

**Lakunaritás elemző, asztigmias 3Ds és többszínű
képregisztrációs algoritmusok és eljárások fejlesztése
lokalizációs mikroszkópai mérések kvantitatív
kiértékelésére**

Doktori értekezés tézisei

Szerző:

H. Kovács Bálint Barna

Témavezető:

Dr. Erdélyi Miklós



Fizika Doktori Iskola
Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék
Szegedi Tudományegyetem

2024
Szeged

1. Összefoglaló

1.1. Bevezetés

Az emberi szem feloldásánál kisebb struktúrák vizsgálatát és megértését a mikroszkópok és a fejlesztésükkel foglalkozó mikroszkópia tudományága teszi lehetővé. A mikrovilág struktúráinak felnagyítását leggyakrabban optikai mikroszkópokkal valósítják meg, amik az emberi szem számára is látható fényt alkalmaznak. A fény hullámtermészetéből fakadóan a legkisebb feloldható struktúra méretét a diffrakció limitálja. Egy nagy numerikus apertúrával bíró, látható tartományon működő rendszer esetén ez tipikusan 250 nm. További lehetőségek a feloldás javítására a hullámhossz csökkentése, vagy részecskék használata. Ezek a módszerek, azonban magával vonják az optikai rendszer teljes átépítését. Amennyiben egy látható fényre optimalizált optikai rendszerrel akarunk nagyobb feloldást elérni más megoldásra van szükség. Ezt a problémát kezelő, illetve megoldó technikák összefoglaló neve az optikai szuperrezolúció [1]. A különböző szuperrezolúciós technikák lehetővé teszik a feloldás növelését a látható fény alkalmazása mellett. Ezen technikák közül az úgynevezett egymolekula lokalizációs technika (SMLM) biztosítja a legjobb feloldást (20 nm) [2], [3], [4]. Ez a feloldás lehetővé teszi sejteken belüli organellumok és biológiai folyamatok megfigyelését, így a technika nagy népszerűségnek örvend a biológia és az orvostudomány területén. A lokalizációs technikák egyes alcsoportjai akár élő sejteken is alkalmazhatók. Természetesen, mint minden technikának, a lokalizációs mikroszkópiának is megvannak a hátrányai. A kiértékelt lokalizációs mérési adatok ponthalmazok, melynek következtében az eredmények összevetése korábbi, képekből álló, eredményekkel nehézkes. Ennek orvoslására olyan algoritmusokat és eljárásokat dolgoztak ki melyek képesek a lokalizációs technikára jellemző ponthalmazokból álló mérési eredményekből további információkat kinyerni [5]. Az ilyen algoritmusok jelentősen elősegítették a lokalizációs eredmények konzisztens összevetését a korábbi hagyományos fluoreszcenciás, illetve konfokális eredményekkel, azonban továbbra is jelentős az igény új kvantitatív kiértékelő módszerek fejlesztésére, korábbi módszerek felgyorsítására, valamint a lokalizációs adathalmazokból további információk kinyerésére.

1.2. Célok és kutatási módszerek

Kutatásom fő célkitűzése a lokalizációs mikroszkóp technika kiegészítése, illetve továbbfejlesztése volt olyan módszerekkel és kiértékelő algoritmusokkal, amelyek lehetővé teszik a vizsgált fluoreszkáló molekulák laterális helyzetén túlmutató információk kinyerését. További célom volt az új eljárások alkalmazása sejtbiológiai problémák feltárására. Ezt a célt két csapásirány mentén

1. Összefoglaló

terveztem elérni. Az egyik a hardveres, ahol a lokalizációs mikroszkópot új modalitásokkal, vagy más technikákkal együttesen alkalmazva nyerek ki több információt. A másik a már meglévő adatok kvantitatív kiértékelése új algoritmusokkal. Konkrét céljaim a következők voltak:

A dSTORM rendszerünkben megvalósítani egy asztigmian alapuló 3D lokalizációs eljárást. Az ehhez az eljáráshoz szükséges mérési protokoll kidolgozása. A 3D szuperrezolúciós rendszer segítségével biológiai rendszerek 3D struktúráinak feltárása. A csapatunkban fejlesztett multimodális mikroszkóp rendszer asztigmias 3D modalitásának modellezése.

A mikroszkóp rendszerünk optimalizálása többszínű dSTORM és konfokális felvételek készítésére, egyazon minta területről. Eljárás fejlesztése a dSTORM és konfokális képek egyesítésére és elemzésére. Több komponensű, komplex biológiai minták strukturális vizsgálata többszínű leképezéssel.

A lakunaritás bevezetése az egymolekula detektáláson alapuló, lokalizációs mikroszkópiai technikák adatsorainak kvantitatív kiértékelésére. Lokalizációs adatsorok lakunaritás kiértékelésére alkalmas eljárás és szoftver fejlesztése. Az eljárás hitelesítése korábbi biológiai mintákon kimutatott eredmények és szimulációk segítségével.

Lakunaritás értékek kiszámításának optimalizálása. A különböző nagy precizitású lakunaritászámító algoritmusok összegyűjtése. Új lakunaritászámító algoritmusok fejlesztése. Lakunaritászámító algoritmusok összehasonlítása teszt adatsorokon. Az adatsor specifikus, optimális lakunaritászámító algoritmus meghatározása.

1.3. Új tudományos eredmények

T1: Matrixoptikára alapuló eljárást dolgoztam ki hengerlencsével megvalósított asztigmias 3D szuperrezolúciós rendszerek modellezésére LabView programozási környezetben. Modellezve a rendszerünket megvizsgáltam, hogyan függ az asztigmia nagysága a hengerlencse fókusztávolságától és pozíciójától. Megmutattam az egyes hengerlencse pozíció tartományok előnyeit és hátrányait reprodukálhatóság és az asztigmia beállíthatóságának szempontjából. A modellt OSLO szimulációkkal támasztottam alá. Kiegészítettem a rendszerünket egy, a modell alapján választott, hengerlencsével és tesztmintákon végzett mérésekkel is hitelesítettem a szimulációs eredményeket. Az optimalizált 3D rendszer számos együttműködésben került felhasználásra. Többek között a 3D képek felvétele lehetővé tette fázisszeparált riboszóma klaszterek pontosabb analizisét. Továbbá, a megvalósított eljárással modelleztem az mmSTORM

lokalizációs mikroszkóp asztigmias 3D modalitását. Meghatároztam a multimodális rendszerben az asztigmia hengerlencse fókusztávolság és pozíció függésének jellegét. [A1, A2]

T2: Optimalizáltam a mikroszkóp rendszerünket többszínű dSTORM és konfokális képek együttes kiértékelésére és kolokalizációs információ kinyerésére. Konfokális és dSTORM képek egyesítésére saját kódot írtam LabView programozási környezetben. Kétszínű konfokális és dSTORM felvételeket készítettem emberi és egér agyi szeletekben található interneuronok HCN1, HCN2 és Kv3.1 ioncsatornáiról. A kétszínű konfokális felvételeken az egyik színcsatornában parvalbumin jelölés segítségével vizualizáltuk a sejt membrán határát míg a másik színcsatornában az adott ioncsatorna volt jelölve lehetővé téve a konfokális-dSTORM összehasonlítást. A nagy feloldású dSTORM mérések segítségével meghatároztuk az ioncsatornák pozícióját 20 nm-es pontossággal. Az általam készített kép egyesítő algoritmus segítségével, valamint dSTORM és konfokális képek vizuális összehasonlításával megmutattuk a HCN1 és HCN2 csatornák eltérő viselkedését humán és egér interneuronokban. [A3]

T3: Kifejlesztettem egy lakunaritás alapú eljárást lokalizációs mikroszkópos felvételek geometriájának kvantitatív kiértékelésére. Bevezettem a lakunaritás eltérés görbét, ami normált lakunaritás értékek ábrázolásával hatékonyan képes megjeleníteni 2D és 3D struktúrák homogenitását különböző méretskálákon. TestSTORM szimulációs szoftverrel generált szintetikus adatsorok segítségével megmutattam hogyan lehet a lakunaritás eltérés görbék alapján következtetni különböző klasztereződési folyamatokra, valamint a klaszterek paramétereire (pl. klaszterméret, klaszterszám, klasztersűrűség, stb.). Kettős szálú DNS törések javító fehérjéről készült dSTORM felvételeken bemutattam, hogy a lakunaritás eltérés görbékkel kapott eredmények egyezést mutatnak korábbi DBSCAN-es klaszteranalízises eredményekkel. Megmutattam, hogy a lakunaritás alapú kiértékelések ötször gyorsabban elvégezhetők, mint a DBSCAN. [A4]

T4: Kifejlesztettem egy a konvolúciós tételre és egy, az eredeti módszer megfordítására épülő új lakunaritászámító algoritmust, melyek képesek gliding-box lakunaritás értékeket nagyságrendekkel gyorsabban kiszámolni, mint az eredeti gliding-box algoritmus. Az új algoritmusokat 2D és 3D adatsorok kiértékelésére is implementáltam. Az eredeti gliding-box valamint két darab optimalizált 2D algoritmust tovább fejlesztettem 3D adatsorok kiértékelésére. Ezen három irodalomból ismert algoritmust és a két új általam bevezetett algoritmust összehasonlítottam 2D és 3D szintetikus adatsorok kiértékelésével futás idő, memória igény és kód komplexitás szempontjából.

1. Összefoglaló

Megmutattam az egyes algoritmusok előnyeit és hátrányait, valamint adott mintákhoz és hardver konfigurációkhoz meghatároztam az optimális lakunaritásszámító algoritmust. [A5]

2. Publikációs lista

MTMT azonosító: 10071753

Tézispontokhoz kötődő publikációk:

[A1] Tamás Gajdos, Zsófia Cserteg, Szilárd Szikora, Tibor Novák, Bálint Barna H. Kovács, Gábor Szabó, József Mihály, és Miklós Erdélyi. "mmSTORM: Multimodal localization based super-resolution microscopy." Scientific Reports 9,1 (2019): 798. **Q1**, IF: **4,6**; doi: 10.1038/s41598-018-37341-9

[A2] Orsolya Németh-Szatmári, Ádám Györkei, Dániel Varga, Bálint Barna H. Kovács, Nóra Igaz, Kristóf Német, Nikolett Bagi és mtsai. "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. **Q-**, IF: **0**; doi: 10.1101/2022.03.16.484567

[A3] Viktor Szegedi, Emőke Bakos, Szabina Furdan, Bálint H. Kovács, Dániel Varga, Miklós Erdélyi, Pál Barzó, Attila Szücs, Gábor Tamás, és Karri Lamsa. "HCN channels at the cell soma ensure the rapid electrical reactivity of fast-spiking interneurons in human neocortex." Plos Biology 21,2 (2023): e3002001. **Q1**, IF: **9,8**; doi: 10.1371/journal.pbio.3002001

[A4] Bálint Barna H. Kovács, Dániel Varga, Dániel Sebők, Hajnalka Majoros, Róbert Polanek, Tibor Pankotai, Katalin Hideghéty, Ákos Kukovecz, és Miklós Erdélyi. "Application of Lacunarity for Quantification of Single Molecule Localization Microscopy Images." Cells 11,19 (2022): 3105. **Q1**, IF: **7,666**; doi: 10.3390/cells11193105

[A5] Bálint Barna H. Kovács, és Miklós Erdélyi. "Methods for calculating gliding-box lacunarity efficiently on large datasets." Expert Systems With Applications, BÍRÁLAT ALATT. **Q1**, IF: **8,5**; ssrn: <https://ssrn.com/abstract=4516313> vagy <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4516313>

2. Publikációs lista

Tézispontokhoz nem felhasznált publikációk:

[A6] Tibor Novák, Dániel Varga, Péter Bíró, Bálint Barna H. Kovács, Hajnalka Majoros, Tibor Pankotai, Szilárd Szikora, József Mihály, és Miklós Erdélyi. "Quantitative dSTORM superresolution microscopy." *Resolution and Discovery* 6,1 (2022): 25-31. **Q-**, IF: **0**; doi: 10.1556/2051.2022.00093

[A7] Orsolya Németh-Szatmári, Bence Nagy-Mikó, Ádám Györkei, Dániel Varga, Bálint Barna H. Kovács, Nóra Igaz, Bence Bognár és mtsai. "Phase-separated ribosome-nascent chain complexes in genotoxic stress response." *RNA* 29,10 (2023): 1557-1574. **Q1**, IF: **4,5**; doi: 10.1261/rna.079755.123

Konferenciák:

[K1] Bálint Barna H. K., D. Varga, D. Sebők, H. Majoros, R. Polanek, T. Pankotai, K. Hideghéty, Á. Kukovecz, M. Erdélyi, P. Bíró és N. Tibor. "Application of Lacunarity for Quantification of Single Molecule Localization Microscopy Images." FOM, 2023.04.02.-05., Porto, Portugália

3. Irodalomjegyzék

- [1] B. Huang, H. Babcock, és X. Zhuang, „Breaking the Diffraction Barrier: Super-Resolution Imaging of Cells”, *Cell*, köt. 143, sz. 7, o. 1047–1058, dec. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.12.002.
- [2] E. Betzig és mtsai., „Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution”, *Science*, köt. 313, sz. 5793, o. 1642–1645, szept. 2006, doi: 10.1126/science.1127344.
- [3] M. J. Rust, M. Bates, és X. Zhuang, „Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)”, *Nat Methods*, köt. 3, sz. 10, o. 793–796, okt. 2006, doi: 10.1038/nmeth929.
- [4] M. Heilemann és mtsai., „Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes”, *Angew Chem Int Ed*, köt. 47, sz. 33, o. 6172–6176, aug. 2008, doi: 10.1002/anie.200802376.
- [5] Y.-L. Wu, A. Tschanz, L. Krupnik, és J. Ries, „Quantitative Data Analysis in Single-Molecule Localization Microscopy”, *Trends in Cell Biology*, köt. 30, sz. 11, o. 837–851, nov. 2020, doi: 10.1016/j.tcb.2020.07.005.