

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Pixelenkénti autofluoreszcencia korigált  
FRET mérés és implementálása  
Pannoramic Confocal konfokális  
patológiai szkenerre**

Rebenku István

Témavezető: Dr. Vereb György



**DEBRECENI EGYETEM**  
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2024

# **Pixelenkénti autofluoreszcencia korrigált FRET mérés és implementálása Panoramic Confocal konfokális patológiai szkenerre**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
A gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Rebenku István, okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskolája  
Farmakológia doktori programja keretében

Témavezető: Prof. Dr. Vereb György, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora  
tagok: Dr. Galajda Péter, PhD  
Dr. Szöllősi Attila Gábor, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK Elméleti Tömb, V.  
emeleti könyvtár, 2024. február 29., 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Máthé Csaba, PhD  
Dr. Szabó-Meleg Edina, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora  
tagok: Dr. Galajda Péter, PhD  
Dr. Szöllősi Attila Gábor, PhD  
Prof. Dr. Máthé Csaba, PhD  
Dr. Szabó-Meleg Edina, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet  
„A” épület tanterme, 2024. február 29., 13:00 óra

## **Bevezetés**

A különböző tumoros megbetegedésekre jellemző a nagy térbeli heterogenitás. Ez különösen nehezíti a megfelelő diagnózis és terápiás eljárás meghatározását. Akár egyetlen, a tumor többi részétől eltérő sejt is befolyásolhatja a tumor reakcióját az alkalmazott kezelésre. A tumor heterogenitás vizsgálatára napjainkban számos módszert fejlesztenek, mint például a térbeli transzkriptomika és térbeli proteomika, azonban ezeket összetettségük és költségességük miatt diagnosztikára nem, csak felfedező klinikopatológiai kutatásokra használják. A digitális patológia gyors fejlődése nem csak szöveti szintű morfológiai felvételek készítését teszi lehetővé, hanem immunhisztokémiai jelölések alkalmazásával ezek a morfológiai jegyek egy vagy két molekula expressziós szintjével is korreláltathatóak. Napjainkban a fluoreszcenciás patológiai szkennerek megjelenése és elterjedése zajlik, melyek lehetővé teszik több molekula egyszerre történő, multiplex jelölésen alapuló vizsgálatát. Ez a technológiai háttér a rutin diagnosztikából fejlődött ki, így kézenfekvő, hogy fontosnak tartott markerek nagy kiterjedésű mintákban - akár ritka eseményként - való megjelenésének vizsgálatára alkalmazzuk.

A 3DHistech Kft. Panoramic Confocal készüléke az első olyan digitális patológiai szkennerek, amely a hagyományos transzmissziós és fluoreszcenciás képalkotáson túlmenően konfokalitást is biztosít, így vastagabb metszetek térbeli vizsgálatára is használható. Ezt a szkennert a konfokalitás, stabilitás, pontosság, linearitás és az érzékenység szempontjából vizsgáltuk. Mivel bizonyos molekulák közötti kölcsönhatás gyakran érzékenyebb mutatója lehet egy adott sejt állapotának, mint ezen molekulák kifejeződési szintje, azt is meg kívántuk vizsgálni, hogy a Panoramic Confocal alkalmassá tehető-e szövettani metszeteken molekuláris interakciók mérésére Förster rezonancia energiáttranszfer (FRET) mérésén keresztül.

### **A digitális patológia**

A digitális patológia a szöveti biomarkerek kutatásán túl a rutin diagnosztikában is egyre inkább előtérbe kerül. Ezt a gyorsabbá váló teljes tárgylemez szkennerek, valamint a tárhely és a számítási teljesítmény csökkenő ára teszi lehetővé. A legtöbb

rutin diagnosztikai területen jelenleg hagyományos transzmissziós módszereket alkalmaznak. A fluoreszcenciás képalkotás, különösen a konfokális képalkotás, az automatizált teljes tárgylemez szkennelés feltörekvő területe. Még a European Society of Digital and Integrative Pathology 2021-es kiadásában, a digitális patológiára vonatkozó legjobb gyakorlatra vonatkozó ajánlásban is csak a fluoreszcenciás módszerek neve kerül említésre, de nem tárgyalják azokat. A konfokális módszerek bevezetése az automatikus tárgylemez szkennerekbe javíthatja azok képminőségét és jelentősen megnövelheti a z irányú feloldást, ami lehetővé teszi olyan technikák alkalmazását, amelyek korábban teljes tárgylemez szkennerekkel nem voltak megvalósíthatóak. A digitális patológia és a teljes tárgylemez szkennelés egy folyamatosan fejlődő terület, ahol az új műszerek és azok folyamatos minőségellenőrzése elengedhetetlen a magas színvonal biztosításához.

### **A Panoramic Confocal képalkotása**

A Panoramic Confocal egy, a 3D Histech Kft. (Budapest) által fejlesztett és gyártott, konfokális képalkotásra képes fluoreszcenciás tárgylemez szkennerek. A készülék konfokális képalkotását az Aurox cc88 apertúra korrelációs konfokális rendszer biztosítja. Ennek központi eleme egy forgó optikai lemez, amely rácsmintázatban áteresztő és visszaverő területeket hordoz. Erre vetül a multispektrális Lumencor LED fényforrás fénye egy motorizált váltóban elhelyezkedő optikai szűrőrendszeren keresztül.

A gerjesztő fény a rácsmintázat transzparens elemein áthaladva az objektíven keresztül eljut a mintára. Ezt követően az emittált fény az objektíven keresztül ismét a forgó lemezre jut, ahol a fény egy része tovább halad, egy másik része pedig visszaverődik. Az optikai rendszer úgy van kialakítva, hogy mindkét frakció ugyanannak az sCMOS kamera szenzornak a két felén képződjön le. A rácsmintázaton átjutó, mintára fókuszált fény által a rácshoz konjugált fókusz síkban gerjesztett fluoreszcencia a transzparens rácsponatokon át a szenzor egyik felére jut. Mivel az áteresztő rész a lemez felét teszi ki, a fókusz síkon kívülről származó fotonok véletlenszerű fele a rácson át ugyanerre a fél szenzorra jut, míg a másik fele a lemez

tükröző részeiről visszaverődve másik optikai úton a szenzor másik felére képződik le. Emiatt, az áteresztett és a visszavert képből – összegként, ill. különbségként – kiszámolható a teljes látómezős („widefield”) és a konfokális kép. A kijelölt területről a mikroszkóp szekvenciálisan, néhány pixel átfedéssel felvételeket készít. A felvételekből egy képösszefűző algoritmus létrehozza a digitális tárgylemezt, amely számítógépes háttértárból bármikor előhívható, és megfelelő program segítségével úgy vizsgálható, mintha a mikroszkóppal navigálnánk a metszetben.

### **Pontkiterjedési függvény és dekonvolúció**

Amikor egy mintát optikai mikroszkóppal vizsgálunk, a kép, ami kialakul, nem a minta tökéletes leképeződése. A pontszerű fényforrásról alkotott kép térbeli szétterülését a pontkiterjedési függvény (PSF) írja le; a kép a tárgy és a PSF konvolúciója. Emiatt a PSF torzító hatását egyszerű lineáris képfeldolgozási módszerekkel nem küszöbölhetjük ki, csak dekonvolúcióval, melyre számos matematikai módszer áll rendelkezésre.

### **Molekuláris kölcsönhatások glioblasztóma daganatokban**

Mivel a glioblasztóma multiforme (GBM) mind a kemo-, mind a sugárterápiával szemben rendkívül ellenálló, számos kutatás irányul a rezisztencia mechanizmusainak feltárására. Többek között megállapították, hogy bizonyos sejtadhéziós molekulák és receptor-tirozinkinázok közötti kölcsönhatás hozzájárulhat a kemo- és sugárrezisztencia kialakulásához. Az egyik ilyen specifikus kölcsönhatás az EGFR és az integrinek között lép fel. Az integrinek (pl. az  $\alpha 5 \beta 1$  heterodimer) különböző fehérjékből álló multimer klasztereket alkotnak a fokális adhéziós komplexekben, amelyek az apoptózist megakadályozó jelátvitelt képesek létrehozni. Az EGFR is előfordul ezekben a struktúrákban, és potenciálisan ugyanazt a túlélési jelátvitelt képes elindítani. Ezen felül az EGFR és a  $\beta 1$  integrin közötti kölcsönhatás fokozza a tumorsejtek leválását a tumorról, azok motilitását és áttétképző képességét. Munkacsoportunk egy korábbi közleményében kimutatta, hogy az EGFR fokozza a  $\beta 1$  integrin expresszióját, valamint azt, hogy a  $\beta 1$  integrin és EGFR magasabb

expressziójának hatására csökken az EGFR homoasszociáció, és növekszik az EGFR- $\beta 1$  integrin heteroasszociáció, és ez a jelenség hozzájárul a GBM sugárrezisztenciájához. A  $\beta 1$  integrin és EGFR heteroasszociációja a magasabb grádusú asztrocitómákon fokozódik, ezért prognosztikai paraméterként használható, mely megbízhatóbb, mint az interakcióban résztvevő molekulák expressziós szintje. Mivel hasonló prediktív kölcsönhatások számos kórfolyamatban jelen vannak, a molekuláris kölcsönhatások feltehetően egyre nagyobb szerephez juthatnak a patodiagnosztikában.

### **Förster rezonancia energiáttranszfer (FRET)**

A molekulák közötti interakciók meghatározására és összehasonlítására a FRET népszerű eszköz. Erre az 1-10 nm-es tartományban erős távolságfüggése teszi alkalmassá még olyan optikai eszközökben is, amelyek egyébként a diffrakció miatt kisebb felbontóképességre korlátozódnak.

#### *A FRET fizikája*

A FRET egy ütközésmentes, erősen távolságfüggő fotofizikai folyamat. FRET során egy gerjesztett fluoreszcens molekula (donor) energiát ad át egy megfelelő akzeptornak, amely gyakran szintén fluoreszcens tulajdonságú. Az energiaátadás nagy távolságú dipol-dipol csatolási mechanizmuson keresztül nem radiatív módon (foton keletkezése nélkül) történik. A FRET létrejöttéhez a donor és akceptor molekuláknak térben megfelelő orientációjúnak kell lennie, valamint a donor emissziós spektrumának átfedésben kell lennie az akceptor abszorpciós spektrumával. Mivel a FRET-hatékonyság ( $E$ ) a távolság negatív hatodik hatványától függ, „spektroszkópiai mérőszalagnak” tekinthetjük a molekuláris dimenzióban. A FRET csak a közeli mezőben fordul elő, amely az 1-10 nm-es tartományba esik. Ha a donor és az akceptor közötti távolság kisebb, mint 1 nm, akkor közöttük az energiaátadás nagy valószínűséggel ütközésen keresztül történik, ha pedig a távolság eléri a ~10 nm-t, akkor az  $E$  2% alá csökken és a donor által kibocsátott fotonemisszió dominál.

#### *Mikroszkópos FRET mérési módszerek*

A FRET mikroszkópiában történő mérésére számos módszer létezik, az egyedi molekula mérésektől a több molekula átlagos távolságát leíró megközelítésekig. Ezek közül több nem igényel drága műszereket, és/vagy nem roncsolja a mintát, ilyenek az intenzitás arányokon alapuló módszerek, amelyeket a fluoreszcens fehérje alapú, ismert donor/akceptor sztöchiometriával rendelkező bioszenzorok egyre bővülő területén lehet a legjobban alkalmazni, valamint az olyan kvantitatív mérési módok, amelyek a donor/akceptor sztöchiometriától független, kalibrált FRET-hatékonyságot eredményeznek. A spektrális átvilágításra korrigált (3 szűrős) FRET módszer egy költséghatékony és sokoldalú megközelítés, amely az áramlási citometriában és a hagyományos fluoreszcenciás mikroszkópiában is alkalmazható. A szintén népszerű akceptor fotoelhalványítási technikával ellentétben ez az eljárás time-lapse és 3D képelemzéssel együtt is alkalmazható.

#### *A FRET mérési módszerek korlátai*

A FRET mérés minden módszerének fő korlátja a jel-zaj arányban (SNR, signal to noise ratio) keresendő. Az összes mért fluoreszcencia-intenzitás zaja tovább terjed az abból számított FRET-hatékonyság zajába. Feltételezve a detektált fotonok Poisson-eloszlását  $\lambda$  várható értékkel, az SNR értéke  $\sqrt{\lambda}$ , így az alacsonyabb intenzitások várhatóan nagyobb mértékben növelik a meghatározott FRET hatásfok bizonytalanságát. Az alacsony SNR-rel rendelkező mintákat a fluoreszcens festékek kvantumhatékonyságának és fotostabilitásának javításával, hatékonyabb detektálással, a FRET festékpárok optimalizálásával, valamint továbbfejlesztett matematikai és statisztikai megközelítésekkel lehet FRET-analízisre alkalmassá tenni. A spektrális átvilágításra korrigált FRET módszer alkalmazásával általában akkor lehet biztonsággal következtetni a meglévő molekuláris kölcsönhatásokra, ha ~5%-os vagy annál nagyobb FRET-hatékonyságot látunk.

#### *FRET mérés és az autofluoreszcencia*

Az elérhető SNR-t a sejtek autofluoreszcenciája is korlátozza. Mivel a sejtek autofluoreszcenciája jellemzően kevésbé erős a látható fény vörös tartományában,

ezért lehetőleg ebbe a tartományba eső donor-akceptor festékpárokat érdemes használnunk. Az autofluoreszcencia torzító hatásának csökkentésére felhasználható, hogy annak spektruma viszonylag stabil, így bevilágítása a FRET mérés optikai csatornáiba egy független referenciacsatorna értéke alapján becsülhető. Ezt a módszer munkacsoportunk korábban sikerrel vezette be áramlási citometriás FRET mérésekre. Leavesley és munkacsoportja továbbfejlesztette a megközelítést a spektrális unmixing bevezetésével, és kimutatta, hogy a módszer alkalmazható a kompartmentális jelátviteli mechanizmusok vizsgálatára. Egy másik, innovatív megközelítésben kvantumdot-okat kombináltak fluoreszcens fehérjékkel a FRET méréshez, miközben a natív fluoreszcenciát időkapuzás alkalmazásával kizárták. Ez utóbbi két megközelítés kivitelezése azonban komoly technikai háttérrel, speciális mikroszkópokat igényel.

## Célkitűzések

Irodalmi adatok azt mutatják, hogy számos patológiás folyamatban, beleértve a tumoros elváltozásokat, nem csak a jelátviteli folyamatokban résztvevő molekulák mennyisége, de az azok között mérhető molekuláris interakciók mértéke is fontos diagnosztikai, ill. prognosztikus/prediktív marker lehet.

A szignalizációs partnerek közötti interakció vizsgálatára kézenfekvő módszer a FRET mérés, aminek pontossága javítható a jelölési és mérési protokollok optimalizálásával, valamint a megfelelő autofluoreszcencia korrekció elvégzésével.

A FRET mérés diagnosztikai elterjedésének komoly gátját képezi, hogy bizonyos mérési eljárások speciális műszereket igényelnek és jellemzően lassú a képalkotásuk. Ennek megoldása lehet, ha a napjainkban robbanásszerűen fejlődő digitális patológia eszköztárát felhasználva, egy automata, konfokális teljes tárgylemez szkenerre implementáljuk a megfelelő FRET mérési eljárást.

Ezek alapján az alábbi célokat tűztük ki:

1. A Panoramic Confocal patológiai szkener képalkotásának, kvantitatív mérésekre való alkalmasságának vizsgálata.
2. Hatékony autofluoreszcencia korrekciós eljárás kidolgozása az intenzitás alapú, spektrálisan korrigált FRET mérésekhez, mely digitális tárgylemez szkenerben is alkalmazható.
3. A digitális patológiában megvalósított autofluoreszcencia korrigált FRET mérés hagyományos konfokális mikroszkópos méréssel történő összehasonlítása.

## **Anyagok és módszerek**

### **Kontaktlencsén növesztett többsejtrétegű 3D modell**

A sejteket hordozó kontaktlencséket felszálló acetone sorban fixáltuk, majd PBS-sel mostuk. A mintát 2% BSA-t és 0,1% Triton X-100-at tartalmazó PBS-sel 1 órán keresztül permeabilizáltuk és blokkoltuk, majd 90 percen keresztül inkubáltuk a következő primer antitestekkel: Alexa Fluor 647 anti-citokeratin 19; tengerimalac anti-citokeratin 3 és Cy3 konjugált egér anti-vimentin. Háromszori PBS/Triton X-100-zal történő mosás után a mintákat Alexa Fluor 488 konjugált anti-tengerimalac antitesttel jelöltük 1 órán keresztül, majd újra háromszor mostuk. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük. Végül a mintákat 1%-os formaldehiddel PBS-ben 10 percig fixáltuk, leöblítettük és Mowiol antifade segítségével a kontaktlencsét fedő- és tárgylemez közé rögzítettük.

### **Immunfluoreszcenciás jelölés FRET méréshez**

Az A172 glioblastóma és SK-BR-3 emlőrák sejteket 10 % FBS-sel kiegészített DMEM-ben, 37 °C-on, 5 % CO<sub>2</sub> mellett, párasított inkubátorban 2 napon át üveg fedőlemezekben tenyésztettük. A fedőlemezeket jégen 4 mM glükózzal kiegészített HEPES pufferrel mostuk, 15 percig fixáltuk 1 %-os formaldehiddel, majd háromszor mostuk. Minden ezt követő lépést szobahőmérsékleten végeztünk. A direkt jelöléshez a sejteket donor és akceptor jelölt antitestekkel jelöltük, mindkettőt telítő végkoncentrációban alkalmaztuk, 2% BSA-t tartalmazó HEPES pufferben 30 percig, a következő kombinációkkal: ab528-Alexa Fluor 546 + BIIG2-Alexa Fluor 647; ab528-Alexa Fluor 647 + BIIG2-Alexa Fluor 546; ab528-Alexa Fluor 546 + TS2-Alexa Fluor 647; ab528-Alexa Fluor 647 + TS2-Alexa Fluor 546. Az intramolekuláris FRET mérések pozitív kontrolljaihoz az ab528-Alexa Fluor 546, BIIG2-Alexa Fluor 546 és TS2-Alexa Fluor 546 primer antitesteket ugyanígy használtuk. A sejteket ismét háromszor mostuk, ezt egy hasonló jelölési ciklus követte a primer ellenanyaghoz megfelelő Alexa Fluor 647 konjugált másodlagos ellenanyaggal. Az utolsó mosást fixálás, majd Mowiolal Superfrost tárgylemezekre történő rögzítés követte.

A fagyasztva metszett N87 tumorokat és üvegfelületre növesztett SK-BR-3 sejteket intramolekuláris FRET méréséhez a fenti direkt jelölési protokolban leírtak szerint készítettük a következő, HER2 ellenes monoklonális antitest kombinációkkal: trastuzumab-Alexa Fluor 546 + pertuzumab-Alexa Fluor 647; pertuzumab-Alexa Fluor 546 + trastuzumab-Alexa Fluor 647.

### **Lézerpásztázó konfokális mikroszkópia**

Minden konfokális mikroszkópos mérésünket egy LSM 880 lézer pásztázó konfokális mikroszkóppal, (Carl Zeiss GmbH) végeztük. A használt objektív egy 40× C-Apochromat vízimmerziós (NA=1,2) volt.

### **FRET mérések**

A FRET mérésekhez a mikroszkópot sorspásztázó üzemmódban használtuk, és az összes fluoreszcens emissziós csatornát a műszer 32 csatornás GaAsP detektorával egyidejűleg detektáltuk. A konfokális apertúra 1 Airy egység volt, a pixelméretet pedig 100 nm-re állítottuk. Az autofluoreszcencia csatornában a gerjesztés 488 nm, a detektálási tartomány pedig 499-535 nm volt. A donor és a transzfer csatornát egyidejűleg 543 nm-es lézerfényel gerjesztettük és 553-615 nm, illetve 651-695 nm között detektáltuk. Az akceptor csatornát 633 nm-en gerjesztettük és a 651-695 nm-es tartományban detektáltuk.

### **Áramlási citometria**

Az áramlási citometriás fluoreszcencia- és FRET méréseket NovoCyte RYB (Acea Biosciences / Agilent) citométerrel végeztük. Az autofluoreszcencia méréséhez a műszer előre meghatározott FITC-H csatornáját használtuk (488 nm gerjesztés és 515-545 nm detektálás); a donor csatorna a PE-H volt (561 nm gerjesztés és 576-596 nm detektálás); a transzfer csatorna PE-Cy5 mPlum-H (561 nm gerjesztés és 650-670 nm detektálás); és az akceptor csatorna APC-H (640 nm gerjesztés és 650-670 nm detektálás). A kiértékelés, kapuzás és a korrekciós faktorok meghatározása az FCS Express (De Novo Software) v7 programmal történt.

## **Pannoramic Confocal**

### *A tárgyasztal stabilitásának és relokalizációs pontosságának mérése*

Az 500 nm átmérőjű TetraSpeck gyöngyöket a Pannoramic Confocal widefield képalkotási módjában vettük fel. A stabilitás vizsgálatához 120 percen keresztül percenként képeket vettünk fel ugyanarról a látótérről. A relokalizációs pontosság méréséhez 10-10 képet készítettünk úgy, hogy minden kép rögzítése után elmozdítottuk a tárgyasztalt egy látótérnyit, majd visszaléptettük a helyére. Ezt a műveletsort mindkét transzlációs tengely mentén mindkét irányban elvégeztük. Minden esetben 15 gyöngy mozgását követtük a TrackMate Fiji plugin segítségével.

### *A megvilágítás homogenitásának mérése*

A megvilágítás homogenitását kék fluoreszcens referencia tárgylemezeken mértük (Ted Pella). Minden csatornához 20 képet rögzítettünk, és a zaj csökkentése érdekében átlagoltuk azokat.

### *Mérési linearitás meghatározása*

A műszer intenzitásválaszának linearitását InSpeck green linearitás kalibrációs gyöngyökkel (ThermoFisher) mértük. A gyöngyöket 15 fókuszszíkban, egymástól 1,2  $\mu\text{m}$  nagyságú lépésközzel mértük, átlagolt intenzitású Z projekciót végeztünk, és az átlagos háttér kivonása után az egyes gyöngyök intenzitását megmértük, majd ezeket átlagoltuk.

### *Szenzitivitás meghatározása*

A műszer érzékenységét QIFIKIT kalibrációs gyöngyökkel határoztuk meg. A QIFIKIT 5 gyöngypopulációt tartalmazott, amelyek felületére különböző, ismert számú egér IgG antitestet konjugáltak. A gyöngyöket szortercsőben telítő koncentrációjú Alexa Fluor 488 konjugált kecske anti-egér IgG-vel HEPES pufferben jelöltünk, 300 g-n mostuk, majd egy éjszakán keresztül tárgylemez felületére szárítottuk és Mowiollal fedtük. A mintáról készült felvételeken a háttér kivonása után

widefield módban 1190 gyöngy, konfokális módban 3196 gyöngy intenzitását határoztuk meg.

### *A pontkiterjedési függvény meghatározása és dekonvolúció*

A Panoramic Confocal konfokális pontkiterjedési függvényét (PSF, point spread function) PS Speck gyökkel határoztuk meg. A mikroszkóp minden csatornájában 20× és 40× objektívvel is 100 szeletet készítettünk 200 nm-es Z-lépésközzel. A PSF szimmetriaeloszlási térképét és az elméleti PSF méreteit a PSFj Fiji plugin segítségével állítottuk elő. A mért képekből az empirikus PSF létrehozásához a Huygens szoftvert (SVI, NL) használtuk. A dekonvolúciót a Huygens Classic Maximum Likelihood Estimation (CMLE) algoritmussal végeztük, maximum 50 iterációra korlátozva azt.

### **Képelemzés**

A képelemzés a Fiji program segítségével történt. A korábban a laboratóriumunkban a hagyományos intenzitás alapú, spektrálisan korrigált FRET mérés kiszámítására létrehozott plugin-t átírtuk, hogy pixelenkénti autofluoreszcencia-korrekciónak is alkalmas legyen, valamint, hogy nagyobb képhalmazok teljesen automatikus feldolgozását tegye lehetővé, továbbá, hogy kompatibilis legyen az ImageJ 2.0-val. Az új plugin a Fiji-n belül a FRET Imaging frissítési oldalán keresztül érhető el.

## Eredmények

### *A Panoramic Confocal automata patológiai szkennertesztelése*

A Panoramic Confocal egy automata konfokális patológiai szkennert, amely potenciálisan alkalmas lehet molekuláris interakciók gyors és automatizált vizsgálatára. Ennek feltétele, hogy képkötés során térben stabilan tartsa a mintát, intenzitásválasza lineáris legyen és elég érzékenyen detektáljon alacsony expressziós szintű fehérjéket is

### **A tárgyasztal stabilitása és relokációs pontossága**

A megfelelő minőségű digitális tárgylemezek létrehozásához elengedhetetlen előfeltétel a nagy stabilitású és precizitású motorizált tárgyasztal. A tárgyasztal stabilitásának vizsgálatához fluoreszcens gyöngyökről percenként felvételeket készítettünk két órán keresztül. Csak az első tíz percben tapasztaltunk enyhe mozgást az X és Y tengely mentén; az elmozdulás nagysága nem érte el egy pixel méretét (<325 nm). A mozgás megszűnésének magyarázata lehet a beálló a termális egyensúly.

A mikroszkóp relokációs pontosságának meghatározásához tízszer oda-vissza mozdítottuk egy-egy látótérrel a mintát, és minden ciklus végén felvételt készítettünk. A mérést a sík mind a 4 kitüntetett irányában elvégeztük. A relokációs pontatlansága minden esetben kisebb volt egy pixel nagyságánál, a hiba nagysága mindig az elmozdulás tengelyén volt nagyobb.

Méréseink alapján a Panoramic Confocal mintakezelése mind időben, mind térben elég stabil a jó minőségű digitális tárgylemezek felvételéhez.

### **A megvilágítás homogenitása**

Kvantitatív mérések végzéséhez, valamint a digitális tárgylemez létrehozásakor történő képösszefűzés jó működéséhez kellően homogén intenzitás eloszlású megvilágító fény szükséges. A Panoramic Confocal megvilágítási fényerősség

eloszlását fluoreszcens tárgylemezeken widefield módban mind a 20×, mind a 40× objektívvel megvizsgáltuk a használt négy fluoreszcencia csatornában. A megvilágítás középpontja nem esik egybe a rögzített kép középpontjával, aminek oka a mikroszkóp speciális optikai rendszerében keresendő. A megvilágítás homogenitása mindkét objektív esetében egyenetlennek tekinthető, valamint enyhe hullámhossz függést mutat. Ezek alapján levonható a következtetés, hogy a megfelelő működéshez korrekciós eljárás használata szükséges. Az általunk bevezetett korrekciós módszer alkalmazásakor egy homogén fluoreszcens mintáról csatornánként, szűrőkészlethez és objektívhez rendeltén felvett képekkel végezzük az intenzitás korrekciót minden nyers képen. Ez a módszer alkalmas kisebb területről és térben változatos mintákról készült felvételek megfelelő korrekciójára, valamint kvantitatív mérések esetén is megbízható eredményeket ad.

### **Linearitás és szenzitivitás**

Ahhoz, hogy egy mikroszkóppal kvantitatív méréseket végezhessünk, az adott képpontban mért intenzitásnak egyenes arányban kell állnia az ott keletkező fotonok számával. Ez a feltétel különösen fontos, ha a mért intenzitások arányát vizsgáljuk, tipikusan ilyenek tekinthetőek például az intenzitás alapú FRET mérések. Ahhoz, hogy ezeket a méréseket biológiailag releváns mintákon is elvégezhessük, a mikroszkópnak alacsony expressziós szintek mellett is kellően érzékenynek kell lennie. A mikroszkóp intenzitásválaszának linearitását InSpeck green fluoreszcencia linearitás kalibrációs gyöngyök segítségével határoztuk meg. A műszer intenzitásválasza lineáris volt widefield és konfokális módban is, az illesztés jóságot mutató  $R^2$  paraméter 0,9996 a widefield, és 0,9997 a konfokális képalkotási módban. A mikroszkóp szenzitivitásának meghatározásához QIFIKIT gyöngyöket használtunk teljes látóterés és konfokális módban. A gyöngyök 5 különböző intenzitású alpopulációból állnak, a mikroszkóp mind az 5 alpopulációt képes volt kimutatni mindkét képalkotási módban. A QIFIKIT gyöngyök átlagos átmérője 10  $\mu\text{m}$ , hasonlóan egy átlagos sejthez, így feltételezhetjük, hogy a QIFIKIT-en kimutatható

2000 epitóp / gyöngy fluoreszcensen jelölt sejtek esetében is hasonló nagyságrendű epitóp-sűrűségnek felel meg.

### **Mérések nagy területű és vastagságú mintákon**

A Panoramic Confocal 3D-s képalkotási képességeit egy kontaktlencse felületén növesztett, több sejtrétegből felépülő, limbális összejthiány transzplantációs kezelésére szolgáló mintán teszteltük. A minta mezenchimális jellegű, vimentin pozitív „tápláló” sejtrétegből, valamint citokeratin 19 és citokeratin 3 pozitív, eltérő irányba differenciálódó epiteliális sejtekből áll. Ezt a három differenciációs markert immunofluoreszcencián jelöltük, továbbá a magi DNS-t DAPI jelöléssel tettük láthatóvá. A negyed kontaktlencséről konfokális módban felvételt készítettünk a Panoramic Confocallal a minta teljes vastagságában, ami ebben az esetben 50  $\mu\text{m}$  volt, a kontaktlencse beágyazás után is megmaradó görbülete miatt. A minta egy kis területéről LSM 880 mikroszkóppal is felvételeket készítettünk. A felvételeken megvizsgáltuk a sejtmentes és magas intenzitású sejtes területeken mérhető intenzitásokat. Ezek alapján a Panoramic Confocal két csatornában jobb, másik két csatornában pedig azonos kontrasztot mutat mint az LSM 880 mikroszkóp. Egyértelmű előnye a Panoramic Confocalnak, hogy az LSM 880 10  $\mu\text{s}$ -os voxel idejével szemben hasonló képminőséget 1  $\mu\text{s}$ -os voxel idővel tudunk elérni.

### **Konfokális teljesítmény és dekonvolúció**

A Panoramic Confocal mért PSF értékei minden irányban jelentősen nagyobbak a konfokális leképezés elméleti értékeinél, valamint a szimmetria is jelentősen elmarad az optimális 1-es értéktől. Emiatt elméleti PSF modellel nem lehetséges a dekonvolúciós algoritmusok futtatása a Panoramic Confocallal készített felvételeken. Bár a PSF nem szimmetrikus, annak térbeli eloszlása homogénnek tekinthető, ami megteremti annak a lehetőségét, hogy csatornánként egy-egy empirikusan meghatározott rendszer-PSF-et felhasználva elvégezhető legyen a dekonvolúció. A feloldás határánál kisebb gyöngyökből a Huygens programmal illesztett empirikus PSF függvény méréseink szerint alkalmasnak bizonyult a

dekonvolúcióhoz, felszínükön színezett kalibrációs gyöngyök esetén mindhárom dimenzióban egy pixelen belül helyezkedett el a fluoreszcencia forrása. Erre alapozva az automatikus, mérés közbeni dekonvolúció — a mikroszkóp gyártójával közös fejlesztés eredményeként — elérhető a mérőszoftver részeként.

### ***Pixelenkénti autofluoreszcencia korrigált FRET***

A spektrális átvilágításra korrigált kvantitatív (3 szűrős) FRET módszer egy költséghatékony és sokoldalú mérési eljárás, ami alkalmazható áramlási citometriában és a fluoreszcencia mikroszkópia különböző módozataiban, de pontosságát csökkentheti a minta autofluoreszcenciája. Ennek kiküszöbölésére implementáltuk és teszteltük a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciót.

#### **Pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciós algoritmus**

A pixelenként korrigált FRET hatások kiszámításához négy fluoreszcenciás csatornára van szükségünk: Az  $I_0$ , amiben az autofluoreszcencia intenzitását mérjük. Az  $I_1$  a donor csatorna. Az  $I_2$  a transzfer csatorna, amelyben a donor festéknek megfelelő gerjesztés mellett detektáljuk az akceptor emisszióját. Az  $I_3$  az akceptor csatorna.

A FRET hatások a donor és akceptor antitesttel jelölt mintán mért intenzitásokból az alábbi egyenlet szerint számolható:

$$E = \frac{A}{\alpha \cdot (\text{eps}R - 1) \cdot [B_2 I_0 S_4 + B_1 I_2 S_6 + I_1 (S_2 - B_2 S_6) - B_1 I_0 S_2 - I_2 S_4] + A}$$

Ahol

$$A = S_2 \{ B_2 I_0 + I_1 S_1 + I_3 S_2 - S_2 (B_3 I_0 + I_1 S_3) + B_1 I_0 (S_2 S_3 - S_1) + (B_3 I_0 - I_3) S_1 S_4 + (B_3 I_1 - B_1 I_3) (S_2 S_5 - S_1 S_6) + I_2 [B_1 S_5 - B_3 S_4 S_5 + B_3 S_6 + S_3 (S_4 - B_1 S_6) - 1] - B_2 [I_0 S_3 S_4 + I_3 (S_6 - S_4 S_5) + I_1 (S_5 - S_3 S_6)] \}$$

Az *epsR* a donor és akceptor festékek egymás gerjesztési hullámhosszán mért moláris abszorpciós együtthatójának szorzata, osztva a saját gerjesztési hullámhosszokon mért moláris abszorpciós együtthatókkal.

Az  $S_1$ ,  $S_3$  és  $S_5$  donor festékre jellemző átvilágítási faktorok a csak donor festéket, míg az  $S_2$ ,  $S_4$  és  $S_6$  akceptorra jellemző átvilágítási faktorokat a csak akceptor festéket tartalmazó mintán határozzuk meg. A  $B_1$ ,  $B_2$  és  $B_3$  értékek az autofluoreszcencia átvilágítását mérik, ezeket jelöletlen sejtes mintákon határozzuk meg

Az  $\alpha$  paraméter korrigálja az akceptor és donor kvantumhatékonyságának, illetve azok detektálási hatékonyságának eltérését. Meghatározásához egy csak donor és egy csak akceptor festéket tartalmazó minta szükséges.

Mivel a hagyományos mérési mód esetén ezeket a faktorokat jelölt sejtes mintákon határozzák meg, a sejtek autofluoreszcenciájának ismeretlen arányú hozzájárulása a jelhez véletlen hibát eredményez. Ennek elkerülésére sejtmentes, hosszútávon eltartható kalibrációs standard lemezeket fejlesztettünk a méréshez, melyek egyben a Panoramic Confocal megvilágítási homogenitás korrekciójához is használhatóak.

Ha nem történik autofluoreszcencia korrekció, akkor minden csatornából csak a műszer háttérét vonjuk ki (nem autofluoreszcencia korrigált kiértékelés). Lehetőség van továbbá arra, hogy jelöletlen mintákon meghatározzuk az átlagos autofluoreszcencia intenzitást az  $I_1$ ,  $I_2$  és  $I_3$  csatornában, majd ezeket az értékeket mindhárom csatornából konstansként levonjuk; ezt a módszert átlagos autofluoreszcencia korrekciónak nevezzük.

### **Autofluoreszcencia korrekció jelöletlen mintákon**

Annak eldöntésére, hogy mennyire hatékony a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció az átlag autofluoreszcencia korrekcióhoz viszonyítva, a két módszert először jelöletlen A172 és SK-BR-3 sejteken teszteltük. A korrekciós módszerek hatékonyságát mind a három, spektrálisan korrigált, intenzitás alapú FRET méréshez használt csatornában elvégeztük. Jelöletlen mintáknál azt várjuk, hogy tökéletes autofluoreszcencia korrekció esetén az eredményként kapott képek átlag intenzitása 0

értéket vesz fel, a pixelenkénti szórás pedig alacsony. A sejtenként integrált autofluoreszcencia intenzitások mindkét módszerrel közel kerültek a 0 értékhez a három vizsgált fluoreszcencia csatornában (donor, transzfer, akceptor), vagyis átlagokat vizsgálva mindkét módszer eltávolítja a celluláris háttér fluoreszcenciát. Átlag autofluoreszcencia korrekció esetén azonban az átlagok nagyobb tartományban szóródnak a 0 érték körül, hiszen a térben ingadozó értékeket egy átlagos konstanssal korrigáljuk. Ezt alátámasztandó meghatároztuk a pixelenkénti és az átlagos autofluoreszcencia korrekcióval kapott képek szórásainak arányát, melynek alapján A172 esetében a pixelenkénti korrekció 50-60% -kal csökkenti a szórást, míg SK-BR-3 sejtek esetében ez az érték 20-40%. Ezek alapján kijelenthető, hogy a pixelenkénti korrekció az elvártan megfelelően nullára csökkenti az átlag autofluoreszcencia intenzitást, és nagymértékben csökkenti a sejtenkénti és a pixelenkénti szórást. Természetesen a detektálás Poisson zaja továbbra is terheli az egyes pixelekben mért értékeket, így teljesen egyenletes korrigált intenzitást nem várhatunk. Ezzel együtt várhatóan a származtatott paraméterek, mint pl. a FRET hatásfok meghatározása pontosabbá válik pixelenkénti korrekcióval.

### **FRET mérések biológiailag releváns molekulapárok között**

A továbbiakban A172 sejteken mértük a FRET hatásfokokat EGFR és ITGA5 valamint ITGB1 között. Mivel ezek az integrinek 5-szörös és 8-szoros mennyiségben találhatóak az A172 sejtek felszínén az EGFR-hez viszonyítva, az epitópok közötti FRET hatékonyságot mindkét EGFR-integrin pár esetén kétféleképpen mértük: az egyik mintán az EGFR-hez volt kötve a donorral jelölt antitest, míg a másik mintán az integrinhez. Ezzel az eljárással kiküszöbölhető az akceptor/donor arány esetleges torzító hatása, amely pl. nagyszámú akceptorral való véletlenszerű együttállás miatt növelheti a FRET E értékét. A kiértékelést elvégeztük autofluoreszcencia korrekció nélkül, valamint átlag és pixelenkénti korrekcióval is. Ezeken a mintákon a FRET hatásfokok jól követték az akceptor/donor arányokat, vagyis azokban az esetekben, ahol az EGFR mint akceptor volt jelen, alacsonyabb FRET hatásfokokat mértünk, mint mikor donorként. A korrekció nélkül és a pixelenkénti korrekcióval kapott

értékek viszonya az egyes esetek között koherens, viszont az átlag korrekcióval kapott FRET hatások az ITGA5→EGFR és ITGB1→EGFR mintákban lényegesen alacsonyabb a másik két módszerhez képest, előbbi esetben kevesebb mint -0,1. Ez azt mutatja, hogy az átlagos autofluoreszcencia korrekció erős negatív műtermékeket képes kialakítani, különösen alacsony FRET hatásfokú minták esetében.

Amikor az ITGB1 volt az akceptor, az átlagos autofluoreszcencia korrekció nagyon magas FRET hatásfokot eredményezett, és 0-t, amikor a donor volt az ITGB1. Ugyanezek a minták a pixelenkénti korrekció mindkét mérési irányban nullától magasabb FRET hatásfokot eredményezett, amelyek aránya a donor és akceptor festékek arányát is jól követte. Ez megerősíti, hogy az átlagos autofluoreszcencia korrekciós eljárás rosszabbul működik, mint a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció. Megfigyelhető még, hogy az összes biológiailag releváns mintán a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció a másik két korrekciós módszerrel mért eredmények között helyezkedik el. Az, hogy az átlagos autofluoreszcencia korrigált és a korrigálatlan FRET E a legmagasabb vagy a legalacsonyabb értéket vette fel, összefüggést mutatott az adott minta szignál/autofluoreszcencia arányával. Azokban az esetekben, amikor a szignál/autofluoreszcencia arány a donor csatornában volt magasabb, a korrekció nélküli FRET értékek voltak magasak, míg azokon a mintákon, ahol a szignál/autofluoreszcencia az akceptor csatornában volt magas, az átlagos autofluoreszcencia korrekció adott magas FRET hatásfokokat.

### **FRET mérések pozitív kontrollokon**

A donorral konjugált primer antitestekhez akceptorral jelölt szekunder antitesteket kötve alacsony és magas expressziójú epitópok esetén olyan pozitív kontrollokat nyertünk, ahol minden mintán azonos volt az akceptor/donor arány, így a FRET hatásokban potenciálisan mért különbségek nem fakadhattak a festékek közötti arányok változásából. Az átlagos autofluoreszcencia korrigált FRET hatások követték a szignál/autofluoreszcencia arányokban tapasztalható trendet, ami az átlagos korrekció tendenciózus torzító hatására utal. Ilyen összefüggést a korrekció nélkül és a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval kapott FRET hatások

esetében nem találtunk. Ugyanakkor a pixelenkénti korrekcióval a FRET hatásfokok nagyon hasonlóak voltak két egér monoklonális antitest esetében (anti-EGFR és anti-ITGB1), de ezektől különbözött a patkány monoklonális anti-ITGA5 esetében mért FRET hatásfok. Feltételezve, hogy a donorral jelölt elsődleges és az akceptorral jelölt másodlagos antitestek komplexei hasonlóbbak, ha a másodlagos antitestek azonos keverékét használjuk, a patkány- és egérellenes antitestet tartalmazó FRET-komplexek közötti különbség elfogadható. Ugyanakkor az alacsony és magas szignál esetén hasonló, egér-anti egér immunkomplexben azonos autofluoreszcencia mellett mért közel azonos FRET E értékek egyértelműen jelzik, hogy a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció jobb, mint az átlag korrekció, vagy mintha nem használnánk semmilyen korrekciót.

A további elemzésként az EGFR és ITGB1 alapú pozitív kontroll minták képpontjait összesítettük, majd autofluoreszcencia intenzitás szerint három csoportba osztottuk őket. Az autofluoreszcencia korrekció nélkül számolt FRET értékek fordítottan arányosak az autofluoreszcenciával, alacsony autofluoreszcencia mellett a FRET hatásfok átfed a pixelenként korrigált FRET hatásfokkal, de ahogy nő az autofluoreszcencia, egyre alulkorrigáltabbá válik a mérés. Átlag autofluoreszcencia korrekcióval a globális átlag távol van egymástól az EGFR és az ITGB1 esetében. Ebben az esetben a magas autofluoreszcenciájú pixelek FRET hatásfoka fed át a pixelenkénti korrekcióval mért FRET hatásfokokkal, és az alacsony autofluoreszcenciájú pixelek túlkorrigáltak. A pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval mért FRET hatásfok független volt az autofluoreszcencia nagyságától.

A bemutatott eredményekből arra következtettünk, hogy a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció növeli a FRET számítás pontosságát és megszünteti a torzítást, amelyet a korrekció hiánya, ill. az átlagos korrekció alacsony, ill. magas jel / autofluoreszcencia arány mellett okoz.

## *FRET mérés a Panoramic Confocal automata patológiai szkennel*

Arra alapozva, hogy a Panoramic Confocal automata patológiai szkennert optikai tulajdonságai alkalmassá teszik kvantitatív mérések végzésére, implementáltuk a készülékre a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciós FRET mérési eljárást.

Az N87 eredetű egérben növesztett tumorból készített fagyasztva metszett mintákon a HER2 onkoproteint két, egymás közelében található epitópot jelölő, donorral, ill. akceptorral konjugált monoklonális antitesttel jelöltük. Ezután a mintát a szkennelrel és LSM 880 konfokális mikroszkóppal is lemértük, és pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval létrehoztuk a FRET hatásfok térképeket. A két műszerrel mért FRET mediánja közel megegyező volt, a Panoramic Confocallal hasonló mérési sebesség mellett keskenyebb FRET eloszlást mértünk.

A fedőlemezre növesztett SK-BR-3 sejt monolayeren ugyanilyen jelölést követően mért FRET hatásfokok is közel azonosnak adódtak, mint a fagyasztva metszett mintákon. Ebben az esetben sem találtunk szignifikáns különbséget a két mikroszkóppal mért FRET hatásfokok között. Ebből arra következtettünk, hogy a Panoramic Confocal alkalmas pontos FRET mérésre, mind adherens sejt kultúrák, mind fagyasztva metszett szövetek esetében. Erre alapozva az általunk kidolgozott mérési és képfeldolgozási algoritmus beépítésre került a készülék vezérlő szoftverébe.

## Megbeszélés

A Panoramic Confocal egy automata konfokális patológiai szkener, amely potenciálisan alkalmas lehet molekuláris interakciók gyors és automatizált vizsgálatára. Ennek eldöntésére megvizsgáltuk a Panoramic Confocal főbb képalkotási paramétereit. Azokban az esetekben, ahol ez releváns volt, a Panoramic Confocalt egy LSM 880 lézer pásztázó konfokális mikroszkóppal hasonlítottuk össze.

A Panoramic Confocal motorizált mintakezeléssel rendelkezik. Ennek vizsgáltuk az időbeni stabilitását valamint a relokalizációs pontosságát. A mikroszkóp időben stabilnak tekinthető, kétórás időtávon a minta elmozdulása kevesebb volt, mint egy pixel; a relokalizációs pontatlanság 10 ismétlést követően egyszer sem érte el az egy pixelnyi távolságot. Mivel a tárgyszal pontatlanságai szubpixeles nagyságúak, ez a gyakorlatban nem befolyásolja a Panoramic Confocallal végzett mérések minőségét.

Kvantitatív mérések végzéséhez, valamint a digitális tárgylemez létrehozásakor történő képösszefűzés jó működéséhez homogén intenzitás eloszlású megvilágító fény szükséges. A Panoramic Confocal megvilágítási fényerősség eloszlását vizsgálva azt találtuk, hogy a mikroszkóp minden csatornájában eltért a megvilágítás középpontja a rögzített kép középpontjától, ennek oka az Aurox cc88 konfokális egység speciális optikai rendszere. A megvilágítás minden csatornában inhomogén volt enyhe hullámhossz függés mellett, emiatt elengedhetetlen a megfelelő korrekciós eljárás használata, különösen kvantitatív mérések végzéséhez. A mikroszkópban a tapasztalatunkra épülő fejlesztés eredményeként jelenleg már egy olyan szoftveres korrekciós eljárás áll rendelkezésre, amely egy homogén fluoreszcens mintáról minden optikai úthoz külön felvett képpel végzi az intenzitáskorrekciót, még a konfokális kép kiszámítása előtt. Ez a módszer alkalmas kisméretű felvételek megfelelő korrekciójára, valamint kvantitatív mérések esetén is pontosabb eredményeket ad, mint a klasszikus, teljes minta felvételét követő statisztikus alapú korrekció.

Minden mikroszkóp kritikus tulajdonsága, hogy az adott képpontból érkező fotonok számával milyen arányban áll a mért intenzitás. Ideális esetben egy mikroszkóp intenzitásválasza lineáris. A lineáris intenzitásválasz különösen fontos, amikor két spektrálisan eltérő fluoreszcens csatornában mért intenzitások arányát hasonlítjuk össze. Ilyenek például a FRET mérések is. Mivel a mikroszkóp intenzitásválasza minden képalkotási módban lineáris, így feltételezhetjük, hogy a mikroszkóp alkalmas kvantitatív mérésekre. A linearitás mérés elvégzése után megvizsgáltuk a mikroszkóp szenzitivitását. A megfelelő szenzitivitás kiemelkedő fontosságú a szokványos expressziót mutató biológiai mintákon végzett kvantitatív mérésekhez. A Panoramic Confocal esetében ~2000 epitóp/sejt már megbízhatóan kvantitálható.

A Panoramic Confocal képalkotását vizsgálva azt találtuk, hogy a mikroszkóp még olyan kihívásokkal teli minták esetében is, mint egy tárgylemezre rögzített negyed kontaktlencse, látható illesztési hibák nélkül képes a digitális tárgylemez létrehozására, annak ellenére, hogy ez a minta komplex 3D-s struktúrával és nagy területtel rendelkezik. Ezen a mintán összehasonlítva a Panoramic Confocal és a kontroll LSM 880 mikroszkóp kontrasztarányát azt találtuk, hogy a Panoramic Confocal két csatornában jobb a másik két vizsgált csatornában pedig megegyező kontrasztarányú képeket rögzített. Kiemelendő továbbá, hogy ezt tized annyi voxel idő alatt volt képes elérni, mint a kontroll mikroszkóp. A mikroszkóp gyors képalkotása rendkívül előnyös lehet nagyméretű minták esetében, de szükség esetén hosszabb expozícióra és jobb jel/zaj arány elérésére is használható.

Ezen felül a konfokális képminőség dekonvolúcióval tovább javítható, felhasználva a pontkiterjedési függvény térbeli homogenitását, és azt, hogy bár elméleti PSF nem modellezhető, megfelelő kalibrációs mintával empirikus rendszer-PSF függvények generálhatók minden optikai csatornához.

Összegezve az eddigieket, a Panoramic Confocal képalkotása - a megvilágítás inhomogenitásának megfelelő korrekciója mellett - alkalmas kvantitatív mérések

elvégzésére, ezen belül pedig spektrális átvilágításra korrigált FRET mérések kivitelezésére.

Az általunk választott spektrálisan korrigált (három-szűrős) FRET egy költséghatékony és sokoldalú mérési eljárás molekuláris interakciók mérésére, mely az áramlási citometria mellett a fluoreszcencia mikroszkópia különböző módozataiban, akár időfüggésben és 3D képalkotásban is alkalmazható. Azonban az ilyen mérések eredményeit befolyásolhatja a minta autofluoreszcenciája. A szövetekre gyakran jellemző a magas és térben változatos autofluoreszcencia, ezért mielőtt implementáltuk volna a spektrálisan korrigált FRET mérést a Panoramic Confocalra, egy másik mikroszkópon teszteltük a lehetséges megoldásokat az autofluoreszcencia zavaró hatásának kiküszöbölésére.

Az átlagos autofluoreszcencia korrekció egy egyszerű megközelítés, ami szinte minden intenzitás alapú FRET mérés esetén könnyen használható, azonban, mivel a térben heterogén eloszlású jelet egy konstanssal korrigálja, hibalehetőséget hordoz magában. Emiatt átalakítottunk és implementáltunk egy korábban áramlási citometriában használt eljárást, amely a mikroszopos mérés során pixelenként képes korrigálni az autofluoreszcencia torzító hatását. A mérési protokollhoz csatlakozó új kiértékelési algoritmust a korábban fejlesztett Fiji (ImageJ) RiFRET pluginünkben is megvalósítottuk, ill. nagy méréshalmazok teljesen automatikus értékelésének a lehetőségével is kiegészítettük.

A korrekciós módokat először jelöletlen sejteken teszteltük. Ilyen mintákon a tökéletes autofluoreszcencia korrekció elméletileg zérus átlagos intenzitású, alacsony szórású képeket eredményez. Az átlagos autofluoreszcencia korrekció mellett a korrigált képek átlag intenzitása közel került a 0 intenzitáshoz, a szórása viszont megegyezett a korrigálatlan képek szórásával. Ezzel szemben a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciós eljárással nemcsak az intenzitások átlaga esett közel a nulla értékhez, de jelentősen csökkent a pixelértékek szórása is.

A két módszer összehasonlítására FRET méréseket végeztünk biológiailag releváns mintákon, valamint a hozzájuk tartozó magas FRET hatásfokú kontrollokon. Az ITGA5 →EGFR minta esetében az átlag autofluoreszcencia korrekció erős negatív műterméket eredményezett. Mivel itt magas az autofluoreszcencia, alacsony az akceptor jel, és a FRET hatékonyság is, ez további bizonyítéka annak, hogy az átlag autofluoreszcencia korrekciós eljárás alacsony szignál/autofluoreszcencia arányú minták esetében kerülendő, helyette a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciós eljárás használata ajánlott. Ezzel szemben az egyenletes, alacsony autofluoreszcenciájú, magas jelölési intenzitású minták esetében az átlagos autofluoreszcencia korrekció is várhatóan helyes eredményre vezet.

A korrekciós eljárások közötti különbségek alaposabb feltárása érdekében az EGFR alapú pozitív kontroll mintán alacsony és magas autofluoreszcenciájú területeket jelöltünk ki, majd meghatároztuk az átlagos, és a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval, illetve korrekció nélkül a FRET hatásfokokat. Az így kapott FRET hatásfokok eloszlását megvizsgáltuk a teljes képen, valamint az alacsony és magas autofluoreszcenciájú területeken is. A pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval mindhárom esetben hasonló normális eloszlást követő FRET hisztogramot kaptunk. Az autofluoreszcencia korrekció nélkül a magas autofluoreszcenciájú terület eloszlása torzult a korrekció hiánya miatt, míg az átlagos autofluoreszcencia korrekciós eljárással hasonló torzulást az alacsony autofluoreszcenciájú területen tapasztaltunk, túlkorrekció miatt.

Ezen torzulások hátterének felderítésére az EGFR és az ITGB1 alapú pozitív kontroll minták összes pixelét összesítettük, és autofluoreszcencia szerint alacsony, közepes és magas csoportokra osztottuk őket. Ennek eredményeit megvizsgálva azt találtuk, hogy korrekció nélkül és átlagos autofluoreszcencia korrekció mellett a FRET hatásfok nem független, viszont a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval független az autofluoreszcencia nagyságától.

A bemutatott eredményekből arra következtettünk, hogy a pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció növeli a FRET számítás pontosságát és megszünteti a torzítást, amelyet az alacsony jel/ autofluoreszcencia arányú mintákon figyeltünk meg.

A Panoramic Confocalra implementált pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciós eljárást trastuzumab/pertuzumab intramolekuláris FRET mintákon teszteltük, úgy, hogy ezt a jelölést üveg felületen növesztett SK-BR-3 sejtvonalon, és N87 eredetű egérben növesztett tumorból készített fagyasztva metszett mintákon is elvégeztük. Kontrollként Zeiss LSM 880 lézerpászttázó mikroszkópot használtunk. A két mikroszkóppal mért FRET hatások között nem találtunk különbséget, ebből arra következtettünk, hogy a Panoramic Confocal alkalmas pontos FRET mérésre mind sejt kultúrák, mind szövettani metszetek esetében. Emellett a Panoramic Confocal alacsonyabb expozíciós idő mellett képes hasonló vagy jobb kontrasztarányú képek felvételére, mint a kontroll LSM 880, valamint alkalmas teljes tárgylemezek szkennelésére. Összességében a Panoramic Confocalra implementált pixelenkénti autofluoreszcencia korrekciós FRET mérési módszer megeremti a technikai alapját annak, hogy a molekuláris interakciók vizsgálata a kutatólaborok után a patodiagnosztika területén is megjelenhessen. A biztató eredmények alapján jelenleg a klinikai minták gyűjtése zajlik az EGFR-integrin interakciók további vizsgálatához.

Emellett az utóbbi időben több olyan vizsgálatot végeztek, melyek további, potenciálisan diagnosztikailag releváns molekulapárra hívták fel a figyelmet. Pl. a HER2-HER3 heteroasszociáció mértéke magas prediktív értékkel bír az emlőtumorok metasztázis képző képességére és kiújulására, és felvetették ugyanezen interakció fontosságát kolorektális karcinómák esetében is, továbbá a HER2-HER2 homoasszociáció is jó prognosztikai markernek bizonyult a korai emlődaganatokban. A PD-1 és PD-L1 interakciójáról kimutatták melanómában, hogy a mértéke független a PD-L1 mennyiségétől, és a magas interakció rontja a beteg túlélési esélyeit, viszont nem kissejtes tüdőrák és melanóma esetén a növeli a PD-1 és a PD-L1 inhibitorok terápiás hatékonyságát is.

Mіндеzen prediktív interakciók a továbbfejlesztett Panoramic Confocal segítségével teljes metszeteken, ill. metszet microarray-eken potenciálisan nagy hatékonysággal vizsgálhatók.

## Összefoglalás

A digitális patológia gyors fejlődése lehetővé teszi szöveti szintű morfológiai felvételek készítését. Immunhisztokémiai jelölések alkalmazásával ezek a morfológiai jegyek egy vagy két molekula expressziós szintjével korrelálthatóak. Napjainkban a fluoreszcenciás patológiai szkennerek megjelenése és elterjedése zajlik, melyek lehetővé teszik több molekula azonos mintában történő, multiplex jelölésen alapuló vizsgálatát. A Panoramic Confocal az első digitális patológiai szkennert, amely a hagyományos transzmissziós és fluoreszcenciás képalkotáson túl konfokalitást is biztosít. A szkennert a konfokális képalkotás, stabilitás, pontosság, linearitás és érzékenység szempontjából vizsgáltuk. A konfokális kép pontkiterjedési függvényét aszimmetrikusnak, de térben invariánsnak mértük; ennek alapján dekonvolúciós algoritmust implementáltunk a műszerhez. Az X-Y dimenzióban mért stabilitás és relokalizációs pontatlanság jóval a felbontási határ alatt volt. Az intenzitásválasz lineáris volt ( $R^2 \geq 0,9996$ ). A kalibrált mérések azt mutatták, hogy indirekt jelölés alkalmazásával sejtenként  $\geq 2000$  molekula jól detektálható és leképezhető. A megvilágítást vizsgálva azt találtuk, hogy a mikroszkóp megvilágítása aszimmetrikus és inhomogén. Ennek kiküszöbölésére bevezettünk egy korrekciós módszert, amely alkalmas kisebb területről és térben változatos mintákról készült felvételek megfelelő korrekciójára is, valamint megbízható kvantitatív eredményeket ad. Ennek alkalmazásával, ill. a mérési pontosság ismeretében a Panoramic Confocal alkalmas lehet szövettani metszeteken molekuláris interakciók mérésére.

A Förster rezonancia energiáttranszfer (FRET) népszerű eszköz a molekuláris kölcsönhatások tanulmányozására, mivel a 1-10 nm-es tartományban igen érzékeny a távolságra. Az intenzitás alapú, spektrálisan korrigált FRET mérési módszer előnye, hogy háromdimenziós, valamint időfüggő mérésekre is alkalmas. Annak érdekében, hogy használható legyen magas autofluoreszcenciájú metszetek mikroszkópos mérése során pixelenkénti autofluoreszcencia korrekcióval, az áramlási citometriában használt sejtenkénti korrekciós algoritmust adaptáltuk. A kidolgozott pixelenkénti autofluoreszcencia korrekció javítja a mérések pontosságát és különösen alacsony szignál/autofluoreszcencia értékek, valamint térben változatos autofluoreszcenciájú

minták esetében ajánlható. Az analízis elvégzésére írt Fiji/ImageJ plugin szabadon elérhető.

A mérési eljárást a Panoramic Confocal készülékkel is teszteltük, ahol a sejteken és fagyasztva metszett szöveten mért FRET hatásfokok a kontrollként használt LSM 880 lézerpásztázó mikroszkóppal mértékekkel egyezést mutattak. Ez alapján a pixelenkénti autofluoreszcencia korrigált FRET mérés implementálásra került a Panoramic Confocal digitális patológiai szkener szoftverében, megteremtve a diagnosztikai célú FRET mérések metodológiai és instrumentális alapját.



Nyilvántartási szám: DEENK/312/2023.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Rebenku István

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Rebenku, I.**, Lloyd, C. B., Szöllősi, J., Vereb, G.: Pixel-by-pixel autofluorescence corrected FRET in fluorescence microscopy improves accuracy for samples with spatially varied autofluorescence to signal ratio.  
*Sci. Rep.* 13 (1), 1-15, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-30098-w>  
IF: 4.996 (2021)
2. **Rebenku, I.**, Bartha, F., Katona, T., Zsebik, B., Antalffy, G., Takács, L., Molnár, B., Vereb, G.: Taking molecular pathology to the next level: whole slide multicolor confocal imaging with the Panoramic Confocal digital pathology scanner.  
*Cytom. Part A.* 103 (3), 198-207, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.24675>  
IF: 4.714 (2021)

### További közlemények

3. Bankó, C., Nagy, Z. L., Nagy, M., Szemán-Nagy, G., **Rebenku, I.**, Imre, L., Tiba, A., Hajdu, A., Szöllősi, J., Kéki, S., Bacsó, Z.: Isocyanide Substitution in Acridine Orange Shifts DNA Damage-Mediated Phototoxicity to Permeabilization of the Lysosomal Membrane in Cancer Cells.  
*Cancers (Basel).* 13 (22), 1-24, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13225652>  
IF: 6.575
4. Csomós, I., Nagy, P., Filep, C. B., **Rebenku, I.**, Nizsalóczki, E., Kovács, T., Vámosi, G., Máttyus, L., Dóczy-Bodnár, A.: Opposing Effects of Chelidonine on Tyrosine and Serine Phosphorylation of STAT3 in Human Uveal Melanoma Cells.  
*Int. J. Mol. Sci.* 22 (23), 1-14, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222312974>  
IF: 6.208





5. Nemes, D., Kovács, R. L., Nagy, F., Tóth, Z., Herczegh, P., Borbás, A., Kelemen, V., Pfliegler, V. P., **Rebenku, I.**, Hajdu, P., Fehér, P., Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F., Váradi, J., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: Comparative biocompatibility and antimicrobial studies of sorbic acid derivatives. *Eur. J. Pharm. Sci.* 143, 1-9, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105162>  
IF: 4.384
6. Hajdu, T., Váradi, T., **Rebenku, I.**, Kovács, T., Szöllősi, J., Nagy, P.: Comprehensive Model for Epidermal Growth Factor Receptor Ligand Binding Involving Conformational States of the Extracellular and the Kinase Domains. *Front. Cell. Dev. Biol.* 8, 1-53, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2020.00776>  
IF: 6.684
7. Nagy, F., Tóth, Z., Bozó, A., Czeglédi, A., **Rebenku, I.**, Majoros, L., Kovács, R. L.: Fluconazole is not inferior than caspofungin, micafungin or amphotericin B in the presence of 50% human serum against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Med. Mycol.* 57 (5), 573-581, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myy108>  
IF: 2.822

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 36,383**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):  
9,71**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.06.29.

