

# Lokalizációs mikroszkópiás mérések kvantitatív elemzése

## DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Szerző:  
**Varga Dániel**

Témavezető:  
**Dr. Erdélyi Miklós**  
egyetemi docens



Fizika Doktori Iskola  
Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék  
Szegedi Tudományegyetem

2022  
Szeged



# 1. Összefoglalás

## 1.1. 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 [1]. 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 [2–4]. 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 [5].

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 klasz-

terek kvantitatív jellemzése további felfedezésekre ad lehetőséget. A klaszterek különböző tulajdonságait eloszlásokkal lehet a legjobban leírni és ezek tér- és időfüggők lehetnek. Biológiai releváns kérdések megválaszolásához a célfehérje által képzett klaszterek egymáshoz viszonyított helyzetének, illetve alaki tényezőjének meghatározása is hozzásegíthet. Lokalizációs adatsorok esetén a felvételek strukturális vizsgálata is új analitikai eszközöket igényel. A fizikai dimenziók meghatározása tipikusan a vizsgált struktúra keresztmetszeti profiljára való elméleti 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.

## 1.2. 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 összevessem 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  $\gamma$ H2AX hisztonok számának kvantitatív megbecslése, a  $\gamma$ 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.

### 1.3. 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 DiVA sejtmagokról 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 szálu DNS töréseket jelző  $\gamma$ 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. [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-naszcnés-lánc komplexek élesztő sejtekben klaszterizálódnak és ennek mértéke Sgs1-RNC expresszálo sejtekben jelentősebb. DBSCAN algoritmussal karakterizáltam az UV kezelés hatását Not1 tartalmú klasz-

terekre. Egy keresztkorreláción alapuló klaszter kereső algoritmussal megállapítottam, hogy a megtalált klaszterek egy jelentős része üreges struktúrával rendelkezik. [A5]

## 2. 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); doi: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. doi:10.1117/12.2545099
- [A3] Sz. Brunner, D. Varga, R. Bozó, R. Polanek, T. Tőkés, E. R. Szabó, R. Molnár, N. Gémes, G. Szebeni, 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); doi:10.3389/pore.2021.1609971
- [A4] K. Szabó, D. Varga, A. G. Vegh, N. Liu, X. Xiao, L. Xu, L. Rovo, L. Dux, M. Erdelyi, 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); doi: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, doi: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); doi: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 poszterek

- [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 for-*

- mation 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] Bo Huang, Hazen Babcock és Xiaowei Zhuang. “Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells”. *Cell* 143.7 (2010), 1047–1058. old.
- [2] Eric Betzig és tsai. “Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution”. *Science* 313.5793 (2006), 1642–1645. old.
- [3] 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.
- [4] Mike Heilemann és tsai. “Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes”. *Angewandte Chemie International Edition* 47.33 (2008), 6172–6176. old.
- [5] Yu-Le Wu és tsai. “Quantitative data analysis in single-molecule localization microscopy”. *Trends in Cell Biology* 30.11 (2020), 837–851. old.