

**ADATÉRTÉKELŐ ELJÁRÁSOK SEJTFELSZÍNI  
FEHÉRJEMINTÁZATOK ANALÍZISÉRE**

**SZENTESI GERGELY**



Témavezetők:  
Dr. Mátyus László  
Dr. Jenei Attila

**DEBRECENI EGYETEM**  
ORVOS ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM  
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR  
BIOFIZIKAI ÉS SEJTBOLÓGIAI INTÉZET

**DEBRECEN, 2005**

## **Köszönetnyilvánítás**

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőimnek Dr. Jenei Attilának és Dr. Mátyus Lászlónak hathatós segítségüket dolgozatom elkészítéséhez. Köszönöm Dr. Damjanovich Sándornak és Gáspár Rezső Professzoroknak a lehetőséget, hogy értekezésemet a DEOEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetben készíthettem el, valamint intézetünk minden dolgozójának segítségét és baráti szeretetét, melyet munkám során megtapasztalhattam. Köszönöm családom megértő türelmét és odaadó segítségét.



## TARTALOMJEGYZÉK

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Bevezetés.....</b>  | <b>7</b>  |
| 1.1 Alkalmazott kutatási metodikák .....  | 9         |
| 1.2 A szoftverek és a biológiai kutatásban alkalmazott módszerek kapcsolata.....                | 11        |
| <b>2. Irodalmi áttekintés .....</b>   | <b>13</b> |
| 2.1 Fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer .....  | 13        |
| 2.2 Az intenzitásváltozáson alapuló rezonancia energiatranszfer .....                           | 14        |
| 2.2.1 FCET értékek meghatározása.....   | 14        |
| 2.2.2 Autofluoreszcencia korrekció.....   | 16        |
| 2.3 A fotonalványodáson alapuló energiatranszfer.....   | 20        |
| 2.3.1 A fotonalványodási időállandó pixelenkénti meghatározása .....                            | 24        |
| 2.4 Immuno-golddal jelölt sejtfelszíni antigének térbeli eloszlás analízise.....                | 27        |
| 2.4.1 Pontmintázatok analízise .....  | 27        |
| 2.4.2 Immuno-gold jelölt antigének térbeli eloszlás analízise elsőrendű paraméter alapján.....  | 29        |
| 2.4.3 Immuno-gold jelölt antigének térbeli eloszlás analízise másodrendű paraméter alapján..... | 30        |
| <b>3. Célkitűzések .....</b>  | <b>32</b> |
| <b>4. Anyagok és módszerek .....</b>  | <b>33</b> |
| 4.1 A FCET és AFCET kísérlet során használt sejtek, antitestek és festékek .....                | 33        |
| 4.2 A pbFRET kísérlet során használt sejtek, antitestek és festékek.....                        | 33        |
| 4.3 Az Immuno-gold kísérlet során használt sejtek és antitestek .....                           | 34        |
| 4.4 A mérések során használt mérőberendezések.....  | 34        |
| 4.5 Fejlesztőkörnyezetek .....  | 35        |
| <b>5. Eredmények és megbeszélés .....</b>   | <b>36</b> |
| 5.1 Az áramlási citometriás kiértékelő program (ReFlex).....                                    | 36        |
| 5.1.1 A ReFlex program felépítése.....  | 36        |
| 5.1.2 Grafikonok .....  | 39        |
| 5.1.3 Kapuzás.....  | 40        |
| 5.1.4 Egyenletszerkesztő felület és modul .....   | 44        |
| 5.1.5 Húz és dob technika (Drag and Drop).....  | 46        |
| 5.1.6 A ReFlex program fájlljai .....   | 48        |
| 5.1.7 Quenching, FCET, AFCET összehasonlítása .....   | 51        |
| 5.2 Fotonalványodás analízis program (pbFRET).....  | 54        |
| 5.2.1 Felhasználói felület.....   | 54        |
| 5.2.2 Illesztő algoritmus.....  | 56        |
| 5.2.3 MHC I és MHC II molekulák aleggységeinek proximitás viszonyainak vizsgálata .....         | 58        |
| 5.3 Az elektronmikroszkópos képfeldolgozó program (ClickOnGold).....                            | 61        |
| 5.3.1 Felhasználói felület.....   | 61        |
| 5.3.2 Képfeldolgozás, ProcessImage metódus.....   | 63        |
| 5.3.3 Foltkeresés algoritmus.....   | 65        |
| 5.3.4 Cellák aranygömb szám eloszlásának meghatározása.....                                     | 66        |
| 5.3.5 Kv1.3 ioncsatornák sejtfelszíni eloszlásának vizsgálata.....                              | 68        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>6. Összefoglalás</b> .....   | <b>70</b>  |
| <b>7. Kiegészítések</b> .....   | <b>71</b>  |
| 7.1 A: FCS fájl felépítése .....  | 71         |
| 7.1.1 FC standardok .....   | 74         |
| 7.2 B: Infix és posztfix kifejezések: a fordított lengyel jelölés .....     | 75         |
| 7.2.1 Infix kifejezés postfixé konvertálása .....                           | 75         |
| 7.2.2 Postfix kifejezés kiszámítása .....                                   | 76         |
| 7.3 C: Képfeldolgozás .....   | 78         |
| <b>8. Irodalomjegyzék</b> .....   | <b>80</b>  |
| <b>9. Közlemények</b> .....   | <b>86</b>  |
| <b>10. Melléklet</b> .....  | <b>87</b>  |
| 10.1 Objektumorientált programozás .....                                    | 87         |
| 10.2 A Reflex program osztályai .....                                       | 90         |
| 10.2.1 A ReFlex program táblái .....  | 90         |
| 10.2.2 FCS fájl olvasó és tároló osztály .....                              | 91         |
| 10.2.3 Egyenletszerkesztő modul tároló osztálya .....                       | 94         |
| 10.2.4 Egyenlettároló, kiértékelő osztály .....                             | 95         |
| 10.2.5 Grafikon komponens .....   | 96         |
| 10.2.6 A kapukat rajzoló grafikon komponens .....                           | 99         |
| 10.2.7 Kapu osztály és leszármazottai .....                                 | 100        |
| 10.2.8 Populációkat megjelenítő panel .....                                 | 101        |
| 10.3 ClickOnGold Program osztályai .....                                    | 103        |
| 10.3.1 Grafikon komponens .....   | 103        |
| 10.3.2 Képmegjelenítő osztály .....   | 104        |
| 10.4 CD melléklet tartalma .....  | 106        |
| <b>11. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai</b> ..... | <b>107</b> |

## FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

|        |   |
|--------|---|
| AFCET  | Autofluoreszcencia korrigált áramlási citometriás energiáttranszfer                                 |
| AFM    | Atomérő mikroszkópia (Atomic Force Microscope)  |
| DRM    | Detergens rezisztens mikrodomén   |
| ErbB   | Epidermális növekedési faktor receptor  |
| FCET   | Áramlási citometriás energiáttranszfer (Flow Cytometric Energy Transfer)                            |
| FRAP   | Fotóhalványodást követő fluoreszcencia visszatérés (fluorescence recovery after photobleaching)     |
| FRET   | Fluoreszcencia rezonancia energiáttranszfer (Fluorescence Resonance Energy Transfer)                |
| MHC    | Fő hisztokompatibilitási komplex (Major Histocompatibility Complex)                                 |
| pbFRET | Fotóhalványodáson alapuló energiáttranszfer (photobleaching Fluorescence Resonance Energy Transfer) |
| SNOM   | Pásztázó közelimező optikai mikroszkópia (Scanning Nearfield Optical Microscope)                    |
| SPT    | Single Particle Tracking  |
| subVI  | Beágyazott Virtual Instrument   |
| PBS    | Phosphate buffered saline, foszfátpuffer  |
| PCF    | Pair correlation function, párkorrelációs függvény  |
| UML    | Unified modeling language, egységes modellezőnyelv  |
| XML    | Extensible markup language, kiterjeszhető jelölőnyelv   |
| FCS    | Flow cytometric standard, áramlási citometriás standard fájltypus                                   |
| OOP    | Object oriented programming, objektumorientált programozás  |
| VI     | Virtual Instrument  |



## 1. Bevezetés

Az eukarióta sejtek membránja képezi a határvonalat a környezet és a sejt belseje között. Ez választja el a külvilágtól, valamint feladata még a sejt és környezete közötti információ és anyagáramlás (jelátviteli folyamatok, anyagtranszport) biztosítása. Ennek a határvonalnak a megismerése mind felépítésében, mind működésében nélkülözhetetlen számos biológiai folyamat megértéséhez.

A napjainkban elfogadott membránmodellek alapját az 1971-ben Singer és Nicolson által felállított folyékony-mozaik modell képezi (Singer és Nicolson, 1971), mely Frye és Edidin klasszikus kísérletére épül, miszerint a Fő Hisztokompatibilitási Komplex (MHC) fehérjék mobilisnak mutatkoztak egér és humán limfociták fúziója során keletkező heterokarionok membránjában. Ez a következtetés szolgált a folyékony mozaik membránmodell alapjául, amely hangsúlyozta a fehérjék véletlenszerű eloszlását és szabad diffúzióját. A biológiai membránok alapépítőkövei a lipidek, melyek amfipatikus molekulák, és spontán rendeződnek micellákba, míg nagyobb koncentrációk esetén kettős réteget képeznek. A modell szerint ebben a lipid kettősréteg „tengerben” (folyadék) „úsznak” a félig vagy teljesen beágyazott (transzmembrán) fehérjék (mozaik), melyek feladata a környezet és a sejt közötti információ és anyagáramlás biztosítása. A biológiai membránokat a lipidek, valamint a lipidek és fehérjék között ható hidrofóbikus erők tartják össze. A membránok nem statikus, sokkal inkább dinamikus képződmények, melyekben a lipidek és fehérjék különböző laterális és rotációs mozgásokat (diffúzió) végeznek.

Az újabb kísérletes bizonyítékok azt sugallták, hogy a fehérjék bizonyos membrán régiókban korlátozott mobilitással rendelkezhetnek (Edidin, 1997). Ugyanebbe az irányba mutattak többek között fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) kísérletek eredményei is, azaz arra, hogy a fehérjék eloszlása nem véletlenszerű a sejtmembránban (Damjanovich és *mtsai*, 1997b; Matkó és *mtsai*, 2002). A FRET egy spektroszkópiai molekuláris távolságmérő módszer. Számos fontos sejtfelszíni fehérje, mint pl. az MHC-I és MHC-II (Matkó és *mtsai*, 1994; Szöllősi és *mtsai*, 1996), valamint az interleukin-2 receptor alegységei (IL-2R) (Damjanovich és *mtsai*, 1997a) homo- és heteroasszociációkban vesznek részt. A FRET kísérletek tanúsága szerint ezek a fehérjék 1-10 nm távolságra vannak egymástól (Damjanovich és *mtsai*, 1997b). Ezen asszociációk mellett a fehérjék szerveződésének egy magasabb, második szerveződési szintje is kimutatható single particle tracking (SPT) (Edidin, 1997), elektronmikroszkópos, atomerő

mikroszkópos (Damjanovich és *mtsai*, 1995) és pásztázó közeli mező optikai mikroszkópos technikákkal (scanning near-field optical microscopy, SNOM) (Hwang és *mtsai*, 1998; Nagy és *mtsai*, 1999b). Ezek az ún. mikrokolóniák néhány száz nm átmérőjűek és 10-1000 fehérje molekulát tartalmazhatnak.

Az 1990-es évek elejére bebizonyosodott, hogy a biológiai membránok nem homogén rendszerek, bizonyos komponensek nem diffundálhatnak szabadon a membránban, azaz mozgásuk gátolt. A gátolt mozgásnak számos oka lehet. Egyes fehérjék mozgását a sejtmembrán belső oldala felől elhelyezkedő citoszkeleton akadályozza, mert a fehérjék intracelluláris vége túllóg azon, mintegy kihorgonyozva a fehérjét (Kusumi és Sako, 1996). Bizonyos fehérjék más fehérjékkel együtt fordulnak elő a membránban, köztük erős másodrendű összetartó erők hatnak, és igen gyakran ezeket a fehérjekomplexeket beágyazó lipid miliő is eltér a membrán más területeinek összetételétől. Ezek a fehérje „társulások” gyakran nem ionos detergensben is oldhatatlanok (detergens rezisztens membrán, DRM), és mintegy tutajokat képezve (lipid raft) „úsznak” a lipid tengerben (Edidin, 1997; Jacobson és Dietrich, 1999; Simons és Ikonen, 1997). Továbbá egyes membránrégiókat belülről fehérjeburok vesz körül (klatrin burok), mely mintegy csapdába ejti a benne elhelyezkedő membránkomponenseket (coated pit) (Xavier és *mtsai*, 1998; Smart és *mtsai*, 1995). Ezek a membránszigetek mind kémiai összetételükben, mind fizikai tulajdonságaikban eltérnek a sejtmembrán átlagos összetételétől, és kulcsfontosságú szerepet töltenek be a sejt és környezete közötti kommunikációban, anyag és jelátvitelben. A tapasztalatok ismeretében megalkotott új biológiai membránmodell szerint a folyékony lipid tengerben mozaikszerűen elhelyezkedő fehérjék mellett található merevebb, rendezettebb régiók (lipid tutajok) is, amelyek folyékony rendezett (liquid ordered) fázist alkotnak. Érdeemes megjegyezni, hogy mivel egyes elképzelések szerint egy lipid tutaj átlagos élettartama nagyon rövid, nem is teljesen helyénvaló ezt különálló doménnek vagy fázisnak nevezni, hanem egy olyan mikrodoménnek, ami dinamikus egyensúlyban van a környező membránterületekkel.

Jelenleg a biológia vár egy új membránmodellre, hiszen a fent leírt modell nem teljes, és az új biofizikai és biokémiai tapasztalatok nincsenek teljes mértékben beleintegrálva. Az első problémát a modell dinamizmusa jelenti, ugyanis a fent vázolt modell nagyrészt statikus, mely ugyan említést tesz a membránkomponensek lehetséges mozgásairól, de nem szól az egyes komponensek különböző mozgásformáinak időskálájáról. Továbbá a modell egyáltalán nem veszi figyelembe a sejt életműködése során bekövetkező membránváltozásokat. Ugyanis vannak olyan sejtek (Thilo, 1985),

melyek minden félórán lecserélik a teljes plazmamembránjukat endo- és exocitózissal. A folyamat során a membrán összetétele és a membránfehérjék sejtfelszíni mintázata is folyamatosan változik.

A jelenlegi modellek ugyancsak nem szólnak a membrán komponensek szerveződési szintjeiről, a közvetlen molekuláris közelséget jelentő szerveződési szintről (nanométeres távolságskála), valamint a molekuláris méreteket meghaladó magasabb hierarchikus szintről (szubmikrométeres / mikrométeres távolság-skála) (Vereb és *mtsai*, 2003). Míg a lipidek laterális heterogenitásának kialakításáért és fenntartásáért felelős tényezőkről viszonylag sok kémiai és fizikai információ áll rendelkezésünkre, addig a fehérjék kompartmentalizációjában szerepet játszó folyamatok jellege, pontos mechanizmusa a legtöbb esetben még nem ismert. Ugyanakkor ezek feltárása, megismerése alapvető információkkal szolgálhat a fehérjemintázatok funkciójának és általában a membránban lezajló folyamatok (pl. jelátvitel) részleteinek a megértéséhez. A modellből ugyancsak hiányzó elem, a kapcsolat a sejtmembrán és a citoskeleton között, mellyel számos közlemény foglalkozik (Tooley és *mtsai*, 2005), de az új eredményeket még integrálni kell a sejtmembrán modelljébe.

## 1.1 Alkalmazott kutatási metodikák

Intézetünk egyik kutatási irányvonala a membránfehérjék szerveződésének, a citoplazmamembrán heterogenitásainak vizsgálata. A sejtmembrán alkotóelemei vizsgálatának számos biokémiai és biofizikai módszere ismert. A biokémiai módszerek elsősorban a membrán összetételének minőségi és mennyiségi elemzését célozzák meg. Napjainkra azonban beigazolódott, hogy a membránban a legtöbb folyamat (anyag és információáramlás) bizonyos membránkomponensek együttes jelenlétét igényli. Számos receptor (pl.: növekedési faktor receptorok, interleukin-2 receptor, immunszinapszis stb.) több alegységből épül fel, melyek csak együttesen képesek az adott ligand megfelelő megkötésére és a jelátvitel megvalósítására.

Ennek megfelelően a membránkomponensek proximitásviszonyainak tanulmányozása nélkülözhetetlen a sejtmembránon keresztül lejátszódó folyamatok megértéséhez. Az egyik lehetséges megközelítési mód a fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (FRET) hatékonyság mérése, mely igen érzékeny molekuláris távolságmérő spektroszkópai módszer, melynek számos más technikára alapuló

adaptációja (mikroszkópos fotonalványodáson alapuló energiatranszfer, áramlási citométer, SNOM) létezik. A módszer alapját egy kvantumfizikai folyamat képezi, miszerint két kellően közel (1-10 nm) elhelyezkedő festékmolekula között energiaátadás jöhet létre, melynek hatékonysága függ a két molekula távolságától. Az energiatranszfer hatékonyságra a fluoroforokat jellemző fizikai paraméterek (fluoreszcencia intenzitás, fluoreszcencia élettartam, fotonalványodási időállandó stb.) megváltozásából következtethetünk, és azon keresztül a molekulák távolságviszonyaira.

A FRET technika egyik leghatékonyabb alkalmazási módszere az áramlási citometriás energiatranszfer (flow cytometric energy transfer, FCET). A mérés során a sejtszuspenzió speciálisan kialakított áramlási fejen halad keresztül, melynek feladata a hidrodinamikai fókuszálás megvalósítása, a sejtek sorba rendezése. A fókuszálást követően a suszpenzióban a sejtek egyesével haladnak el a gerjesztő lézertény(ek) és a detektorok előtt. Így rövid idő alatt nagy számú sejt számos fluoreszcencia és fényszórási paramétere mérhető. Az energiatranszfer hatékonyság meghatározása intenzitásváltozás mérésen alapszik (Mátyus, 1992; Szöllősi és *mtsai*, 1998; Szöllősi és *mtsai*, 2002; Stryer, 1978). Előnye, hogy rövid idő alatt nagy számú sejt vizsgálható, jó statisztikával. Azonban ebben rejlik hátránya is, hiszen a nyerhető információ felbontása sejtszintű, azaz minden sejtről egy átlagos információt kapunk.

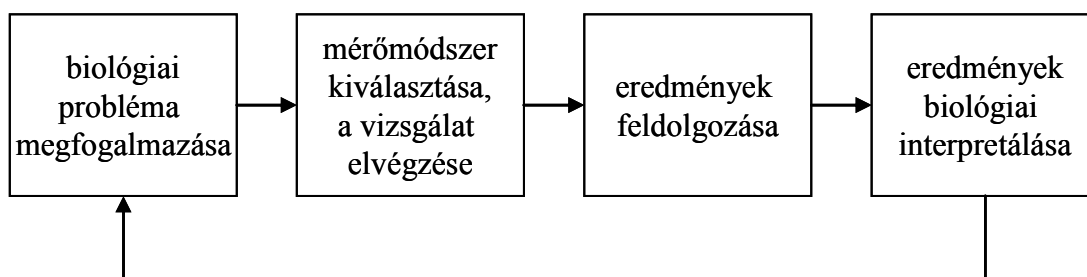
A fotonalványodáson alapuló rezonancia energia transzfer (pbFRET) a FRET technika egyik mikroszkópos adaptációja. Az energiatranszfer hatékonyság meghatározás ebben az esetben a donor fotonalványodási időállandó megváltozásának mérésén alapul. A mintát megvilágítjuk a donor gerjesztési színekének megfelelő hullámhosszúságú fényel, és közben digitális felvételeket készítünk, melyeken rögzítjük a donor fluoreszcencia intenzitás fotonalványodás miatt bekövetkező csökkenését. A képszekvenciák analízisével kapjuk meg a fotonalványodási időállandó értékeket akár képpontonként. A csak donorral, illetve donorral és akceptorral egyaránt jelölt mintákon meghatározott fotonalványodási időállandók átlagából számítjuk az energiatranszfer hatékonyság átlagos értékét. Mivel ez egy mikroszkópos technika, így a módszer felbontóképességét a mikroszkóp optikai felbontóképessége limitálja, így a sejtfelszíni heterogenitások, mikrokolóniák is tanulmányozhatók ezzel a módszerrel (Nagy és *mtsai*, 2002; Bodnár és *mtsai*, 1996; Bodnár és *mtsai*, 2003; Szabó, Jr. és *mtsai*, 1995). Érdemes megjegyezni, hogy a FRET mikroszkópos mérésével az optikai mikroszkóp kb. 200 nm-es feloldóképességénél sokkal jobb érzékenységgel (1-10 nm) lehet a fluoroforok, fehérjék

kölcsönhatását vizsgálni. Az alacsony sejtszám miatt azonban relatíve rossz a módszer statisztikája, és megvalósítása időigényes.

Az immuno-gold technika segítségével a sejtfelszíni receptorok kolloidális aranygömbbel történő jelölésével, az antigének közvetlenül detektálhatók transzmissziós elektronmikroszkóppal vagy AFM-mel (atomic force microscope, atomerő mikroszkópia). A digitalizált felvételek megfelelő matematikai módszerekkel analizálhatók, mely alapján a vizsgált receptorok eloszlásáról vonhatunk le következtetéseket, valamint a molekulák magasabb szerveződési szintjeit, az általuk létrehozott nano- és mikrokolóniák méretét tanulmányozhatjuk.

## 1.2 A szoftverek és a biológiai kutatásban alkalmazott módszerek kapcsolata

Biológiai kutatások során a problémákat részekre kell bontani, azaz meg kell fogalmaznunk egy konkrét kérdést, mely megválaszolható a rendelkezésünkre álló mérőmódszerek egyikével. A módszer kiválasztását, mintapreparálást és mérést a mérés során nyert adatok (számértékek) értelmezése követi, majd az eredményeket megpróbáljuk a jelenleg meglévő modellbe illeszteni (1.2-1. ábra). (Amennyiben ez nem sikerül ennek két oka lehet: 1. nem áll megfelelő mennyiségű és minőségű adat a rendelkezésünkre, 2. a modell változtatásra szorul.)



1.2 - 1. ábra: **Biológiai probléma megoldásának menete.**

Napjainkban mind a mérés vezérlését, mind az adatok tárolását és feldolgozását megfelelően kialakított hardver és szoftver segíti. A mérőberendezéseket gyártó cégek a mérőberendezéseket teljesen a megfelelő vezérlő, adatgyűjtő egységekkel és adatfeldolgozó és archiváló szoftverekkel együtt forgalmazzák. Egy-egy módszer kisebb módosítása során a hardver és a mérést vezérlő szoftver általában nem szorul módosításra, de az adatértékelés menete nagymértékben megváltozhat, így a szoftver átdolgozására, új

eljárásokra, függvényekre, grafikus felületre, adatmegjelenítésre (vizualizáció) lehet szükség.

A felmerülő igények kielégítését célozzák meg a tudományos adatfeldolgozó szoftverek úgynevezett makró szerkesztői, valamint a futásidejű értelmezővel (interpreter) ellátott script nyelvek. A script nyelv egy meglévő szoftver olyan szöveges parancsokból álló utasításkészlete, melynek segítségével a felhasználó írja le az adatfeldolgozás egyes lépéseit, azaz a programot szöveges formában utasítja egy konkrét feladat végrehajtására. Azonban a tapasztalat azt mutatja, hogy egyszerű script nyelv esetén, bár annak használata egyszerű, komolyabb problémák megoldását nagyban nehezítik az egyszerűsítés során a nyelvből elhagyott elemek. Teljes vagy majdnem teljes értékű script nyelv segítségével (pl.: az ImageProPlus script nyelve) már szinte minden programozási feladat megvalósítható, ám a nyelv bonyolultsága és összetettsége vetekedhet egy már “élő” programozási nyelvével, melynek ismerete és használata nem várható el az átlagos műszerfelhasználótól.

Intézetünkben illetve kollaborációs partnereinknél is megjelentek ezek a problémák, így célunk a hiányosságok pótlása a meglévő rendszerek adatértékelő szoftvereinek továbbfejlesztése az egyszerűbb és hatékonyabb adatfeldolgozás irányába.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1 Fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer

A fluoreszcencia rezonancia energiatranszfert (FRET) Theodor Förster (Förster T., 1948) írta le elsőként. Ez egy sugárzásmentes energiaátadási folyamat, amely gerjesztett állapotú fluoreszcens donor és molekuláris közelségben (1-10 nm) lévő, nem feltétlenül fluoreszcens akceptor molekulák között jöhet létre. A transzfer alapját a festék molekulák elektron rendszere között létrejövő dipólus-dipólus kölcsönhatás képezi, mely létrejöttének a feltételei: i) megfelelő térbeli orientáció a festékmolekulák között; ii) átfedés a donor emissziós és az akceptor gerjesztési spektruma között. Az energiatranszfer átmenet sebességi állandója fordítottan arányos a donor és akceptor molekulák távolságának hatodik hatványával. Energiatranszfer esetén a donor kvantumhozama lecsökken, mivel az energiatranszfer során a gerjesztett állapotú molekula relaxálódik. Ezzel szemben a gerjesztett állapotú akceptor molekulák száma és ennek következtében az akceptor molekulák fluoreszcencia intenzitása növekszik, mely jelenséget szenzitizált emisszióknak nevezünk.

A FRET jelenséget elsősorban molekuláris távolságok mérésére használjuk, mint egy “spektroszkópia vonalzót” (Stryer és *mtsai*, 1982), melyre az energiatranszfer hatékonyság távolságérzékenysége teszi alkalmassá. A FRET mérés legáltalánosabban elterjedt módja a fluoreszcencia intenzitásváltozáson alapuló energiatranszfer meghatározás, mely során az energiatranszfer hatékonyságot a donor intenzitás csökkenéséből, valamint az akceptor molekulák intenzitás növekedéséből határozzuk meg.

Számos mérőrendszerre adaptálták ezt a mérési módszert, többek között áramlás citométerre (Mátyus, 1992; Szöllösi és *mtsai*, 1998; Vereb és *mtsai*, 2004). Ennek a módszernek az előnye az, hogy rövid idő alatt nagy számú sejten végezhetünk kvantitatív fényszórás és fluoreszcencia intenzitás méréseket. Továbbá a mért paraméterekből sejtenként számíthatunk más jellemzőket (energiatranszfer, anizotrópia stb.) a nagy sejtszám miatt relatíve jó statisztikával (Szentesi és *mtsai*, 2004). Azonban hátrányt jelent, hogy a számított és mért paraméterek egy sejtről nyújtanak átlagolt információt. Ennek következtében ez a módszer nem alkalmas a sejtek mért tulajdonságainak esetleges sejtfelszíni vagy sejten belüli heterogenitásainak vizsgálatára.

A FCET méréseket adaptálták mikroszkópra is (Damjanovich és mtsai, 1995; Lidke és mtsai, 2003; Nagy és mtsai, 1998; Jares-Erijman és Jovin, 2003; Gu és mtsai, 2004). Számos biológiai rendszert lehet ezzel a módszerrel vizsgálni: immunválaszban résztvevő receptorok eloszlását és proximitás viszonyait (Damjanovich és mtsai, 1998; Dornan és mtsai, 2002; Vámosi és mtsai, 2004), tumor sejtek növekedési faktor receptorai sejtfelszíni eloszlását (Diermeier és mtsai, 2005; Nagy és mtsai, 1999a; Nagy és mtsai, 2002), lipid-mikrodomén struktúrákat (Szöllősi és mtsai, 2002; Vereb és mtsai, 2003), valamint fehérjék konformáció változását (Bagossi és mtsai, 2005; Gáspár, Jr. és mtsai, 2001). A módszer előnye az alkalmazott mérőberendezésben, a mikroszkóp feloldásában rejlik, hiszen a nagy feloldás miatt az esetleges heterogenitások, a membránfehérjék szerveződési szintjei is tanulmányozhatók.

## **2.2 Az intenzitásváltozáson alapuló rezonancia energiatranszfer**

### **2.2.1 FCET értékek meghatározása**

A FCET értékek áramlási citométerrel történő meghatározása a donor fluoroforok az energia transzfer miatt bekövetkező intenzitásváltozás mérésén alapszik. A mérés során a sejtuszpenzió speciálisan kialakított áramlási fejen keresztül halad, melynek feladata a hidrodinamikai fókuszálás megvalósítása, a sejtek sorba rendezése. A fókuszálást követően a szuszpenzióban a sejtek egyesével haladnak el a gerjesztő lézerefények és a detektorok előtt. FCET méréseknél két térben szeparált (egymás után elhelyezett) különböző hullámhosszúságú lézerefényt alkalmazunk, a donor és akceptor fluoroforok gerjesztéséhez. Az energiatranszfer meghatározásához a donor molekulákat - a gerjesztési spektrumuk maximumához tartozó hullámhosszon - gerjesztve kell mérnünk az akceptor fluoreszcencia intenzitását.

Ideális mérőrendszer esetén a donor molekulákat gerjesztő fény nem képes az akceptort gerjeszteni, valamint a donor és akceptor molekulák emissziós spektruma nem fed át, azaz a donor és akceptor emisszió egymástól függetlenül, külön-külön csatornában detektálható. Ezek a feltételek csak speciális esetekben valósíthatók meg, így a mért jelek, fluoreszcencia intenzitások a donor és akceptor molekulák fluoreszcencia intenzitásainak keverékei. Az egyes jelek matematikai úton történő "elválasztáshoz" az átvilágítások mértékét jellemző korrekciós faktorokat ( $S$  faktorok) kell bevezetni, melyeket csak egy

fluoroforral (donor vagy akceptor) jelölt mintákon mért fluoreszcencia intenzitásokból határozhatunk meg. A következő három fluoreszcencia intenzitást kell detektálni a csak donorral, csak akceptorral, és a mindkettővel jelölt (transzferes) mintán:  $I_1(\lambda_{exD}, \lambda_{emD})$ ,  $I_2(\lambda_{exD}, \lambda_{emA})$ ,  $I_3(\lambda_{exA}, \lambda_{emA})$  ahol  $\lambda_{exD}$ ,  $\lambda_{exA}$  a donor és akceptor molekulák gerjesztési hullámhosszai, a  $\lambda_{emD}$ ,  $\lambda_{emA}$  pedig a donor és akceptor molekulák emissziós hullámhosszai.

A csak donorral jelzett mintán mért fluoreszcens jelekből az  $S_1$  és az  $S_3$  korrekciós faktorokat a következő matematikai formulák segítségével határozhatjuk meg:

$$S_1 = \frac{I_2}{I_1}, \quad S_3 = \frac{I_3}{I_1}. \quad (2.2 - 1)$$

Az  $S_2$  és  $S_4$  faktorok meghatározásához a csak akceptorral jelölt mintáról származó intenzitás átlagát használjuk, mely értékekből a faktorok az alábbi módon számíthatók:

$$S_2 = \frac{I_2}{I_3}, \quad S_4 = \frac{I_1}{I_3}. \quad (2.2 - 2)$$

Az összes átlagintenzitás korrigálva van a háttérintenzitásra, melyet a jelöletlen mintából határozunk meg.

Az energiatranszfer meghatározásához a mérés során meg kell tudnunk határozni a donor és akceptor molekulával egyaránt jelölt mintán az energiatranszfer és akceptor átvilágítás nélküli donor intenzitást ( $I_D$ ), az energiatranszfer és a donor átvilágítás nélküli akceptor intenzitást ( $I_A$ ), valamint az energiatranszfer hatékonyság értékét ( $E$ ). A három ismeretlen meghatározásához három független mért adatra van szükség, ezek az  $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$ . Az ismeretlenek és a mért adatok közötti összefüggéseket az alábbi egyenletek írják le.

$$I_1 = I_D(1 - E) + I_A S_4 + (S_4 / S_2) I_D E \alpha \quad (2.2 - 3)$$

$$I_2 = I_D(1 - E) S_1 + I_A S_2 + I_D E \alpha \quad (2.2 - 4)$$

$$I_3 = I_D(1 - E) S_3 + I_A + (S_3 / S_1) I_D E \alpha. \quad (2.2 - 5)$$

A három egyenlet megoldása a következő eredményre vezet:

$$C = \frac{E}{1-E} = \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{S_1 S_2 [I_2(1-S_3 S_4) - I_1(S_1 - S_2 S_3) - I_3(S_2 - S_1 S_4)]}{(S_1 - S_2 S_3)(I_1 S_2 - I_2 S_4)} \quad (2.2 - 6)$$

Melyből az energiatranszfer a következő módon számítható:

$$E = \frac{C}{1+C} \quad (2.2 - 7)$$

Az  $\alpha$  faktor a mérőrendszer, valamint az alkalmazott festékpár jellemzőit foglalja magában, és azt jellemzi, hogy egy gerjesztett állapotú akceptor molekulát milyen hatékonyan képes a mérőrendszer detektálni egy gerjesztett állapotú donorhoz képest. Az  $\alpha$  faktor a következő egyenlet alapján határozható meg kísérletesen:

$$\alpha = \frac{M^A \overline{B^D} L^D \varepsilon^D \rho^D}{M^D \overline{B^A} L^A \varepsilon^A \rho^A} \quad (2.2 - 8)$$

Az  $M^D$  és  $M^A$  értékek a csak donorral jelölt minta  $I_1$  intenzitásának, valamint a csak akceptorral jelölt minta  $I_2$  intenzitásának átlaga.  $\overline{B^D}$ ,  $\overline{B^A}$  értékek a donor és akceptor molekulák kötőhelyeinek átlagos száma,  $L^D$ ,  $L^A$  a festék/fehérje jelölési arány, az  $\varepsilon^D$ ,  $\varepsilon^A$  értékek a donor és akceptor molekulák moláris abszorpciós együtthatói a gerjesztési hullámhosszon mérve, valamint a  $\rho^D$ ,  $\rho^A$  a donor és akceptor molekulákat gerjesztő lézerefények intenzitásai.

Egy adott optikai rendszer esetén az  $S$  faktorok a használt festékekre jellemzők, így ezek értéke a vizsgált biológiai rendszertől független. A  $\alpha$  számításához használt konstansok és faktorok pedig precízen meghatározhatók, mérhetők (Trón és *mtsai*, 1984).

### 2.2.2 Autofluoreszcencia korrekció

Kis jel-zaj arány esetén a sejtekről érkező autofluoreszcencia intenzitás összemérhetővé válik a fluorofortól származó fluoreszcencia intenzitással, ezért szükséges a detektált intenzitások autofluoreszcencia korrekciója. A korrekcióra két lehetőség van.

1. Jelöletlen sejteken az egyes csatornában mért autofluoreszcencia intenzitások átlagának levonása a jelölt mintán mért fluoreszcencia intenzitásból. Ennek a módszernek a hátránya, hogy kis fluoreszcencia intenzitás értékek esetén a relatíve nagy autofluoreszcencia átlag torzíthatja az energiatranszfer értékeket, így a transzfer hisztogram kiszélesedik.

2. A másik lehetőség a sejtenkénti autofluoreszcencia korrekció. Ilyenkor egy külön csatornában mérjük az autofluoreszcencia intenzitás sejtenkénti értékét a jelölt mintán, majd további átvilágítási faktorok bevezetésével / mérésével korrigáljuk az egyes csatornában mért fluoreszcencia intenzitásokat (Sebestyén és *mtsai*, 2002).

A sejtenkénti autofluoreszcencia korrekció megvalósításához szükség van egy negyedik csatornára, melyben az autofluoreszcenciát mérjük. Továbbá megfelelő donor-akceptor festékpárra, hogy az egyes csatornák jelei spektrálisan jól szeparálhatóak legyenek. A Cy3-Cy5 festékpár alkalmasnak bizonyult, hiszen ezek emissziója a vörös felé van eltolódva, így az autofluoreszcencia intenzitás jól mérhető a donor fluoreszcencia maximuma alatt.

A következő négy fluoreszcencia jelet kell detektálnunk a mérés során:  $I_1(\lambda_{exD}, \lambda_{emAut})$ ,  $I_2(\lambda_{exD}, \lambda_{emD})$ ,  $I_3(\lambda_{exD}, \lambda_{emA})$  továbbá  $I_4(\lambda_{exA}, \lambda_{emA})$ , ahol  $\lambda_{exD} = 488$  nm,  $\lambda_{exA} = 635$  nm a donor és akceptor molekulák a gerjesztési hullámhosszai,  $\lambda_{emD} = 585/42$  nm,  $\lambda_{emA} > 670$  nm a donor és akceptor molekulák emissziós hullámhosszai, valamint  $\lambda_{emAut} = 530/30$  nm az autofluoreszcencia detektálásának hullámhossza. A fenti intenzitások közül az  $I_1$  az autofluoreszcencia csatorna. A mérés során kihasználjuk, hogy a  $(\lambda_{ex,D}, \lambda_{em,Aut})$  hullámhosszpár esetén a donor (Cy3) intenzitása alacsony, illetve azt, hogy a Cy3 festék a FacsCalibur 488 nm-es lézervonalával még gerjeszthető, de csak szuboptimálisan (Sebestyén és *mtsai*, 2002).

Az egyes csatornában a spektrális átfedéstől és az energiatranszfer hatékonyságtól függő mértékben, a négy fluoreszcencia intenzitás kombinációját mérjük. Az egyes csatornában mérhető intenzitások a következő módon írhatók fel a detektált fluoreszcencia intenzitások kombinációjaként:

$$I_1 = A + I_D(1 - E)S_5 + I_A S_6 + I_D E \alpha \frac{S_6}{S_2} \quad (2.2 - 9)$$

$$I_2 = AB_2 + I_D(1 - E) + I_A S_4 + I_D E \alpha \frac{S_4}{S_2} \quad (2.2 - 10)$$

$$I_3 = AB_4 + I_D(1-E)S_1 + I_A S_2 + I_D E \alpha \quad (2.2 - 11)$$

$$I_4 = AB_4 + I_D(1-E)S_3 + I_A + I_D E \alpha \frac{1}{S_2} \frac{\varepsilon_{\lambda_{exA}}^D \varepsilon_{\lambda_{exD}}^A}{\varepsilon_{\lambda_{exD}}^D \varepsilon_{\lambda_{exA}}^A} \quad (2.2 - 12)$$

Meg kell jegyezni, hogy az  $I_4$  egyenletben az  $I_D E \alpha$  átvilágításának mértéke a 2.2 - 5 egyenlethez képest eltér, melynek oka az, hogy a FacsCalibur az  $I_3$  és  $I_4$  intenzitásokat eltérő hullámhosszokon detektálja.

Az autofluoreszcencia intenzitást az egyes, a donor fluoreszcenciát a kettes, a lézerefény által közvetlenül gerjesztett akceptor molekulák fluoreszcencia intenzitását a négyes csatornában detektáljuk, mely értékek rendre a következők:  $A$ ,  $I_D$ ,  $I_A$ . Az  $S_1$ - $S_6$ , valamint  $B_2$ - $B_4$  faktorok írják le a spektrális átfedés mértékét az egyes csatornák között. Az  $\frac{\varepsilon_{\lambda_{exA}}^D \varepsilon_{\lambda_{exD}}^A}{\varepsilon_{\lambda_{exD}}^D \varepsilon_{\lambda_{exA}}^A}$  a donor és akceptor molekulák moláris abszorpciós együtthatóinak hányadosa a megfelelő hullámhosszokon mérve.

Az  $S_1$ ,  $S_3$  és  $S_5$  faktorok a csak donorral (Cy3) jelölt minta mérésével határozhatók meg a következő módon:

$$S_1 = \frac{I_3}{I_2}, \quad S_3 = \frac{I_4}{I_2}, \quad S_5 = \frac{I_1}{I_2}. \quad (2.2 - 13)$$

Az  $S_2$ ,  $S_4$  és  $S_6$  faktorok a csak akceptorral (Cy5) jelölt mintából határozhatók meg az alábbi formulák segítségével:

$$S_2 = \frac{I_3}{I_4}, \quad S_4 = \frac{I_2}{I_4}, \quad S_6 = \frac{I_1}{I_4}. \quad (2.2 - 14)$$

Jelöletlen minta mérésével a  $B_2$ ,  $B_3$ ,  $B_4$  faktorok számíthatók ki:

$$B_2 = \frac{I_2}{I_1}, \quad B_3 = \frac{I_3}{I_1}, \quad B_4 = \frac{I_4}{I_1}. \quad (2.2 - 15)$$

Az  $\alpha$  paraméter, a donor és akceptor molekulák eltérő fluoreszcencia kvantumhatásfokát és emissziójuk eltérő detektálási hatékonyságát korrigálja. Meghatározása méréssel, valamint az alábbi formula kiszámításával történik, hasonlóan a korábban leírtakhoz:

$$\alpha = \frac{M^A \overline{B^D} L^D \varepsilon^D \rho^D}{M^D \overline{B^A} L^A \varepsilon^A \rho^A}. \quad (2.2 - 16)$$

Az általunk használt FacsCalibur optikai elemeinek köszönhetően a  $S_3$ ,  $S_4$  és  $S_6$ , továbbá az

$\frac{\varepsilon_{\lambda_{\text{exA}}}^D \varepsilon_{\lambda_{\text{exD}}}^A}{\varepsilon_{\lambda_{\text{exD}}}^D \varepsilon_{\lambda_{\text{exA}}}^A}$  hányados is nullának adódott, amely nagyban egyszerűsíti a fent leírt négy

egyenletet, valamint azok megoldását:

$$C = \frac{E}{1-E} = \frac{1}{\alpha} \left[ \frac{I_1 (B_2 S_1 + B_4 S_2 - B_3) + I_2 (B_3 S_5 - S_1 - B_4 S_2 S_5) + I_3 (1 - B_2 S_5) + I_4 S_2 (B_2 S_5 - 1)}{I_2 - I_1 B_2} \right] \quad (2.2 - 17)$$

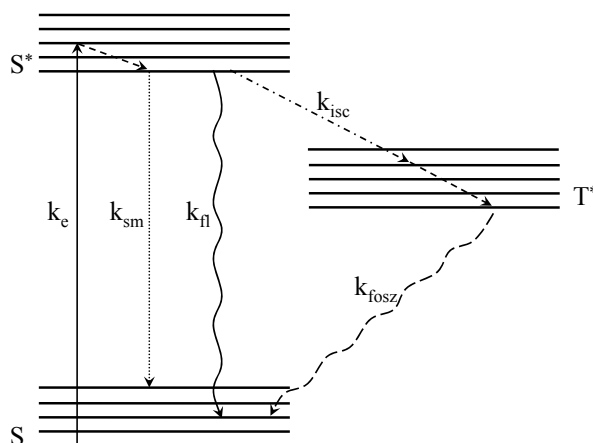
A fenti képletből az energiatranszfer a következő módon határozható meg:

$$E = \frac{C}{1+C}. \quad (2.2 - 18)$$

### 2.3 A ftohalványodáson alapuló energiatranszfer

A ftohalványodás egy olyan fotokémiai folyamat, mely során a fluorofor molekulából az abszorpciós spektrumának megfelelő hullámhosszágú fényrel megvilágítva olyan termékek keletkeznek, melyek a megvilágító fény hatására már nem képesek fluoreszkálni (Young és *mtsai*, 1994; Jovin és Arndt-Jovin, 1989a; Jovin és Arndt-Jovin, 1989b). Ez a jelenség általában nem előnyös, és kerülendő a hagyományos fluoreszcencia mikroszkópiában, azonban, mint látni fogjuk, előnyösen alkalmazható egyéb fizikai folyamatok, mint pl. a rezonancia energiatranszfer detektálására.

A megvilágított fluorofor a fényt abszorbeálva gerjesztett állapotba kerül (szingulett állapot), ahonnan a 2.3 - 1. ábrán látható folyamatok során kerülhet újra alapállapotba.



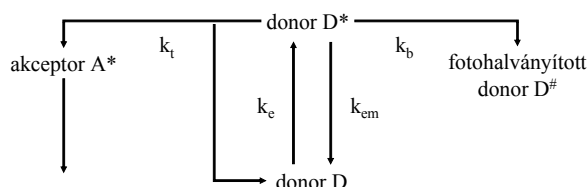
2.3 - 1. ábra: **Fluoreszcens molekula egyszerűsített Jablonski diagramja.** Az ábrán csak az elektron alap, szingulett és triplett állapota látható ( $S$ ,  $S^*$ , és  $T^*$ ) (rotációs nívók nincsenek feltüntetve). Továbbá feltüntettük a lehetséges elektronátmenetekhez tartozó folyamatok sebességi együtthatóit, melyek rendre a következők: abszorpció ( $k_e$ ), fluoreszcencia ( $k_{fl}$ ), egyéb sugárzásmentes relaxációs folyamatok ( $k_{sm}$ ), szingulett-triplett átmenet (rendszerek közötti átmenet,  $k_{isc}$ ), triplett állapoton keresztül megvalósuló foszforeszcencia ( $k_{fosz}$ ), valamint az adott szint egy magasabb energiájú nívójáról a legalsó nívójára történő sugárzásmentes átmenet.

A fluoreszcenciát és a foszforeszcenciát foton emissziója kíséri, míg a kémiai reakciókban olyan termékek keletkeznek, melyek a gerjesztő fény hatására már nem képesek fluoreszkálni. A kémiai reakciók során a szingulett és a triplett állapotú fluorofor molekulák reagálnak a vizes környezetben lévő oldott  $O_2$ -nel, alapállapotú szomszédos festékmolekulával, vagy a ftohalványodás során keletkezett termékekkel. Az egyik

legelterjedtebben használt fluoreszkáló molekula, a fluoreszcein esetében eddig 9 ilyen típusú reakciót sikerült azonosítani (Song és *mtsai*, 1995b).

A teljes reakciómechanizmus sebességi egyenletének meghatározásához minden egyes termékre, illetve köztes termékre fel kell írni a sebességi egyenletet. Ha minden részfolyamatot figyelembe veszünk, legalább hat darab csatolt differenciálegyenletet kapunk, melyeknek analitikus megoldása nem létezik.

A modell megfelelő egyszerűsítése mellett azonban a sebességi egyenlet megoldható (Young és *mtsai*, 1994; Periasamy, 2001). A megfelelő hullámhosszúságú megvilágító fény hatására a fluorofor ( $D$ ) gerjesztett állapotba ( $D^*$ ) kerül. A folyamat sebességi együtthatója legyen  $k_e$ , mely magában foglalja a fluorofor moláris abszorpciós együtthatóját, a fluorofor koncentrációját, valamint a kísérleti körülményektől függő, a foton fluxust magába foglaló szorzófaktorot. A relaxáció három folyamatát, a fluoreszcenciát és a triplett állapoton keresztül megvalósuló foszforeszcenciát, valamint az egyéb sugárzásmentes relaxációs folyamatokat jellemezzük egy közös sebességi együtthatóval  $k_{em}$ -vel. A fotokémiai folyamatokat tekintjük egy olyan kémiai folyamatnak, mely a gerjeszthető fluoroforok számát csökkenti, sebességi együtthatója  $k_b$ . Amennyiben kellően közel megfelelő akceptor ( $A$ ) molekula is található, úgy létrejöhet az energiatranszfer. Az energiatranszfer sebességi együtthatója - mely folyamat során az akceptor fluorofor molekula kerül  $S^*$  szingulett állapotba - legyen  $k_t$  (2.3 - 2. ábra).



2.3 - 2. ábra: **Gerjesztett állapotú donor molekula lehetséges relaxációs útvonalainak sematikus rajza.**  $D^*$ ,  $D^\#$ ,  $D$  rendre a gerjesztett állapotú, fotohalványított és alapállapotú donor molekulát, míg  $A^*$  a gerjesztett állapotú akceptor molekulát jelöli. Az ábrán a fluoreszcenciát, a triplett állapoton keresztül megvalósuló foszforeszcenciát, valamint az egyéb sugárzásmentes relaxációs folyamatokat egy közös sebességi együttható jellemzi ( $k_{em}$ ). Az abszorpció sebességi együtthatóját  $k_e$ , a fotohalványodási folyamatét  $k_b$ , míg az energiatranszfer sebességi együtthatóját  $k_t$  jelöli.

Ez az egyszerűsítő közelítés elfogadható, mert a biológiai vizsgálatok során leggyakrabban alkalmazott fluorofor, a fluoreszcein illetve származékai esetében a lehetséges fotokémiai folyamatok sebességi állandói a kísérleti tapasztalatok szerint a fotohalványodási görbékben nem oldhatók fel.

A fenti megfontolások alapján a teljes reakcióegyenlet a következő alakban írható fel:



mely alapján az alapállapotú donor molekula koncentrációjának változására felírható differenciálegyenlet:

$$\frac{d[D]}{dt} = -k_e[D] + (k_{em} + k_t)[D^*], \quad (2.3 - 2)$$

valamint a gerjesztett állapotú donor molekulák koncentrációjának megváltozására vonatkozó differenciálegyenlet:

$$\frac{d[D^*]}{dt} = k_e[D] - (k_{em} + k_t)[D^*] - k_b[D^*], \quad (2.3 - 3)$$

melyben  $k_t = 0$ , ha nincs jelen akceptor molekula. A két csatolt differenciálegyenlet megoldásához még feltételeznünk kell, hogy az alapállapot és gerjesztett állapot között előegyensúly alakul ki (steady-state közelítés), azaz kellően rövid időintervallumon belül a  $D^*$  koncentrációjának változása zérus. Az egyenletek megoldása a következő:

$$D(t) = D(t=0) \cdot \exp\left(\frac{-k_e \cdot k_b}{k_{em} + k_b + k_t} \cdot t\right). \quad (2.3 - 4)$$

Az az időtartam, mely alatt a donor koncentráció az  $e$ -ed részére csökken a fotohalványodási időállandó, és az alakja a következő:

$$\tau = \frac{k_{em} + k_b + k_t}{k_e \cdot k_b}, \quad (2.3 - 5)$$

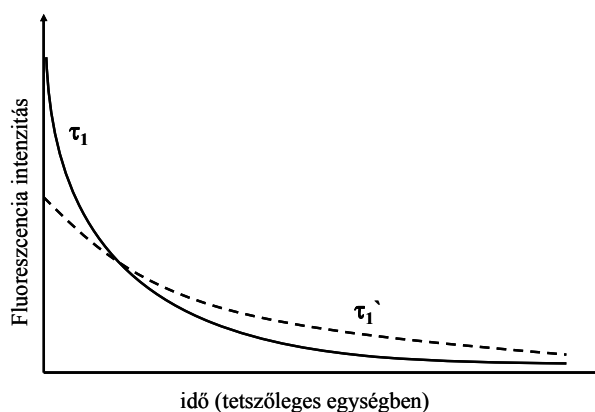
valamint akceptor távollétében ( $k_t = 0$ ):

$$\tau = \frac{k_{em} + k_b}{k_e \cdot k_b}. \quad (2.3 - 6)$$

Látható, hogy energiatranszfer esetén a fotonhalványodási időállandó értéke megnő:

$$\tau' = \tau + \frac{k_t}{k_e k_b}, \quad (2.3 - 7)$$

mely az energiatranszfer, mint egy alternatív relaxációs út megjelenésével magyarázható (2.3 - 3. ábra).



2.3 - 3. ábra: **Fotonhalványodási görbe.** Amennyiben a donor molekulák mellett kellően közel akceptor molekulák is találhatóak, úgy létrejehet az energiatranszfer. Ennek következtében a fotonhalványodási folyamat lelassul, a donor molekulák kezdeti intenzitása lecsökken, valamint a meghatározott fotonhalványodási időállandó  $\tau_1'$  nagyobb lesz, mint akceptor távollétében ( $\tau_1$ ), mivel az energiatranszfer egy újabb sugárzásmentes utat nyit a gerjesztett állapotú donor molekuláknak a relaxációra.

A fentiekben elméletileg meghatározott fotonhalványodási kinetika szerint a gerjeszthető molekulák száma exponenciálisan csökken a megvilágítási idő növekedtével, melyet a következő egyenlet ír le:

$$D(t) = D_1(t=0) \cdot e^{-t/\tau_1} + D_2(t=0) \cdot e^{-t/\tau_2} \quad (2.3 - 8)$$

A kísérleti tapasztalat szerint ez két exponenciális tagot tartalmazó egyenlet szerint változik. Ez feltehetően azt tükrözi, hogy a lehetséges fotonhalványodási folyamatok közül legalább két egymástól kimutathatóan eltérő sebességű komponens van jelen a

fotohalványodási kinetikában. Mivel a fluoreszcencia intenzitás egyenesen arányos a gerjeszthető fluoroforok koncentrációjával, az egyenlet átírható az alábbi alakra:

$$F(t) = F_1 \cdot e^{-t/\tau_1} + F_2 \cdot e^{-t/\tau_2} \quad (2.3 - 9)$$

ahol  $F$  a fluoreszcencia intenzitás az idő függvényében. Az értékelés során általában az átlagos  $\langle \tau \rangle$  értéket célszerű számítani a következő formula alapján:

$$\langle \tau \rangle = \frac{A_1 \cdot \tau_1 + A_2 \cdot \tau_2}{A_1 + A_2} \quad (2.3 - 10)$$

ahol az  $A_1$  és  $A_2$  a két  $\tau$  értéket adó intenzitáskomponens amplitúdója. Az energiatranszfer százalékos értékét az alábbi összefüggés szerint lehet meghatározni:

$$E = 1 - \tau / \tau' \quad (2.3 - 11)$$

A fenti egyszerűsített összefüggésnél figyelembe vettük, hogy  $k_b$  elhanyagolható az összes többi relaxációs folyamat sebességi állandójához képest.

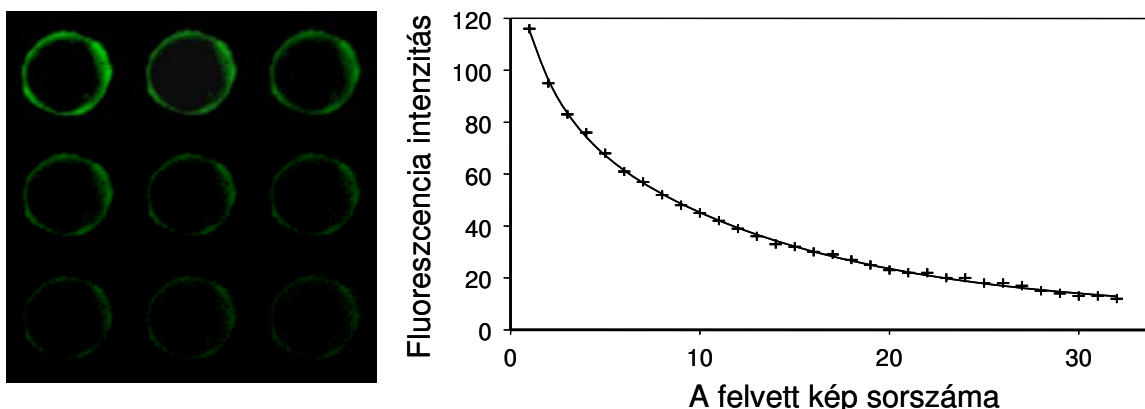
### 2.3.1 A fotohalványodási időállandó pixelenkénti meghatározása

A fotohalványodás mérése során a minta halványodását a fluoreszcencia intenzitás csökkenésével, fluoreszcens mikroszkópot alkalmazva, digitális képek felvételével detektálhatjuk. A mérés során felvett képek száma a fluorofor fotohalványodási időállandójától, valamint az energiatranszfer hatékonyságtól függ. Hiszen minél nagyobb a fotohalványodási időállandó, annál hosszabb ideig tart, ugyanolyan gerjesztő fény intenzitás mellett, azonos számú donor molekula elhalványítása. Amennyiben energiatranszfer szintén létrejöhét, úgy a fotohalványodás folyamata tovább lassul, mivel az energiatranszfer ugyancsak egy lehetséges út a gerjesztett állapotú donor molekulák relaxációjára.

Az egyes részfolyamatok (fotohalványodás, energiatranszfer, fluoreszcencia) sebessége függ a donor molekulák gerjesztett állapotának telítettségétől (Jovin és *mtsai*, 1990), így fotohalványodási folyamat során alkalmazott gerjesztő fény intenzitásának

megválasztásánál figyelembe kell venni az alábbiakat. Alacsony gerjesztő fényintenzitás mellett a fotalványodás sebessége elhanyagolható, mivel a gerjesztett állapotú molekulák száma túl alacsony. Ezzel szemben túl nagy gerjesztő fény intenzitás mellett a donor molekulák lehetséges gerjesztett állapotai telítésbe kerülnek, többek között a hosszú élettartamú triplett állapotra is beáll a steady-state egyensúly. Ebben az esetben a fluoreszcencia többé nem arányos a gerjesztő fény intenzitásával, és így a fotalványodás sebességének megváltozásán alapuló energiatranszfer meghatározás nem megvalósítható. Mindezeket figyelembe véve közepes fényintenzitást kell használni a fotalványodás mérése során, mert ebben az esetben a fotalványodás sebessége, valamint a fluoreszcencia intenzitás egyenesen arányos az alkalmazott gerjesztő fény intenzitásával.

A mért képszekvenciákból az egyes képek megfelelő pixeléhez tartozó intenzitás értékek az idő függvényében történő ábrázolásával jön létre a fluoreszcencia intenzitás lecsengés görbe (2.3 - 4. ábra).



2.3 - 4. ábra: **Fotalványodási képsorozat.** Egy reprezentatív egyenlő időközönként felvett fotalványodási képsorozat és egy pixel fotalványodási görbéje (+), valamint a pontsorra illesztett két exponenciális tagból álló görbe (folytonos vonal) látható.

A fotalványodási időállandók pixelenkénti meghatározásához minden egyes pixelhez tartozó lecsengés görbére illeszteni kell egy exponenciális függvényt. Korábbi munkákkal összhangban (Song és mtsai, 1995a; Song és mtsai, 1996; Song és mtsai, 1997) a következő két exponenciális tagot tartalmazó függvényt lehetett a legjobban illeszteni (a legkisebb négyzetes hibával) a mért görbékre:

$$I(t) = A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2} + I_\infty, \quad (2.3 - 12)$$

ahol  $I(t)$  az adott  $t$  időben a fluoreszcencia intenzitás nagysága,  $I_\infty$  a háttér fluoreszcencia,  $A_1$  és  $A_2$  a két exponenciális komponens amplitúdója, valamint  $\tau_1$  és  $\tau_2$  a fotohalványodási időállandók.

## 2.4 Immuno-golddal jelölt sejtfelszíni antigének térbeli eloszlás analízise

FRET technikák segítségével vizsgálhatjuk a sejtfelszíni receptorok proximitás viszonyait, sőt a FRET fluorofor koncentrációtól való függésének analízisével a néhány nm-nél nagyobb asszociátumok is vizsgálhatók (Kenworthy és Edidin, 1999). Ennek ellenére a FRET nem alkalmazható a fehérjék magasabb szerveződési szintjének, a vizsgált fehérjék esetleges homo- és heterokolónia képzésének vizsgálatára. A membránkomponensek nano- és mikrométer nagyságrendbe eső kolóniamintázatainak tanulmányozására alkalmas módszer az immuno-gold jelölés, mely során elektronmikroszkópos felvételeket készítünk kolloidális méretű aranygömbökkel jelölt mintákról. Az elektronmikroszkópos felvételeken a nagy elektrondenzitású aranygömbök fekete pontokként jelennek meg, melyek méretük alapján a különböző receptorok elkülöníthetők, és távolság viszonyaik tanulmányozhatók. A pontok közötti távolságeloszlás analízisével következtetéseket lehet levonni a fehérjék eloszlásának véletlenszerűségével kapcsolatban, valamint lehetőség nyílik a fehérjekolóniák átlagos méretének becslésére.

Az immuno-gold jelölési módszer specifikus és érzékeny eszköz biológiai minták antigén eloszlásának vizsgálatára, melyet a biológia számos területén alkalmaznak ultravékony metszetek antigén eloszlásának és sejtfelszíni fehérjemintázatok vizsgálatára (Damjanovich és *mtsai*, 1995; Jenei és *mtsai*, 1997; Panyi és *mtsai*, 2003; Vereb és *mtsai*, 2000). A technika további pozitívuma, hogy különböző méretű aranygömböket használva lehetőség nyílik összetettebb rendszerek vizsgálatára is.

### 2.4.1 Pontmintázatok analízise

Az 1950-es évektől kezdődően számos módszert fejlesztettek ki térbeli pontmintázatok (random és nem random) analízisére és karakterizálására (Diggle, 2003; König és *mtsai*, 1991; Stoyan és *mtsai*, 1995), melyeket a tudomány számos területe (állat és növény ökológia, geográfia, bányamérnökök, biológia stb.) használ.

Térbeli pontmintázat ekvivalens egy olyan valószínűségi változóval, melynek értéke egy pont (pontosabban annak  $(x, y)$  koordinátái) egy előre definiált vizsgálati

területen. Egy ismeretlen törvényszerűséget követő ponteloszlás jellemezhető első és másodrendű paraméterekkel.

#### 2.4.1.1 Elsőrendű paraméter

Az elsőrendű paraméter a ponteloszlás globális vagy domináns eloszlás mintázatát, azaz a pont felületi sűrűségének ( $\lambda$ ) helyfüggését írja le a vizsgált területen. Homogén ponteloszlás esetén  $\lambda(x, y) = \text{állandó}$ , azaz helyfüggetlen, valamint egy adott  $A$  területen megtalálható pontok száma  $\lambda A$  paraméterű Poisson eloszlást követ:

$$P(N = k) = \frac{(-\lambda A)^k}{k!} e^{-\lambda A}, \quad (2.4 - 1)$$

melyre később, mint teljesen random ponteloszlásra (CSR: complete spatial randomness) fogok hivatkozni.

#### 2.4.1.2 Másodrendű paraméter

A másodrendű paraméterekből a vizsgált terület egyes részeinek lokális vagy szomszédsági ponteloszlás mintázatára lehet következtetéseket levonni az egész eloszlásra nézve. A másodrendű analízis magában foglalja többek között a Ripley féle  $K$  függvényt és a párkorrelációs függvényt (PCF).

A Ripley féle  $K$  függvény, melyet redukált második momentum mértéknek (reduced second moment measure) is neveznek a pontok közötti átlagos távolságról ad felvilágosítást. Teljesen random ponteloszlás esetén, mely  $N$  pontot tartalmaz, egy adott sugarú körön belül található pontok várt száma ( $P(r)$ ) a következőképpen számolható ki:

$$P(r) = \frac{N}{A} \pi r^2, \quad (2.4 - 2)$$

ahol  $N$  a teljes pontszám,  $A$  a teljes mintaterület,  $\pi r^2$  azon kör területe, melyen belül a pontok számát vizsgáljuk. A fenti formula úgy értelmezhető, hogy az  $r$  sugarú körön belül

elhelyezkedő pontok számát úgy kapjuk meg homogén ponteloszlás esetén, hogy a pontok felületi sűrűségét,  $\lambda = \frac{N}{A}$ , megszorozzuk a vizsgált terület nagyságával. Ennek megfelelően homogén ponteloszlás esetén  $P(r)$  és a felületi sűrűség hányadosa - melyet  $K$  függvénynek nevezünk -  $\pi r^2$  értéket vesz fel bármely  $r$  esetén, míg inhomogén esetben ettől eltér:

- $K(r) = P(r) \frac{1}{\lambda} = \pi r^2$  : homogén ponteloszlás,
- $K(r) > \pi r^2$  : a pontok aggregálódtak (feldúsulás),
- $K(r) < \pi r^2$  : a pontok eltávolodtak (ritkulás) egymástól.

A párkorrelációs függvény előállítható a  $K$  függvény deriváltjaként az alábbi formula alapján:

$$PCF(r) = \frac{1}{2\pi r} \frac{dK(r)}{dr}. \quad (2.4 - 3)$$

A párkorrelációs függvény egy adott részecskétől adott  $r$  távolságon belül lévő pontok sűrűségének, valamint a pontok átlagos felületi sűrűségének hányadosa. Hasonlóan a  $K$  függvényhez a pontok aggregációja esetén a függvény értéke növekedni, míg ritkulása esetén az értéke csökkeni fog. A PCF előnye a  $K$  függvénnyel szemben, hogy teljesen random eloszlás esetén konstansfüggvény, hiszen értéke minden  $r$ -re 1, így értelmezése egyszerűbb, valamint a ponteloszlás inhomogenitása könnyebben vizualizálható.

#### **2.4.2 Immuno-gold jelölt antigének térbeli eloszlás analízise elsőrendű paraméter alapján**

Az analízis első lépéseként minden egyes aranygömbnek meg kell határozni a helyét, azaz a képbeli  $x$  és  $y$  koordinátáját. Ezt követően egy rácsot kell kifeszíteni a képre, mellyel a képet elemi cellákra bontjuk, majd meg kell határozni az egyes cellákban található aranygömb számot (Jenei és mtsai, 1997; Panyi és mtsai, 2003; Vereb és mtsai, 2000). Végezetül a cellák aranygömb száma alapján egy hisztogramot kell létrehozni, azaz ábrázolni kell a cellák számát az aranygömb szám függvényében. Amennyiben az

aranyömbök eloszlása véletlenszerű, a hisztogram burkoló görbéje Poisson eloszlást követ. Szignifikáns eltérés esetén az aranyömbök illetve az antigének sejtfelszíni eloszlása nem véletlenszerű, azaz az antigének között valamilyen rendező erő működik.

### 2.4.3 Immuno-gold jelölt antigének térbeli eloszlás analízise másodrendű paraméter alapján

#### 2.4.3.1 A $K$ függvény becslése

A függvény becsléséhez meghatározzuk minden egyes aranyömb körül egy adott  $r$  távolságon belül található aranyömbök átlagos számát, majd elosztjuk az aranyömbök felületi sűrűségével (Glasbey és Roberts, 1997; Philimonenko és *mtsai*, 2000), az alábbi formula alapján:

$$K(r) = \frac{1}{\lambda^2} \sum_{i=1}^N \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^N \frac{1[d(i,j) \leq r]}{\gamma(d(i,j))}. \quad (2.4 - 4)$$

ahol  $d(i,j)$  az  $i$  pont távolsága a  $j$  ponttól. A  $K$  függvény becsléséhez meghatározzuk az  $a \times b$  területű képen az aranyömbök átlagos felületi sűrűségét ( $\lambda$ ), oly módon hogy az aranyömbök  $N$  számát osztjuk a kép területével. Az  $1[\text{feltétel}]$  egy indikátor függvény, melynek értéke egy, ha a feltétel teljesül, - jelen esetben, ha a pont az  $r$  sugarú körön belül helyezkedik el -, egyébként nulla.

Az analízis során nagyobb távolságok ( $r$ ) esetén egyre nagyobb a valószínűsége, hogy az  $r$  sugarú kör nem fér rá a vizsgált felületre, ez a mintaszél effektus. Ennek kiküszöbölésének egyik lehetséges módja a geometriai kovariogram ablak (geometric window covariogram) használata. A korrekció során a minta területnek csak azt a darabját vizsgáljuk, melyen belül elhelyezkedő pontok köré rajzolt  $r$  sugarú kör az  $a \times b$  nagyságú képen belül helyezkedik el. Ennek meghatározásához, az eredeti képet önmagához viszonyítva minden irányba ( $0-2\pi$ ) eltoljuk  $r$ -el, majd meghatározzuk az eredeti és az eltoló képek átfedő területét / metszetét, ez a  $\gamma$  faktor. A  $K$  függvény becslésekor a  $\gamma$  faktort adott  $r$  esetén a következő képen számítjuk ki:

$$\gamma(r) = ab - \frac{2}{\pi}(ab)r + \frac{1}{\pi}r^2, \quad (2.4 - 5)$$

ahol  $a$  és  $b$  a vizsgált terület magassága és szélessége.

#### 2.4.3.2 Párkorrelációs függvény becslése

A párkorrelációs függvény becsléséhez elsőként a  $K^{-1}$  függvényt becsüljük, mely a PCF integrálja az  $r_1, r_2$  intervallumon (Glasbey és Roberts, 1997; Philimonenko és mtsai, 2000), meghatározása az alábbi formula alapján történik:

$$K^{-1}(r_1, r_2) = \frac{1}{2\pi\lambda^2} \sum_{i=1}^N \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^N \frac{1[r_1 \leq d(i, j) \leq r_2]}{d(i, j)\gamma(d(i, j))}. \quad (2.4 - 6)$$

A  $K^{-1}$  függvény ismeretében a PCF átlagos értéke egy adott  $r, r + \Delta r$  intervallumra meghatározható a  $K^{-1}$  függvény  $r$  szerinti deriváltjának számításával az alábbi egyenlet alapján:

$$\langle PCF \rangle = \frac{K^{-1}(r, r + \Delta r)}{\Delta r}. \quad (2.4 - 7)$$

### 3. Célkitűzések

Munkánk során célunk volt bemutatni három, sejtfelszíni fehérje proximitásviszonyainak tanulmányozására alkalmas módszert, elsősorban ezek elméleti fizikai hátterének, valamint a nyerhető információk matematikai feldolgozásának és az eredmények interpretálásának módját. Továbbá célunk volt mindhárom módszer adatfeldolgozásának szoftveres hátterének megteremtése, illetve a meglévő programok kiegészítése az adatok feldolgozását segítő algoritmusok létrehozásával.

Az analízis programokban a következő funkciók megvalósítását tűztük ki célul:

- Az áramlási citométereket elsősorban rutindiagnosztikai eljárásokra tervezik, így bár rendelkeznek a méréshez, illetve az adatok feldolgozásához nélkülözhetetlen szoftvercsomagokkal, de azok nem alkalmasak energiatranszfer számításra. Célunk volt a hiány pótlása, egy olyan adatfeldolgozó szoftver kifejlesztése, melynek segítségével egyszerre több mérési fájl is feldolgozható párhuzamosan, továbbá egy olyan felhasználói felület biztosítása, melyen keresztül a felhasználó aritmetikai műveleteket definiálhat a sejtenként mért paramétereken.
- Mivel a kereskedelemben nem kapható fotohalványodási képsorozatok pixelenkénti kiértékelésére alkalmas szoftver, célunk volt egy olyan szoftvercsomag létrehozása, mely teljes körű támogatást nyújt az analízishez, valamint az eredmények prezentációjához.
- Aranygömbbel jelzett antigének elektronmikroszkópos felvételeinek analíziséhez célunk volt egy olyan program fejlesztése, mely alkalmas a különböző méretű aranygömbökkel jelölt antigének helyzetének meghatározására, valamint a pozíciók koordinátáinak megfelelő fájlformátumban történő tárolására, az aranygömb mérettől függően, további statisztikai analízishez.

## **4. Anyagok és módszerek**

### **4.1 A FCET és AFCET kísérlet során használt sejtek, antitestek és festékek**

A FCET kísérlethez N87 gyomor tumor sejtvonalat (American Type Culture Collection (Rockville, MD)) használtunk, és a specifikáció szerint (10% FCS-t, 2mM L-glutamint és 0,25% gentamycint tartalmazó RPMI médiumban 5%-os CO<sub>2</sub> koncentráció és 37 °C-os hőmérséklet mellett) növesztettük korai konfluens állapotig. Az ErbB2 receptorok jelöléséhez Cy3 és Cy5 fluoreszkáló festékek maleimid-származékaival konjugált humanizált 4D5 (Trastuzumab, Herceptin™) és 2C4 (Pertuzumab, Omnitarg™) Fab-t használtunk, melyeket a Genentech Inc.-től kaptunk. A sejteket kétszer mostuk hideg PBS-ben (pH=7,4), majd kb. 1 millió sejtet szuszpendáltunk fel 50 µl foszfát pufferben (PBS, phosphate buffered saline). A sejteket ezután 30 percig, jégen, sötétben jelöltük a megfelelő festékekkel konjugált monoklonális antitestek Fab fragmentumainak telítési koncentrációjával. A FRET mérésekben használt kettős jelölés esetén a fluoreszcensen jelölt antitest fragmentumokat egyszerre adtuk a sejtekhez. Végül a sejteket hideg PBS-ben mostuk kétszer és 1%-os hideg formaldehid PBS-ben fixáltuk.

### **4.2 A pbFRET kísérlet során használt sejtek, antitestek és festékek**

Az EBV-módosított humán B limfoblastoid JY sejtvonal, RPMI 1640 médiumban növesztettük (10% hőkezeléssel inaktivált FCS-t, 2 mM L-glutamint és 50 µg/ml koncentrációban gentamycint tartalmaz) 5%-os CO<sub>2</sub> koncentráció mellett, 37 °C-on. Az MHC I (HLA-A,B,C) nehézlánc jelölésére W6/32 (IgG2 $\kappa$ ) antitestet, a  $\beta$ 2-microglobulin (MHC I könnyű lánc) jelölésére L368 (IgG1 $\kappa$ ) antitestet, míg MHC II (HLA-DR) jelölésére L243 (IgG2 $\alpha$ ) antitestet használtunk. A megtisztított antitestekhez, 6-(fluoreszcein-5-karboxamido)-hexánsav-szukcinimidil-észtert (SFX) vagy 6-(tetrametil-rodamine-5-(és-6)-karboxamido)-hexánsav-szukcinimidil-észtert (TAMRAX, Molecular Probes, USA) kötöttünk. A festék antitest jelölési arányt spektrofotométerrel határoztuk meg. A sejtszuspenzió koncentrációját kétszeri mosás után  $0,5-1 \times 10^6$  sejt/50 µl-re állítottuk be, majd szuszpendáltuk PBS-ben (pH=7,4). Ezt követően a sejteket telítési koncentrációjú SFX- és/vagy TAMRAX- konjugált monoklonális antitestekkel inkubáltuk

45 percig jégen. Az inkubálás után a sejteket kétszer mostuk PBS-sel és fixáltuk 1% formaldehid PBS-ben jégen 30 percig. A jelölés alatt külön figyelmet fordítottunk arra, hogy a sejteket 4 °C alatt tartsuk, az esetleges sejtfelszíni aggregációk elkerülése érdekében.

### **4.3 Az Immuno-gold kísérlet során használt sejtek és antitestek**

A kísérlet során transzfektált Jurkat TagC15 sejtvonalakat használtunk, melyeket 5%-os CO<sub>2</sub> koncentráció mellett 37 °C-on RPMI 1640 médiumban növesztettünk, mely 10% hőkezeléssel inaktivált FCS-t, 2 mM L-glutamint és 50 µg/ml koncentrációban gentamycint tartalmaz. Az immuno-gold jelölés során a transzfektált sejteket kétszer mostuk Hanks` oldatban, majd anti-FLAG M elsődleges antitesttel jelöltük (Sigma, Budapest) jégen 40 percig. Majd a sejtszuszpenziót mostuk kétszer és egy másodlagos poliklonális antitesthez konjugált 10 nm-es kolloidális aranygömbökkel (AuroProbe EM 10 nm, Amersham Pharmacia) jelöltük. Végül a sejteket jégen fixáltuk 1%-os paraformaldehiddel 1 órán át, majd 2%-os glutaraldehiddel 0,1 M Sorensen's pufferben (pH=7,2) egy éjszakán át. A transzmissziós elektronmikroszkópiához a sejteket a korábban leírt módon preparáltuk (Jenei és mtsai, 1997; Vereb és mtsai, 2000).

### **4.4 A mérések során használt mérőberendezések**

A FCET és az AFCET méréseket Becton Dickinson FACSCalibur áramlási citométeren (Becton Dickinson, San Jose, CA) végeztük el. A donor molekulák gerjesztésére 488 nm-es, az akceptor molekulák gerjesztésére 635 nm-es hullámhosszúságú lézertényt, míg a donor és akceptor fluoreszcencia detektálásánál rendre 585/42 nm-es sávszűrőt és 570 nm-es felüláteresztő szűrőt használtunk. Az AFCET méréseknél a sejtek autofluoreszcenciájának detektálására 530/30 nm-es sávszűrőt használtunk.

A pbFRET méréseket Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkópon végeztük el. A donor molekulák gerjesztésére Ar ion lézer 488 nm-es hullámhosszát, míg az akceptor molekulák gerjesztéséhez He-Ne lézer 543 nm-es hullámhosszúságú fényét használtuk. A donor és akceptor fluoreszcencia detektáláshoz rendre 525/20 nm-es sávszűrőt, valamint 570 nm-es felüláteresztő szűrőt használtunk.

Az aranygömbökkel jelölt sejteket JEOL elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (JEM 100 B mikroszkóp, 80 kV-os feszültség).

#### 4.5 Fejlesztőkörnyezetek

A FCET analízis (ReFlex) és elektronmikroszkópos képfeldolgozó (ClickOnGold) programokat Borland Delphi Stúdióban (Borland Software Corporation, Scotts Valley CA, USA) fejlesztettük. Azért esett a választás erre a fejlesztő környezetre, mivel támogatja az objektum orientált programozást, valamint számos beépített grafikus eszközt és komponenst tartalmaz (pl.: táblázatok (TStringGrid), és fanézetek (TTreeView)) (Cantu, 1997). Mindemellett a beépített programtervező felülete olyan eszközöket biztosít (object inspector, tulajdonság szerkesztő stb.), melyek megkönnyítik és felgyorsítják a felhasználói felület tervezését.

A fothalványodás képszekvencia analízis programot a National Instruments LabVIEW- 6.1 (National Instruments Corporation, Austin TX) környezetben fejlesztettük ki az NI Europe céggel történő együttműködés során, mivel igen egyszerűen használható grafikus fejlesztőfelülettel rendelkezik. A LabVIEW egy ún. adatútvézérelt grafikus fejlesztőkörnyezet, melyet eredetileg mérnököknek fejlesztettek ki intelligens vezérlő és folyamatirányító berendezések szoftveres vezérlésének egyszerű megvalósításához. Azonban az utóbbi időben az eszköztára olyan dinamikus bővült, hogy mára egy gyakorlatilag teljes értékű programozási nyelvnek tekinthető, mely számos grafikus eszközt és matematikai rutint, ún. VI-t (virtual instrument) foglal magába. Mindhárom szoftvert Windows platformra fejlesztettük és teszteltük Windows9X, WindowsNT, Windows2000 és WindowsXP operációs rendszereken.

## 5. Eredmények és megbeszélés

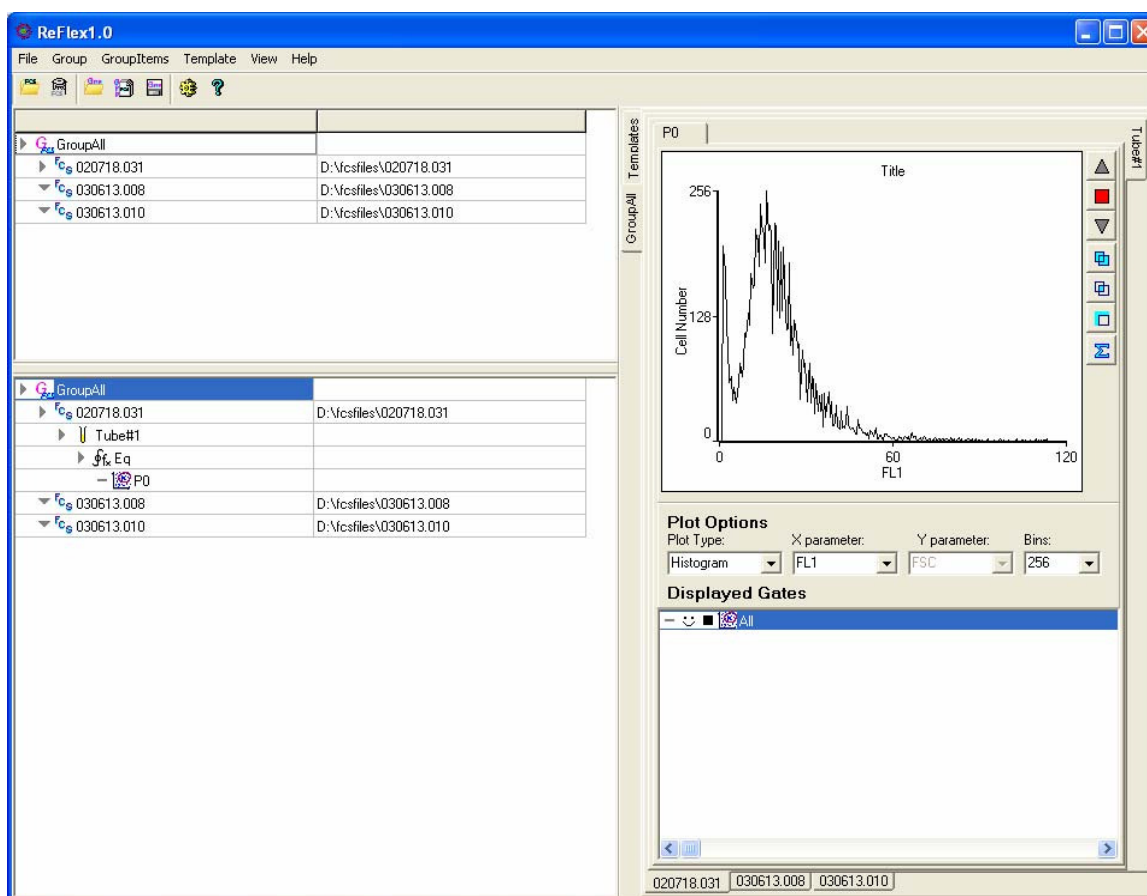
### 5.1 Az áramlási citometriás kiértékelő program (ReFlex)

A FCET és az AFCET számítások elvégzése speciális szoftvert igényel, mivel ekkor a sejtenként mért paramétereiből sejtenként határozzuk meg az energiatranszfer értékeket. A programnak képesnek kell lennie az áramlási citométerek által szolgáltatott fájltypusok (flow cytometry standard, FCS (Data File Standard Committee, 1990; Seamer és *mtsai*, 1997)) megnyitására, a megfelelő számítások elvégzésére, valamint megfelelő felületet kell biztosítania a kapuzások (a vizsgálni kívánt sejtpopuláció kiválasztása) elvégzéséhez. Az áramlási citométerek által generált fájlok szerkezete, valamint a standardok leírása az A kiegészítésben, míg a program legfontosabb osztályainak leírása a Mellékletben található.

A program fejlesztése során, mivel ezt a technikát intézetünk és kollaborációs partnereink számos biológiai probléma megoldásánál használják, célunk volt a korábban felmerült igények kielégítése. Ennek megfelelően kifejlesztettünk egy olyan szoftvert, mely alkalmas az FCS fájlok feldolgozására, valamint a mért paramétereiből a FCET és az AFCET értékek meghatározására. A hatékonyabb adatfeldolgozás érdekében a programot többdokumentumos felülettel láttuk el, mely lehetővé teszi tetszőleges számú adatsor egyidejű / párhuzamos feldolgozását. A program tartalmazza a jelenleg használt grafikon típusokat, valamint a kapuzások elvégzéséhez szükséges grafikus eszközöket. Mivel a számítások eltérőek lehetnek a különböző számítási módszereknél, a programot elláttuk egyenletszerkesztő modullal is, melyen keresztül a felhasználó adhatja meg az elvégzendő számítások matematikai formuláit.

#### 5.1.1 A ReFlex program felépítése

A program felhasználói felülete három részre osztható (5.1 - 1. ábra). Az első rész a fájlok csoportjainak kezelésére és megjelenítésére szolgáló Projekttábla. A második rész a Csoporttábla, mely egy a Projekttáblában kiválasztott csoport fájljait és azok adatait jeleníti meg. A harmadik részen, mely egy Tabulált panel (egymás fölé helyezett felületek, melyek között kis „fülek” segítségével navigálhatunk, továbbiakban Tabpanel), a felhasználó által definiált grafikonok, a kapuhierarchia és a templátok láthatók.



5.1 - 1. ábra: A program felhasználói felülete. A felület három részre osztható, Projekt tábla, alatta a Csoport tábla, jobb oldalt pedig a Tabpanel található.

Mivel a program képes egyszerre több fájl megnyitására, szükséges a megnyitott állományok rendszerezése, a hasonló adatsorok (FCS fájlok) csoportosítása. Ezt teszi lehetővé a Projekttábla, mely a csoportokat (Group) és az egyes csoportokhoz tartozó FCS fájlokat jeleníti meg. Tetszőleges számú csoport hozható létre a kiértékelés közben. A legelső csoport (GroupAll) a program indításakor jön létre. A beolvasott FCS fájlok a táblában legelső csoport alá rendelődnek automatikusan, melyből bármikor áthelyezhetők, vagy kitörölhetők.

Hasonló fájlok szimultán analízisét teszi lehetővé a Csoporttábla. A Projekttáblában kiválasztott csoport teljes hierarchiája jelenik meg ebben a táblában. Ugyancsak ezen az interfészen keresztül lehetséges az egyes fájlok kapuzott populációinak más fájlokra történő másolása (drag and drop), az egyenletszerkesztő modul megnyitása, valamint itt jelennek meg a kapuzott populációk és az azokon definiált statisztikák eredményei is.

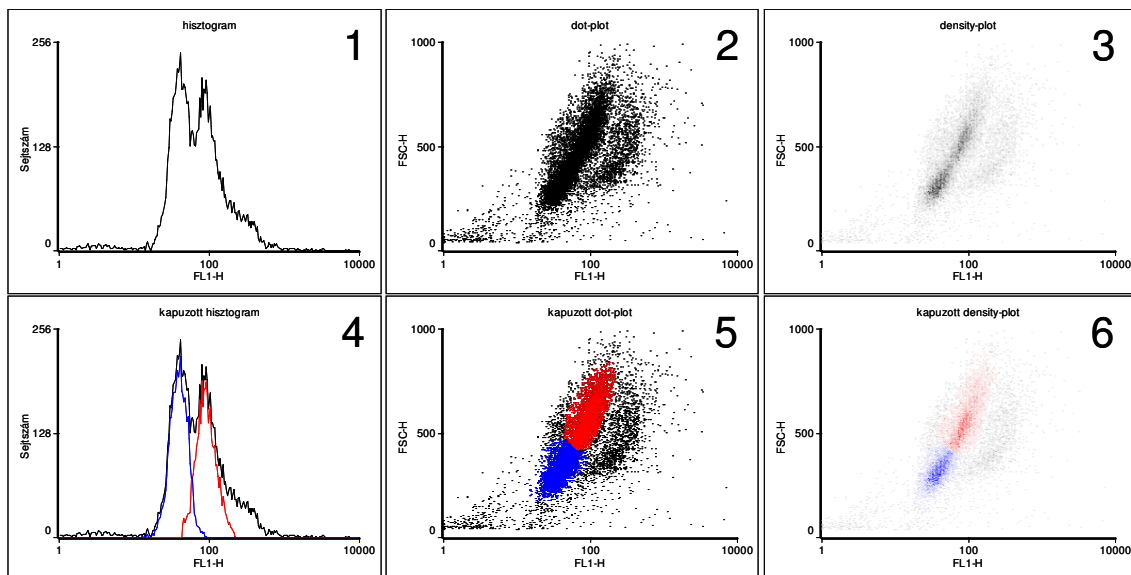
A Tabpanel szolgál a csoportok alá rendelt FCS fájlok populációinak megjelenítésére. A panel szerkezete a következő: A legkülső tabpanel tárolja a csoportokat és templátokat. A templátok segítségével a felhasználó egyszerre módosíthatja egy csoporton belül lévő FCS fájlok egyenletszerkesztőinek álneveit és konstansait.

A csoportfülek segítségével érhetők el az egyes csoportok alá rendelt FCS fájlok. A csoportpaneleden belül egy-egy újabb tabpanel látható, a füleken a megnyitott FCS fájlok neveivel. Mivel minden egyes fájl több minta mérési eredményeit is tartalmazhatja, ezért az egyes mérések külön panelon jelennek meg, ezek az úgynevezett Tube-ok. Végül a legbelső paneleken az adott mérés kapuzott populációi érhetők el.

Az egyes populációk egy-egy tabpanelen láthatók. A felület három részre osztható, a grafikon megjelenítő legfelső területre, mely a grafikonokon kívül, jobbra rendezve egy eszköztárat is tartalmaz. Az eszköztár segítségével lehet a populáció hierarchián belül navigálni, a kapuzott populációk között műveleteket végrehajtani, valamint a populáción statisztikákat megadni. A felület középső részén található a grafikon típusának megváltoztatására és az ábrázolt paraméterek kiválasztására szolgáló kontrolok. A harmadik részen az adott populáción létrehozott kapuhierarchia látható egy Kaputáblában, melynek felugró menüje számos funkciót tartalmaz, többek között a kapukat lehet átnevezni, láthatóvá tenni, átszínezni, törölni stb.

## 5.1.2 Grafikonok

A programban háromfajta grafikont lehet létrehozni futásidőben: hisztogram, dot-plot, density-plot (5.1 - 2. ábra).



5.2 - 2. ábra: **Hisztogram, dot-plot és density-plot.** Az 1-es grafikon, mely egy egydimenziós hisztogram, a sejtek számát mutatja a kiválasztott paraméter függvényében. A 2-dik grafikonon, mely egy kétdimenziós dot-plot, két paramétert ábrázolunk egymás függvényében, és a sejteket egy-egy pont reprezentál. A 3-dik grafikonon, mely egy kétdimenziós szinkódolt hisztogram, a dot plot-hoz hasonlóan két paraméter egymástól való függését ábrázoljuk. A pontok szürkeshálán kódolt színe a paraméterek megfelelő intervallumába eső sejtek számát reprezentálja. A hisztogramon (1) egyértelműen látható, hogy két átfedő sejtpopulációval van dolgunk. A két populáció dot-ploton (2) nem különíthető el egyértelműen a nagy pontsűrűség miatt, míg a density-ploton (3) jól látható a két populáció határa. A density-ploton történő kapuzás után a szétválasztott populációk grafikonjai a 4, 5, 6 képeken láthatók.

Mindhárom grafikon esetében az ábrázolás történhet lineáris és logaritmus skálán is. Az egyes kapuk által szelektált alpopulációk a kapu színével jelennek meg a grafikonokon.

### 5.1.3 Kapuzás

A kiértékelés során különböző populációk kiválasztására kapukat (gate) definiálunk. A kapuzás során a mért vagy számított paramétereken definiált szabályok alapján választjuk ki azt az alappopulációt, melyet vizsgálni akarunk. Két típusa létezik az egy és kétdimenziós kapuzás. Egydimenziós kaput hisztogramon, míg kétdimenziós kaput dot-ploton illetve density-ploton hozhatunk létre.

#### 5.1.3.1 *Hisztogram kapu*

Hisztogramon létrehozott kapuk segítségével valósítható meg az egydimenziós kapuzás, mely azt jelenti, hogy azokat a sejteket kell kiszelektálni, melyek ábrázolt paramétere a kapu minimuma és maximuma közé esnek.

A hisztogram kapunak van egy tulajdonsága, melynek beállításával egy speciális viselkedésű, úgynevezett nyesőkaput (trimgate) lehet létrehozni. Ez a kapu az egyszerű hisztogram kaputól annyiban tér el, hogy minimum és maximum értékét automatikusan a megadott százalékos értékeknek megfelelően állítja be. Azaz a két küszöbérték úgy kerül kiválasztásra, hogy a populáció megadott százalékát vágja le mind felülről, mind alulról. A kapu előnye az, hogy a küszöbértékek ily módon történő megadása nem szubjektív, azaz független attól, hogy ki hozta létre a kaput.

#### 5.1.3.2 *Kétdimenziós Dot-plot kapu*

Dot-plotos ábrázolás esetén a kapuzott sejtek meghatározása jóval összetettebb algoritmust kíván, hiszen azt kell megvizsgálni, hogy az adott koordinátákkal (paraméter értékekkel) rendelkező pont (sejt) a felhasználó által a grafikonon körülhatárolt területen (poligon) belül található-e. A probléma megoldásához a következő vizsgálatot kell végrehajtani: Legyenek a sejtet reprezentáló pont koordinátái  $x$  és  $y$ . A poligon csúcsainak koordinátáit jelöljük  $x[i]$  és  $y[i]$ -vel,  $i$  ( $= 0 \dots n$ ), ahol  $n$  a poligon csúcsainak a száma. Amennyiben a vizsgált pont a poligon páratlan számú oldalához képest helyezkedik el balra, úgy a pont a poligonon belül helyezkedik el, egyébként a poligon nem foglalja

magában a vizsgált pontot. Matematikailag ez a következőt jelenti: amennyiben mindkét alábbi kifejezés igaz

$$0 \leq \frac{y - y[i]}{y[j] - y[i]} \leq 1 \text{ és } \frac{\Delta x}{\Delta y} ry \geq rx, \text{ ahol } j = i + 1, ry = y - y[i], \text{ továbbá } rx = x - x[i],$$

a vizsgált poligon él a ponttól balra található, egyébként jobbra. Az *Inside* függvény, melynek Pascal kódja a Java nyelv Polygon osztályának *contains* metódusán alapszik (J2EE, *Java.awt.polygon.contains*), a következő:

```

function TPolygon.Inside( x,y : integer ) : boolean ;
var
  hits    : integer;
  ySave  : integer;
  i,n,j   : integer;
  dx,dy   : integer;
  rx,ry   : integer;
  s       : double;
begin
  if getBounds.inside(x, y) then
    begin
      hits := 0;
      ySave := 0;
      i := 0;
      while (i < length(XPoints)) and (ypoints[i] = y) do inc(i);
      for n := 0 to High( XPoints ) do
        begin
          j := (i + 1) mod length(XPoints);
          dx := xpoints[j] - xpoints[i];
          dy := ypoints[j] - ypoints[i];
          if (dy <> 0) then
            begin
              rx := x - xpoints[i];
              ry := y - ypoints[i];
              if (ypoints[j] = y) and (xpoints[j] >= x) then ySave := ypoints[i];
              if (ypoints[i] = y) and (xpoints[i] >= x) then
                if (ySave > y) <> (ypoints[j] > y) then dec(hits);
                s := ry / dy;
                if (s >= 0.0) and (s <= 1.0) and ((s * dx) >= rx) then inc(hits);
            end;
          i := j;
        end;
      Result := (hits mod 2) <> 0;
    end
  else Result := false;
end;

```

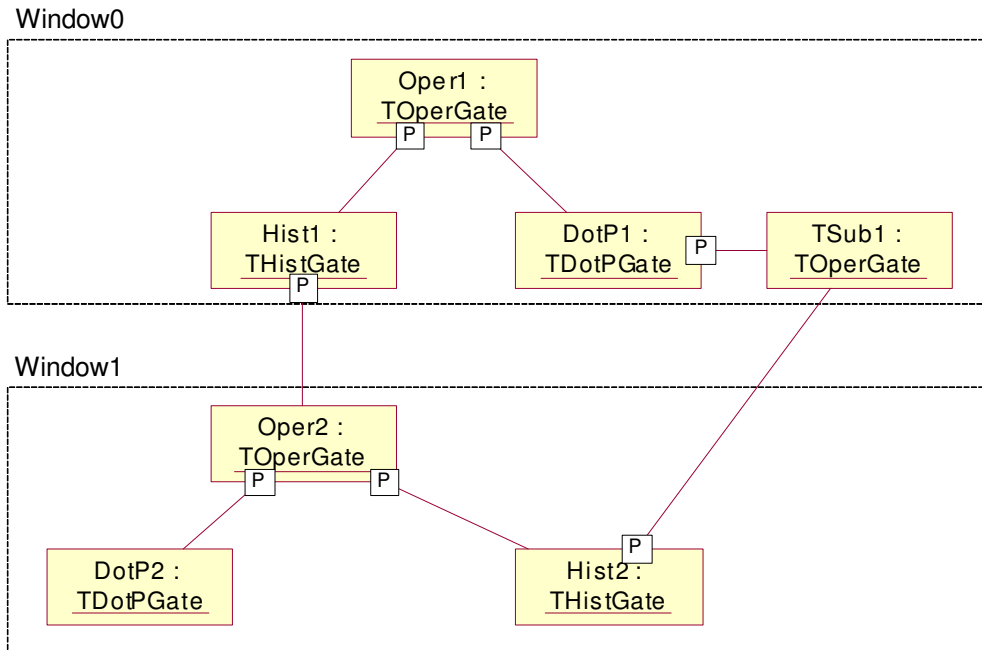
A vizsgált ponttól balra elhelyezkedő poligon élek megszámlálásához egy *hits* nevű, egész típusú változót vezettünk be. Amennyiben ennek értéke páros, úgy a pont a poligonon kívül található.

### 5.1.3.3 *Operátor kapuk*

Az operátor kapukra azért van szükség, hogy a felhasználó a kapuk által szelektált alpopulációkon alapvető halmazműveleteket hajthasson végre. Ennek megfelelően az operátor kapunak két halmazművelet elvégzésére (unió és metszet) alkalmas típusa van, valamint a kapuk másolására létrehoztunk egy másoló kaput, mely egy adott hisztogram vagy dot-plot kapu új grafikonon való megjelenítésére szolgál.

### 5.1.3.4 *Kapuk közötti kapcsolatok*

Az FCS fájl olvasása után automatikusan létrejön egy másoló kapu, mely az összes mért sejt indexét tartalmazza. Ez a kapuhierarchia feje. Az összes többi kapu ez alá van rendelve (5.1 - 3. ábra). Egy új kapu létrehozásakor (mely ebben az esetben csak dot-plot vagy hisztogram kapu lehet) a születő kapu tulajdonosa ez a kapu lesz. Az újonnan létrehozott kapu meghatározza a kaput kielégítő sejtek indexét, és a kapuzott populáció megjelenik a grafikonon a kapu színével. Minden egyes kapu populációja megjeleníthető új ablakban, valamint a dot-plot és hisztogram kapuk között operációkat értelmezhetünk (unió, metszet), melyet a program ugyancsak operátor kapukon keresztül valósít meg.



5.1 - 3. ábra: **Kapuhierarchia gráfja.** A kapuhierarchia feje egy operátor kapu (Oper1), mely a fájl megnyitásakor jön létre, és az összes mért sejt indexét tartalmazza. Közvetlen leszármazottai csak hisztogram vagy dot-plot kapuk lehetnek. Ez fordítva is igaz, miszerint hisztogram és dot-plot kapuk gyermeke csak operátor kapu lehet. Az ábrán téglalapok zárják körbe a közös grafikonon megjelenő kapukat, valamint a P betű jelöli a szülőkaput.

Minden kapu ismeri szülő kapuját, vagy operátorkapuk esetében kapuit, valamint minden szülőkapu ismeri gyermekeit. Erre a következők miatt van szükség:

- Gyermekkapuk automatikus frissítése: amennyiben egy kaput a felhasználó módosít, úgy nem csak a módosított kapu szelektált sejtjeit kell újra meghatározni, hanem annak gyermekkapuinak is.
- Kaputörlés: amennyiben egy kaput törölünk, annak gyermekeit is fel kell szabadítani.

Mindkét folyamat megvalósításához nélkülözhetetlen, hogy a szülő ismerje gyermekkapuját és fordítva.

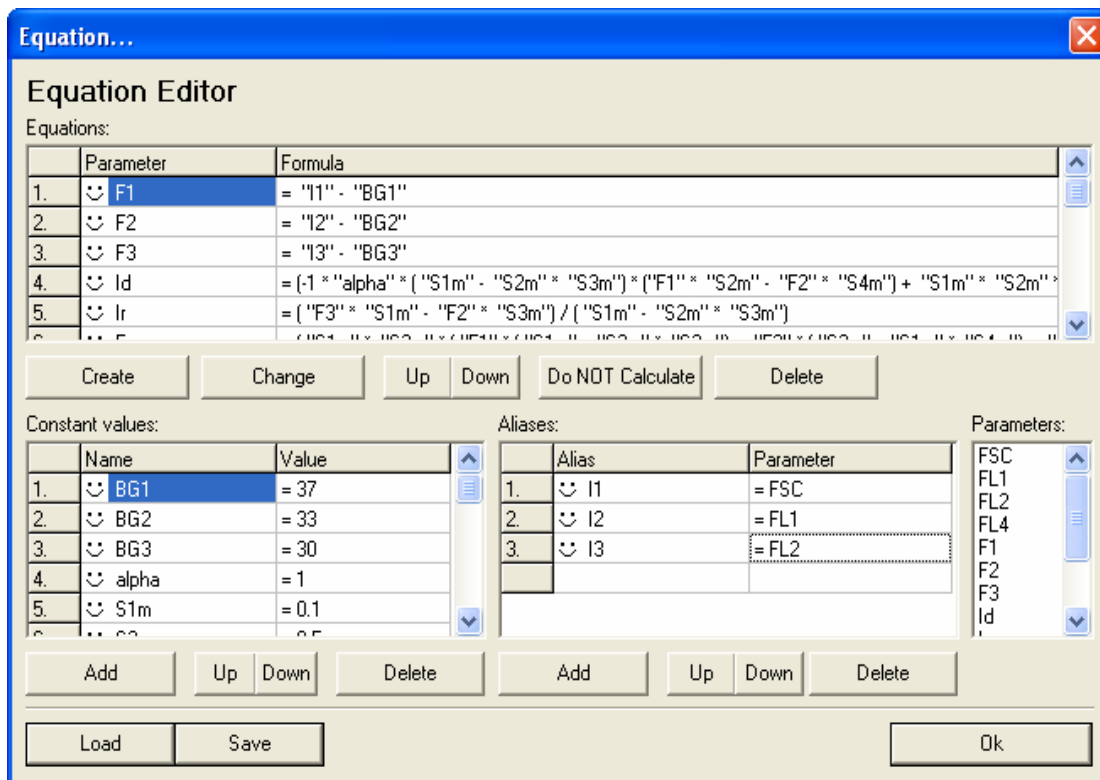
#### 5.1.4 Egyenletszerkesztő felület és modul

Az energiatranszfer meghatározásához számos matematikai számítást kell elvégezni több mért paraméter felhasználásával, amit még tovább nehezít, hogy a különböző áramlási citométereken a mérésnél generált paraméterek nevei eltérőek. A probléma megoldására alapvetően két lehetőség kínálkozik:

- A matematikai formulákat a program kódjában helyezzük el, és a felhasználónak biztosítunk egy interfészt, melyen keresztül az egyenletek bemenő paramétereit, mint pl.: a sejtparaméterek neve, konstansok stb., módosítani tud. Ez a megoldás gyors és hatékony, azonban az egyenletek módosítására nincs lehetőség, csak a program újrafordítása esetén.
- A program rendelkezik egy olyan felülettel, melyen keresztül a felhasználó maga definiálhat egyenleteket a mért vagy számított sejtenkénti paraméterek felhasználásával. Ez a probléma lényegesen összetettebb, de így a felhasználó “szabad kezet kap”, saját maga alakíthatja ki a használni kívánt egyenleteket, egyenletrendszereket.

A fenti megfontolásokat figyelembe véve a második lehetőség mellett döntöttünk, hiszen így a program sokkal szélesebb körben használható (energiatranszfer hatékonyság számítás FCET, AFCET, Quenching módszerrel, stb.), valamint az újonnan kidolgozott technikák adaptálása egyszerűbb.

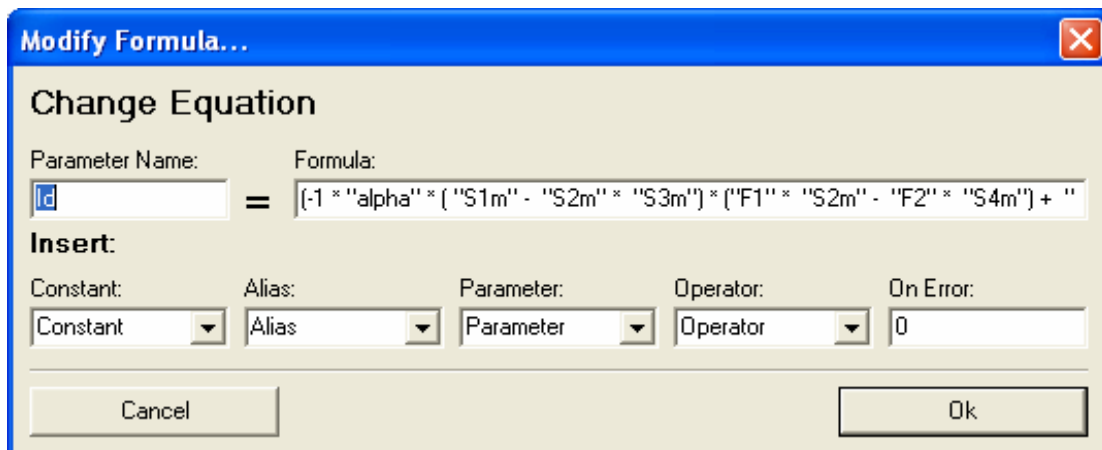
Az egyenletszerkesztő modul segítségével a felhasználó definiálhat egyenleteket a mért paramétereken. Minden egyes megnyitott FCS fájl összes méréssora (Tube) rendelkezik ilyen modullal, így a különböző méréseket más-más módon lehet értékelni, vagy ugyanazon fájl újbóli megnyitásával más módon is analizálhatunk.



5.1 - 4. ábra: Az egyenletszerkesztő modul. A grafikus felület három fő részre osztható. A felső táblázat tartalmazza a már definiált egyenletek nevét és formuláját, míg az alsó két táblázat a felhasználó által definiált nevesített konstansokat és álneveket.

Az egyenletszerkesztő modul a Csoporttáblából érhető el. A felület három fő részre osztható (5.1 - 4. ábra). A felső táblázat tartalmazza a már definiált egyenleteket, melynek első oszlopa tartalmazza a számított paraméterek nevét, a második pedig a számítási műveleteket. A táblázat alatt a legfontosabb funkciók gombjai láthatók. Az egyenlet tábla alatt további két táblázat található a nevesített konstansok és álnevek tárolására. Az egyenletekben a konstansokra nevekkel lehet hivatkozni, így ha a konstans értéke megváltozik, elegendő a konstans táblázatban a névhez tartozó értéket megváltoztatni. Az álnevek (alias) segítségével hivatkozhatunk sejtenként mért vagy számított paraméterre. A funkciója azonos a konstansokéval, amennyiben egy az egyenletekben hivatkozott paraméter neve megváltozik elegendő az álnév paraméterét megváltoztatni. Erre a két típusra azért van szükség, mert egy összetettebb egyenletrendszer módosítása meglehetősen sok veszéllyel jár(hat), továbbá számos hiba forrása is lehet. A két táblázat mellett egy listadoboz látható, mely a mért vagy számított paramétereket tartalmazza.

Egyenlet definiálásakor a 5.1 - 5. ábrán látható ablak jelenik meg. Itt kell megadni az új, számítandó paraméter egyedi nevét, valamint a formulát. Az egyenlet billentyűzet segítségével adható meg, vagy a legördülő listákból lehet kiválasztani az álneveket, operátorokat stb.



5.1 - 5. ábra: **Egyenlet definiálása.** Az egyenletek definiálásakor a felhasználónak meg kell adni az új számított paraméter nevét, mely egyben egy egyedi azonosító is, majd a számítás módját. Az egyenlet definiálásakor a nevesített konstansok, álnevek, paraméterek, valamint konstans számok is használhatók. Az operátorok egy listadobozból választhatók ki. Az OnError szövegdoboz funkciója az, hogy számítási hiba esetén (pl.: nullával való osztás) a számított érték a szövegdobozban megadott értéket veszi fel. Ennek segítségével ki lehet szűrni azon sejteket, melyekre nézve a számítás nem végezhető el.

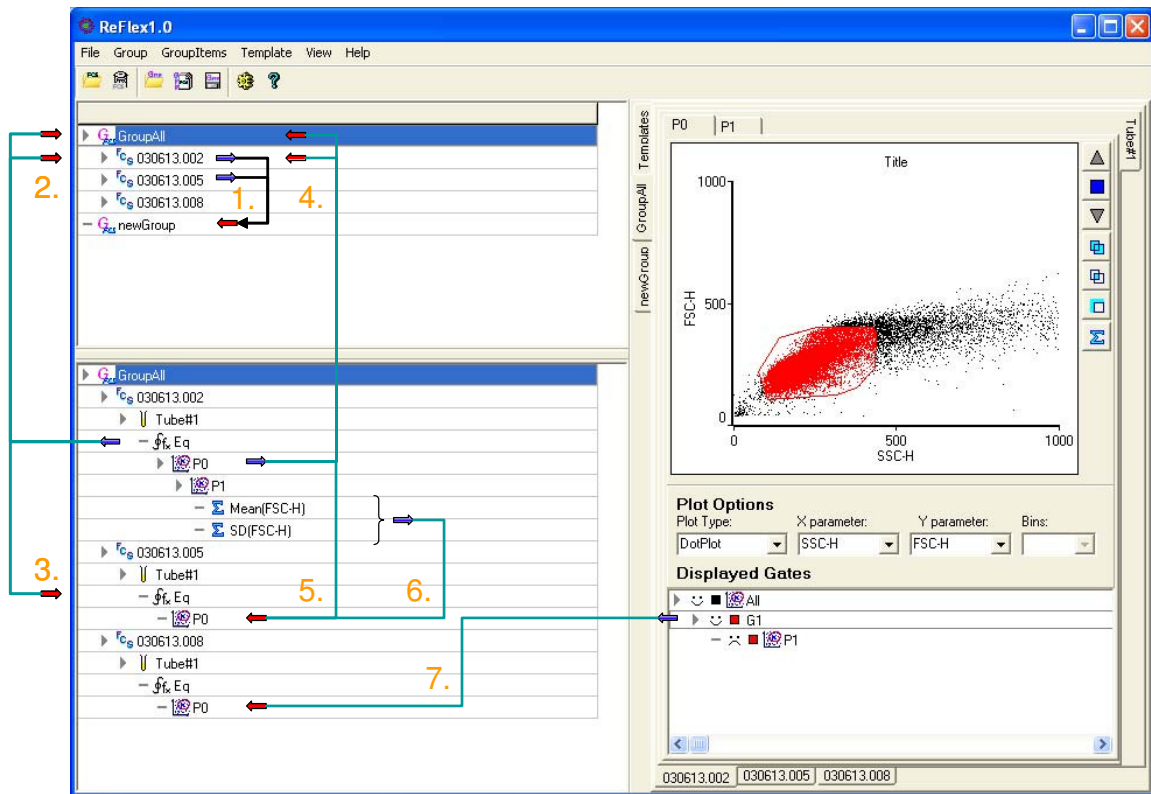
Az egyenlet definiálása után a program ellenőrzi az egyenletet, és amennyiben azt ki lehet számítani, meghatározza az összes sejt új paraméterértékét, egyébként hibaüzenetet küld.

### 5.1.5 Húz és dob technika (Drag and Drop)

Számos Windows platformra írt alkalmazás használja ezt a technikát, különösen, ha az alkalmazás több dokumentumos (multiple document interface, MDI). A technika számos funkció megvalósítására alkalmas, például az alkalmazások túlnyomó többsége képes a program ikonjára vagy a már futó alkalmazás ablakára ráhúzott és dobott fájl megnyitására. Természetesen csak akkor, ha az adott szoftver képes az adott fájl formátumát kezelni.

A ReFlex program több dokumentumos. Ennek megfelelően szükség volt a fájlok létrehozott struktúrák (grafikonok, kapuk, statisztikák) egyik fájlról a másikra

történi másolásának felhasználóbarát megvalósítására. Az 5.1 - 6. ábra a programban elvégezhető húz és dob funkciókat foglalja össze.



5.1 - 6. ábra: A ReFlex program főablaka által támogatott húz és dob technika.

A ➡ jelöli a húzás kezdetének, míg a ➡ a dobás helyét.

1. FCS fájl(ok) dobása csoportból csoportba:  
A fájlok az új csoportba kerülnek.
2. Egyenletszerkesztő dobása csoportra vagy FCS fájlra:  
Az egyenletszerkesztő tartalma átmásolódik a csoport fájljainak vagy az FCS fájl egyenletszerkesztőjébe.
3. Egyenletszerkesztő dobása egyenletszerkesztőre:  
Az egyenletszerkesztő tartalma átmásolódik az egyenletszerkesztőbe.
4. Populáció dobása csoportra vagy FCS fájlra:
  - a. A populáció csomópontja zárva van:  
A populáció teljes kapuhierarchiája másolódik a csoport fájljaira vagy FCS fájlra.
  - b. A populáció csomópontja nyitva van:  
Csak a populáción létrehozott kapuk és statisztikák másolódnak a csoport fájljaira vagy az FCS fájlra.
5. Populáció dobása populációra:
  - a. A populáció csomópontja zárva van:  
A populáció teljes kapuhierarchiája másolódik a populációra.
  - b. A populáció csomópontja nyitva van:  
Csak a populáción létrehozott kapuk és statisztikák másolódnak a populációra.
6. Statisztika(ák) dobása populációra:  
A statisztikák létrejönnek a populáción.
7. Kapu dobása populációra:  
A kapu létrejön a populáción.

## 5.1.6 A ReFlex program fájljai

### 5.1.6.1 Az XML fájlformátum

Az XML (eXtensible Markup Language) egy olyan szöveges fájlformátum, mely támogatja strukturált adatok (táblázat, címjegyzék stb.) létrehozását és tárolását. Az XML tagokat (szavak '<' és '>' jelek között) és attribútumokat (név = "érték" formátumban) használ. A tagok feladata az egyes adatszoportok elválasztása.

Az XML fájl előnyei:

- Szöveges formátumú, így bármely szövegszerkesztővel olvasható, egyszerűbb a hibakeresés szoftverfejlesztés közben.
- Szabályai szigorúak, jól meghatározott létrehozási móddal.
- Bővíthető, platform-független és támogatja a nemzetköziesítést és a lokalizációt, mivel teljes egészében az Unicode-on alapul.

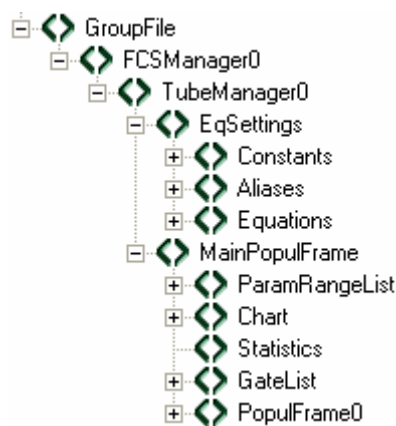
Hátrányai:

- Mivel az XML egy szöveges formátum, és tagokat használ az adatok körülhatárolásához, ezért értelemszerűen egy XML fájl mindig nagyobb lesz, mint egy hasonló adatokat tartalmazó bináris fájl.
- XML szabályai szigorúak, így egy lefelejtett lezáró tag vagy egy attribútum hiányzó idézőjelei az XML fájlt használhatatlanná teszik.

### 5.1.6.2 Adatok tárolása

A program kizárólag az XML fájltypust használja az adatok és objektumok tárolására, melynek gyökéreleme mindig egy csoport (Group), mely tartalmazza a csoportra, valamint a benne lévő összes fájlra és az azokon a felhasználó által definiált minden objektumra (grafikonok, kapuk, statisztikák stb.) vonatkozó adatokat. A fájl szerkezet hierarchikus, fa szerkezetű (5.1 - 7. ábra).

Az első tag a csoporttag (GroupFile), melynek attribútumai a csoport tulajdonságokat tárolják.



5.1 - 7. ábra: **Adatok tárolása XML fájlban.** Mivel az XML fájlformátum hierarchikus szerveződésű, így megfelel kapu és ablakhierarchiák leírására. A fájl gyökerelemét egy GroupFile tag képezi, majd ebbe van beágyazva a teljes ablak és kapuhierarchia, valamint azok tulajdonságait leíró tagok.

A csoporttag tartalmazza a FCS fájl leíró tagokat. Az 5.1 - 7. ábrán látható csoport csak egy FCS fájlt tartalmaz (FCSManager0), mely tartalmazza a fájlra vonatkozó összes releváns információt (fájl neve, elérési útvonal, stb.). Minden FCS leíró tag tartalmaz Tube leíró tagokat is (TubeManager0), melyek száma az FCS fájlba mentett független adatsorok számával kell, hogy megegyezzen. Ez a tag több tagot is magába foglal. Az első tag az egyenletszerkesztő beállításait tartalmazza - konstansok, álnevek, egyenletek -, melyek felsorolás formájában tartalmazzák a felhasználó által definiált értékeket. Ezt a tagot követi a kapuzatlan populációt megjelenítő tag (MainPopulFrame), mely annak összes objektumára (paraméterek, grafikonok beállításai és tulajdonságai, definiált statisztikák, kapuk listája) vonatkozó információt tartalmaz. E tagokat követik a populáció hierarchiában alárendelt kapuk tagjai, melyek az előzővel megegyező formában írják le objektumaikat.

Ez a fájl semmilyen információt sem tartalmaz az alkalmazott kapuk, illetve az alpopulációkon végzett statisztikák eredményével kapcsolatban, hiszen csak az egyes objektumokat, illetve azok tulajdonságait írja le. Ennek következtében ez a fájl templátként használható FCS fájlok analízisére, egyszerűen csak a FCS fájl leíró tag fájlnev és elérési útvonal attribútum értékét kell megváltoztatni, melynek megvalósításához a program grafikus felületet nyújt.

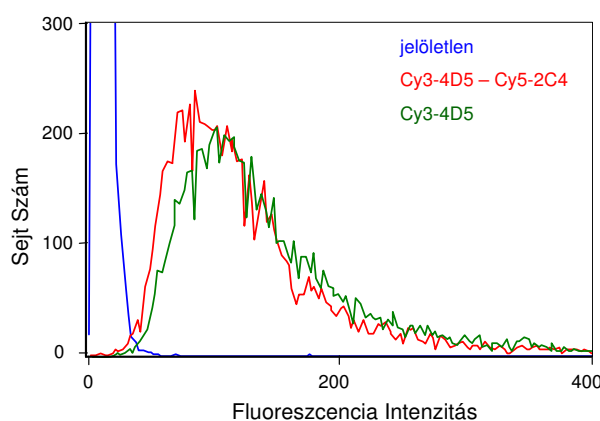
### 5.1.6.3 *Eredmények mentése*

A program az analízis eredményeinek tárolására az Excel (.xls) fájlformátumát használja, melybe a kiválasztott csoport fájljain elvégzett statisztikák eredményét menti az adat azonosításához szükséges információval együtt (FCS fájl neve, elérési útvonala stb.)

A programban ugyancsak lehetőség van a grafikonok elmentésére. A mentés itt is csoportorientált, azaz a kiválasztási paraméterek (Tube száma, populáció neve stb.) alapján a program a kiválasztási feltételeknek eleget tevő populációk grafikonját menti el windows metafile vektorgrafikus képformátumban. A választás azért esett erre a fájl típusra, mivel ez a Windows saját vektorgrafikus képformátuma. A vektorgrafikus formátum azt jelenti, hogy a fájl nem a képpontok színét rögzíti, hanem az egyes képpontok, vonalak, síkidomok koordinátáit. Nagy előnye a bittérképpel vagy Tiff (tagged image format) formátumokkal szemben, hogy a méretezés során nincs információvesztés, azaz a kép kicsinyítése vagy nagyítása következtében a kép nem lesz darabos, és nem tűnnek el róla pontok. További pozitívuma, hogy mivel a Windows saját formátuma, így minden Office alkalmazásban (Word, Excel, PowerPoint) egyszerűen megnyitható és szerkeszthető.

### 5.1.7 Quenching, FCET, AFCET összehasonlítása

A következő kísérletet végeztük el, hogy demonstráljuk a különböző módon meghatározott átlagos energiatranszfer hatékonyságok értéke és jelentése közötti különbséget. Az N87 gyomor tumor sejtek felszínén jelöltük az ErbB2 receptor két epitópját humanizált 4D5 és 2C4 antitestek Fab fragmentumával. Az antitestek Fab fragmentumait Cy3 (donor) és Cy5 (akceptor) festékekhez konjugáltuk, majd megmértük a különböző minták fluoreszcencia intenzitásait (5.1 - 8. ábra) a megfelelő csatornában Becton Dickinson FACSCalibur áramlási citométeren (Becton Dickinson, San Jose, CA). A számítások elvégzéséhez csak donorral, csak akceptorral, donorral és akceptorral egyaránt jelölt mintákra, valamint a háttér meghatározásához jelöletlen mintára volt szükségünk.



5.1 - 8. ábra: **Eltérő módon jelölt N87 gyomor tumor sejtek donor fluoreszcencia intenzitás eloszlása.** A kék, zöld és piros görbék, rendre a jelöletlen, csak donorral, valamint donorral és akceptorral egyaránt jelölt minták donor (Cy3) fluoreszcencia intenzitás eloszlását reprezentálják. A görbék alapján látható, hogy a kétszeresen jelölt (transzferes) minta fluoreszcencia intenzitás átlaga eltolódott a kisebb értékek felé, míg a jelöletlen minta intenzitás átlaga szignifikánsan kisebb, mint a kétszeresen jelölt mintáé, de nem nulla, a sejtek autofluoreszcenciája miatt.

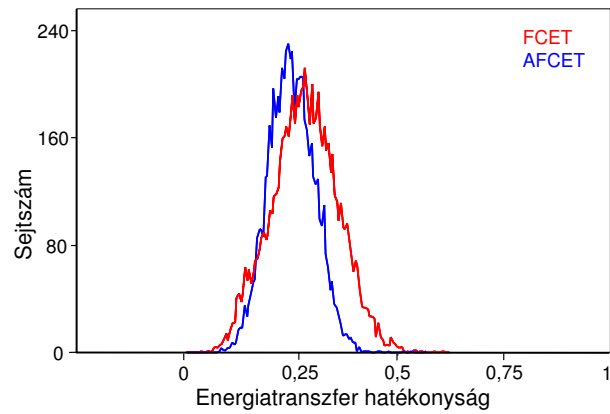
Az energiatranszfer számításának legegyszerűbb és egyben legnagyobb hibával terhelt módja a quenching számítás, amely egy átlagos energiatranszfer hatékonyságot határoz meg a teljes sejtpopulációra. A számításához meghatározzuk a donorral és akceptorral egyaránt jelölt úgynevezett transzferes minta átlagos fluoreszcencia intenzitását a donor csatornában ( $mean(I_{don,acc})$ ), valamint a csak donorral jelölt minta fluoreszcencia intenzitását ugyanebben a csatornában ( $mean(I_{don})$ ). Az  $E(quenching)$  értéke a következő formula alapján határozható meg a számított adatokból:

$$E(quenching) = 1 - \frac{mean(I_{don,acc})}{mean(I_{don})}. \quad (5.1 - 1)$$

Ez a számítás bármelyik kereskedelmi forgalomban lévő szoftver segítségével elvégezhető, mely képes az FCS fájlok kezelésére.

A mért adatok feldolgozásához és a FCET és az AFCET számítások elvégzéséhez az általunk fejlesztett szoftvert használtuk. Eredményeink szerint az  $E(quenching)$  (0,145) módszerrel számított energiatranszfer hatékonyság szignifikánsan eltér a populáció szinten autofluoreszcencia korrigált és a sejtenkénti autofluoreszcenciára korrigált átlagos energiatranszfer értékektől ( $E_{FRET} = 0,282$ ;  $E_{AFRET} = 0,253$ ). Az eltérés magyarázata a számítás módjában keresendő, hiszen az  $E(quenching)$  értéket a fluoreszcencia intenzitások átlagából számítottuk ki. Ezzel szemben a sejtenkénti energiatranszfer számítás esetén sejtenként számított energiatranszfer eloszlást kaptunk, majd ezen az eloszláson számítottuk ki a megfelelő statisztikát.

Bár a FCET és az AFCET metódusok közötti eltérés nem szignifikáns, de az eloszlás szórása a második esetben kisebb (5.1 - 9. ábra), mivel sejtenkénti autofluoreszcencia korrekciót alkalmaztunk. Amennyiben a vizsgált membránkomponens expressziós szintje alacsony, a fluoreszcencia intenzitások összemérhetővé válhatnak a minta (sejtek) autofluoreszcencia intenzitásával. Ilyenkor a sejtenkénti autofluoreszcencia meghatározását követő, az autofluoreszcencia donor, akceptor és FRET csatornába történő átvilágítását figyelembe vevő sejtenkénti autofluoreszcencia korrekcióval a számítások eredménye megbízhatóbb, mivel a nyert eloszlások szórása kisebb.



5.1 - 9. ábra: **Energiaátvitel hisztogramok.** Az ábrán a kék görbe jelöli az AFCET, míg a piros görbe a FCET módszerrel számított energiaátvitel eloszlásokat. A két számítási módszerrel a kapott energiaátvitel eloszlások átlaga szignifikánsan nem tér el, azonban szórási különbség látható (az AFCET módszerrel nyert eloszlás szórási kisebbsége), melynek oka az, hogy az AFCET módszernél sejtenkénti autofluoreszcencia korrekciót alkalmaztunk.

## 5.2 Fotohalványodás analízis program (pbFRET)

A sejtfelszíni heterogenitások, mikrokolóniák tanulmányozása céljából a lehető legjobb felbontással kell a fotohalványodási időállandókat meghatározni, ezért képpontonként (pixel-by-pixel) számítottuk ki a fotohalványodási időállandókat. Egy kép általában  $512 \times 512$  pixelből áll, azaz 262144 fotohalványodási görbét kell külön-külön két exponenciális tagot tartalmazó görbével illeszteni. Ennek a feladatnak az elvégzése kereskedelmi forgalomban kapható programmal lehetetlen (Gadella és Jovin, 1997). Ezért létrehoztunk egy olyan szoftvert, mely alkalmas a pbFRET mérés során felvett képszekvenciák analízisére, továbbá olyan felülettel láttuk el, hogy alkalmas legyen több mérés képszekvenciáinak egymást követő automatikus analízisére, valamint az eredmények statisztikai feldolgozására.

A programfejlesztés elsődleges célja az volt, hogy az adatgyűjtő műszerünk (Attofluor, Zeiss, Oberkochen Germany) által generált képszekvenciákból meghatározhassuk a képpontonkénti fotohalványodási időállandókat. A mérőberendezés különböző méretű ( $64 \times 60$ ,  $128 \times 120$ ,  $256 \times 240$  és  $512 \times 480$ ) képek felvételére és rögzítésére alkalmas, 8 bites felbontásban, raw formátumban. A raw képformátum nem tartalmaz semmilyen fájlleíró részt, a képpontonkénti intenzitás értékeket egymás után “ömlesztve” tartalmazza. A fájlformátum előnye az, hogy a legtöbb képfeldolgozó és adatgyűjtő program segítségével a képek elmenthetők ilyen formátumban. Így ez a program képes más mérőrendszerek által generált fájlok feldolgozására (pl.: konfokális lézerpásztázó mikroszkóp, CLSM).

### 5.2.1 Felhasználói felület

A program főablakában négy gomb található, melyekkel az alprogramok indíthatók, rendre: “Analyze Pixel”, “Multifit”, “Multi Analyze”, valamint “Distribution Viewer”.

*Analyze Pixel alprogram:* Ez az alprogram segít eldönteni az analízis elején, hogy a fotohalványodási görbékre milyen típusú egyenlet illeszthető a legjobban. A felhasználói felületen egy keretben látható a beolvasott képszekvencia első tagja, melyen egy sárga kurzor mozgatásával lehet kiválasztani egy képpontot, melyhez tartozó fotohalványodási és

az arra illesztett görbe a kép mellett egy grafikonon jelenik meg. A felületen található egy táblázat is, ahol a kiindulási illesztési paraméterek adhatók meg, valamint az illesztett görbe illesztési paraméterei jelennek meg. Az alprogramból továbbá meg lehet hívni a "Movie" alprogramot, mely a képszekvencia tagjait időrendi sorrendben jeleníti meg, ezáltal lehetővé téve az adatgyűjtés során a sejtek esetleges elmozdulásainak észlelését.

*Multifit alprogram:* Az összes mérés minden képszekvenciájának fotonalványodási görbéinek illesztése meglehetősen időigényes folyamat, ezért van szükség erre az alprogramra, melyben háttéranalízist lehet végrehajtani. Ekkor a képszekvenciák elérési útvonalainak megadása után az alprogram automatikusan végrehajtja az illesztési folyamatot minden egyes képszekvenciára a beállított illesztési paraméterek figyelembevételével. Az illesztések eredményét a program egy tabulátorral szeparált ASCII szövegfájlba menti későbbi feldolgozásra, melynek szerkezete 5.2 - 1. ábrán látható.

| X pos. | Y pos. | < $\tau$ > | mse.  | A1       | $\tau_1$ | ... |
|--------|--------|------------|-------|----------|----------|-----|
| 63     | 383    | 0.183      | 2.466 | 10940.93 | 0.173    |     |
| 66     | 385    | 2.781      | 4.468 | 72.266   | 1.096    |     |
| 66     | 415    | 2.234      | 3.557 | 88.361   | 1.498    |     |
| 67     | 382    | 1.148      | 3.991 | 186.712  | 0.447    |     |
| 67     | 384    | 2.88       | 5.104 | 51.189   | 0.977    |     |
| 67     | 385    | 1.919      | 3.238 | 104.266  | 0.548    |     |
| 67     | 396    | 2.175      | 4.254 | 92.747   | 1.147    |     |
| 67     | 397    | 1.923      | 6.43  | 98.712   | 0.954    |     |
| 67     | 415    | 1.539      | 2.942 | 113.426  | 0.841    |     |
| 67     | 416    | 2.526      | 2.691 | 82.68    | 1.403    |     |
| 68     | 380    | 0.143      | 3.508 | 29246.72 | 0.136    |     |
| 68     | 381    | 2.7        | 2.332 | 73.304   | 1.304    |     |
| 68     | 393    | 2.657      | 5.667 | 88.205   | 1.344    |     |
| 68     | 394    | 2.612      | 5.596 | 72.547   | 1.407    |     |
| 68     | 395    | 2.173      | 3.739 | 80.578   | 0.808    |     |
| 68     | 399    | 4.208      | 5.665 | 75.813   | 2.122    |     |
| 68     | 400    | 2.752      | 3.347 | 81.888   | 1.245    |     |
| ...    | ...    | ...        | ...   | ...      | ...      | ... |

5.2 - 1. ábra: A "Multifit" alprogram által generált eredményfájl szerkezete. A képpontonkénti illesztések paramétereit a program egy tabulátorral elválasztott listafájlba írja. Az oszlopok a képpont X és Y pozícióját, az átlagos fotonalványodási állandót, az illesztés hibáját, valamint az illesztett exponenciális függvény paramétereit és a pont kezdeti intenzitását tartalmazzák.

Az illesztési folyamat további gyorsítása érdekében, minden képszekvenciánál meg kell adni egy küszöbintenzitás értéket, melynél alacsonyabb kezdeti intenzitással rendelkező fotonalványodási görbéket a program nem illeszt meg. Ezzel a funkcióval lehet kijelölni a kép biológiai szempontból releváns régióit, azaz a fluoreszcensen jelölt sejtmembránt vagy egyéb sejtalkotót.

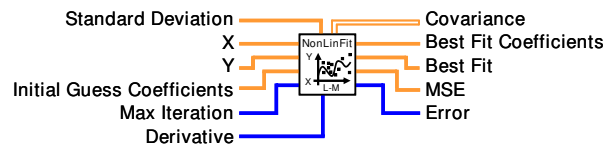
*Multi Analyze alprogram:* Ebben az alprogramban az illesztés eredménye ábrázolható oly módon, hogy a felületen a beolvasott képszekvencia első képén két kurzor

segítségével kiválasztjuk a vizsgálni kívánt területet, majd a képszekvencia első képe alatt jelenik meg a kiválasztott illesztési paraméter színskódolt formában (paraméter térkép). Ez azt jelenti, hogy minden egyes pixelhez tartozó paraméter értékhez az algoritmus hozzárendel egy színárnyalatot (feketétől a kéken át a fehérig) oly módon, hogy a paraméter legkisebb lehetséges értékéhez (általában 0) a feketét, míg legnagyobb értékéhez a fehér színt társítja, és a megfelelő képpontot a paraméter térképen a paraméternek megfelelő színűre színezi. Az alprogram segítségével az analízis eredménye tovább finomítható számos paraméter figyelembevételével (pl.: maximális intenzitás érték, maximális illesztési hiba stb.), majd az eredményeket a program egy ASCII szövegfájlba írja.

*Distribution Viewer alprogram:* Az egy mintához tartozó képszekvenciák analízisének eredményeit ebben az alprogramban lehet egy adathalmazba rendezni, majd az illesztési paramétereket hisztogram formájában ábrázolni. A hisztogramokra Gauss függvény illeszthető, melynek a paraméterei a hisztogramon jelennek meg. A fotohalványodási időállandó értékek kapuzhatók három különböző színű kapu segítségével. A kapuzott értékek a megfelelő képszekvenciák első képén jelennek meg képpont helyesen, a kapu színének a fotohalványodási időállandó értékétől függő árnyalatával. A generált hisztogramok valamint a kapuzott képek elmenthetők 24-bites felbontású bittérkép formájában. A színes kapuzás segítségével különíthetők el és jeleníthetők meg a sejtmembránban mért fotohalványodási időállandó értékek.

### **5.2.2 Illesztő algoritmus**

A program a Levenberg-Marquardt nemlineáris illesztő algoritmust használja az intenzitás lecsengés görbék illesztéséhez. Az illesztés alapját a  $\chi^2$  merit, függvény minimalizációja képezi, mely alapján az eljárás megtalálja a legjobban illeszkedő függvény együtthatóit. A minimalizáció egy iterációs folyamat, mely az együttható becslésének megadása után addig változtatja azok értékeit, míg a  $\chi^2$  függvény nem vagy számottevően nem csökken tovább (William és mtsai, 2005). A LabVIEW fejlesztőkörnyezet tartalmaz egy matematikai VI (virtual instrument) csomagot, melyben a Levenberg-Marquardt subVI is megtalálható (5.2 - 2 ábra).



5.2 - 2. ábra: A Levenberg-Marquardt subVI ikonja a LabVIEW fejlesztő környezetben. Az objektumok, struktúrák, és szubrutinok elrejtethők a LabVIEW fejlesztő környezetben subVI-okba, melyek a fejlesztő felületen egy ikonként jelennek meg. Minden egyes subVI rendelkezhet tetszőleges számú ki- és bemenő paraméterrel, melyeket különböző színű lábak jelölnek, a paraméter típusától függően. A Levenberg-Marquardt subVI-nak 6 bemenő (az ikon baloldalán) és 5 kimenő (az ikon jobb oldalán) paramétere van.

A VI bemenő paraméterei a következők:

1. Standard deviation: standard deviáció tömb,  $\sigma[i]$  az  $(x[i], y[i])$  adat standard deviációja. Az alapérték 1,0, ha a standard deviációk értéke mind egyforma vagy nem ismertek.
2. X és Y: Az adatpontok tömbje
3. Initial Guess Coefficients: a paraméterek kiindulási értékeinek tömbje.
4. Max iteration: Az iterációk maximális száma.
5. Derivative: Az illesztendő formula derivált függvényei minden egyes változó szerint, melyet egy grafikus matematikai egyenletmegoldóban lehet megadni ("Formula Node", graphical mathematical expression evaluator) a blokkdiagramban.

A VI kimenő paraméterei a következők:

1. Covariance: A kovariancia értékek mátrixa.
2. Best fit coefficients: a legjobban illeszkedő függvényparaméterek halmaza, melyekkel a  $\chi^2$  függvénynek minimuma van. A  $\chi^2$  az alábbi módon van definiálva:

$$\chi^2 = \sum_{i=0}^{n-1} \left( \frac{y_i - f(x_i, a_1 \dots a_m)}{\sigma_i} \right)^2, \quad (5.2 - 1)$$

3. Best fit: az illesztett adatok tömbje. Az értékeket az illesztési paraméterek alapján generálja a subVI.
4. MSE: az átlagos négyzetes hiba.
5. Error: VI hiba visszatérési pont.

Részletes információ erről a VI-ról a LabVIEW súgójában (LabVIEW™ Help, National Instruments Corporation, Austin TX) található.

### **5.2.3 MHC I és MHC II molekulák alegységeinek proximitás viszonyainak vizsgálata**

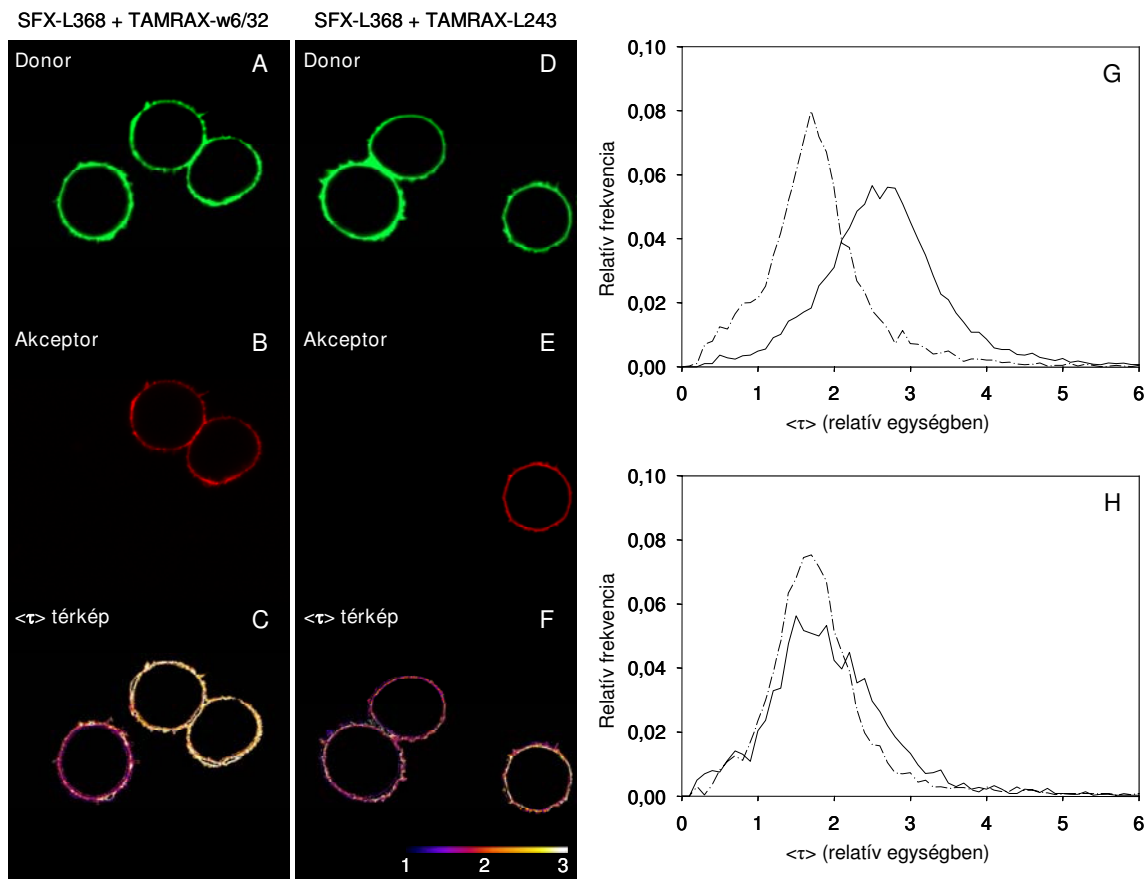
A program működésének bemutatására megmértük a FRET hatékonyság értékeit JY humán B limfoblasztoid sejtek membránjában az MHC I két lánc ( $\beta_2m$ , nehézlánc), valamint a MHC I molekulák ( $\beta_2m$ ) és az MHC II molekulák között. A fehérjéket SFX (donor) és TAMRAX (akceptor) festékekkel jelzett monoklonális antitestekkel jelöltük meg. A következő mintákat készítettük el:

- 1, JY sejtek donorral jelzett L368-cal jelölve
- 2, JY sejtek donorral jelzett L368-cal és akceptorral jelzett W6/32-vel jelölve
- 3, JY sejtek donorral jelzett L368-cal és akceptorral jelzett L243-mal jelölve
- 4, JY sejtek akceptorral konjugált L243-mal jelölve
- 5, jelöletlen JY sejtek

Mivel a fotohalványodás igen érzékeny az oldott oxigén koncentrációjára, a mérés során a csak donorral és a donorral és akceptorral egyaránt jelölt minták keverékét használtuk, hogy a fotohalványodás során biztosítsuk mindkét minta azonos oxigéntartalmát. Annak érdekében, hogy az egyszeresen, csak donorral jelölt sejteket meg tudjuk különböztetni a kétszeresen jelölt (transzferes) minta sejtjeitől, a mérés végén a vizsgált területről az akceptor emissziós csatornában ( $\lambda_{ex} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} > 580 \text{ nm}$ ) felvettünk egy-egy képet. A csak akceptorral jelölt mintát arra használtuk, hogy ellenőrizzük, hogy az akceptor intenzitás változott-e a fotohalványodási folyamat során. Amennyiben az akceptor intenzitás számottevően csökken, az azt jelenti, hogy az akceptor molekulák is fotohalványíthatók. Az akceptor fotohalványodás következtében elveszti energia elnyelő képességét, az energiáttranszfer hatékonyság lecsökken, és a mért fotohalványodási időállandókból nem lehet a molekulák átlagos távolságára következtetni. Az ötödik mintát háttér mérésére használtuk.

A méréseket Zeiss LSM 510 mikroszkópon végeztük el (lézerek: Ar ion lézer, 488nm, donorgerjesztés; He-Ne lézer, 543 nm, akceptorgerjesztés) annak érdekében, hogy

demonstráljuk, hogy a programunk más mérőrendszereken elvégzett kísérletek értékelésére is alkalmas. Minden mintáról négy képszekvenciát (mindegyiken 2-3 sejt, mintánként kb. 10 sejt) vettünk fel. Sejtenként, a sejt méretétől függően 600-1500 fotohalványodási időállandót határoztunk meg, amely azt jelenti, hogy mintánként átlagosan 6000 fotohalványodási időállandó értéket kaptunk. Az eredmények hisztogramjai, reprezentatív képhármasokkal az 5.2 - 3. ábrán láthatók. A képhármasokon az első kép a donor, a második az akceptor csatornában felvett kép, míg a harmadik a számított fotohalványodási időállandó ("tau") térkép a kétszeresen jelölt sejtekre.



5.2 - 3. ábra: **Reprezentatív pbFRET mérés eredménye.** Az MHC I két lánc (β2m és nehéz lánc) SFX-L368 és TAMRAX-W6/32 monoklonális antitestekkel, míg az MHC II TAMRAX-L243-mal lett jelölve JY humán B limfoma sejteken. SFX a donor, a TAMRAX pedig az akceptor fluorofor molekula. A fotonalványodás mérést a csak donorról, valamint donorról és akceptorral egyaránt jelölt minták keverékén végeztük el.

**A, D** képek: A fotonalványodás első felvételei; **B, E**: a fotonalványodás után az akceptor csatornában készített felvételek; **C, F**: színekódolt fotonalványodási térkép ('tau' térkép); **G, H**: A fotonalványodási időállandók hisztogramjai.

Az energiáttranszfer miatt a donorról és akceptorral egyaránt jelölt minták hisztogramjai a nagyobb értékek felé tolódtak el a csak donorról jelölt mintákéhoz képest, mely a "tau" térképen is jól látható. A G esetben az eltolódás jóval nagyobb mértékű, mint a H esetben, mivel az MHC I molekula két lánc közelebb található egymáshoz, mint a β2m és MHC II, és ennek következtében az energiáttranszfer valószínűsége nagyobb.

A fotonalványodási időállandó értékek az 1-es minta csak donorról jelölt sejtjei esetében függetlenek voltak attól, hogy melyik keverékben lettek lemerve, az 1-es és 2-es minta keverékében  $1,65 \pm 0,48$  adódott, míg a 1-es és 3-as minta keverékében  $1,69 \pm 0,35$ . (Az időállandók mértékegysége a „kép” (frame), tehát a  $\tau$  azt jelenti, hogy a fluoreszcencia intenzitás az  $\tau$ -dik kép felvételekor csökkent az  $1/e$ -ad részére.) A transzferes minták esetén azonban az eltérés jelentősebb. Az átlagos fotonalványodási időállandó értékek  $2,62 \pm 0,56$ , illetve  $1,78 \pm 0,56$  a 2-es és 3-as mintákra, valamint a számított energiáttranszfer hatékonyság értékek rendre 35,5% és 6,9% voltak.

### 5.3 Az elektronmikroszkópos képfeldolgozó program (ClickOnGold)

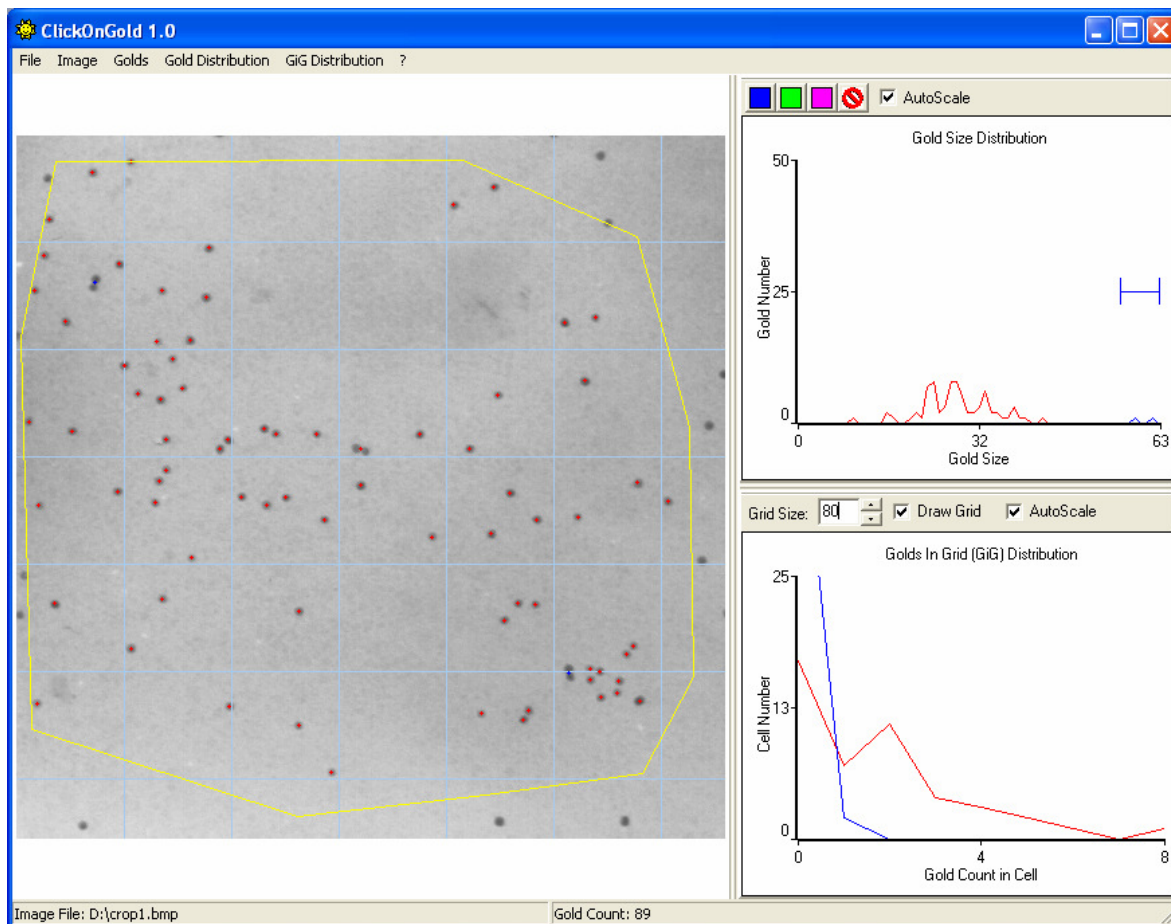
Az elektronmikroszkópiás képek másodrendű paraméterek becslésén alapuló statisztikai analízisére alkalmas program a rendelkezésünkre állt (Philimonenko és *mtsai*, 2000), azonban az elsőrendű paraméter alapján történő analízishez, valamint az aranygömbök helyzetének meghatározására alkalmas szoftver nem. Ezért kifejlesztettünk egy olyan szoftvert, mely alkalmas a digitalizált elektronmikroszkópos felvételeken az aranygömbök helyzetének meghatározására, valamint azok eloszlásának elsőrendű paraméterek alapján történő analízisére.

#### 5.3.1 Felhasználói felület

A felhasználói felület három részre osztható (5.3 - 1. ábra). A jobb oldalon a beolvasott 24 bites szürkeskálájú kép látható, mely a programba beépített funkciók segítségével nagyítható, kicsinyíthető, valamint a látható terület egér segítségével mozgatható. A kép beolvasása után a program automatikusan megkeresi az aranygömbök helyét, és piros színnel megjelöli azokat. A képmegjelenítő komponens lehetővé teszi, hogy a felhasználó egy zárt poligon segítségével kijelölje a kép azon részét, melyen az aranygömböket vizsgálni kívánja. Ugyancsak lehetőség nyílik a már megtalált foltok törlésére, valamint új foltok megjelölésére.

Az ablak jobb felső részén egy grafikon látható, melyen a megtalált foltok méret szerinti hisztogramja jelenik meg. A hisztogramon a felhasználó méret szerint kapuzhat három eltérő színű kapu segítségével, majd a kapuzott foltok jelölése a kapu színére vált. Ezzel a funkcióval, többféle aranygömbbel történő jelölés esetén, az eltérő méretű aranygömböket választhatjuk el egymástól.

Az aranygömb méret hisztogram alatt egy másik hisztogram látható, mely csak akkor aktív, ha a rácsrajzolást aktivizáljuk. Ebben az esetben a szoftver meghatározza, hogy az egyes foltok a rács melyik cellájába esnek, majd a cellák aranygömb számának hisztogramját jeleníti meg ezen a grafikonon, a kapuk színének megfelelően.



5.3 - 1. ábra: A **ClickOnGold** program főablak. A felület három részre osztható. Az ablak baloldali területe a kép megjelenítésére szolgál, míg a jobboldalon az aranygömbök méretszerinti eloszlása, valamint alatta a képre rajzolt rácsozat celláinak aranygömb szám eloszlása látható. A program funkciói megtalálhatók mind az ablak menüjében, mind a hisztogramok felett elhelyezett eszköztárakon. Az egyes funkciók leírása a súgóban megtalálható.

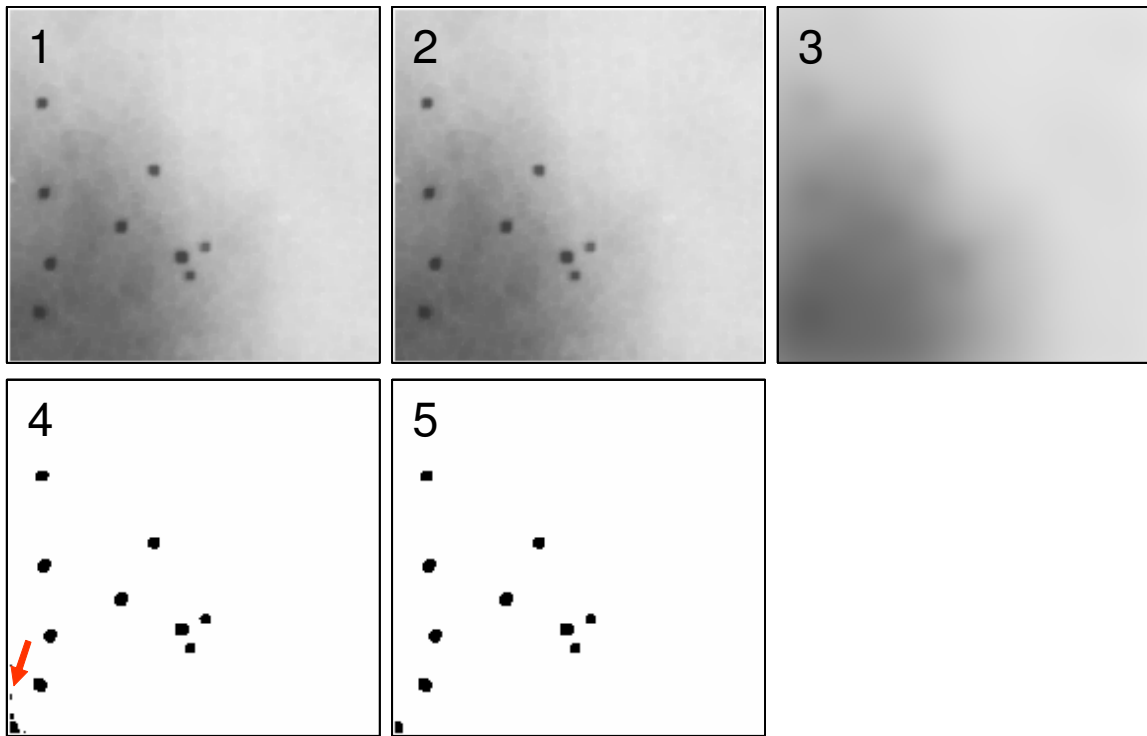
### 5.3.2 Képfeldolgozás, ProcessImage metódus

A foltok megtalálásának kulcsa az, hogy a képet át kell úgy alakítani, hogy minden más felesleges részlet és információ eltűnjön róla (pl. a sejtmembrán különböző vastagsága miatt látható árnyalatok, sejt széle stb.), csak az aranygömböket reprezentáló foltok maradjanak meg. Azaz a képen olyan transzformációt kell végrehajtani, hogy a foltok pixelei feketék, minden más fehér legyen (vagy fordítva).

A probléma egyik megoldásához figyelembe vesszük, hogy az aranygömbök képe a legsötétebb a képen, így a kép invertálása után egy egyszerű háttérlevonás is eredményre vezethet, ha a kép többi része homogén intenzitású. Problémát az apró részletek, illetve a sejtmembrán különböző vastagsága jelenti, melynek következtében a háttér nem homogén, valamint hogy a háttérlevonást a felhasználónak kell végrehajtani, azaz nem automatikus.

A feldolgozás automatizálásához az inhomogén megvilágítás mellett készült képek intenzitás korrekciójára (Illumination Flattening) használt eljáráshoz hasonló módszert kell követnünk (Smith, 1999). A módszer lényege röviden a következő. A képen elsimítjuk a részleteket egy nagyméretű (a kép egy ötöde) Gauss szűrő kernelt (lásd C kiegészítés) alkalmazva. Az így nyert képen a részletek eltűnnek, és a nyert kép csak a megvilágítás intenzitás eloszlásáról hordoz becsült információt. Ezután az így nyert intenzitás képpel elosztva az eredeti képet megkapjuk az intenzitás korrigált képet.

A mi esetünkben azonban nem az inhomogén megvilágítás korrekciójára, hanem pont ellenkezőleg, az alacsony intenzitású, a háttértől elütő részletek kiemelésére van szükség. Így a simított képet osztjuk el az eredetivel képpontról-képpontra. A kép simítása során gyakorlatilag az aranygömböket reprezentáló intenzitásgödröket töltjük fel a környező pixelek intenzitásának átlagával. Az osztás során az aranygömbök helyén megnövekedett intenzitású pixelek értékét osztjuk egy alacsonyabb intenzitású pixel értékével, minek következtében a hányados értéke biztos, hogy nagyobb lesz mint egy. A számítás során azon pixelek feketék lesznek, ahol a hányados nagyobb mint 1,3, illetve fehér, ahol ennél kisebb. Az 1,3 egy empirikus szám, melyhez sok elektronmikroszkópos kép elemzése alapján, próbálkozás útján jutottunk el. Azért kell egynél nagyobb számot választani az elemzés során, mert a simítás során a háttér pixeleinek intenzitása is változik, így előfordulhat, hogy egy háttérxixel intenzitása kismértékben megnövekszik, és a hányados kicsivel nagyobb lesz mint 1, aranygömb jelenlététől függetlenül is.



5.3 - 2. ábra: **Képfeldolgozás lépései.** 1. eredeti kép, 2. morfológia zárás, 3. Gauss simítás, 4. osztás (2. és 3. kép hányadosa) utáni kép, 5. az osztott kép (4) zárás után. A Gauss simítást követően az aranygömbök, míg a zárást követően a kisméretű fekete pontok tűnek el (piros nyíl által mutatott pont).

A kép feldolgozása során (5.3 - 2. ábra) első lépésként a rutin egy morfológiai zárást hajt végre (C kiegészítés), hogy a kisméretű egy-két pixel nagyságú sötét pontok eltűnjenek a képről. Ezt a simítás követi, amely során az aranygömbök a háttérbe simulnak. Majd a két kép hányadosának képpontonkénti elemzésével nyerjük a végső képet, melyen a foltkeresés végrehajtható.

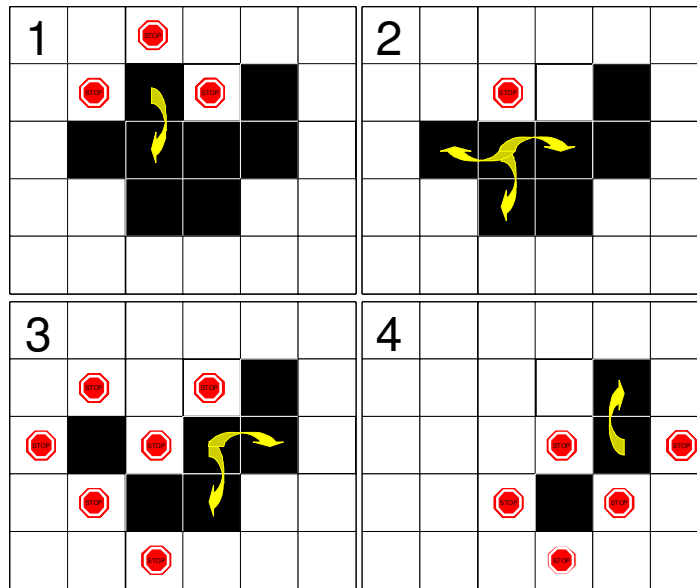
### 5.3.3 Foltkeresés algoritmus

A kép feldolgozása után a feldolgozott képen már csak fekete és fehér pixelek találhatóak. A morfológiai zárásnak köszönhetően az aranygömböket egy-egy fekete folt reprezentálja, melyek széle nem vagy csak kis mértékben töredezett.

A fekete foltok megtalálásához mindenekelőtt definiálni kell, hogy mit tekintünk egy foltnak. A program egy folthoz tartozónak tekinti azokat a fekete képpontokat, melyek a széleiken legalább egy a folthoz tartozó fekete képpont szomszédal rendelkeznek, tehát minden egyes pixel esetében (két dimenziós képen) 4 szomszédpixelt kell megvizsgálni (4-szeres összeköttetés, „4-connectivity”). A foltok megtalálásához a kép minden egyes sorának minden egyes pontját balról jobbra haladva meg kell vizsgálni (természetesen lehetne a másik irányból is). Amennyiben a képpont fekete, úgy egy folt szélénél járunk. Ezután ha fehér képpont következik, akkor a foltot elhagytuk. Azonban egyazon folt több sort is lefedhet, melyet ily módon többször detektálna az algoritmus.

A probléma egyik lehetséges megoldása az, hogy a szélső pontoknál meg kell vizsgálni, hogy az éppen vizsgált pont, vagy valamelyik tőle jobbra lévő fekete képpont szomszédja tartalmaz-e közvetlen fekete szomszédot a kép előző sorában, hiszen ha tartalmaz, akkor ez a folt már regisztrálva lett. Ezzel a módszerrel azonban azok az alakzatok, amelyek több, a kép tetejének irányába mutató csúccsal is rendelkeznek többször detektálódnak.

Az eredményre vezető megoldás, mellyel tetszőleges alakú folt detektálható a következő (5.3 - 3. ábra). A kép minden egyes sorának minden egyes pixelét megvizsgáljuk. Amennyiben a képpont fekete, úgy folthoz értünk. Ezután az algoritmus a megtalált képpontot fehérre festi, majd minden egyes közvetlen szomszédos képpontot megvizsgál, és amennyiben fekete, úgy azokat is fehérre festi stb. Mindezt addig folytatjuk, míg a folt összes közvetlen szomszédos pixele fehér nem lesz, vagy el nem érjük a kép szélét.



5.3 - 3. ábra: **Foltkeresés algoritmus**a. Az első pont megtalálása után, a szomszédok felderítése, majd azok szomszédjának felderítése stb. következnek. A stoptáblák azokat a helyeket jelölik, ahol a szomszédkeresés leáll.

Ennek a módszernek az előnye az, hogy viszonylag gyors és a detektált folt minden egyes képpontjának koordinátáját rögzíteni lehet a keresés során, így a folt területe és a középpontja meghatározható. Az algoritmus hatékony és gyors, hiszen a legrosszabb esetben is, mikor az egész kép egyetlen folt (minden pixel fekete), az algoritmus minden képpontot kétszer vizsgál meg.

### 5.3.4 Cellák aranyömb szám eloszlásának meghatározása

A hisztogram generálásához az aranyömbök pozíciójának ismeretében minden egyes aranyömbre meghatározzuk, hogy a képre kifeszített rács melyik cellájába esik, majd, hogy a különböző aranyömbszámú cellákból hány darab található a képen. Végül a cellák számát ábrázoljuk az aranyömb szám függvényében. A rács celláinak méretét a felhasználó állítja be. Ezt célszerű úgy megválasztani, hogy az egy cellába eső átlagos aranyömbszám kb. 5-10 legyen, így általában biztosítható az, hogy egy képre kellő számú cella férjen, és az egy cellában található aranyömbök száma ne legyen túl alacsony.

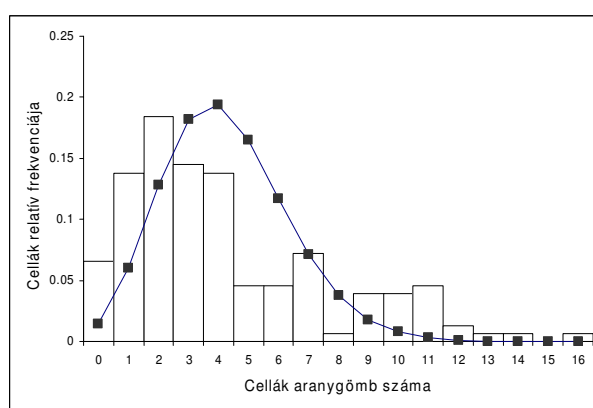
Első lépésként egy  $n \times m$  nagyságú kétdimenziós tömböt kell létrehozni, melynek,  $[i, j]$ -dik eleme, a képre kifeszített rács  $[i, j]$ -dik cellájának aranyömbtartalma. Kezdetben a tömb minden eleme zérus. Annak meghatározásához, hogy egy  $(x, y)$  kép koordinátákkal rendelkező aranyömb melyik cellába esik, el kell osztani mindkét koordinátát a cella

szélességével, illetve magasságával (a programban a kettő megegyezik), majd a kapott eredményeket felfelé kell kerekíteni. Az így nyert két számérték megadja annak a cellának illetve a tömb megfelelő elemének indexeit, melyben a gömb található. A megfelelő indexű tömbelem értékét növelni kell eggyel. A fenti műveletet minden aranygömbre végrehajtva, megkapjuk a cellák aranygömb tartalmát. Ezután egy újabb egydimenziós tömböt kell létrehozni, melynek elemszáma megegyezik a cellák maximális aranygömb tartalmával. Majd az egydimenziós tömb azon elemének értékét, melynek indexe megegyezik a vizsgált cella aranygömb számával, megnöveljük eggyel. Az összes cellára elvégezve a fenti műveletet az egydimenziós tömb a cellák aranygömb szám eloszlás hisztogramját fogja tartalmazni, ahol a tömb indexe adja a gömbök számát, míg a tömb megfelelő indexű eleme a cellák számát.

### 5.3.5 Kv1.3 ioncsatornák sejt felszíni eloszlásának vizsgálata

Immuno-gold technikával vizsgáltuk a Kv1.3 ioncsatornák sejt felszíni eloszlását Jurkat sejtek felszínén, első és másodrendű paraméterek alapján.

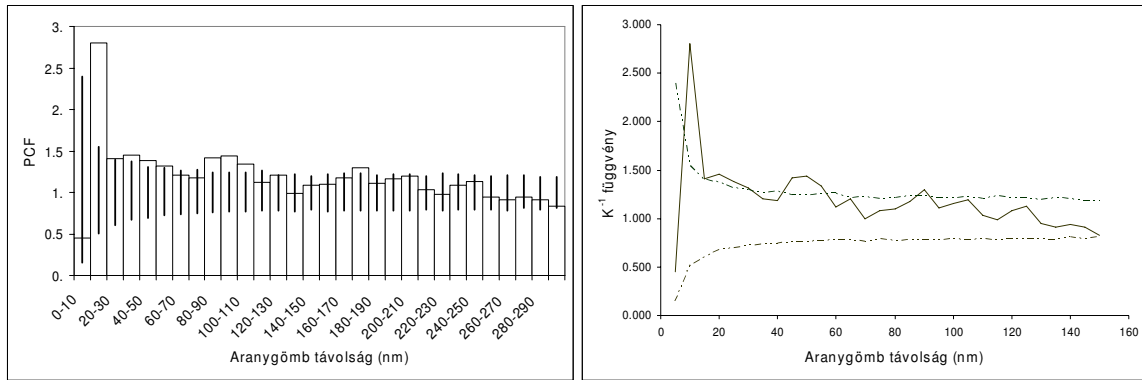
Az elektronmikroszkópos felvételek digitalizálása után az általunk fejlesztett program segítségével meghatároztuk az aranygömbök helyzetét, valamint a megfelelő méretű rácsozat kiválasztása után (kb. 5 aranygömb / cella) a cellák aranygömb szám eloszlását (5.3 - 4. ábra).



5.3 - 4. ábra: **Immuno-golddal jelölt Kv1.3 ioncsatornák eloszlásának vizsgálata.** A digitalizált elektronmikroszkópos képeken meghatároztuk az aranygömbök pozícióját, majd 120×120 pixel cellanagyságú rácsozaton meghatároztuk az egyes cellák aranygömb tartalmát. A grafikon oszlopdiagramja a cellák aranygömb szám eloszlása, a —■— vonal pedig a cellák átlagos aranygömb száma ( $\lambda = 4,25$ ) alapján illesztett Poisson eloszlás histogramja. Az 5%-os szignifikancia szinten elvégzett  $\chi^2$  teszt igazolja, hogy a megfigyelt eloszlás eltér a teljesen véletlenszerű ponteloszlástól.

Az elsőrendű paramétervizsgálat egyértelműen bizonyítja, hogy a Kv1.3 ioncsatornák sejt felszíni eloszlása nem egyenletes, hiszen a cellák aranygömb szám histogramja, valamint a cellák átlagos aranygömb száma ( $\lambda = 4.25$ ) alapján generált Poisson eloszlás szignifikánsan eltér egymástól 5%-os szignifikancia szint mellett.

A csatornák aggregáció mértékének meghatározásához az eloszlás másodrendű paramétereit kell megvizsgálni. Az antigéneloszlás másodrendű paraméterek alapján történő vizsgálatát az Anatoly A. Philimonenko és munkatársai (Philimonenko és *mtsai*, 2000) által kifejlesztett program segítségével végeztük el. A szoftverrel megbecsültük a  $K^{-1}$  és a PCF függvényeket (5.3 - 5. ábra).



5.3 - 5. ábra: **Immuno-golddal jelölt Kv1.3 ioncsatornák eloszlásának vizsgálata, PCF és  $K^{-1}$  függvények becslése.** A Kv1.3 ioncsatornák a Jurkat sejtek felszínén kolóniákat hoznak létre, mely mind a PCF és a  $K^{-1}$  függvények grafikonján látható. Mindkét függvény esetében 0-10, valamint 20 nm-es távolságokra kiugróan alacsony, ill. magas értékeket kaptunk. 0-10 nm-es távolság esetén a függvények alacsony értéke az aranyömbök méretével magyarázható, hiszen a 10 nm-es aranyömbök esetén, ezen távolságon belül a szomszédos aranyömbök száma nulla. A 20-30 nm-es tartományban látható magas PCF és  $K^{-1}$  érték az aranyömbök, valamint a jelölés során használt antitestek között fellépő, másodrendű kölcsönhatásokkal magyarázható. A  $K^{-1}$  függvény random ponteloszlásra vonatkozó 95%-os konfidencia intervallumát Monte Carlo szimulációval határoztuk meg, melyek alsó és felső értékeit a jobboldali ábrán szaggatott vonal jelöli.

A párcorrelációs és  $K^{-1}$  függvények szignifikánsan eltérnek a random ponteloszlásra meghatározott értékektől, 40-60, valamint 80-100 nm-es tartományban, mely alapján megállapíthatjuk, hogy a Kv1.3 ioncsatornák sejt felszíni eloszlása nem véletlenszerű, közöttük olyan kölcsönhatások lépnek fel, melynek következtében klasztereket, aggregátumokat hoznak létre a sejt felszínén.

## 6. Összefoglalás

Munkánk során célunk volt bemutatni három sejtfelszíni fehérje proximitás viszonyainak tanulmányozására alkalmas módszert, elsősorban azok elméleti fizikai hátterének, valamint a nyerhető információk matematikai feldolgozásának és az eredmények interpretálásának módját. Továbbá célunk volt mindhárom módszer adatfeldolgozásának szoftveres hátterének megteremtése, illetve a meglévő programok kiegészítése az adatok feldolgozását segítő programok létrehozásával. Végezetül mindhárom módszert alkalmaztuk egy-egy biológiai kérdés megválaszolására.

Eredményeink a következők:

- Kifejlesztettünk egy programot, melynek segítségével egyszerre több áramlási citometriás adatsor is analizálható párhuzamosan, valamint alkalmas a felhasználó által definiált aritmetikai kifejezések értékének sejtenkénti meghatározására és sorozatos alkalmazására. A programhoz olyan felhasználói felületet terveztünk, és olyan funkciókat implementáltunk, melyek segítik az analízis folyamatát, valamint az adatok áttekinthető elrendezését, az eredmények vizualizációját és értelmezését. Bemutattuk a program használatát az N87 gyomor tumor sejteken az ErbB2 sejtfelszíni receptorok két epitópja között mért energiatranszfer számításán keresztül, valamint összehasonlítottuk a korábban kidolgozott transzferszámítási módszereket.
- Kifejlesztettünk egy szoftvercsomagot a fotohalványodási képsorozatok értékeléséhez, melynek segítségével leegyszerűsödik a nyert adatok feldolgozása és az eredmények interpretálása. Megvizsgáltuk az MHC I és MHC II molekulák alegységeinek proximitásviszonyait JY sejteken a mért fotohalványodási képszekvenciák analízisével.
- Kifejlesztettünk egy szoftvert az immuno-gold jelölt sejtfelszíni antigének helyzetének meghatározására elektronmikroszkópos képeken és elvégeztük Jurkat sejtek felszínén a Kv1.3 ioncsatornák eloszlásanalízisét első- és másodrendű paraméterek alapján.

## 7. Kiegészítések

### 7.1 A: FCS fájl felépítése

Áramlási citometriás standard fájlok (Flow Cytometric Standard, FCS) négy fő részre oszthatók (Data File Standard Committee, 1990; Seamer és *mtsai*, 1997). Az első rész a HEADER, melynek első 10 bájta a FCS azonosítót tartalmazza (pl.: FCS2.0 + 4 db szóközkarakter). A következő 2×8 bájta tartalmazza a fájl következő nagy egységére, az úgynevezett TEXT rész elejére és végére mutató fájlmutatót ASCII formátumban. A HEADER minden információja ASCII formátumban szerepel. Az ezt követő 2×8 bájta a mért paraméterek sejtenként mért értékét tartalmazó DATA rész elejére és végére, míg az ezt követő 2×8 bájta az opcionális ANALYSIS rész elejére és végére mutató fájlmutatót tartalmazza.

A következő fő egység a TEXT rész, mely a méréssel és a mért paraméterekkel kapcsolatos információkat tartalmazza ASCII formátumban. Minden egyes bejegyzés két részből, kulcsszóból (KEYWORD) és a hozzá tartozó értékből (VALUE) áll. A TEXT rész első bájta kódolja az elválasztó karaktert, mely az egyes bejegyzéseket választja el egymástól. Az összetartozó értékpárok között találunk olyanokat, melyek az FC standard részét képezik, ezek \$-el kezdődnek (7.1 - 1. táblázat). A kötelező kulcsszavak nélkül az FCS fájl nem olvasható, így ezeknek a fájl TEXT részében szerepelniük kell, míg az opcionális kulcsszavak (7.1 - 2. táblázat) léte nem esszenciális az adatolvasás szempontjából. Az általunk fejlesztett szoftver feladata elsősorban a "listmode" fájlok megnyitása, és az adatok feldolgozása, így az opcionális kulcsszavak közül csak azokat a kulcsszavakat olvassa, melyek ilyen típusú fájlokban előfordulhatnak.

A TEXT részt követi a DATA adatokat kódoló rész. Ebben a részben található a sejteken mért adatok "ömlesztett" (listmode) formában, amely azt jelenti, hogy az egyes sejteken mért paraméterek a TEXT részben megadott sorrendben követik egymást. A DATA rész lehet különböző, bináris és karakter formátumban is elmentve, melyre vonatkozó információt a TEXT rész \$DATATYPE kulcsszava kódolja.

Az FCS fájlok tartalmazhatnak további, a mérést végző szoftver beállításaira és/vagy az adatok értékelésére vonatkozó információkat az ANALYSIS részben. Mivel ez a rész szoftverspecifikus és opcionális, így ezzel a résszel továbbiakban nem foglalkozunk.

7.1 - 1. táblázat: Az FC standardban definiált kötelező kulcsszavakat és azok lehetséges értékei.

| <b>Kötelező kulcsszavak</b> |  |
|-----------------------------|--|
| <b>Kulcsszó</b>             | <b>Lehetséges érték(ek)</b>  |
| \$DATATYPE                  | I: előjel nélküli egész<br>F: lebegőpontos szám (4 bájtt)<br>D: lebegőpontos szám (8 bájtt)<br>A: ASCII karaktorsorból álló szám |
| \$MODE                      | L: az adatok sejtenként “ömlesztve” (listmode)<br>U: korrelálatlan egyparaméteres hisztogram formában vannak tárolva             |
| \$BYTEORDER                 | Az adat bájtjainak tárolási sorrendje<br>Pl.: \$BYTEORDER/1,2,3,4/   |
| \$NEXTDATA                  | Egy FCS fájl több mérést is tartalmazhat, a kulcsszó értéke mutat a következő adathalmaz TEXT részének elejére                   |
| \$PAR                       | A mért paraméterek teljes száma  |
| \$PnB                       | A sejteken mért n-dik paraméter hossza bitekben  |
| \$PnR                       | Az n-dik paraméter feloldása   |

7.1 - 2: táblázat Az FC standardban definiált és a program által olvasott opcionális kulcsszavak listája.

| <b>A program által olvasott opcionális kulcsszavak</b> |   |
|--|---|
| \$DATE   | A mérés időpontja   |
| \$EXP  | A mérést végző személy azonosítója (neve)                                     |
| \$PROJ   | A projekt neve  |
| \$OP   | Operátor neve   |
| \$INST   | Laboratórium neve   |
| \$FIL  | Fájl neve   |
| \$CYT  | Áramlási citométer neve   |
| \$SRC  | Minta származása  |
| \$SYS  | Operációs rendszer, melyen az adatgyűjtés történt                             |
| \$CELLS  | A vizsgált sejtek típusa  |
| \$BTIM   | Az adatgyűjtés kezdetének időpontja   |
| \$ETIM   | A mérés végének időpontja   |
| \$TOT  | A fájlban tárolt sejtszám   |
| \$LOST   | Az adatgyűjtés során az adatgyűjtő rendszer hibájából elvesztett adatok száma |
| \$ABRT   | A mérőműszer hibájából nem mért adatok száma                                  |
| \$PnN  | Az n-dik paraméter neve   |
| \$PnF  | Az n-dik paraméter méréséhez használt optikai szűrő neve                      |
| \$PnL  | Az n-dik paraméter méréséhez használt lézer hullámhossza (nm-ben)             |
| \$PnE  | Az n-dik paraméter erősítése, lineáris vagy logaritmikus                      |
| \$PnO  | Az n-dik gerjesztő lézer kimenő teljesítménye                                 |
| \$PnT  | Az n-dik paraméter detektorának típusa  |
| \$PnV  | Az n-dik paraméter detektor feszültsége                                       |

### 7.1.1 FC standardok

Jelenleg három standard használatos, az FCS1.0, 2.0 és az FCS3.0, bár a ReFlex program az FCS1.0-ás fájlstruktúrát nem támogatja. Ennek legfőbb oka az, hogy az FCS1.0 standard nem rögzíti az összes, az adatok olvasásához szükséges kulcsszót, emiatt a különböző műszerek által generált fájlok szerkezete, illetve információ tartalma nagymértékben eltérhet, így egységes fájlolvasó rutin készítése gyakorlatilag lehetetlen.

A legfontosabb nélkülözhetetlen kulcsszóbeli különbségek az FCS2.0 és 1.0 között:

1. FCS2.0 tartalmaz nélkülözhetetlen kulcsszavakat, míg az FCS1.0 nem feltétlenül.
2. Az FCS2.0-ás fájlok egynél több mérést (a programban Tube-nak nevezzük) is tartalmazhatnak.
3. FCS2.0 tartalmazza a \$BYTEORDER kulcsszót, hogy a különböző operációs rendszereken tárolt adatok olvashatók legyenek.
4. \$ASC helyett a \$DATATYPE kulcsszót kell használni.

A legfontosabb különbségek az FCS2.0 és 3.0 között:

1. Amennyiben az FCS3.0 fájl HEADER részében lévő fájlmutató hosszabb 8 bájt nál, úgy a HEADER-ben 0-át kell írni, az adott szegmens elejére és végére mutató fájlmutatók helyére, és a TEXT részben kell a mutatók értékét megadni a \$BEGINDATA és \$ENDDATA kulcsszavak alatt.
2. A TEXT rész két részre osztható, az első rész tartalmazza a nélkülözhetetlen kulcsszavakat és az első 99.999.999 bájton belül kell elhelyezkednie, míg a második az opcionális kulcsszavakat.
3. \$UNICODE kulcsszó használható az unicode (speciális font készletek) kódoláshoz.
4. \$TIMESTEP kulcsszó a precíz mérésidő tároláshoz.

16 bites opcionális CRC (Cyclic Redundancy Check) ellenőrzési pontot (2 bájt hosszú) lehet adni az adathalmaz végére. Célja a fájlintegritás ellenőrzése.

## 7.2 B: Infix és posztfix kifejezések: a fordított lengyel jelölés

Az infix aritmetikai kifejezések megoldásához, melyekben az operátorok az operandusok között helyezkednek el, ismernünk kell az operátorok precedenciáját, kiértékelési sorrendjét. Legnagyobb precedenciával a hatványozás művelet rendelkezik, majd ezt követi a szorzás és osztás és végül az összeadás és kivonás. Továbbá az egyes részkifejezések kiértékelési sorrendje zárójelek segítségével befolyásolható, illetve módosítható. A fenti szabályok miatt infix aritmetikai kifejezések számítógépes kiértékelése meglehetősen bonyolult feladat, azonban a kifejezés megfelelő átalakítása után a számítás elvégezhető (Lipschutz, 1993).

Az átalakítás során az infix kifejezést lengyel jelölésre kell konvertálni, melyben az operátor megelőzi a két operandust, így zárójelekre nincs szükség, mivel a műveletek végrehajtásának sorrendjét az operátorok és operandusok sorrendje határozza meg. A lengyel jelöléssel felírt kifejezést jobbról balra kell olvasni. Annak érdekében, hogy a kifejezés balról jobbra legyen olvasható, meg kell cserélni az operátorok és operandusok sorrendjét. Ezt a jelölési módot fordított lengyel jelölésnek (postfix) nevezzük.

### 7.2.1 Infix kifejezés postfixé konvertálása

Az infix kifejezések postfixé történő átalakításához szükség van az operátorok és operandusok tárolására alkalmas adatszerkezetre, a veremre. A verem egy olyan tároló, amelyre csak felülről lehet adatot ráhelyezni (push), és csak a legfelső elem emelhető le róla (pop).

Az infix kifejezés a következő algoritmust segítségével konvertálható postfix kifejezéssé. Első lépésként az infix kifejezést le kell zárni egy karakterrel (jobboldali zárójel), ez jelzi, hogy a kifejezés véget ért, valamint egy baloldali zárójelet a veremre helyezünk, mely a verem alját jelzi. A kifejezés balról jobbra értékelhető. Az értékelés szabályai a következők (7.2 – 1. táblázat):

- Operandust hozzacsatoljuk a postfix kifejezéshez.
- Baloldali zárójelet a veremre kell helyezni.

- Operátor olvasása esetén a veremről le kell emelni, majd a postfix kifejezéshez hozzá kell csatolni az azonos vagy nagyobb precedenciájú operátorokat.
- Jobboldali zárójel esetén addig kell az operátorokat leemelni a veremről, és a postfix kifejezéshez csatolni, míg baloldali zárójel nem következik, melyet le kell emelni a veremről.

7.2 - 1. táblázat: Az infix kifejezés postfixé konvertálásának lépései egy konkrét példával.

| Infix aritmetikai kifejezés: $5 \cdot (6 + 2) - 12 / 4$ |           |         |                    |
|---|-----------|---------|--------------------|
| Lépés   | Szimbólum | Verem   | Postfix kifejezés  |
| 1,  | 5         | (       | 5                  |
| 2,  | •         | ( •     | 5                  |
| 3,  | (         | ( • (   | 5 6                |
| 4,  | 6         | ( • ( + | 5 6                |
| 5,  | 2         | ( • ( + | 5 6 2              |
| 6,  | )         | ( •     | 5 6 2 +            |
| 7,  | -         | ( -     | 5 6 2 + •          |
| 8,  | 12        | ( -     | 5 6 2 + • 12       |
| 9,  | /         | ( - /   | 5 6 2 + • 12       |
| 10,   | 4         | ( - /   | 5 6 2 + • 12 4     |
| 11,   | )         |         | 5 6 2 + • 12 4 / - |

### 7.2.2 Postfix kifejezés kiszámítása

Postfix kifejezés feldolgozása során (7.2 - 2. táblázat) ismét a verem adatszerkezetet használjuk. Első lépésként a kifejezést egy pontosvesszővel lezárjuk, mely jelzi, hogy a kifejezés véget ért. Az operandusokat a veremre helyezzük, míg egy operátor nem következik a kifejezés olvasása során. Ekkor két operandust a veremről leemelve a részszámítás elvégezhető, majd az eredményt visszahelyezve a veremre, az eljárás addig

folytatódik, míg a kifejezés végére nem érünk. Ekkor a verem már csak egyetlen számot tartalmazhat a végeredményt.

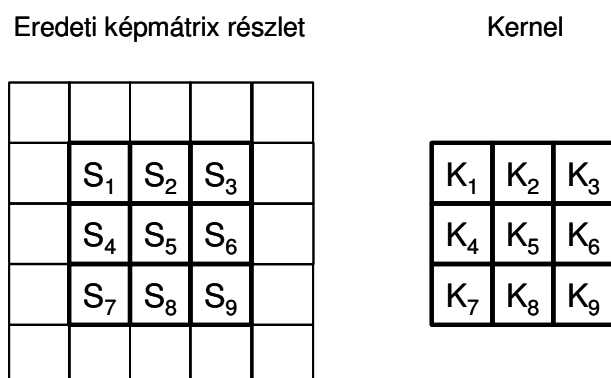
7.2 - 2. táblázat: **Postfix kifejezés kiszámítása, a példa befejezése.**

| <b>Postfix aritmetikai kifejezés: 5 6 2 + • 12 4 / - ;</b> |                  |              |
|--|------------------|--------------|
| <b>Lépés</b>   | <b>Szimbólum</b> | <b>Verem</b> |
| 1,   | 5                | 5            |
| 2,   | 6                | 5 6          |
| 3,   | 2                | 5 6 2        |
| 4,   | +                | 5 8          |
| 5,   | •                | 40           |
| 6,   | 12               | 40 12        |
| 7,   | 4                | 40 12 4      |
| 8,   | /                | 40 3         |
| 9,   | -                | 37           |
| 10,  | ;                |              |

### 7.3 C: Képfeldolgozás

A képfeldolgozás során a képet úgy módosítjuk, olyan műveleteket hajtunk rajta végre, melyekkel a lényeges információkat a lényegtelenektől elválasztjuk. A képfeldolgozásnak/képelemzésnek számos lehetséges, és más-más eredményre vezető módja van, melyek közül csak a konvolúciót és a morfológiai transzformációt fogjuk tárgyalni, mivel a ClickOnGold program e műveleteket használja a képelemzés során.

A konvolúciós műveletek során a szürke skálájú kép pontjait a szomszéd képpontok szürkességi szintjeinek figyelembevételével módosítjuk. A módosítás alapját egy  $m \times n$  konvolúciós mátrix képezi (7.3 - 1. ábra), melynek középső elemét a kép pontjaira helyezzük pontról-pontra, majd a mátrix által lefedett terület pixeleit megszorozzuk a mátrix értékeivel, azokat összeadjuk és az eredményt a mátrix elemeinek összegével (vagy bármilyen tetszőleges számmal) normáljuk, végül ezt az értéket helyezzük vissza a képre.



7.3 - 1. ábra: **Konvolúció művelete.** A baloldalon az eredeti képmátrix egy részlete, míg a jobboldalon, a képen alkalmazott kernel (konvolúciós mátrix) látható.

A fent leírtak matematikai formában kifejezve:

$$S_5^{\text{módosított}} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{m \times n} K_i S_i, \quad (7.4 - 1)$$

ahol  $S_5^{\text{módosított}}$  a számított képpont értéke, N a normáló konstans,  $K_i$  a kernel i-edik eleme,  $S_i$  a kernel által lefedett képmátrix részlet i-edik eleme.

A szűrő mátrixoknak számos fajtája létezik, melyek mind méretükben, mind tulajdonságaikban eltérnek egymástól, néhányat említve a teljesség igénye nélkül: átlagoló,

simító, élkiemelő kernel stb. A program csak egy simító kernelt, a Gauss-szűrő kernelhez hasonló szűrőt használ. Az eltérés abban áll, hogy a program által használt kernel  $1 \times 50$  méretű, mely a Gauss eloszlás értékeit tartalmazza. Ezt a szűrőt alkalmazzuk a képen kétszer egymás után vízszintes irányban, de a két lépés között a képet elforgatjuk  $90^\circ$ -al.

A morfológiai műveletek képezik a képfeldolgozás egy másik nagy csoportját. Ebben az esetben az egyes képpontok értékét ugyancsak a szomszédos képpontoktól függően változtatjuk meg, de ebben az esetben aritmetikai műveletek helyett, logikai műveleteket használunk (kisebb, nagyobb relációk). A morfológiai átalakítások nagy előnye, hogy a lényegtelen információk kiküszöbölése megbízható, irányított módon zajlik szemben a konvolúcióval, ahol a lényegtelen információk, bár kevésbé hangsúlyosan, de megmaradnak. A leggyakoribb morfológiai transzformációk az erózió és a dilatáció. Erózió során az adott képpontot az önmaga és tetszőleges számú szomszédja (általában nyolc) által alkotott csoport minimumával, míg dilatáció során a maximumával helyettesítjük. Erózió során, a képen lévő sötét objektumok mérete megnő, mintegy a képen lévő árkok kiszélesednek, míg dilatáció során ezek az árkok feltöltődnek.

Az összetett morfológiai transzformáció az erózió és dilatáció műveletek megfelelő számú és sorrendű végrehajtásával valósítható meg. A legegyszerűbb összetett morfológiai transzformációk a nyitás és zárás, melyek rendre egy erózióból és egy azt követő dilatációból, valamint egy dilatációból és egy azt követő erózióból állnak. A nyitás művelete a kisméretű és világos pontokat, ezzel szemben a zárás a kisméretű sötét pontokat távolítja el a képről.

Természetesen az erózió és dilatáció műveletek segítségével, összetettebb transzformációk is megvalósíthatók (black és white smoothing, tophat transzformáció stb.), azonban a program megírásánál ezekre nem volt szükség, így ezekkel nem foglalkozunk.

## 8. Irodalomjegyzék

- Angster E (1999) *Az objektumorientált tervezés és programozás alapjai*, Első kiadás, Angster Erzsébet.
- Bagossi P, Horváth G, Vereb G, Szöllősi J, & Tözsér J (2005) Molecular modeling of nearly full-length ErbB2 receptor. *Biophysical Journal*, 88, 1354-1363.
- Bodnár A, Bacsó Z, Jenei A, Jovin TM, Edidin M, Damjanovich S, & Matkó J (2003) Class I HLA oligomerization at the surface of B cells is controlled by exogenous beta(2)-microglobulin: implications in activation of cytotoxic T lymphocytes. *Int.Immunol.*, 15, 331-339.
- Bodnár A, Jenei A, Bene L, Damjanovich S, & Matkó J (1996) Modification of membrane cholesterol level affects expression and clustering of class I HLA molecules at the surface of JY human lymphoblasts. *Immunol.Lett.*, 54, 221-226.
- Cantu M (1997) *Mastering Delphi 3*, 2nd edn, Sybex Inc..
- Damjanovich S, Bene L, Matkó J, Alileche A, Goldman CK, Sharrow S, & Waldmann TA (1997a) Preassembly of interleukin 2 (IL-2) receptor subunits on resting Kit 225 K6 T cells and their modulation by IL-2, IL-7, and IL-15: a fluorescence resonance energy transfer study. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 94, 13134-13139.
- Damjanovich S, Gáspár R, Jr., & Pieri C (1997b) Dynamic receptor superstructures at the plasma membrane. *Q.Rev.Biophys.*, 30, 67-106.
- Damjanovich S, Matkó J, Mátyus L, Szabó G, Jr., Szöllősi J, Pieri JC, Farkas T, & Gáspár R, Jr. (1998) Supramolecular receptor structures in the plasma membrane of lymphocytes revealed by flow cytometric energy transfer, scanning force- and transmission electron-microscopic analyses. *Cytometry*, 33, 225-233.
- Damjanovich S, Vereb G, Schaper A, Jenei A, Matkó J, Starink JP, Fox GQ, Arndt-Jovin DJ, & Jovin TM (1995) Structural hierarchy in the clustering of HLA class I molecules in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 92, 1122-1126.
- Data File Standard Committee (1990) Data file standard for flow cytometry. Data File Standards Committee of the Society for Analytical Cytology. *Cytometry*, 11, 323-32.
- Diermeier S, Horváth G, Knuechel-Clarke R, Hofstaedter F, Szöllősi J, & Brockhoff G (2005) Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Exp.Cell Res.*, 304, 604-619.
- Diggle PJ (2003) *Statistical analysis of spatial point patterns*, Second edn, Oxford University Press Inc., New York, USA.

- Dornan S, Sebestyén Z, Gamble J, Nagy P, Bodnár A, Alldridge L, Doe S, Holmes N, Goff LK, Beverley P, Szöllösi J, & Alexander DR (2002) Differential association of CD45 isoforms with CD4 and CD8 regulates the actions of specific pools of p56lck tyrosine kinase in T cell antigen receptor signal transduction. *J.Biol.Chem.*, 277, 1912-1918.
- Edidin M (1997) Lipid microdomains in cell surface membranes. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, 7, 528-532.
- Förster T. (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 2, 55-75.
- Gadella TWJ & Jovin TM (1997) Fast algorithms for the analysis of single and double exponential decay curves with a background term. Application to time-resolved imaging microscopy. *Bioimaging*, 5, 19-39.
- Gáspár R, Jr., Bagossi P, Bene L, Matkó J, Szöllösi J, Tözsér J, Fésüs L, Waldmann TA, & Damjanovich S (2001) Clustering of class I HLA oligomers with CD8 and TCR: three-dimensional models based on fluorescence resonance energy transfer and crystallographic data. *J.Immunol.*, 166, 5078-5086.
- Glasbey CA & Roberts IM (1997) Statistical analysis of the distribution of gold particles over antigen sites after immunogold labelling. *Journal of Microscopy-Oxford*, 186, 258-262.
- Gu Y, Di WL, Kelsell DP, & Zicha D (2004) Quantitative fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement with acceptor photobleaching and spectral unmixing. *J.Microsc.*, 215, 162-173.
- Hwang J, Gheber LA, Margolis L, & Edidin M (1998) Domains in cell plasma membranes investigated by near-field scanning optical microscopy. *Biophysical Journal*, 74, 2184-2190.
- Jacobson K & Dietrich C (1999) Looking at lipid rafts? *Trends in Cell Biology*, 9, 87-91.
- Jares-Erijman EA & Jovin TM (2003) FRET imaging. *Nature Biotechnology*, 21, 1387-1395.
- Jenei A, Varga S, Bene L, Mátyus L, Bodnár A, Bacsó Z, Pieri C, Gáspár R, Jr., Farkas T, & Damjanovich S (1997) HLA class I and II antigens are partially co-clustered in the plasma membrane of human lymphoblastoid cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 94, 7269-7274.
- Jovin TM & Arndt-Jovin DJ (1989a) Digital imaging of fluorescence resonance energy transfer. Applications in cell biology. Cell structure and function by microspectrofluorimetry, pp. 99-115. Academic Press, San Diego CA.
- Jovin TM & Arndt-Jovin DJ (1989b) FRET microscopy: digital imaging of fluorescence energy transfer. Application in cell biology. Cell Structure and Function by Microspectrofluorimetry (ed. by E. Kohen, J. S. Ploem, & J. G. Hirschberg), pp. 99-117. Academic Press, Orlando.

- Jovin TM, Arndt-Jovin DJ, Marriott G, Clegg RM, Robert-Nicoud M, & Schormann T (1990) Distance, wavelength and time: The versatile 3rd dimensions in light emission microscopy. *Optical Microscopy for Biology*. (ed. by B. Herman & K. Jacobson), pp. 575-602. Wiley-Liss, New York.
- Kenworthy AK & Edidin M (1999) Imaging fluorescence resonance energy transfer as probe of membrane organization and molecular associations of GPI-anchored proteins. *Methods Mol.Biol.*, 116, 37-49.
- Konig D, Carvajalgonzalez S, Downs AM, Vassy J, & Rigaut JP (1991) Modeling and Analysis of 3-D Arrangements of Particles by Point-Processes with Examples of Application to Biological Data Obtained by Confocal Scanning Light-Microscopy. *Journal of Microscopy-Oxford*, 161, 405-433.
- Kusumi A & Sako Y (1996) Cell surface organization by the membrane skeleton. *Curr Opin Cell Biol*, 8, 566-574.
- Levendovszky T (1999) *Bevezetés az UML nyelvű modellezésbe*, Levendovszky Tihamér.
- Lidke DS, Nagy P, Barisas BG, Heintzmann R, Post JN, Lidke KA, Clayton AH, Arndt-Jovin DJ, & Jovin TM (2003) Imaging molecular interactions in cells by dynamic and static fluorescence anisotropy (rFLIM and emFRET). *Biochem.Soc.Trans.*, 31, 1020-1027.
- Lipschutz S (1993) *Adatszerkezetek*, Hungarian edn, Panem Kft., Budapest.
- Matkó J, Bodnár A, Vereb G, Bene L, Vámosi G, Szentesi G, Szöllősi J, Gáspár R, Horejsi V, Waldmann TA, & Damjanovich S (2002) GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines. *Eur.J.Biochem.*, 269, 1199-1208.
- Matkó J, Bushkin Y, Wei T, & Edidin M (1994) Clustering of class I HLA molecules on the surfaces of activated and transformed human cells. *J.Immunol.*, 152, 3353-3360.
- Mátyus L (1992) Fluorescence resonance energy transfer measurements on cell surfaces. A spectroscopic tool for determining protein interactions. *J.Photochem.Photobiol.B*, 12, 323-337.
- Nagy P, Bene L, Balázs M, Hyun WC, Lockett SJ, Chiang NY, Waldman F, Feuerstein BG, Damjanovich S, & Szöllősi J (1998) EGF-induced redistribution of erbB2 on breast tumor cells: flow and image cytometric energy transfer measurements. *Cytometry*, 32, 120-131.
- Nagy P, Jenei A, Damjanovich S, Jovin TM, & Szöllősi J (1999a) Complexity of signal transduction mediated by ErbB2: clues to the potential of receptor-targeted cancer therapy. *Pathol.Oncol.Res.*, 5, 255-271.
- Nagy P, Jenei A, Kirsch AK, Szöllősi J, Damjanovich S, & Jovin TM (1999b) Activation-dependent clustering of the erbB2 receptor tyrosine kinase detected by scanning near-field optical microscopy. *J.Cell Sci.*, 112, 1733-1741.

- Nagy P, Vereb G, Sebestyén Z, Horváth G, Lockett SJ, Damjanovich S, Park JW, Jovin TM, & Szöllösi J (2002) Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2. *J.Cell Sci.*, 115, 4251-4262.
- Panyi G, Bagdány M, Bodnár A, Vámosi G, Szentesi G, Jenei A, Mátyus L, Varga S, Waldmann TA, Gáspár R, Jr., & Damjanovich S (2003) Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100, 2592-2597.
- Periasamy A (2001) Fluorescence resonance energy transfer microscopy: a mini review. *J.Biomed.Opt.*, 6, 287-291.
- Philimonenko AA, Janacek J, & Hozak P (2000) Statistical evaluation of colocalization patterns in immunogold labeling experiments. *Journal of Structural Biology*, 132, 201-210.
- Seamer LC, Bagwell CB, Barden L, Redelman D, Salzman GC, Wood JC, & Murphy RF (1997) Proposed new data file standard for flow cytometry, version FCS 3.0. *Cytometry*, 28, 118-22.
- Sebestyén Z, Nagy P, Horváth G, Vámosi G, Debets R, Gratama JW, Alexander DR, & Szöllösi J (2002) Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. *Cytometry*, 48, 124-135.
- Simons K & Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569-572.
- Singer SJ & Nicolson G (1971) The fluid mosaic nature of the structure of cell membranes. *Science*, 175, 720-726.
- Smart EJ, Ying YS, & Anderson RGW (1995) Hormonal-Regulation of Caveolae Internalization. *Journal of Cell Biology*, 131, 929-938.
- Smith SW (1999) *The Scientist and Engineer's Guide to Digital Signal Processing*, Second edn, California Technical Publishing, California.
- Song L, Hennink EJ, Young IT, & Tanke HJ (1995a) Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, 68, 2588-2600.
- Song L, van Gijlswijk RP, Young IT, & Tanke HJ (1997) Influence of fluorochrome labeling density on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy. *Cytometry*, 27, 213-223.
- Song L, Varma CA, Verhoeven JW, & Tanke HJ (1996) Influence of the triplet excited state on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy. *Biophysical Journal*, 70, 2959-2968.

- Song L, Hennink EJ, Young IT, & Tanke HJ (1995b) Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy. *Biophysical Journal*, 68, 2588-2600.
- Stoyan D, Kendall WS, & Mecke J (1995) *Stochastic Geometry and its Applications*, Second edn, Wiley, Chichester.
- Stroustrup B (2005) *The C++ Programming Language*, Special edn, Addison Wesley, USA.
- Stryer L (1978) Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu.Rev.Biochem.*, 47, 819-846.
- Stryer L, Thomas DD, & Carlsen WF (1982) Fluorescence energy transfer measurements of distances in rhodopsin and the purple membrane protein. *Methods Enzymol.*, 81, 668-678.
- Szabó G, Jr., Weaver JL, Pine PS, Rao PE, & Aszalos A (1995) Cross-linking of CD4 in a TCR/CD3-juxtaposed inhibitory state: a pFRET study. *Biophysical Journal*, 68, 1170-1176.
- Szentesi G, Horváth G, Bori I, Vámosi G, Szöllösi J, Gáspár R, Jr., Damjanovich S, Jenei A, & Mátyus L (2004) Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Comput.Methods Programs Biomed.*, 75, 201-211.
- Szöllösi J, Damjanovich S, & Mátyus L (1998) Application of fluorescence resonance energy transfer in the clinical laboratory: routine and research. *Cytometry*, 34, 159-179.
- Szöllösi J, Horejsi V, Bene L, Angelisova P, & Damjanovich S (1996) Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J.Immunol.*, 157, 2939-2946.
- Szöllösi J, Nagy P, Sebestyén Z, Damjanovich S, Park JW, & Mátyus L (2002) Applications of fluorescence resonance energy transfer for mapping biological membranes. *J.Biotechnol.*, 82, 251-266.
- Thilo L (1985) Quantification of Endocytosis-Derived Membrane Traffic. *Biochimica et Biophysica Acta*, 822, 243-266.
- Tooley AJ, Jacobelli J, Moldovan MC, Douglas A, & Krummel MF (2005) T cell synapse assembly: proteins, motors and the underlying cell biology. *Seminars in Immunology*, 17, 65-75.
- Trón L, Szöllösi J, Damjanovich S, Helliwell SH, Arndt-Jovin DJ, & Jovin TM (1984) Flow cytometric measurement of fluorescence resonance energy transfer on cell surfaces. Quantitative evaluation of the transfer efficiency on a cell-by-cell basis. *Biophys J*, 45, 939-46.
- Vámosi G, Bodnár A, Vereb G, Jenei A, Goldman CK, Langowski J, Tóth K, Mátyus L, Szöllösi J, Waldmann TA, & Damjanovich S (2004) IL-2 and IL-15 receptor alpha-

- subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 101, 11082-11087.
- Vereb G, Matkó J, & Szöllősi J (2004) Cytometry of fluorescence resonance energy transfer. *Methods Cell Biol.*, 75, 105-152.
- Vereb G, Matkó J, Vámosi G, Ibrahim SM, Magyar E, Varga S, Szöllősi J, Jenei A, Gáspár R, Jr., Waldmann TA, & Damjanovich S (2000) Cholesterol-dependent clustering of IL-2R alpha and its colocalization with HLA and CD48 on T lymphoma cells suggest their functional association with lipid rafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 6013-6018.
- Vereb G, Szöllősi J, Matkó J, Nagy P, Farkas T, Vigh L, Mátyus L, Waldmann TA, & Damjanovich S (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100, 8053-8058.
- William HP, Brian PF, Saul AT, & William TV (2005) *Numeriacla Recipes in C*, Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Xavier R, Brennan T, Li QQ, McCormack C, & Seed B (1998) Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity*, 8, 723-732.
- Young RM, Arnette JK, Roess DA, & Barisas BG (1994) Quantitation of fluorescence energy transfer between cell surface proteins via fluorescence donor photobleaching kinetics. *Biophysical Journal*, 67, 881-888.

## 9. Közlemények

### Az értekezésben felhasznált közlemények

1. **Szentesi G**, Horváth G, Bori I, Vámosi G, Szöllősi J, Gáspár R, Damjanovich S, Jenei A, Mátyus L. Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Comput. Meth. Prog. Bio.* 2004;75:201-211.

**IF: 0,686 (JCR 2004)**

2. **Szentesi G**, Vereb G, Horváth G, Bodnár A, Fábíán A, Matkó J, Gáspár R, Damjanovich S, Mátyus L, Jenei A. Computer program for analyzing donor photobleaching FRET image series. *Cytometry Part A* 2005;67A:119-128.

**IF: 2,698 (JCR 2004)**

### Egyéb közlemények

1. Matkó J, Bodnár A, Vereb G, Bene L, Vámosi G, **Szentesi G**, Szöllősi J, Gáspár R, Horejsi V, Waldmann TA, Damjanovich S. GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines. *Eur. J. Biochem.* 2002;269:1199-1208.

**IF: 3,260 (JCR 2004)**

2. Panyi G, Bagdány M, Bodnár A, Vámosi G, **Szentesi G**, Jenei A, Mátyus L, Varga S, Waldmann TA, Gáspár R, Damjanovich S. Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 2003;100:2592-2597.

**IF: 10,452 (JCR 2004)**

3. Bene L, **Szentesi G**, Mátyus L, Gáspár R, Damjanovich S. Nanoparticle energy transfer on the cell surface. *J. Mol. Recognit.* 2004;18(3):236-253.

**IF: 1,859 (JCR 2004)**

4. Bene L, Szöllősi J, **Szentesi G**, Damjanovich L, Gáspár R, Waldmann TA, Damjanovich S. Detection of receptor trimers on the cell surface by flow cytometric fluorescence energy homotransfer measurements. *BBA-Mol. Cell. Res.* 2005;1744:176-198.

**IF: 3,482 (JCR 2004)**

5. Horváth G, Petrás M, **Szentesi G**, Fábíán A, Park JW, Vereb G, Szöllősi J. Selecting the right fluorophores and flow cytometer for fluorescence resonance energy transfer measurements. *Cytometry Part A* 2005;65A:148-157.

**IF: 2,698 (JCR 2004)**

## 10. Melléklet

### 10.1 Objektumorientált programozás

Egy program megszületésekor a program feladatától (típusától) függően többé-kevésbé a valós világot modellezzük. Ahhoz, hogy a modell sikeres és használható legyen, a világ (probléma) elemzése során valahol meg kell állnunk, a problémát nem lehet a végtelenségig finomítani, azaz absztrakt módon kell megfogalmaznunk. Ilyenkor csak a probléma lényegére koncentrálunk, az egyes objektumoknak csak azon tulajdonságait vesszük figyelembe, melyek a kívánt cél eléréséhez nélkülözhetetlenek.

Az objektumorientált program legkisebb egysége az osztály, melyben az adatok és eljárások (metódusok) össze vannak zárva. Minden osztálynak megvannak a saját adatai és tagfüggvényei, melyeken keresztül meg lehet kérni bizonyos feladatok elvégzésére. Minden egyes program több osztállyal is dolgozik, melyek létrehozott példányait objektumoknak nevezzük (Stroustrup, 2005; Angster, 1999).

Minden objektumnak állapota van, például születés után inicializálatlan, azaz „semmilyen” állapotban van, ezért a létrehozás után be kell táplálnunk kezdeti adatait. Az élete során az állapot az éppen végzendő, vagy a már elvégzett feladattól függ. Az objektumoknak élete van. A létrehozáskor (memória foglalás, inicializálás) megszületik, majd él, eközben feladatokat hajt végre, végül meghal és befejezi működését (felszabadítás).

Az objektum (osztály) legnagyobb ereje abban áll, hogy zárt és sérthetetlen, melyet úgy valósít meg, hogy a külvilág számára érdektelen vagy nem engedélyezett információkat elrejt. Ennek következtében más programrészlet nem tudja elrontani az objektum belsejét, illetve az esetleges hibák nem tudnak átterjedni más programrészletre.

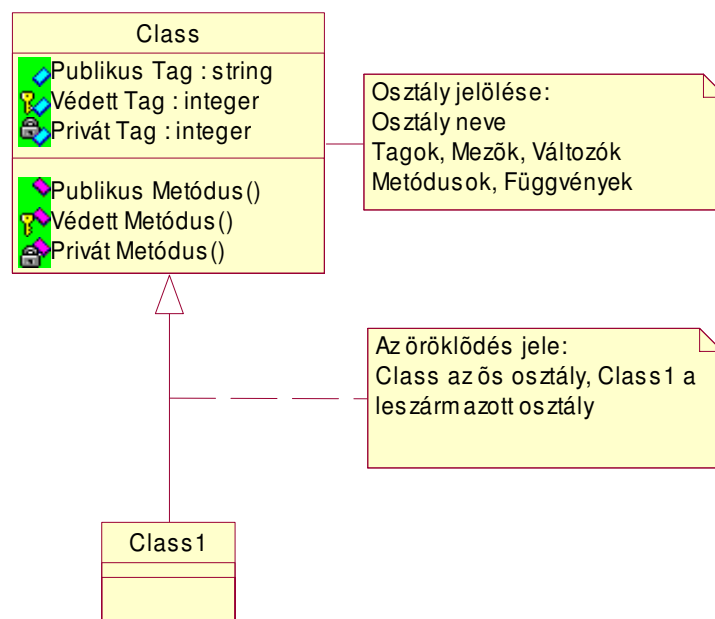
Az objektumorientált programozás (OOP) kulcsfontosságú eleme az öröklődés. Öröklődéssel új osztályokat tudunk létrehozni egy már meglévő osztályból vagy osztályokból. Ez azt jelenti, hogy az új osztály az ősoosztály(ok) (bázisosztály) minden tulajdonságával és metódusával rendelkezik, és azokat továbbiakkal egészíthetjük ki. Az öröklődés gyakran specializációt jelent, bár a többszörös öröklődés néha általánosítást is jelenthet. Továbbá az öröklődés segítségével elkerülhetők a felesleges ismétlődések, hiszen hasonló osztályok esetén nem kell a kódot másolgatni, hanem egyszerűen egy ősoosztályból

kell az újabb osztályokat létrehozni. Végül a hibakeresést és a kód módosítását is nagyban egyszerűsíti.

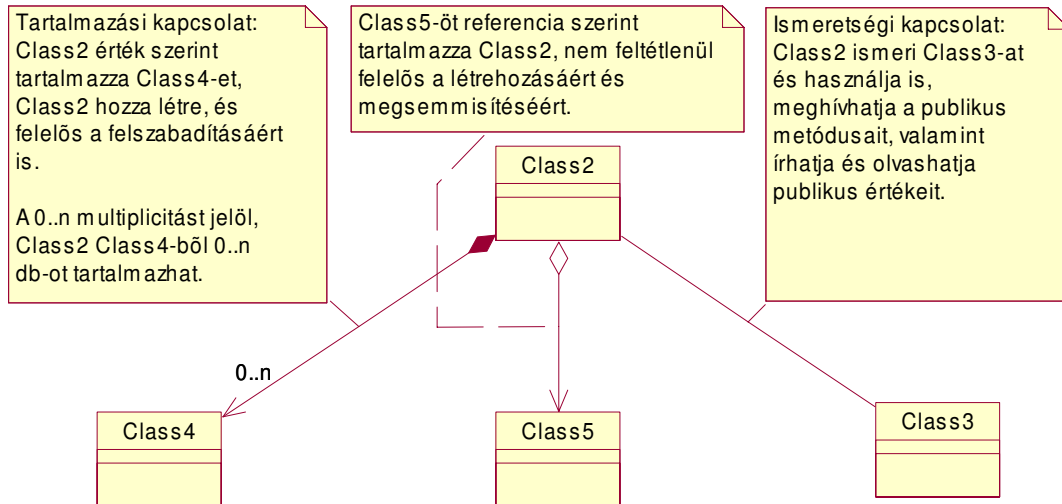
Ugyancsak fontos eleme az OOP-nek a polimorfizmus. Ez szó szerint azt jelenti, hogy egy objektum többféle alakban is megjelenhet, mely segítségével különböző osztályok objektumaira ugyanazon a változón keresztül lehet hivatkozni, de ha az objektummal végrehajtunk egy műveletet, az objektum az osztályának megfelelő metódust fogja végrehajtani.

Ennek a dolgozatnak nem célja az objektumorientált programozás részletes tárgyalása, csak az alapvető fogalmakat gyűjtöttük össze, és azok közül is csak azokat, amelyek nélkülözhetetlenek a további fejezetek megértéséhez.

Az osztályleírásoknál az UML (Unified Modelling Language) grafikus jelölő rendszert használom az osztályhierarchiák, valamint az osztályok közötti kapcsolatok szemléltetésére (10.1 - 1., 10.1 - 2. ábra.)(Levendovszky, 1999).



10.1 - 1. ábra: **UML jelölés rendszer.** Az osztályokat három részre osztott téglalapok reprezentálják. A felső részben az osztály neve, míg az alsó kettőben a változók nevei és típusai, valamint a metódusok láthatók.

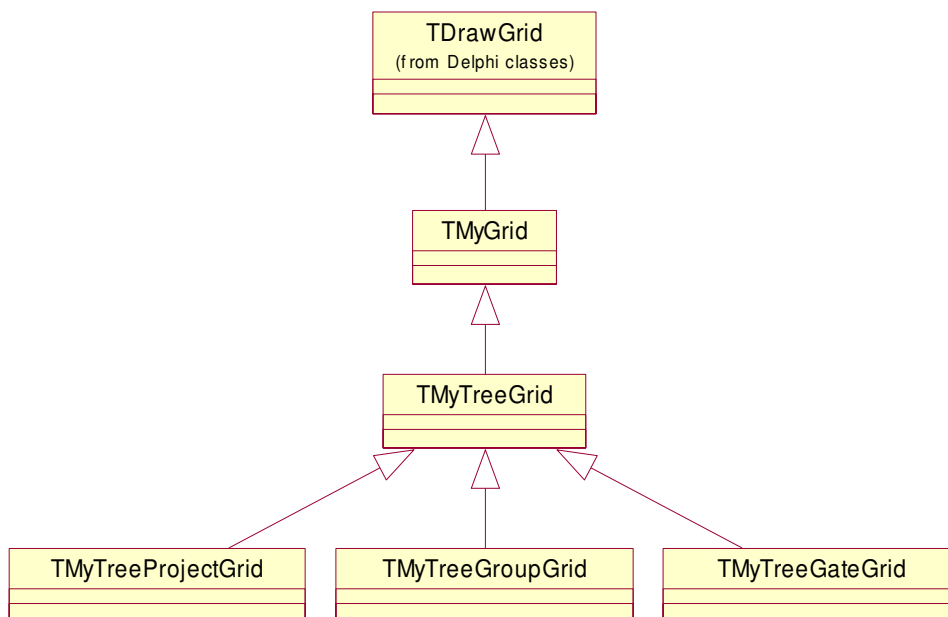


10.1 - 2. ábra: **Az osztályok közötti kapcsolatok jelölése.** A kapcsolatok jelölésére különböző nyilakat és vonalakat használ a jelölő nyelv. A legfontosabbak ezek közül, az öröklődés jele (üres nyílvég), a tartalmazási kapcsolatokat jelölő nyilak (tartalmazási kapcsolat: teli rombusz a nyíl talpánál, referencia szerinti tartalmazási kapcsolat: üres rombusz a nyíl talpánál), valamint az ismeretségi kapcsolatokat jelölő vonalak és nyilazott nyilak.

## 10.2 A Reflex program osztályai

### 10.2.1 A ReFlex program táblái

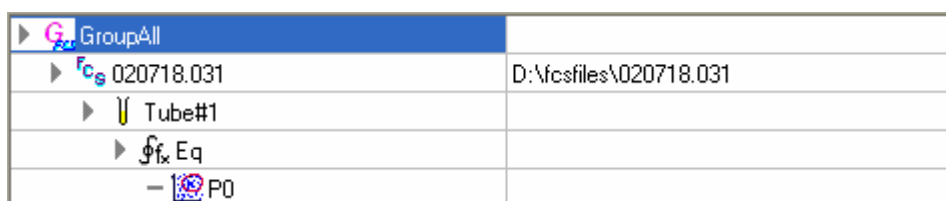
Mindhárom tábla (Projektábra, Csoportábra, Kaputábra) a TMyTreeGrid leszármazottja (10.2 - 1. ábra), mely a TMyGrid-ből öröklődik. Bár a Delphi tartalmaz tábla objektumot (TDrawGrid), de ez a komponens csak egymást követő sorok egyidejű kiválasztását teszi lehetővé. Azonban szükség van eltérő sorok kiválasztására is, így létre kellett hozni egy új osztályt (TMyGrid), mely a TDrawGrid leszármazottja. A TMyGrid osztály tartalmaz egy listát, mely a kiválasztott cellák paramétereit (sor, oszlop száma) tároló TMySelection típusú objektumokat tárolja. A kiválasztás során, ha a felhasználó a tábla valamelyik celláján klikkel, miközben a SHIFT billentyű le van nyomva, egy új TMySelection objektum jön létre a kiválasztott cella paramétereivel, majd a listához adódik.



10.2 - 1. ábra: **Tábla osztályhierarchia.** A táblák a VCL által nyújtott TDrawGrid táblából származnak. Mivel a TDrawGrid osztályban nem lehetséges a táblázat sorainak tetszőleges sorrendben történő kiválasztása, így létrehoztunk egy olyan táblaosztályt (TMyTreeGrid), mely támogatja ezt a funkciót, és bázisosztály lehet a további specifikus tábláknak.

Ez az osztály további tulajdonságokkal is fel lett ruházva:

- Képes hierarchikusan egymásnak alárendelt adatok megjelenítésére, valamint azok elrejtésére (10.2 - 2. ábra:). Erre a funkcióra a kapu és a kapuzott populáció hierarchiák megjelenítésénél van szükség.
- Az egyes cellákhoz tetszőleges számú ikon rendelhető, valamint rendelkezik egy olyan eseménnyel, mely akkor következik be, ha a felhasználó valamelyik ikonra klikkel. Ez az esemény visszaadja a tábla megfelelő sorát, valamint azt, hogy hányadik ikonon nyomtuk le az egeret.

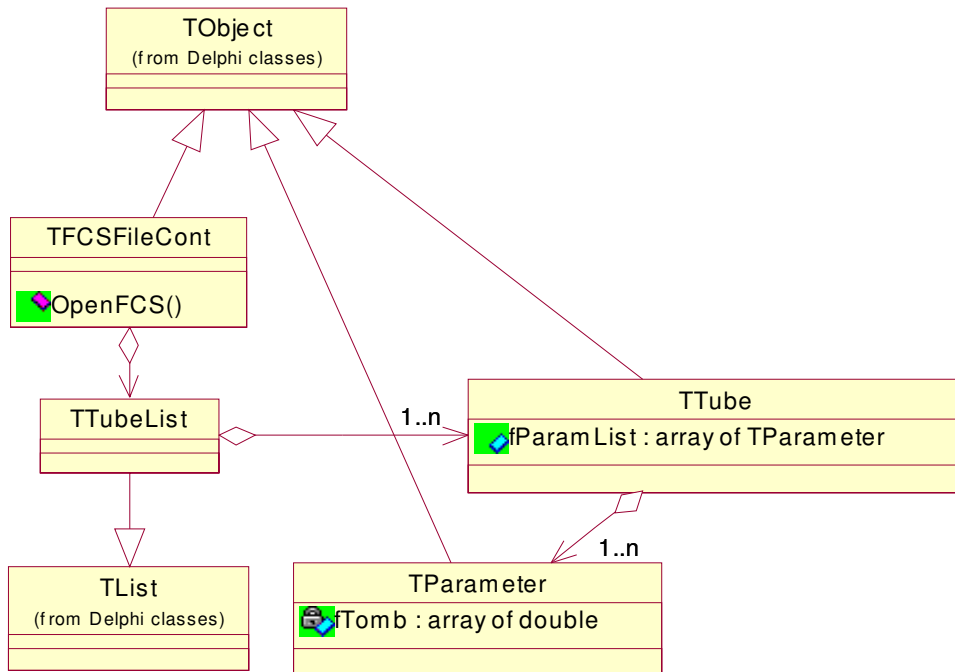


|                  |                        |
|------------------|------------------------|
| ▶ G GroupAll     |                        |
| ▶ FCS 020718.031 | D:\fcsfiles\020718.031 |
| ▶ U Tube#1       |                        |
| ▶ f Eq           |                        |
| - P0             |                        |

10.2 - 2. ábra: A TMyTreeGrid táblakomponens képes hierarchikus, egymásnak alárendelt sorok megjelenítésére. A megvalósításhoz egy fa szerkezetet kell létrehozni a memóriában, melynek csomópontjai a TMyNode osztály objektumai. Minden egyes csomópontnak több csomópontja is lehet, melyeket egy listában a TMyNodeList egy példányában tárol. Minden egyes csomópont képes a benne tárolt adat (szöveg), továbbá a hozzá rendelt ikonok megjelenítésére, valamint az alárendelt csomópontok elrejtésére.

### 10.2.2 FCS fájl olvasó és tároló osztály

Az FCS fájlok olvasását valamint az adatsorok és adatok tárolását TFCSFileCont osztály végzi (10.2 - 3. ábra). Az osztály konstruktora megkapja argumentumként a betöltendő fájl nevét és elérési útvonalát, majd a konstruktor meghívja az OpenFCS procedúrát, melynek feladata a fájl olvasásának lebonyolítása. Továbbá ez az osztály szervezi az adatokat Tube-okba (méréssorozat egy tagját tároló objektum), valamint a sejteken mért paramétereket átadja a TParaméter osztály megfelelő egyedének.



10.2 - 3. ábra: Az FCS fájl olvasó és tároló osztály felépítése. Az osztály konstruktora végzi az FCS fájl feldolgozását. A mérés paramétereit a TTube osztály egy általa létrehozott egyedének adja át, valamint a mérés adatait paraméterenként egy a Tube egyed által létrehozott TParaméter típusú objektum tárolja.

A fájl olvasását a konstruktor végzi, mely meghívja az OpenFCS metódust.

```

procedure TFCSFileCont.OpenFCS(FilePath: TFileName);
var
  f      : file;
  NextData : longword;
begin
  try
    AssignFile(f, FilePath);
    Reset(f, 1);

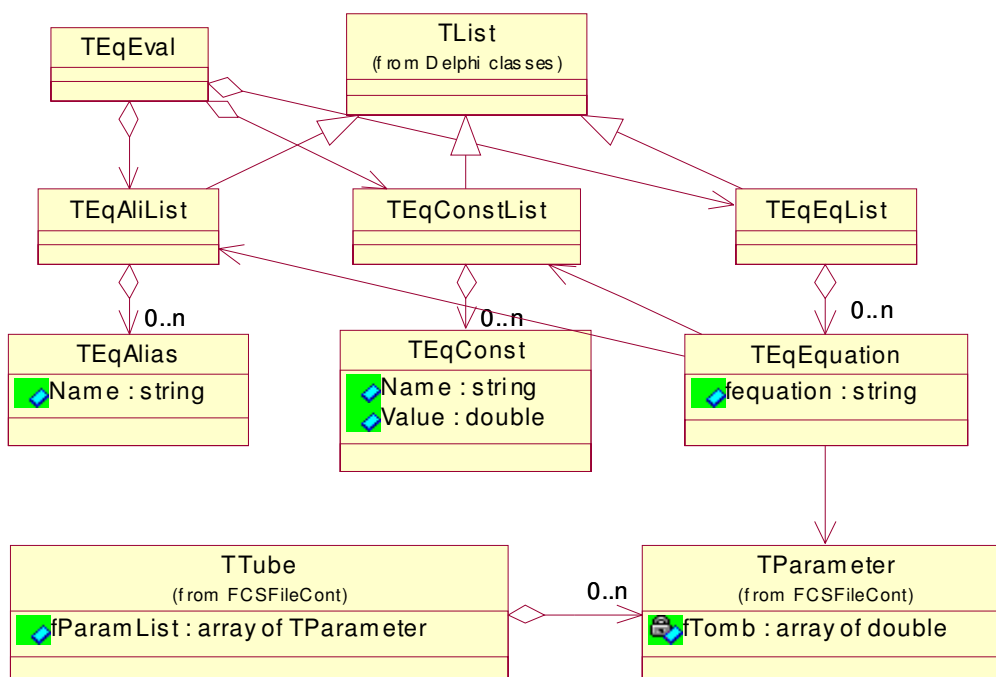
    while (1 = 1) do
      begin
        CheckFileTypeHeader(f);
        GetTextParams(f);
        GetData(f);
        NextData:= TTube(fTubeList.Items[fTubeList.Count - 1]).NextData;
        if NextData = 0 then break;
        seek(f, NextData);
      end;
    finally
      CloseFile(f);
    end;
  end;

```

A betöltendő fájl megnyitása az FCS típus ellenőrzésével, majd a fájlmutatók olvasásával kezdődik. Amennyiben a fájl típusa nem FCS2.0 vagy 3.0, úgy a procedúra egy kivételt generál és az objektum nem jön (nem jöhet) létre. A mutatók olvasása után a procedúra feldolgozza a TEXT rész adatait (GetTextParams), és létrehozza az adatok tárolására szolgáló TParameter osztályegyedeket, melyeket a GetData metódus tölt fel a DATA részből kiolvasott adatokkal. A TEXT rész \$NEXTDATA kulcs értéke mutat a következő méréssorra, melynek nem nulla értéke esetén újabb TTube típusú objektum jön létre, és az olvasási folyamat folytatódik. Amennyiben az érték 0, úgy a fájl nem tartalmaz több adatsort.

### 10.2.3 Egyenletszerkesztő modul tároló osztálya

Az egyenletszerkesztő modul megvalósításához szükség van egy tároló osztályra (TEqEval) (10.2 - 4. ábra). Ennek az osztálynak az elsődleges feladata az egyenletek paramétereinek, konstansok, álnevek és egyenletek tárolása, valamint a Tube objektum (az FCS fájl megfelelő adatsora) paramétereinek és az egyenletek alapján számított paraméterek összefogása.



10.2 - 4. ábra: Az egyenletszerkesztő modul tároló osztályának felépítése. Az osztály rendelkezik egy TEqAliasList-el, TEqConstList-el, továbbá egy TEqEqList-el, melyek feladata rendre az álnevek neveinek és a megfelelőített paraméter, a konstans nevek és értékek, valamint az egyenletértékelő objektumok (TEqEquation) tárolására, továbbá ismeri és használja az FCS fájl tároló objektum Tube objektumát.

Rendelkezik néhány metódussal is, a konstruktoron és destruktoron kívül, a Save és Load metódusokkal, melyek feladata az egyenletszerkesztő összes információjának írása és olvasása XML fájlból. Képes ezen kívül megjeleníteni az egyenletszerkesztő ablakot (felhasználói felület) a ShowEditor procedúra meghívásával. Továbbá rendelkezik egy

másoló rutinnal (Copy), melyen keresztül képes teljes tartalmát (álnevek, konstansok, egyenletek) átmásolni egy másik egyenletszerkesztő objektumba.

#### 10.2.4 Egyenlettároló, kiértékelő osztály

A TEqEquation osztály feladata egy a felhasználó által definiált egyenlet tárolása és annak kiértékelése az álnevek, konstansok és a rendelkezésre álló mért vagy számított sejtenkénti paraméterek ismeretében.

```
TEqEquation = class(TObject)
private
  fequation      : string;
  fTube         : TTube;
  fConstList    : TEqConstList;
  fAliList      : TEqAliasList;

  fSelfParam    : TParameter;
  ...
  fFormulaStack : TStack;
  fPostStack    : TStack;
  fTempStack    : TStack;
  ...
  procedure InFixToPostFix;
  procedure CalcPostFix;

protected
  ...
published
  ...
end;
```

Az osztály deklarációjában a privát tagok közül az “fequation” tárolja karakterlánc formában az egyenletet. Az fTube az FCS fájl megfelelő adatsorának paramétertároló objektumára mutat. Ugyancsak látja az osztály a konstansok és álnevek listáját (fConstList, fAliList), de csak olvassa őket. Az fSelfParam az osztály által létrehozott paraméter sejtenkénti értékeit tároló TParameter osztály egyede. Ezután következnek az egyenlet kiértékelése során fellépő hibák tárolására szolgáló mezők, majd a számításhoz szükséges veremek.

Az egyenlet értékelése során a felhasználó által beírt paramétereket, álneveket és konstansokat értelmezni kell, azaz az egyes nevek, álnevek helyére a megfelelő adatot vagy adatsort kell beírni. Az értelmezett, de még infix egyenletet tárolja a fFormulaStack, míg a postfix kifejezést az fPostStack tárolja (Infix kifejezés postfixé konvertálásának

elmélete: lásd B kiegészítés). Ezt a két lépést csak egyszer kell végrehajtani, hiszen minden egyes sejtre ugyanezt az egyenletet kell kiszámítani a megfelelő sejt megfelelő paraméterének értékével. A postfix kifejezés kiszámításához szükség van egy további veremre (fTempStack), melyben a részsámítások eredményeit tárolja az osztály.

A privát metódusok közül az InFixToPostFix valamint CalcPostFix metódusok az osztály legfontosabb feladatait látják el, az első az infix kifejezést alakítja postfix kifejezéssé, a második pedig a már postfix kifejezés sejtenkénti értékét határozza meg.

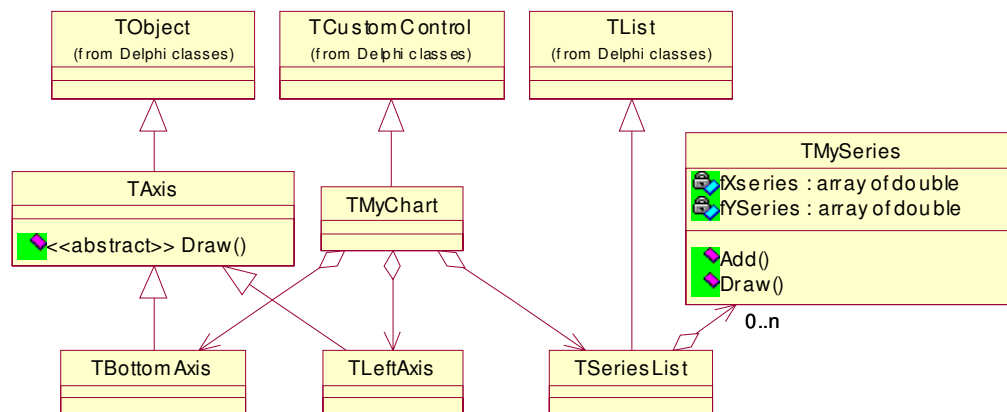
### 10.2.5 Grafikon komponens

A Borland Delphi tartalmaz egy grafikon komponenst (TChart), mely tulajdonságai és metódusai alapján alkalmas arra, hogy bázisosztálya legyen egy olyan osztálynak, mely dot-plotok és hisztogramok megjelenítésére képes. Azonban ez az osztály meglehetősen robusztus, nagyon sok metódusa és tulajdonsága van, így túlságosan nagy az erőforrásigénye. Ennek következtében a pontsorhoz adott pontok kirajzolása lassú, valamint tapasztalataink szerint kb. 20.000 pont felett a pontsorhoz történő pont hozzáadása, az újbóli memórafoglalás miatt hosszú időt vesz igénybe.

A probléma megoldását egy új grafikus komponens (TMyChart, 10.2 - 5. ábra) létrehozása jelentette, mely képes magát kirajzolni egy ablakra, vagy bármilyen más TControl-ból származó objektum fogadására alkalmas komponensre. A bázis osztálya a TCustomControl, mely rendelkezik vászonnal (TCanvas). Az alapötlet az, hogy a grafikon keretét, valamint a pontsorokat is közvetlenül erre a vászonra rajzolja a komponens. Azonban az átméretezések, valamint frissítések során a komponens villog, ami elkerülhető a komponens kétszeri pufferelemével.

A TMyChart-ból létrehozott TMyGateChart (10.2 - 5. ábra) rendelkezik a kapuk létrehozására és rajzolására is alkalmas metódusokkal. A kapuk módosítása során sokszor kell az egész grafikont újra rajzolni, mely egy meglehetősen időigényes (drága) művelet. A megoldást az jelenti, hogy a grafikont egy bittérképre (TBitMap) rajzolja a komponens, melyet a rajzolás végeztével kimásol a vásznára, míg a kapuk vonalait ezután közvetlenül a vászonra rajzolja. Így a kapuk módosítása esetén, mikor a pontsor és a keret nem változik, elegendő a bittérképet kimásolni a vászonra, és arra a kapukat újra rajzolni. Sajnálatos módon ekkor a komponens ismét villog. Ezért a végső megoldást az jelenti, hogy két bittérképet kell létrehozni. Az elsőre rajzolódik a keret és a pontsorok, amennyiben ezt

frissíteni kell. A másodikra másolódik az első bittérkép tartalma, valamint a kapuk kirajzolják magukat rá. Végül a kész grafikonképet a komponens másolja a vásznára. Ez kielégítően gyors, továbbá a komponens nem villog az átméretezés és kapurajzolás közben.



10.2 - 5. ábra: **TMyChart osztály felépítése.** Az osztály számos objektummal rendelkezik, melyek feladata a rajzolás egyes részeinek végrehajtása. A két tengely osztály (mindkettő a TAxis osztály leszármazottja) feladata az adott tengelyre vonatkozó beállítások tárolása (tengely vonalvastagság, skála minimum, maximum értéke, színe stb.), továbbá a beállításoknak megfelelő tengely és cím rajzolása a Draw függvénynek átadott vászónra. Egy grafikon több különböző pontsört (TMySeries) is ábrázolhat, melyeket a TList-ből származó fSeriesList privát tag fog össze.

### 10.2.5.1 *Grafikon komponens pontsor osztályai*

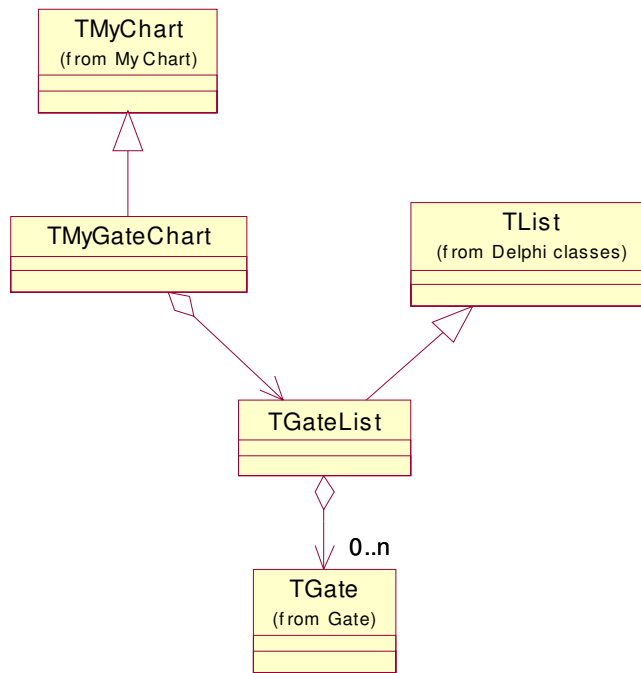
A pontsor osztályok bázis osztálya a `TMySeries`, melynek feladata az összetartozó értékpárok  $x, y$  értékeinek tárolása tömbökben. További feladata a pontsor rajzolása a `Draw` metódusnak átadott vászonra. Az ősoosztályban ez a metódus virtuális és absztrakt, melyet a belőle örökített osztályokban implementálni kell, a pontsor típusának megfelelő algoritmussal. Így a belőle származtatott osztályok elsősorban a rajzolás módjában térnek el egymástól.

`TMyPointSeries` valamint a `TLineSeries` rajzoló metódusa meglehetősen egyszerű. A pontsorozat osztály esetében a pontok  $[x, y]$  koordinátáit át kell számítani a grafikon vászon koordinátjává  $[i, j]$ , majd a vászon megfelelő pixelét át kell színezeni az osztály pontszínére (`Canvas.Pixels[i, j]:= Color;`). A vonalpontsor első pontja esetében a vászon tollát el kell mozgatni a pont vászonkoordinátjába (`Canvas.MoveTo( i, j );`), majd vonalat kell húzni a következő pont vászon koordinátái által meghatározott pontba a vonal színével (`Canvas.LineTo( i, j );`).

A `TMyDensitySeries` esetében a rajzoló algoritmus összetettebb, mivel ez a pontsorfajta egy kétdimenziós hisztogram színekódolt formában. Két, sejtenként mért paraméter értékei képezik az értékpárokat. Mind a két érték esetében meg kell határozni, hogy az adott paraméter egydimenziós hisztogramjának hányadik osztályába (intervallumába) esik. A két intervallum indexét ismerve a kétdimenziós hisztogram (kétdimenziós tömb) megfelelő cellájának értékét megnöveljük eggyel. Miután a fenti eljárást elvégeztük az összes értékpárra, a hisztogram minden egyes osztályához hozzá kell rendelni egy a grafikon háttérszínéből és a pontsor színéből generált színt, mely 256 különböző árnyalattal rendelkezik. Végül a vászon megfelelő pixelét a hisztogram értékeihez rendelt színűre kell átfesteni.

## 10.2.6 A kapukat rajzoló grafikon komponens

Ez a komponens (TMyGateChart) a TMyChart osztályból származik, örökölve annak minden metódusát és tulajdonságát, valamint képes a felhasználó által definiált kapukat az összes paraméterükkel tárolni és kirajzolni (10.2 - 6. ábra).

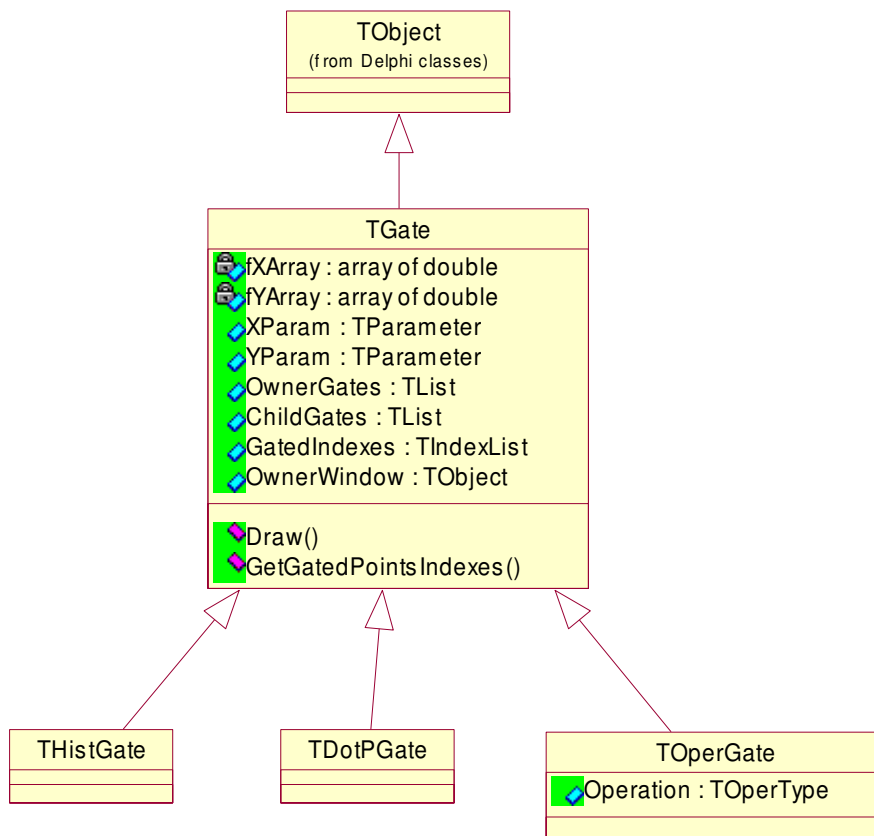


10.2 - 6. ábra: **A kapukat rajzoló grafikon osztály szerkezete.** Ez a komponens fogadja a felhasználó által kiváltott egéreseeményeket, melyekkel a felhasználó új kaput hozhat létre, vagy meglévő kaput módosíthat. A grafikonon létrehozott kapukat egy lista tartalmazza (TGateList). Minden egyes kapu rendelkezik egy rajzoló művelettel, mellyel ki tudja rajzolni határoló vonalait a grafikon vásznára.

Képes a Windows egér üzeneteit fogadni (bal egérgomb lenyomva (mouse down), felengedve (mouse up), duplaklikk (dblclick) stb.), mely segítségével a felhasználó kapukat hozhat létre, és a meglévő kapukat módosíthatja.

## 10.2.7 Kapu osztály és leszármazottai

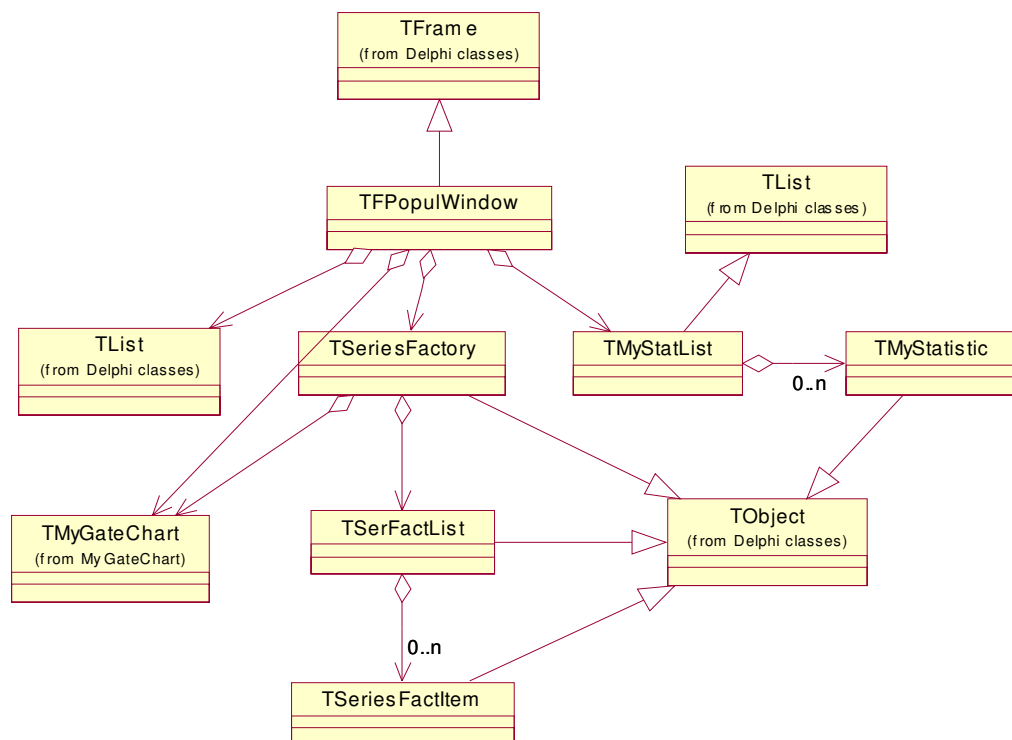
A kapu osztály (TGate) (10.2 - 7. ábra) feladata a kapuk összes tulajdonságának tárolása, valamint a kapuzás végrehajtása, mely azt jelenti, hogy minden egyes kapu képes előállítani a kapuzás feltételeit kielégítő sejtek részalmazát. Továbbá rendelkezik egy rajzoló metódussal, mellyel saját magát rajzolja ki a grafikon komponensre.



10.2 - 7. ábra: **Kapu osztályhierarchia.** A program három kapuosztályt használ a különféle kapuzások megvalósítására. Mindhárom osztály közös ős (TGate) leszármazottja, mely számos mezővel és két absztrakt metódussal rendelkezik, melyeket minden leszármazott osztálynak implementálnia kell. Az egyik a rajzoló metódus, mellyel a kapu a grafikonra rajzolja ki magát (Draw( Canvas: TCanvas; ... )), a második a kapuzás, mellyel a kisselektált sejtek indexét határozza meg (GatedIndexes: TIndexList). Ennek végrehajtásához minden kapu ismeri a sejt paramétereit, melyek grafikonján létre lett hozva (XParam, YParam: TParameter), az ablakot (OwnerWindow: TObject), melynek grafikonján lett definiálva, tartalmazza definiáló pontjait (fXArray, fYArray: array of double), valamint ismeri szülő és gyermek kapuit, melyeket egy-egy listában tárol (OwnerGates, ChildGates: TList).

## 10.2.8 Populációkat megjelenítő panel

A populációkat megjelenítő panel (TFPopulWindow) feladata a grafikus komponensek (grafikon, eszköztár, Kapuhierarchia tábla) csoportba foglalása, valamint megjelenítése. Az interfészen keresztül képes a felhasználó különböző paramétereket és grafikonokat megjeleníteni (hisztogram, dot-plot, density-plot), továbbá a kapukat szervezni, létrehozni, törölni, módosítani, illetve kapuk (alpopulációk) között műveleteket elvégezni (metszet, unió, inverz kapu stb.). Az osztály szerkezete a 10.2 - 8. ábrán látható.



10.2 - 8. ábra: **Populációkat megjelenítő panel szerkezete.** A TFPopulWindow osztály a TFrame osztály leszármazottja. Számos objektumot fog össze és irányít. Irányítja a Grafikon komponenst (TMyGateChart), valamint a TSeriesFactory-n keresztül állítja be a látható és rejtett alpopulációk megjelenítését. Tartalmaz egy listát (TList), mely az adott populáción létrehozott kapuk populációinak ablakait tartalmazza. Továbbá létrehoz egy TMyStatList objektumot, melynek feladata a statisztikák létrehozása (TMyStatistic), valamint a számítások elvégzésének irányítása.

#### 10.2.8.1 *Grafikon pontsorgyár osztály*

Ennek az osztálynak a feladata a grafikon komponens vezérlése. Minden egyes az adott populáción vagy valamelyik alpopulációján létrehozott kapuhoz létrehoz egy `TSeriesFactItem` osztályegyedet, melyet a `TSerFactList` osztályban tárol. A `TSeriesFactItem` feladata az adott kapu pontsorának (`TMySeries`) létrehozása és a grafikon komponenssel való kirajzoltatása. Ugyancsak feladata az egyes pontsorok rajzolási sorrendjének tárolása, valamint az adott populáció láthatóságától függően a pontsor létrehozása vagy megsemmisítése.

#### 10.2.8.2 *Statisztikák a TMyStatistic osztály*

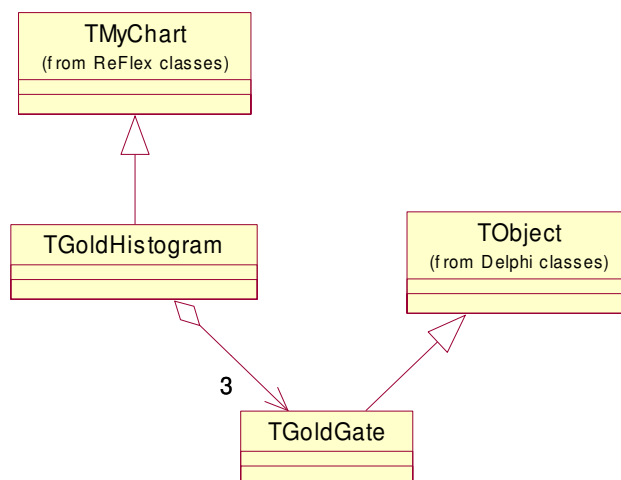
A program számos statisztika elvégzését lehetővé teszi, többek között átlag, szórás és módusz stb. számítását. Minden egyes statisztika létrehozásakor a `TMyStatistic` nevű osztály egy új egyede jön létre, melynek `StatType` tulajdonságának beállításával lehet a statisztika típusát kiválasztani. Az egyed feladata a sejt paraméterének tárolása, melyen a statisztikát el kell végezni, továbbá a számítások végrehajtása, valamint a kiszámított értékek megjelenítése.

Minden `TFPopulWindow` egyed rendelkezik `TMyStatList` osztályegyeddal, melyben a statisztikákat tárolja, valamint az osztály megfelelő metódusaival a `TMyStatistic` osztály egyedeit létrehozza, frissíti és megsemmisíti.

## 10.3 ClickOnGold Program osztályai

### 10.3.1 Grafikon komponens

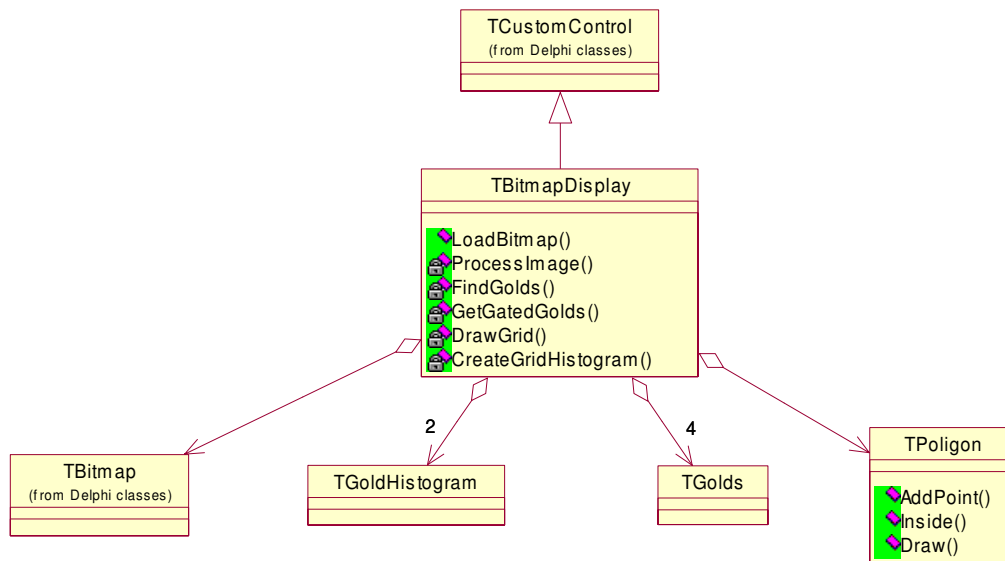
A program grafikon komponense a ReFlex program TMyChart grafikonjából származik (10.3 - 1. ábra). A származtatásra azért volt szükség, mivel a TMyGateChart komponense túlságosan összetett, hiszen az rendelkezik egy kapulistával, képes mind dot-plot, hisztogram és density-plot megjelenítésére, valamint megfelelő kapuk tárolására és rajzolására, mely funkciókra most nincs szükség. Így a TGoldHistogram létrehozásakor vissza kellett nyúlni az egyszerűbb, kevésbé specializált ősig. Az új grafikon komponens rendelkezik néhány, a TMyGateChart-éhoz hasonló metódussal és tulajdonsággal. Ez a komponens is képes kapukat, de csak hisztogram kapukat rajzolni, illetve a kapuk módosításához szükséges egéreseményeket fogadni, azonban csak három kapuval (TGoldGate) rendelkezik, a lehetséges három kapuzásnak (kék, zöld, lila), megfelelően.



10.3 - 1. ábra: **TGoldHistogram osztály felépítése.** Az osztály a TMyChart osztályból származik, mivel a TMyGateChart túlságosan specializált. Ez a komponens csak három hisztogram kapuval (TGoldGate) rendelkezik, melyek ugyancsak egyszerűbbek, mint a ReFlex program THistGate-jei, hiszen ezeknek a kapuknak nincsenek szülő és gyermek kapuik. Ennek megfelelően a kapuk számára egy új osztályt hoztunk létre, melyek feladata csak a kapu határainak tárolása, valamint a kapu rajzolása.

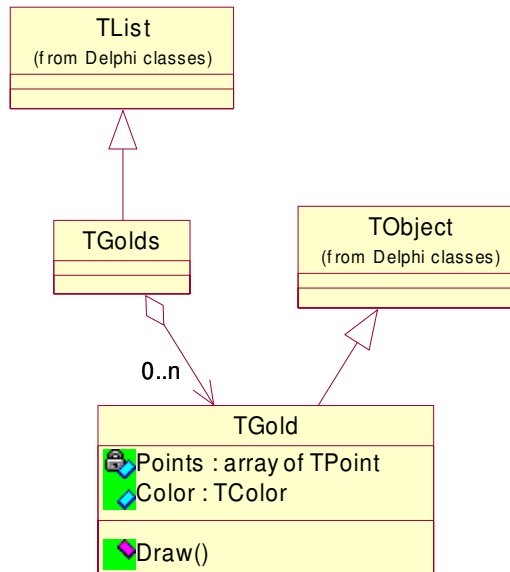
### 10.3.2 Képmegjelenítő osztály

A képmegjelenítő osztály (TBitmapDisplay osztály) (10.3 - 2. ábra) fogja össze és irányítja az egyes komponenseket, valamint feladata a képfeldolgozás és a statisztikai elemzések végrehajtása.



10.3 - 2. ábra: A **program osztályainak kapcsolata**. A képfeldolgozás és a hisztogramok létrehozása a TBitmapDisplay osztály végzi, majd a megkapott értékpárokat adja át a hisztogram komponenseknek (TGoldHistogram) megjelenítésre. További feladata még a kép megjelenítése (TBitmap), valamint az egéresemények kezelése.

A kép beolvasása után a ProcessImage metódus során létrejön az aranygömbök helyének meghatározására alkalmas kép és a FindGolds metódus meghívásával, meghatározza azok koordinátáit és pontjait. Minden egyes aranygömb képpontjainak tárolására egy TGold osztályegyed jön létre (10.3 - 3. ábra), illetve azok egy listába (TGolds) kerülnek. Az aranygömbök statisztikai feldolgozása során már a TGold lista elemeit használja.



10.3 - 3. ábra: **Az TGold és a TGolds osztályok.** A TGold osztály egyedei tárolják a megtalált aranyömbök pixeleinek koordinátáit (Points), valamint a rajzolásuk során használt színt. A TGold osztály egyedeit a TGolds lista fogja össze.

Amennyiben a felhasználó definiált a képen sokszöget, azaz kijelölt egy aktív területet, úgy az adatfeldolgozás következő lépése azon aranyömbök meghatározása, melyek a poligonon belül helyezkednek el. A poligon pontjainak tárolását valamint az egyes pontok elhelyezkedésének (a poligonon belül vagy kívül található-e a vizsgált pont) meghatározását egy külön osztály (TPoligon) végzi. Ezt követi az aranyömb méret hisztogramon létrehozott kapuk által meghatározott aranyömbök kiválasztása (GetGatedGolds), melyeket ugyancsak egy-egy listában tárol az osztály a kapu színének megfelelően, majd létrehozza az aranyömb méreteloszlásokat. Következő lépés a felhasználó által megadott méretű rácsozat megrajzolása (DrawGrid), valamint a kapuzott aranyömb populációkra a cellák aranyömb tartalmának eloszlás meghatározása. Végül a grafikon komponenseket frissíti, és a képet, ill. annak nagyításának és pozíciójának megfelelő részét a vászonra másolja.

#### **10.4 CD melléklet tartalma**

A disszertációhoz csatoltuk az általunk fejlesztett programok futtatható verzióját, valamint teljes forráskódját. A CD-n három könyvtár található a programok nevével, melyek tartalmazzák a programok telepítőit (programneveSetup.exe), próbamérési fájlokat a "Sample" alkönyvtárakban, melyekkel a programok kipróbálhatók, valamint a szoftverek teljes forráskódját a "Source" alkönyvtárakban.

## **11. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különnyomatai**