018, **2018.06.15.**, Budapest, Magyarország
- [P7] H. Majoros, D. Varga, Zs. Újfaludi, M. Erdélyi, T. Pankotai (2018) *Dissolving single DNA repair foci by super-resolution STORM microscopy*. EMBO Workshop, **2018.03.18-21.**, Heidelberg, Németország
- [P8] T. Gajdos, J. Németh, J. Sinkó, D. Varga, E. J. Rees, G. Szabó, M. Erdélyi (2016) *Localization analysis with rainSTORM*. 6th Single Molecule Localization Microscopy Symposium, **2016.08.28-30.**, Lausanne, Svájc

- [P9] M. Erdélyi, R. Kákonyi, A. Kelemen, E. Rees, D. Varga, G. Szabó (2016) *Artifacts analysis in localization based microscopy*. 16th international ELMI meeting, **2016.05.24-27.**, Debrecen, Magyarország
- [P10] T. Gajdos, J. Németh, J. Sinkó, D. Varga, E. J. Rees, G. Szabó, M. Erdélyi (2016) *Localization analysis with rainSTORM*. 16th international ELMI meeting, **2016.05.24-27.**, Debrecen, Magyarország

Irodalomjegyzék

- [1] Gerald Donnert és tsai. “Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.31 (2006), 11440–11445. old.
- [2] Mats GL Gustafsson. “Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy”. *Journal of microscopy* 198.2 (2000), 82–87. old.
- [3] Rainer Heintzmann, Thomas M Jovin és Christoph Cremer. “Saturated patterned excitation microscopy—a concept for optical resolution improvement”. *JOSA A* 19.8 (2002), 1599–1609. old.
- [4] Eric Betzig és tsai. “Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution”. *Science* 313.5793 (2006), 1642–1645. old.
- [5] Samuel T Hess, Thanu PK Girirajan és Michael D Mason. “Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy”. *Biophysical journal* 91.11 (2006), 4258–4272. old.
- [6] Michael J Rust, Mark Bates és Xiaowei Zhuang. “Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)”. *Nature methods* 3.10 (2006), 793–796. old.
- [7] Mike Heilemann és tsai. “Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes”. *Angewandte Chemie International Edition* 47.33 (2008), 6172–6176. old.
- [8] Bo Huang, Hazen Babcock és Xiaowei Zhuang. “Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells”. *Cell* 143.7 (2010), 1047–1058. old.
- [9] Eric Betzig. “Single molecules, cells, and super-resolution optics (Nobel Lecture)”. *Angewandte Chemie International Edition* 54.28 (2015), 8034–8053. old.
- [10] William E Moerner. “Single-molecule spectroscopy, imaging, and photocontrol: foundations for super-resolution microscopy (nobel lecture)”. *Angewandte Chemie International Edition* 54.28 (2015), 8067–8093. old.
- [11] David Baddeley és Joerg Bewersdorf. “Biological insight from super-resolution microscopy: what we can learn from localization-based images”. *Annual review of biochemistry* 87 (2018), 965–989. old.
- [12] Richard Buckley Litchfield. *Tom Wedgwood, the First Photographer: An Account of His Life, His Discovery and His Friendship with Samuel Taylor Coleridge, Including the Letters of Coleridge to the Wedgwoods and an Examination of Accounts of Alleged Earlier Photographic Discoveries*. Duckworth és Company, 1903.
- [13] Marin van Heel és tsai. “A new generation of the IMAGIC image processing system”. *Journal of structural biology* 116.1 (1996), 17–24. old.

- [14] Dylan Myers Owen és Katharina Gaus. “Imaging lipid domains in cell membranes: the advent of super-resolution fluorescence microscopy”. *Frontiers in plant science* 4 (2013), 503. old.
- [15] Juliette Griffié és tsai. “Dynamic Bayesian cluster analysis of live-cell single molecule localization microscopy datasets”. *Small Methods* 2.9 (2018), 1800008. old.
- [16] Guy A Orban, David Van Essen és Wim Vanduffel. “Comparative mapping of higher visual areas in monkeys and humans”. *Trends in cognitive sciences* 8.7 (2004), 315–324. old.
- [17] William J Croft. *Under the microscope: a brief history of microscopy*. 5. köt. World Scientific, 2006.
- [18] CR Burch és JPP Stock. “Phase-contrast microscopy”. *Journal of Scientific Instruments* 19.5 (1942), 71. old.
- [19] HE Rosenberger. “Differential interference contrast microscopy”. *Interpretive Techniques for Microstructural Analysis*. Springer, 1977, 79–104. old.
- [20] Marvin Minsky. “Memoir on inventing the confocal scanning microscope”. *Scanning* 10.4 (1988), 128–138. old.
- [21] James Pawley. *Handbook of biological confocal microscopy*. 236. köt. Springer Science & Business Media, 2006.
- [22] William E Moerner és Lothar Kador. “Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid”. *Physical review letters* 62.21 (1989), 2535. old.
- [23] Michel Orrit és J Bernard. “Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal”. *Physical review letters* 65.21 (1990), 2716. old.
- [24] Ernst Abbe. “Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung”. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 9.1 (1873), 413–468. old.
- [25] Lord Rayleigh. “XXXI. Investigations in optics, with special reference to the spectroscopie”. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 8.49 (1879), 261–274. old.
- [26] Rolf Erni és tsai. “Atomic-resolution imaging with a sub-50-pm electron probe”. *Physical review letters* 102.9 (2009), 96101. old.
- [27] Bruce Alberts és tsai. *Molecular Biology of the Cell*. W.W. Norton & Company, 2007. dec. DOI: 10.1201/9780203833445. URL: <https://doi.org/10.1201/9780203833445>.
- [28] Stefan W Hell. “Nanoscopy with focused light (Nobel Lecture)”. *Angewandte Chemie International Edition* 54.28 (2015), 8054–8066. old.
- [29] Lothar Schermelleh és tsai. “Super-resolution microscopy demystified”. *Nature cell biology* 21.1 (2019), 72–84. old.
- [30] Bo Huang. “Super-resolution optical microscopy: multiple choices”. *Current opinion in chemical biology* 14.1 (2010), 10–14. old.

- [31] Yasuhiro Hirano, Atsushi Matsuda és Yasushi Hiraoka. “Recent advancements in structured-illumination microscopy toward live-cell imaging”. *Microscopy* 64.4 (2015), 237–249. old.
- [32] Florian Ströhl és Clemens F Kaminski. “Frontiers in structured illumination microscopy”. *Optica* 3.6 (2016), 667–677. old.
- [33] Justin Demmerle és tsai. “Strategic and practical guidelines for successful structured illumination microscopy”. *Nature protocols* 12.5 (2017), 988–1010. old.
- [34] Stefan W Hell és Jan Wichmann. “Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy”. *Optics letters* 19.11 (1994), 780–782. old.
- [35] Julie S Biteen és tsai. “Super-resolution imaging in live *Caulobacter crescentus* cells using photoswitchable EYFP”. *Nature methods* 5.11 (2008), 947–949. old.
- [36] Alexey Sharonov és Robin M Hochstrasser. “Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.50 (2006), 18911–18916. old.
- [37] Keith A Lidke és tsai. “Superresolution by localization of quantum dots using blinking statistics”. *Optics express* 13.18 (2005), 7052–7062. old.
- [38] Antoine M van Oijen és tsai. “3-Dimensional super-resolution by spectrally selective imaging”. *Chemical Physics Letters* 292.1-2 (1998), 183–187. old.
- [39] Matthew P Gordon, Taekjip Ha és Paul R Selvin. “Single-molecule high-resolution imaging with photobleaching”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101.17 (2004), 6462–6465. old.
- [40] Mike Heilemann és tsai. “High-resolution colocalization of single dye molecules by fluorescence lifetime imaging microscopy”. *Analytical Chemistry* 74.14 (2002), 3511–3517. old.
- [41] Xiaohui Qu és tsai. “Nanometer-localized multiple single-molecule fluorescence microscopy”. *Proceedings of the national academy of sciences* 101.31 (2004), 11298–11303. old.
- [42] Jonas Fölling és tsai. “Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return”. *Nature methods* 5.11 (2008), 943–945. old.
- [43] Joerg Schnitzbauer és tsai. “Super-resolution microscopy with DNA-PAINT”. *Nature protocols* 12.6 (2017), 1198–1228. old.
- [44] Francisco Balzarotti és tsai. “Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes”. *Science* 355.6325 (2017), 606–612. old.
- [45] Christian Eggeling és tsai. “Lens-based fluorescence nanoscopy”. *Quarterly reviews of biophysics* 48.2 (2015), 178–243. old.

- [46] Russell E Thompson, Daniel R Larson és Watt W Webb. “Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes”. *Biophysical journal* 82.5 (2002), 2775–2783. old.
- [47] Hendrik Deschout és tsai. “Precisely and accurately localizing single emitters in fluorescence microscopy”. *Nature methods* 11.3 (2014), 253–266. old.
- [48] Fei Chen, Paul W Tillberg és Edward S Boyden. “Expansion microscopy”. *Science* 347.6221 (2015), 543–548. old.
- [49] Ricardo Henriques és tsai. “QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ”. *Nature methods* 7.5 (2010), 339–340. old.
- [50] Martin Ovesný és tsai. “ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging”. *Bioinformatics* 30.16 (2014), 2389–2390. old.
- [51] Mickaël Lelek és tsai. “Single-molecule localization microscopy”. *Nature Reviews Methods Primers* 1.1 (2021), 1–27. old.
- [52] Mike Heilemann és tsai. “Super-resolution imaging with small organic fluorophores”. *Angewandte Chemie International Edition* 48.37 (2009), 6903–6908. old.
- [53] Tai Kiuchi és tsai. “Multitarget super-resolution microscopy with high-density labeling by exchangeable probes”. *Nature methods* 12.8 (2015), 743–746. old.
- [54] H Nyquist. “American Institute of Electrical Engineers”. *Transactions of The* 47 (1928), 617–644. old.
- [55] Edmund Taylor Whittaker. “XVIII.—On the functions which are represented by the expansions of the interpolation-theory”. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 35 (1915), 181–194. old.
- [56] Lekha Patel és tsai. “A hidden Markov model approach to characterizing the photo-switching behavior of fluorophores”. *The annals of applied statistics* 13.3 (2019), 1397. old.
- [57] Daniel Sage és tsai. “Quantitative evaluation of software packages for single-molecule localization microscopy”. *Nature methods* 12.8 (2015), 717–724. old.
- [58] Sjoerd Stallinga és Bernd Rieger. “Accuracy of the Gaussian point spread function model in 2D localization microscopy”. *Optics express* 18.24 (2010), 24461–24476. old.
- [59] Tingwei Quan, Shaoqun Zeng és Zhenli Huang. “Localization capability and limitation of electron-multiplying charge-coupled, scientific complementary metal-oxide semiconductor, and charge-coupled devices for superresolution imaging”. *Journal of biomedical optics* 15.6 (2010), 66005. old.
- [60] Miklós Erdélyi és tsai. “Origin and compensation of imaging artefacts in localization-based super-resolution microscopy”. *Methods* 88 (2015), 122–132. old.
- [61] *Directory of SMLM software*. (2021.09.28.) URL: <http://bigwww.epfl.ch/palm/software/>.

- [62] Bo Huang és tsai. “Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy”. *Science* 319.5864 (2008), 810–813. old.
- [63] Manuel F Juetten és tsai. “Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples”. *Nature methods* 5.6 (2008), 527–529. old.
- [64] Sri Rama Prasanna Pavani és tsai. “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* 106.9 (2009), 2995–2999. old.
- [65] David Baddeley, Mark B Cannell és Christian Soeller. “Three-dimensional sub-100 nm super-resolution imaging of biological samples using a phase ramp in the objective pupil”. *Nano Research* 4.6 (2011), 589–598. old.
- [66] Andrey Aristov és tsai. “ZOLA-3D allows flexible 3D localization microscopy over an adjustable axial range”. *Nature communications* 9.1 (2018), 1–8. old.
- [67] Gleb Shtengel és tsai. “Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.9 (2009), 3125–3130. old.
- [68] Daniel Aquino és tsai. “Two-color nanoscopy of three-dimensional volumes by 4Pi detection of stochastically switched fluorophores”. *Nature methods* 8.4 (2011), 353–359. old.
- [69] Nicolas Bourg és tsai. “Direct optical nanoscopy with axially localized detection”. *Nature Photonics* 9.9 (2015), 587–593. old.
- [70] Yu-Le Wu és tsai. “Quantitative data analysis in single-molecule localization microscopy”. *Trends in Cell Biology* 30.11 (2020), 837–851. old.
- [71] Mickaël Lelek és tsai. “Superresolution imaging of HIV in infected cells with FLAsH-PALM”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.22 (2012), 8564–8569. old.
- [72] Anna Szymborska és tsai. “Nuclear pore scaffold structure analyzed by super-resolution microscopy and particle averaging”. *Science* 341.6146 (2013), 655–658. old.
- [73] Raquel Salvador-Gallego és tsai. “Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores”. *The EMBO journal* 35.4 (2016), 389–401. old.
- [74] Markus Mund és tsai. “Systematic nanoscale analysis of endocytosis links efficient vesicle formation to patterned actin nucleation”. *Cell* 174.4 (2018), 884–896. old.
- [75] Leonid Andronov és tsai. “CENP-A nucleosome clusters form rosette-like structures around HJURP during G1”. *Nature communications* 10.1 (2019), 1–8. old.
- [76] Alexandre Fürstenberg és Mike Heilemann. “Single-molecule localization microscopy—near-molecular spatial resolution in light microscopy with photoswitchable fluorophores”. *Physical Chemistry Chemical Physics* 15.36 (2013), 14919–14930. old.
- [77] Paolo Annibale és tsai. “Identification of clustering artifacts in photoactivated localization microscopy”. *Nature methods* 8.7 (2011), 527–528. old.

- [78] Sarah L Veatch és tsai. “Correlation functions quantify super-resolution images and estimate apparent clustering due to over-counting”. *PloS one* 7.2 (2012), e31457.
- [79] Nela Durisic és tsai. “Single-molecule evaluation of fluorescent protein photoactivation efficiency using an in vivo nanotemplate”. *Nature methods* 11.2 (2014), 156–162. old.
- [80] Derek Greenfield és tsai. “Self-organization of the Escherichia coli chemotaxis network imaged with super-resolution light microscopy”. *PLoS biology* 7.6 (2009), e1000137.
- [81] Prabuddha Sengupta és tsai. “Probing protein heterogeneity in the plasma membrane using PALM and pair correlation analysis”. *Nature methods* 8.11 (2011), 969–975. old.
- [82] P Annibale és tsai. “Photoactivatable fluorescent protein mEos2 displays repeated photoactivation after a long-lived dark state in the red photoconverted form”. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 1.9 (2010), 1506–1510. old.
- [83] Sang-Hyuk Lee és tsai. “Counting single photoactivatable fluorescent molecules by photoactivated localization microscopy (PALM)”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.43 (2012), 17436–17441. old.
- [84] Caroline Laplante és tsai. “Molecular organization of cytokinesis nodes and contractile rings by super-resolution fluorescence microscopy of live fission yeast”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.40 (2016), E5876–E5885.
- [85] Carla Coltharp, Rene P Kessler és Jie Xiao. “Accurate construction of photoactivated localization microscopy (PALM) images for quantitative measurements”. *PLoS One* 7.12 (2012), e51725.
- [86] Ágnes Szabó és tsai. “The effect of fluorophore conjugation on antibody affinity and the photophysical properties of dyes”. *Biophysical journal* 114.3 (2018), 688–700. old.
- [87] Ismail M Khater és tsai. “Super resolution network analysis defines the molecular architecture of caveolae and caveolin-1 scaffolds”. *Scientific reports* 8.1 (2018), 1–15. old.
- [88] Ulrike Endesfelder és tsai. “Multiscale spatial organization of RNA polymerase in Escherichia coli”. *Biophysical journal* 105.1 (2013), 172–181. old.
- [89] Fedor V Subach és tsai. “Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy”. *Nature methods* 6.2 (2009), 153–159. old.
- [90] Cristina Flors és tsai. “A stroboscopic approach for fast photoactivation- localization microscopy with dronpa mutants”. *Journal of the American Chemical Society* 129.45 (2007), 13970–13977. old.
- [91] Sergiy Avilov és tsai. “In cellulo evaluation of phototransformation quantum yields in fluorescent proteins used as markers for single-molecule localization microscopy”. *PloS one* 9.6 (2014), e98362.

- [92] Geoffrey C Rollins és tsai. “Stochastic approach to the molecular counting problem in superresolution microscopy”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.2 (2015), E110–E118.
- [93] Sebastian Van de Linde és Markus Sauer. “How to switch a fluorophore: from undesired blinking to controlled photoswitching”. *Chemical Society Reviews* 43.4 (2014), 1076–1087. old.
- [94] David Lando és tsai. “Quantitative single-molecule microscopy reveals that CENP-ACnp1 deposition occurs during G2 in fission yeast”. *Open biology* 2.7 (2012), 120078. old.
- [95] Sebastian Letschert és tsai. “Super-resolution imaging of plasma membrane glycans”. *Angewandte Chemie International Edition* 53.41 (2014), 10921–10924. old.
- [96] Steven J Tobin és tsai. “Single molecule localization microscopy coupled with touch preparation for the quantification of trastuzumab-bound HER2”. *Scientific reports* 8.1 (2018), 1–13. old.
- [97] Anna Löschberger és tsai. “Correlative super-resolution fluorescence and electron microscopy of the nuclear pore complex with molecular resolution”. *Journal of Cell Science* 127.20 (2014), 4351–4355. old.
- [98] Elias M Puchner és tsai. “Counting molecules in single organelles with superresolution microscopy allows tracking of the endosome maturation trajectory”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.40 (2013), 16015–16020. old.
- [99] Maria Aurelia Ricci és tsai. “Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo”. *Cell* 160.6 (2015), 1145–1158. old.
- [100] Adish Dani és tsai. “Superresolution imaging of chemical synapses in the brain”. *Neuron* 68.5 (2010), 843–856. old.
- [101] Sergei A Grigoryev és tsai. “Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.32 (2009), 13317–13322. old.
- [102] Kieran Finan, Anika Raulf és Mike Heilemann. “A set of homo-oligomeric standards allows accurate protein counting”. *Angewandte Chemie International Edition* 54.41 (2015), 12049–12052. old.
- [103] Paul WK Rothemund. “Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns”. *Nature* 440.7082 (2006), 297–302. old.
- [104] Francesca Cella Zanacchi és tsai. “A DNA origami platform for quantifying protein copy number in super-resolution”. *Nature methods* 14.8 (2017), 789–792. old.
- [105] Yongdeng Zhang és tsai. “Visualization and characterization of individual type III protein secretion machines in live bacteria”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114.23 (2017), 6098–6103. old.
- [106] Nadine Ehmann és tsai. “Quantitative super-resolution imaging of Bruchpilot distinguishes active zone states”. *Nature communications* 5.1 (2014), 1–12. old.

- [107] Franziska Fricke és tsai. “One, two or three? Probing the stoichiometry of membrane proteins by single-molecule localization microscopy”. *Scientific reports* 5.1 (2015), 1–8. old.
- [108] Gerhard Hummer, Franziska Fricke és Mike Heilemann. “Model-independent counting of molecules in single-molecule localization microscopy”. *Molecular biology of the cell* 27.22 (2016), 3637–3644. old.
- [109] Christos Karathanasis és tsai. “Molecule counts in localization microscopy with organic fluorophores”. *ChemPhysChem* 18.8 (2017), 942–948. old.
- [110] Graham T Dempsey és tsai. “Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging”. *Nature methods* 8.12 (2011), 1027–1036. old.
- [111] Prabuddha Sengupta, Tijana Jovanovic-Talisman és Jennifer Lippincott-Schwartz. “Quantifying spatial organization in point-localization superresolution images using pair correlation analysis”. *Nature protocols* 8.2 (2013), 345–354. old.
- [112] Robert PJ Nieuwenhuizen és tsai. “Measuring image resolution in optical nanoscopy”. *Nature methods* 10.6 (2013), 557–562. old.
- [113] Robert PJ Nieuwenhuizen és tsai. “Quantitative localization microscopy: effects of photophysics and labeling stoichiometry”. *PloS one* 10.5 (2015), e0127989.
- [114] Marin van Heel és tsai. “Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution”. *Quarterly reviews of biophysics* 33.4 (2000), 307–369. old.
- [115] Niccolo Banterle és tsai. “Fourier ring correlation as a resolution criterion for super-resolution microscopy”. *Journal of structural biology* 183.3 (2013), 363–367. old.
- [116] Barbara Forrest. “How We Know What Isn’t So: The Fallibility of Human Reason in Everyday Life”. *Teaching Philosophy* 16.2 (1993), 185–187. old.
- [117] *Clustering illusion*. (2021.09.28.) URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Clustering_illusion.
- [118] Sebastian Malkusch és tsai. “Coordinate-based colocalization analysis of single-molecule localization microscopy data”. *Histochemistry and cell biology* 137.1 (2012), 1–10. old.
- [119] Joerg Schnitzbauer és tsai. “Correlation analysis framework for localization-based superresolution microscopy”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.13 (2018), 3219–3224. old.
- [120] Sophie V Paeon és tsai. “Clus-DoC: a combined cluster detection and colocalization analysis for single-molecule localization microscopy data”. *Molecular biology of the cell* 27.22 (2016), 3627–3636. old.
- [121] Filipa B Lopes és tsai. “Membrane nanoclusters of Fc γ RI segregate from inhibitory SIRP α upon activation of human macrophages”. *Journal of Cell Biology* 216.4 (2017), 1123–1141. old.

- [122] Sebastian Malkusch és Mike Heilemann. “Extracting quantitative information from single-molecule super-resolution imaging data with LAMA–LocAlization Microscopy Analyzer”. *Scientific reports* 6.1 (2016), 1–4. old.
- [123] Matthew B Stone és Sarah L Veatch. “Steady-state cross-correlations for live two-colour super-resolution localization data sets”. *Nature communications* 6.1 (2015), 1–10. old.
- [124] Brian D Ripley. “Modelling spatial patterns”. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 39.2 (1977), 172–192. old.
- [125] Philip M Dixon. “Complete Spatial Randomness”. *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* (2014), 1–5. old.
- [126] Maria A Kiskowski, John F Hancock és Anne K Kenworthy. “On the use of Ripley’s K-function and its derivatives to analyze domain size”. *Biophysical journal* 97.4 (2009), 1095–1103. old.
- [127] Julian Besag. “Contribution to the discussion on Dr Ripley’s paper”. *JR Stat. Soc.* 39 (1977), 193–195. old.
- [128] Marcelo Ehrlich és tsai. “Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits”. *Cell* 118.5 (2004), 591–605. old.
- [129] Ismail M Khater, Ivan Robert Nabi és Ghassan Hamarneh. “A review of super-resolution single-molecule localization microscopy cluster analysis and quantification methods”. *Patterns* 1.3 (2020), 100038. old.
- [130] Thorsten Wiegand és Kirk A. Moloney. “Rings, circles, and null-models for point pattern analysis in ecology”. *Oikos* 104.2 (2004), 209–229. old.
- [131] Peter Haase. “Spatial pattern analysis in ecology based on Ripley’s K-function: Introduction and methods of edge correction”. *Journal of vegetation science* 6.4 (1995), 575–582. old.
- [132] Eric Marcon és Florence Puech. “Generalizing Ripley’s K function to inhomogeneous populations”. (2009).
- [133] François Goreaud és Raphaël Pélissier. “On explicit formulas of edge effect correction for Ripley’s K-function”. *Journal of Vegetation Science* 10.3 (1999), 433–438. old.
- [134] Philip M Dixon. “Ripley’s K function”. *Encyclopedia of environmetrics* 3 (2001), 1796. old.
- [135] Arthur Getis és Janet Franklin. “Second-order neighborhood analysis of mapped point patterns”. *Perspectives on Spatial Data Analysis*. Springer, 2010, 93–100. old.
- [136] Martin Ester és tsai. “A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise.” *kdd.* 96. köt. 34. 1996, 226–231. old.
- [137] Daniel F Nino, Daniel Djayakarsana és Joshua N Milstein. “FOCAL3D: A 3-dimensional clustering package for single-molecule localization microscopy”. *PLoS computational biology* 16.12 (2020), e1008479.

- [138] Florian Levet és tsai. “SR-Tesseler: a method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data”. *Nature methods* 12.11 (2015), 1065–1071. old.
- [139] Leonid Andronov és tsai. “ClusterViSu, a method for clustering of protein complexes by Voronoi tessellation in super-resolution microscopy”. *Scientific reports* 6.1 (2016), 1–9. old.
- [140] Kalina T Haas és tsai. “Single-molecule localization microscopy reveals molecular transactions during RAD51 filament assembly at cellular DNA damage sites”. *Nucleic acids research* 46.5 (2018), 2398–2416. old.
- [141] Atsuyuki Okabe és tsai. *Spatial tessellations: concepts and applications of Voronoi diagrams*. 501. köt. John Wiley & Sons, 2009.
- [142] Mark EJ Newman. “The structure and function of complex networks”. *SIAM review* 45.2 (2003), 167–256. old.
- [143] Ismail M Khater és tsai. “Sub-cellular network analysis of ryanodine receptor positioning in control and phosphorylated states”. *2016 Computing in Cardiology Conference (CinC)*. IEEE. 2016, 821–824. old.
- [144] Ismail M Khater és tsai. “Identification of caveolin-1 domain signatures via machine learning and graphlet analysis of single-molecule super-resolution data”. *Bioinformatics* 35.18 (2019), 3468–3475. old.
- [145] Ismail M Khater és tsai. “Super-resolution modularity analysis shows polyhedral caveolin-1 oligomers combine to form scaffolds and caveolae”. *Scientific reports* 9.1 (2019), 1–10. old.
- [146] Patrick Rubin-Delanchy és tsai. “Bayesian cluster identification in single-molecule localization microscopy data”. *Nature methods* 12.11 (2015), 1072–1076. old.
- [147] Juliette Griffié és tsai. “A Bayesian cluster analysis method for single-molecule localization microscopy data”. *Nature Protocols* 11.12 (2016), 2499–2514. old.
- [148] Juliette Griffié és tsai. “3D Bayesian cluster analysis of super-resolution data reveals LAT recruitment to the T cell synapse”. *Scientific reports* 7.1 (2017), 1–9. old.
- [149] David J Williamson és tsai. “Machine learning for cluster analysis of localization microscopy data”. *Nature communications* 11.1 (2020), 1–10. old.
- [150] Guo Fu és tsai. “In vivo structure of the E. coli FtsZ-ring revealed by photoactivated localization microscopy (PALM)”. *PloS one* 5.9 (2010), e12680.
- [151] Yina Wang és tsai. “PALMER: a method capable of parallel localization of multiple emitters for high-density localization microscopy”. *Optics express* 20.14 (2012), 16039–16049. old.
- [152] Carla Coltharp, Xinling Yang és Jie Xiao. “Quantitative analysis of single-molecule superresolution images”. *Current opinion in structural biology* 28 (2014), 112–121. old.
- [153] David Baddeley, Mark B Cannell és Christian Soeller. “Visualization of localization microscopy data”. *Microscopy and microanalysis* 16.1 (2010), 64–72. old.

- [154] Szilárd Szikora és tsai. “Nanoscopy reveals the layered organization of the sarcomeric H-zone and I-band complexes”. *Journal of Cell Biology* 219.1 (2020).
- [155] Szilárd Szikora és tsai. “Superresolution Microscopy of Drosophila Indirect Flight Muscle Sarcomeres”. *Bio-protocol* 10.12 (2020), e3654–e3654.
- [156] Sebastian van de Linde és tsai. “The effect of photoswitching kinetics and labeling densities on super-resolution fluorescence imaging”. *Journal of biotechnology* 149.4 (2010), 260–266. old.
- [157] Richard J Marsh és tsai. “Artifact-free high-density localization microscopy analysis”. *Nature methods* 15.9 (2018), 689–692. old.
- [158] Mario Raab és tsai. “Using DNA origami nanorulers as traceable distance measurement standards and nanoscopic benchmark structures”. *Scientific reports* 8.1 (2018), 1–11. old.
- [159] József Sinkó és tsai. “TestSTORM: Simulator for optimizing sample labeling and image acquisition in localization based super-resolution microscopy”. *Biomedical optics express* 5.3 (2014), 778–787. old.
- [160] Tibor Novák és tsai. “TestSTORM: Versatile simulator software for multimodal super-resolution localization fluorescence microscopy”. *Scientific reports* 7.1 (2017), 1–8. old.
- [161] Varun Venkataramani és tsai. “SuReSim: simulating localization microscopy experiments from ground truth models”. *Nature methods* 13.4 (2016), 319–321. old.
- [162] Martin Lindén és tsai. “Simulated single molecule microscopy with SMeagol”. *Bioinformatics* 32.15 (2016), 2394–2395. old.
- [163] Sebastian Van de Linde és tsai. “Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes”. *Nature protocols* 6.7 (2011), 991–1009. old.
- [164] (2021.09.28.) URL: <https://fiji.sc/>.
- [165] Eric J Rees és tsai. “Elements of image processing in localization microscopy”. *Journal of Optics* 15.9 (2013), 94012. old.
- [166] *rainSTORM*. (2021.09.28.) URL: http://titan.physx.u-szeged.hu/~adoptim/?page_id=582.
- [167] *Blind drift correction*. (2021.09.28.) URL: <http://titan.physx.u-szeged.hu/~adoptim/wp-content/uploads/2019/05/rainSTORM-blind-drift-correction.pdf>.
- [168] *TestSTORM*. (2021.09.28.) URL: http://titan.physx.u-szeged.hu/~adoptim/?page_id=183.
- [169] LJ Mah, A El-Osta és TC Karagiannis. “ γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair”. *Leukemia* 24.4 (2010), 679–686. old.
- [170] Stephen P Jackson és Jiri Bartek. “The DNA-damage response in human biology and disease”. *Nature* 461.7267 (2009), 1071–1078. old.

- [171] Mark Bates, Timothy R Blosser és Xiaowei Zhuang. “Short-range spectroscopic ruler based on a single-molecule optical switch”. *Physical review letters* 94.10 (2005), 108101. old.
- [172] Jan Vogelsang és tsai. “A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes”. *Angewandte Chemie International Edition* 47.29 (2008), 5465–5469. old.
- [173] Willliam Feller. *An introduction to probability theory and its applications, vol 2*. John Wiley & Sons, 2008.
- [174] Brian M Scott. *N unlabelled balls in M labeled buckets*. (2021.09.28.) 1961. URL: <https://math.stackexchange.com/questions/192670/n-unlabelled-balls-in-m-labeled-buckets>.
- [175] Linda J Kuo és Li-Xi Yang. “ γ -H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks”. *In vivo* 22.3 (2008), 305–309. old.
- [176] Yosuke Ichijima és tsai. “Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response”. *Biochemical and biophysical research communications* 336.3 (2005), 807–812. old.
- [177] Mark B Villarino. “Ramanujan’s Perimeter of an Ellipse”. *arXiv preprint math/0506384* (2005).
- [178] Christoph R Bauer. “Labeling and use of monoclonal antibodies in immunofluorescence: protocols for cytoskeletal and nuclear antigens”. *Monoclonal Antibodies*. Springer, 2014, 543–548. old.
- [179] Erich Schubert és tsai. “DBSCAN revisited, revisited: why and how you should (still) use DBSCAN”. *ACM Transactions on Database Systems (TODS)* 42.3 (2017), 1–21. old.
- [180] Jörg Sander és tsai. “Density-based clustering in spatial databases: The algorithm gdbscan and its applications”. *Data mining and knowledge discovery* 2.2 (1998), 169–194. old.
- [181] Jim R Parker. *Algorithms for image processing and computer vision*. John Wiley & Sons, 2010.
- [182] *matlab edges*. (2021.09.28.) URL: <https://www.mathworks.com/help/images/ref/edge.html>.
- [183] Pierre Soille. *Morphological image analysis: principles and applications*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [184] *matlab imfill*. (2021.09.28.) URL: <https://www.mathworks.com/help/images/ref/imfill.html>.
- [185] Mostapha K Heris. *DBSCAN Clustering in MATLAB*. (2021.09.28.) 2015. URL: <https://yarpiz.com/255/ypml110-dbscan-clustering>.

- [186] Prasanna K Sahoo, SAKC Soltani és Andrew KC Wong. “A survey of thresholding techniques”. *Computer vision, graphics, and image processing* 41.2 (1988), 233–260. old.
- [187] Fernand Meyer. “Topographic distance and watershed lines”. *Signal processing* 38.1 (1994), 113–125. old.
- [188] Derek Bradley és Gerhard Roth. “Adaptive thresholding using the integral image”. *Journal of graphics tools* 12.2 (2007), 13–21. old.
- [189] Calvin R Maurer, Rensheng Qi és Vijay Raghavan. “A linear time algorithm for computing exact Euclidean distance transforms of binary images in arbitrary dimensions”. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 25.2 (2003), 265–270. old.
- [190] *matlab imextendemin*. (2021.09.28.) URL: https://nl.mathworks.com/help/images/ref/imextendedmin.html?searchHighlight=imextendedmin&s_tid=srchtitle.
- [191] *matlab imimposemin*. (2021.09.28.) URL: https://nl.mathworks.com/help/images/ref/imimposemin.html?s_tid=doc_ta.
- [192] Archana Kumari és tsai. “Structural insights into actin filament recognition by commonly used cellular actin markers”. *The EMBO journal* 39.14 (2020), e104006.
- [193] T. Gajdos T. és Novák. (2022.03.23.) URL: https://titan.physx.u-szeged.hu/~adoptim/?page_id=1246.
- [194] Toshiro Oda, Keiichi Namba és Yuichiro Maéda. “Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by X-ray fiber diffraction analysis”. *Biophysical journal* 88.4 (2005), 2727–2736. old.
- [195] Nobuyuki Otsu. “A threshold selection method from gray-level histograms”. *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics* 9.1 (1979), 62–66. old.
- [196] *matlab bwskel*. (2021.09.28.) URL: https://nl.mathworks.com/help/images/ref/bwskel.html?searchHighlight=bwskel&s_tid=srchtitle.
- [197] *matlab bwmorph*. (2021.09.28.) URL: https://nl.mathworks.com/help/images/ref/bwmorph.html?s_tid=doc_ta.
- [198] *matlab bwdistgeodesic*. (2021.09.28.) URL: https://nl.mathworks.com/help/images/ref/bwdistgeodesic.html?s_tid=doc_ta.
- [199] Olesya O Panassenko és tsai. “Co-translational assembly of proteasome subunits in NOT1-containing assemblysomes”. *Nature structural & molecular biology* 26.2 (2019), 110–120. old.

Függelék

F1: Levezetés az állapotok betöltöttségéről

Az általam használt modellben a fluofórok az alábbi állapotokban lehetnek.

0: kikapcsolt

1: bekapcsolt

2: kifakult

A modell alapján az állapotok közötti lehetséges átmeneteket az alábbi diagram szemlélteti:



A k_{xx} a különböző átmenetek sebességi állandóit jelöli.

Az összes molekula száma $N_{\text{össz}}$, a különböző állapotokban lévő molekulák száma pedig $N_0(t)$, $N_1(t)$ és $N_2(t)$. Ennek megfelelően a sebességi egyenletek

$$\frac{dN_0(t)}{dt} + (k_{01} + k_{02})N_0(t) = k_{10}N_1(t), \tag{9.2}$$

$$\frac{dN_1(t)}{dt} + (k_{10} + k_{12})N_1(t) = k_{01}N_0(t), \tag{9.3}$$

$$\frac{dN_2(t)}{dt} = k_{02}N_0(t) + k_{12}N_1(t). \tag{9.4}$$

Tehát a 9.2 és a 9.3 képletek alapján adódik, hogy

$$N_1 = \frac{\dot{N}_0 + (k_{01} + k_{02})N_0}{k_{10}}, \tag{9.5}$$

$$\dot{N}_1 + (k_{10} + k_{12})N_1 - k_{01}N_0 = 0 \tag{9.6}$$

a 9.5 és a 9.6 képletekből pedig

$$\frac{1}{k_{10}}\ddot{N}_0 + \frac{k_{01} + k_{02} + k_{10} + k_{12}}{k_{10}}\dot{N}_0 + \left[\frac{(k_{10} + k_{12})(k_{01} + k_{02})}{k_{10}} + k_{01} \right] N_0 = 0. \tag{9.7}$$

Az egyszerűség kedvéért helyettesítsük a 9.9 egyenletben a konstansokat:

$$A_1 \ddot{N}_0 + A_2 \dot{N}_0 + A_3 N_0 = 0 \quad (9.8)$$

Hasonlóan a 9.5 és a 9.6 képletekből adódik, hogy

$$\frac{1}{k_{01}} \ddot{N}_1 + \frac{k_{01} + k_{02} + k_{10} + k_{12}}{k_{01}} \dot{N}_1 + \left[\frac{(k_{10} + k_{12})(k_{01} + k_{02})}{k_{01}} + k_{10} \right] N_1 = 0. \quad (9.9)$$

Helyettesítssel most is egyszerűbb alakra hozhatjuk az egyenletet:

$$B_1 \ddot{N}_1 + B_2 \dot{N}_1 + B_3 N_1 = 0. \quad (9.10)$$

Egyszerűen megoldáshoz jutunk, hogyha Laplace transzformációt hajtunk végre a 9.10 képleten. Ha $X(s) = \mathcal{L}\{N_0(t)\}$, akkor az $N_0(0) = x_0$, illetve $\dot{N}_0(0) = \nu_0$ helyettesítésekkel

$$A_1[s^2 X(s) - sx_0 - \nu_0] + A_2[sX(s) - x_0] + A_3 X(s) = 0, \quad (9.11)$$

amiből átrendezéssel adódik, hogy

$$X(s) = \frac{sx_0 + \nu_0 + \frac{A_2}{A_1}x_0}{s^2 + \frac{A_2}{A_1}s + \frac{A_3}{A_1}}. \quad (9.12)$$

Mivel $\left(s + \frac{A_2}{2A_1}\right)^2 = s^2 + \frac{A_2}{A_1}s + \left(\frac{A_2}{2A_1}\right)^2$, ezért $X(s)$ -t felírhatjuk az alábbi módon is:

$$X(s) = x_0 \frac{s + \frac{A_2}{2A_1}}{\left(s + \frac{A_2}{2A_1}\right)^2 + \frac{A_3}{A_1} - \left(\frac{A_2}{2A_1}\right)^2} + (\nu_0 + x_0 \frac{A_2}{2A_1}) \frac{1}{\left(s + \frac{A_2}{2A_1}\right)^2 + \frac{A_3}{A_1} - \left(\frac{A_2}{2A_1}\right)^2}. \quad (9.13)$$

Mivel a $\sqrt{\frac{A_3}{A_1}} < \frac{A_2}{2A_1}$ feltétel teljesülés, $\omega = \sqrt{\left(\frac{A_2}{2A_1}\right)^2 - \frac{A_3}{A_1}}$ helyettesítéssel felírhatjuk, hogy

$$X(s) = x_0 \frac{s + \frac{A_2}{2A_1}}{\left(s + \frac{A_2}{2A_1}\right)^2 - \omega^2} + \left(\nu_0 + x_0 \frac{A_2}{2A_1}\right) \frac{1}{\left(s + \frac{A_2}{2A_1}\right)^2 - \omega^2}. \quad (9.14)$$

Belátható, hogy $\mathcal{L}\{e^{-\beta t}ch(\omega t)\} = \frac{s+\beta}{(s+\beta)^2-\omega^2}$ és $\mathcal{L}\{e^{-\beta t}sh(\omega t)\} = \frac{\omega}{(s+\beta)^2-\omega^2}$, ezért

$$N_0(t) = x_0 e^{-\frac{A_2}{2A_1}t} ch(\omega t) + \frac{\nu_0 + x_0 \frac{A_2}{2A_1}}{\omega} e^{-\frac{A_2}{2A_1}t} sh(\omega t). \quad (9.15)$$

Kihasználva az $x_0 = N_0(0) = 0$ peremfeltételt, adódik, hogy

$$N_0(t) = \frac{\nu_0}{\omega} e^{-\frac{A_2}{2A_1}t} sh(\omega t). \quad (9.16)$$

Mivel a $\sqrt{\frac{B_3}{B_1}} < \frac{B_2}{2B_1}$ feltétel teljesül, ezért a 9.10 egyenletből, az $\dot{N}_1(0) = \mu_0$ és $\xi = \sqrt{\left(\frac{B_2}{2B_1}\right)^2 - \frac{B_3}{B_1}}$ helyettesítésekkel és az $N_1(0) = N_{\text{össz}}$ peremfeltételt kihasználva adódik, hogy

$$N_1(t) = N_{\text{össz}} e^{-\frac{B_2}{2B_1}t} ch(\xi t) + \frac{\mu_0 + N_{\text{össz}} \frac{B_2}{2B_1}}{\xi} e^{-\frac{B_2}{2B_1}t} sh(\xi t) \quad (9.17)$$

A ν_0 és μ_0 konstansok kiszámításához szintén az $N_1(0) = N_{\text{össz}}$ peremfeltételt használhatjuk ki, vagyis hogy a mérés kezdete során az összes flouorofór a floureszcens, bekapcsolt állapotban van. Vagyis

$$\nu_0 = \left. \frac{dN_0(t)}{dt} \right|_{t=0} = k_{10} N_{\text{össz}}, \quad (9.18)$$

$$\mu_0 = \left. \frac{dN_1(t)}{dt} \right|_{t=0} = -(k_{10} + k_{12}) N_{\text{össz}}. \quad (9.19)$$

Kicsit komplikáltabb módon kiszámolhatjuk N_2 -t is, de egyszerűbb, ha kihasználjuk, hogy a használt modell szerint csak 3 állapota lehet egy festékmolekulának, így két állapot betöltöttségét ismerve már egyértelműen adódik a harmadik állapot betöltöttsége, vagyis

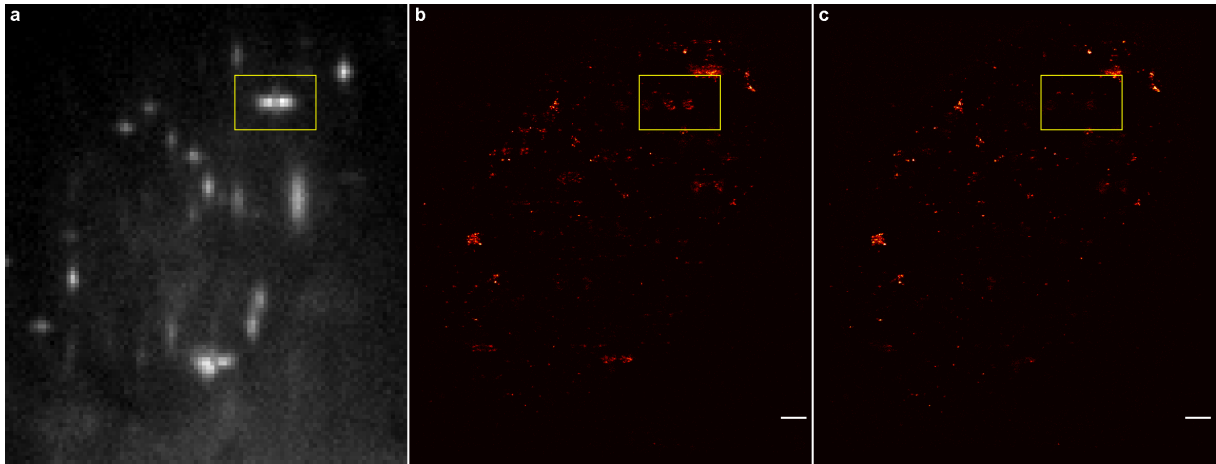
$$N_2(t) = N_{\text{össz}} - N_0(t) - N_1(t). \quad (9.20)$$

Ezek alapján

$$N_2(t) = N_{\text{össz}} (1 - e^{-\frac{B_2}{2B_1}t} ch(\xi t)) - \frac{\nu_0}{\omega} e^{-\frac{A_2}{2A_1}t} sh(\omega t) - \frac{\mu_0 + N_{\text{össz}} \frac{B_2}{2B_1}}{\xi} e^{-\frac{B_2}{2B_1}t} sh(\xi t). \quad (9.21)$$

F2: Műtermékek asztigmiás 3D-s mérés során

Az optikai hibák miatt az asztigmiás 3D-s mérések során a fókuszon kívüli flourofúrokhoz tartozó PSF „kilyukadhat”, vagyis annak intenzitás profiljában két intenzitás maximum alakulhat ki (9.1.a ábra) amire a lokalizációs algoritmus két függvényt illeszt. Ennek eredményeképpen megduplázódott alakzatokat alakulhatnak ki a rekonstruált képen (9.1.b ábra). A megduplázódott alakzatokat ki lehet szűrni oly módon, hogy a lokalizációkat szűrjük az illesztett függvény szélessége szerint, mivel a defókuszált PSF-re nagyobb félértékszélességű görbét illeszt a program, de ilyenkor jelentős számú lokalizációt veszünk és el is tűnik néhány struktúra, ami a valóságban ott van (9.1.c ábra).



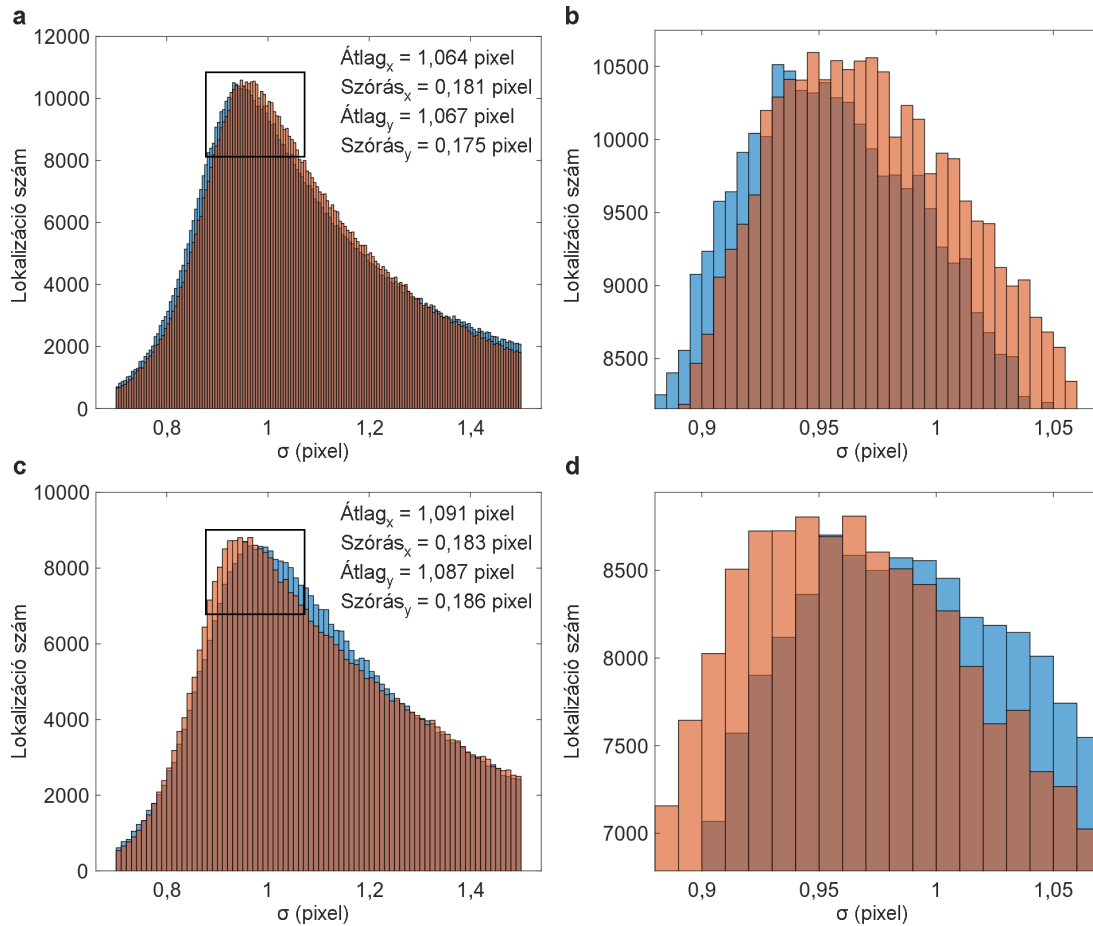
9.1. ábra. Asztigmiás 3D-s módszer során fellépő műtermék. **a**, Egy képkocka az asztigmiás dSTORM mérés során. A minta 4-OHT kezelt DlvA sejtmag volt γ H2AX hiszton jelöléssel. A sárgával jelölt rész két intenzitást maximummal rendelkező PSF-et jelöl. **b**, Rekonstruált dSTORM kép az **a** felvételtől. A bejelölt területen a PSF torzulás miatti megduplázódás (műtermék) látható. **c**, Az **a** ábrán jelzett felvétel rekonstrukciója a lokalizáció során illesztett függvények szélesség szerinti szűrése után. A megduplázódott alakzatokhoz tartozó lokalizációk nagyrészt eltűntek. Skála: 1 μm (**b,c**)

F3: Az illesztések σ paramétereinek eloszlása

A molekulák képére a rainSTORM Gauss függvényt illeszt, aminek képlete:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}. \quad (9.22)$$

Az asztigmias 3D-s módszerrel készült Sgs1-RNC és Rpt1-RNC expresszálo élesztő sejtekről készült felvételek elemzése során hisztogramot készítettem az illesztett függvények σ paramétereiből (9.2. ábra). A kétféle sejtípus mérési eredményeinek összevetése során nem tapasztaltam szignifikáns eltérést a σ illesztési paraméterben.



9.2. ábra. Illesztett függvények σ paramétereinek eloszlása. a–b, Sgs1-RNC expresszálo élesztő sejtekről készült felvételek lokalizációinak σ eloszlása (a) és egy kinagyított rész a módusz környékéről (b). **c–d,** Rpt1-RNC expresszálo élesztő sejtekről készült felvételek lokalizációinak σ eloszlása (c) és egy kinagyított rész a módusz környékéről (d). Jól látszódik, hogy a rekonstrukció során azok a lokalizációk lettek elfogadva, amelyekre az illesztett függvény σ értéke 0,7 és 1,5 pixel érték között van.