

# SPOT DYNAMICS IN 2D ELECTROPHORESIS IMAGES

**Lenka Polášková**

Bachelor Degree Programme (3), FEEC BUT

E-mail: xpolas28@stud.feec.vutbr.cz

Supervised by: Jiří Nedvěd

E-mail: nedved@phd.feec.vutbr.cz

**Abstract:** The text briefly describes factors and parameters which influence the results of 2D electrophoresis focusing on image processing as one manner to reduce incorrect interpretation of its outputs. As dataset, image processing performance uses images from repeated execution of one experiment also known as multiplicates. Using multiplicates analysis it is possible to observe or smother the changes of one experiment and to compare them with outputs of other experiments. The aim of this work is to provide support for specialist who takes care about describing the character patterns located in electrophoretic images.

**Keywords:** Image processing, spot dynamics, 2D electrophoresis.

## 1. ÚVOD

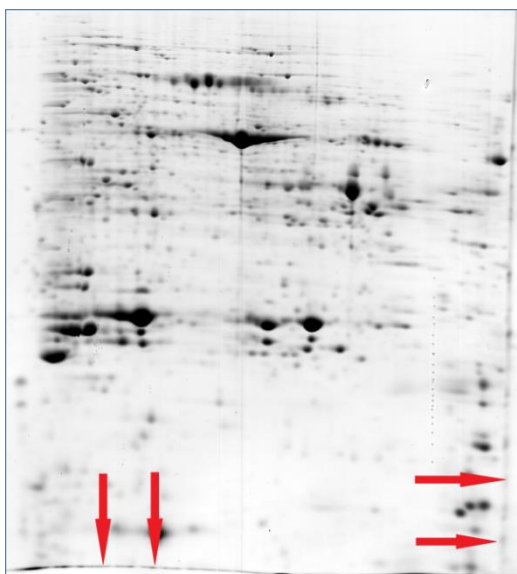
Elektroforéza je významnou a běžně využívanou metodou analýzy genomu či proteomu. Aplikace elektroforézy ve dvou směrech dala vzniku 2D gelové elektroforézy. Tato metoda představuje jednu z hlavních separačních technik budoucnosti, protože její předností, jako je citlivost na změny proteinů například vlivem posttranslační modifikace, jsou ve srovnání s jinými metodami bezkonkurenční. Elektroforéza je jednoduchá, rychlá, vizuální metoda s obvyklým rozlišením okolo 2000 proteinů a její výstupy je možno použít pro další analýzu například hmotnostní chromatografií. [1]

## 2. DYNAMIKA SPOTU

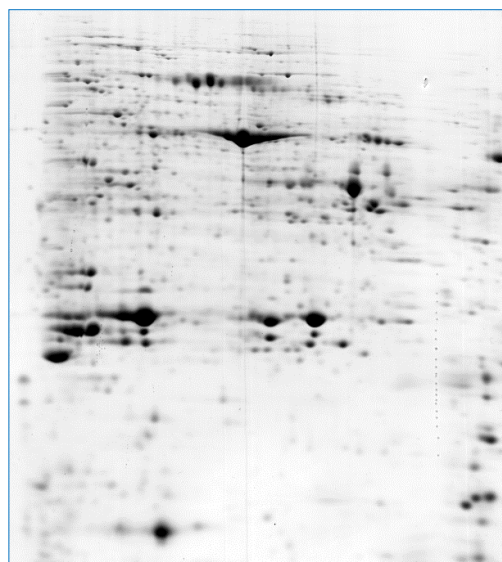
Elektroforéza je však také velice citlivá na změny jejích vstupních parametrů. I nepatrná změna může měřitelně ovlivnit výsledek separace. Dochází k posunu spotů vůči kontrolnímu vzorku, což je nazýváno dynamikou spotu. Změny vstupních parametrů jsou prováděny laborantem, v tom případě se jedná o žádoucí změny, a často je jejich účel experimentální. Bohužel se vyskytují také změny nežádoucí, kterým se nelze vždy vyhnout. Jedním ze způsobů jak sledovat žádoucí změny nebo omezit či upravit změny nežádoucí je vytváření vícenásobných replik. Vícenásobné repliky jsou výstupy vícero elektroforetických pokusů s jedním vzorkem. Vytvářejí se tak, že laborant rozdělí jeden vzorek do několika zkumavek a každý jednotlivý vzorek ze zkumavky podstupuje elektroforézu. Rozměření spotu ve vícenásobných replikách umožňuje odhad co možná nejvěrohodnějších informací o daném spotu.

## 3. NEŽÁDOUCÍ ZMĚNY VZORKU

Mezi nejzávažnější situace, kdy dochází ke změně migrace spotu, patří nehomogenní proudové charakteristiky uvnitř gelu (nedostatečně elektricky izolované okraje), mechanické poškození gelu nebo nedbalá péče při vizualizaci gelu či nesprávná interpretace obrazu. Malé změny se projevují při interakci proteinů s komponenty roztoku (solí, DNA, barviva, inhibitory, proteázy apod.). [2]



Obr. 1: chyba při vizualizaci – „shrnutý“ spodní a pravý okraj (znázorněno červenými šipkami)



Obr. 2: Úprava Obr. 1, „narovnání“ spodního a pravého okraje

#### 4. ÚPRAVA OBRAZU

Úprava elektroforetického obrazu je prováděna v programu MATLAB. Zahrnuje kroky předzpracování obrazu, poloautomatické detekce spotu, analýzy detekovaného spotu a grafické znázornění výstupu analýzy.

##### 4.1. PŘEDZPRACOVÁNÍ

Do této kategorie patří metody pro úpravu jasové a geometrické transformační funkce obrazu. Úprava jasové transformační funkce se provádí za účelem sjednocení průměrné hodnoty šedi obrazu a provádí se v každém obraze zvlášť. Jako příklad úpravy geometrické transformační funkce je uveden Obr. 1 a Obr. 2. Zde byla použita metoda interpolace hodnot pixelů obrazové matice za účelem „narovnání shrnutých“ okrajů.

##### 4.2. DETEKCE SPOTU

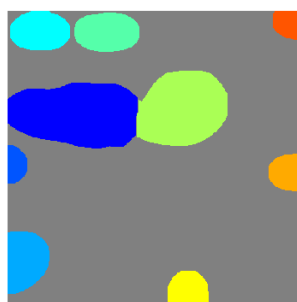
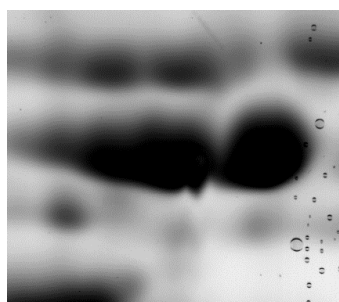
Jeden z obrazů vícenásobných replik je vybrán a v něm je spot detekován ručně. V dalších obrazech jsou spoty dohledány pomocí metod zpracování obrazu. Algoritmus detekce je víceúrovňový. Původní obraz je vykreslen jako mapa vzdáleností objektů. Vznikne obraz semínek [3]. Tento obraz podléhá segmentaci metodou povodí. Mezitím je vytvořen komplementární obraz k původnímu obrazu a v něm jsou struktury dilatovány, načež je provedena extenze maxim. Získaný obraz se nazývá binární maska [3]. Objekty v masce jsou oštitkovány. Protože v tomto obraze vznikne také informační šum, je nutno provést dohledání objektů, které reprezentují spoty. To se provádí překrytím masky semínky, pak je-li objekt v masce překryt semínkem, pak je objekt v masce validován jako spot. Takto vzniká obraz „filtrovaný“ od informačního šumu. Tento obraz je logickou operací or překryt s obrazem povodí. Výsledkem je obraz s jednotlivými spoty a provedená logická operace umožnila odlišit od sebe i velmi blízké (Obr. 4) nebo dokonce překrývající se objekty. Tento obraz opět podstupuje štitkování a oštitkované spoty lze již snadno rozměřit. Protože je v jednom obraze detekováno několik spotů, je nutno rozpoznat, který z těchto spotů odpovídá ručně detekovanému spotu. Pro všechny spoty v tomto obraze se tedy provede rozměření, získají se tři atributy a těmto atributům je přiřazena váha při rozhodování. Váhy lze nastavit volitelně pomocí panelu nástrojů. Pro rozhodování je použita metoda shlukové analýzy, kdy k ručně detekovanému spotu je přiřazen ten spot, jehož atributy mají k atributům ručně detekovaného spotu nejmenší euklidovskou vzdálenost.

### 4.3. ANALÝZA SPOTU

Výsledné detekované spoty jsou podrobeny analýze, při níž jsou získány informace o:

- horizontální a svislé poloze spotu,
- hodnotě nejvyšší intenzity,
- hodnotě integrované intenzity,
- hodnotě plochy spotu.

Součástí práce je grafické znázornění těchto parametrů. Tyto parametry se využívají v dalších projektech například pro získání informace o počtu proteinů ve spotu, tedy pro vyhodnocení celkové exprese, dále například pro vyhledání uspořádaných seskupení (*spot trains*) daných specifickou posttranslační modifikací a podobně.



Obr. 3: Velmi blízké spoty v originálním obraze. Obr. 4: Velmi blízké spoty jsou odlišeny.

## 5. VÝSLEDKY

Navržený program umožňuje výběr 1 až 6 obrazů a detekci a rozměření spotů v nich. Dále umožňuje úpravu posunutých okrajů obrazu. Nastavitelné parametry v panelu nástrojů poskytují zlepšení schopnosti detekce správného spotu. Zvýšení váhy pro y-ovou, resp. x-ovou souřadnici středu spotu zvýší pravděpodobnost nalezení spotu, který má stejné souřadnice jako ručně detekovaný spot, avšak zcela jinou hodnotu integrální denzity. Stejně tak zvýšení váhy pro integrální denzitu poskytuje zvýšení pravděpodobnosti detekce spotu s podobnou integrální denzitou. Volitelný posun pracovní oblasti umožňuje zacílit pracovní prostor na spot, který je potřeba detekovat, je-li to nutné.

## 6. ZÁVĚR

Metoda byla testována na 31 objektech nacházejících se v triplikách. Úspěšnost detekce dosáhla 86% se standardně nastavenými parametry a až 95% při změně parametrů. Posouzení toho, zda tyto výsledky jsou dobré či ne, ponechávám na odbornících. Relativní odchylka měření integrální denzity dosáhla 18% oproti referenčnímu měření v programu ImageJ. V bakalářské práci bude program rozšířen o možnost samostatného spuštění na knihovněch MATLABU.

## REFERENCE

- [1] J. Lopéz, „Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis,“ 2007.
- [2] A. M. Bland, L. R. D'Eugenio a M. A. Dugan, „Comparison of Variability Associated with Sample Preparation in Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Cardiac Tissue,“ 2006.
- [3] S. Straka, Segmentace obrazu, Brno, 2009.