

РАЗРАБОТКА МОДЕЛЕЙ И МЕТОДОВ АНАЛИЗА ДАННЫХ С УЧЕТОМ ОСОБЕННОСТЕЙ МЕТОДА ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПОСЛЕ ФОТООБЕСЦВЕЧИВАНИЯ

М. В. Антоненко

ВВЕДЕНИЕ

Одним из методов, которые позволяют проводить анализ внутриклеточных процессов, является метод восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP). Данный метод нашел широкое применение в исследованиях диффузии белков, скорости потока транспортных процессов, подвижности молекулярных соединений в мембранах [1].

На практике, как правило, проводят эксперименты с набором клеток с биологическим шумом (характеризует различные состояния жизненного цикла, наличие каких-либо молекулярных соединений и т.д.). Представляет практический интерес исследование подходов, основанных на усреднении данных, как с точки зрения оценки среднего значения параметра, так и построения доверительного интервала для этой оценки.

Целью данной работы является разработка моделей и методов анализа данных с учетом влияния экспериментальных особенностей метода FRAP (таких, как шум фотоэлектронного умножителя (ФЭУ), неполнота засветки и эффект темных состояний флуоресценции) и исследование подходов к анализу данных с усреднением и без усреднения кривых восстановления флуоресценции.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ С УЧЕТОМ НЕПОЛНОТЫ ЗАСВЕТКИ

Воздействие света лазера высокой интенсивности при фотообесцвечивании может привести к необратимым последствиям в клетке, выжиганию не только флуоресцирующего красителя, но и частиц самого образца, воздействуя на исследуемые процессы. Поэтому на практике происходит неполное выжигание исследуемой области клетки.

Для учета этого эффекта удобно ввести в теоретическую модель параметр φ – обесцвеченную часть интенсивности флуоресценции.

$$\varphi = \frac{I_{frap-bleach}}{I_{frap-pre}}, \quad (1)$$

где $I_{frap-bleach}$ – ординаты первой экспериментальной точки после фотообесцвечивания; $I_{frap-pre}$ – средняя интенсивность в исследуемой области клетки до фотообесцвечивания.

Тогда теоретические модели симулятора FRAP эксперимента в случае круговой области засветки имеют вид:

1. Модель диффузии G-актина:

$$\begin{cases} frap(t) = 1 - \varphi + \varphi * e^{-2\frac{\tau_D}{t}} * \left[I_0\left(2\frac{\tau_D}{t}\right) + I_1\left(2\frac{\tau_D}{t}\right) \right] \\ \tau_D = \frac{w^2}{4D_f} \end{cases}, \quad (2)$$

где t – время восстановления флуоресценции; I_0, I_1 – модифицированные функции Бесселя первого рода.

2. Модель химического взаимодействия («ловушек» G-актина):

$$frap(t) = 1 - \varphi_{набл} * e^{-k_{off}t}, \quad (3)$$

где k_{off} – константа скорости и освобождения (диссоциации) актина; $\varphi_{набл}$ – наблюдаемая обесцвеченная часть, которая не является реальной из-за быстропротекающего процесса диффузии, не учитываемого данной моделью, по сравнению с процессом химических взаимодействий.

3. Общая модель диффузии и неподвижных ловушек G-актина:

$$frap(t) = 1 - \varphi + \varphi * [L^{-1}(frap(p))], \quad (4)$$

где L^{-1} – оператор обратного преобразования Лапласа; $frap(p)$ – выражение для восстановления флуоресценции [2].

РАЗРАБОТКА СИМУЛЯТОРА FRAP-КРИВЫХ С УЧЕТОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ

Симулятор FRAP-эксперимента с учетом экспериментальных особенностей разработан для набора кривых, получаемых в ходе эксперимента: $frap$ – средняя интенсивность флуоресценции в исследуемой фотообесцвеченной области; $whole$ – во всей клетке; $base$ – вне клетки, фон; $reference$ – часть клетки вне исследуемой области.

При уменьшении интенсивности флуоресценции, то есть уменьшении числа фотонов, поступающих на катод ФЭУ, необходимо увеличивать напряжение на нем. При этом на ФЭУ уровень шумов экспоненциально возрастает [3], поэтому при моделировании FRAP-эксперимента при зашумлении данных кроме Гауссова шума, добавлялось слагаемое:

$$N_{PMT} = C_d * \xi * e^{C_{d2}/I_{max}}, \quad (5)$$

где ξ – реализация стандартной нормальной случайной; C_d, C_{d2} – калибровочные коэффициенты, позволяющие откалибровать конкретную экспериментальную установку; I_{max} – максимальный уровень интенсивно-

сти, определяющий «растяжение» кривой вдоль оси ординат, построенной по теоретическим значениям (в диапазоне от 0 до 1).

В частности, общее выражение для моделирования кривой *frap*:

$$I_{frap}(t) = I_{max}(I_{theory}(t) + C_{disp}\xi\sqrt{I_{theory}(t)}) + C_d\xi e^{C_{dz}/I_{max}}, \quad (6)$$

где I_{theory} - значения в соответствии с теоретической моделью.

Моделирование других рассматриваемых кривых флуоресценции осуществляется схожим образом (зашумление стандартным Гауссовым шумом теоретической модели, шкалирование по уровню интенсивности, учет шума ФЭУ в виде слагаемого N_{PMT} соответствие с этим уровнем).

Эффект повторного фотообесцвечивания, когда при снятии изображения часть флуорофоров повторно обесцвечивается, учитывается экспоненциальной зависимостью *reference(whole)*.

Таким образом, выражение для моделирования кривых *reference(whole)* имеет вид:

$$\begin{cases} I_{ref_th}(t) = e^{-\tau_{decay}t} + y_0; \\ I_{ref}(t) = I_{max}(I_{ref_th}(t) + C_{disp}\xi\sqrt{I_{ref_th}(t)}) + C_d\xi e^{C_{dz}/I_{max}}, \end{cases} \quad (7)$$

где y_0 – значение интенсивности флуоресценции при $t \rightarrow \infty$; τ_{decay} – параметр, учитывающий повторное уменьшение флуоресценции.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОДХОДОВ С УСРЕДНЕНИЕМ ДО ПРОЦЕССА ПОДГОНКИ ПАРАМЕТРОВ И ПОСЛЕ ПРИ БИОЛОГИЧЕСКОМ ШУМЕ

Разработанная методика исследования на первом этапе включает моделирование с использованием разработанного симулятора (набор из $N=30$ кривых), описывающих процесс диффузии в клетке с вариацией биологического параметра (в частности, вариация задавалась нормальным распределением коэффициента диффузии со средним значением $4 \text{ мкм}^2/\text{с}$ и стандартным отклонением $2 \text{ мкм}^2/\text{с}$).

Процесс анализа включает в себя предобработку данных. Для учета эффекта темных состояний (dark states) [4] отбрасывается 10 первых точек кривой флуоресценции в части до фотообесцвечивания. Выполнена нормировка данных [5]. На следующем этапе в первом подходе проводилось усреднение N кривых в каждой точке с последующим анализом для усредненной кривой. Затем по алгоритму оптимизации Левенберга-Марквардта [6] производился процесс подгонки параметров моделей для кривых восстановления флуоресценции, на основе которого строились доверительные интервалы для оценок параметра. Для оценки качества аппроксимации данных использовался параметр *RMSE* [6]. На последнем этапе во втором подходе необходимо усреднить N оценок средних значений биологического параметра и построить доверительный интер-

вал для этой оценки. Ввиду того, что N оценок среднего значения коэффициента диффузии могли быть получены с разной точностью, их усреднение проводилось как по формуле без учета весов для каждого значения [6], так и с учетом весовых факторов, относящихся как квадраты точности. В качестве оценки такой точности использовалось относительное значение ширины доверительного интервала:

$$RE_{\beta} = \frac{\beta}{x}, \quad (8)$$

где β – ширина доверительного интервала; x – оценка среднего значения.

Описанная методика повторялась 5 раз. Сравнение полученных в разных подходах оценок средних значений параметров моделей и ширины доверительного интервала проводилось на основе относительной ошибки (RE) [6] и параметра RE_{β} .

В результате для **оценки среднего** значения в подходе с усреднением *после подгонки* параметров RE в пределах 7–8.3 % в случае расчета среднего без учета весов и 0.2–4.5 % в случае расчета среднего с учетом весов. Для оценки среднего с усреднением *до подгонки* RE в пределах 9.7–12.9 %. Для **ширины доверительного интервала** с усреднением *после подгонки* параметров RE_{β} в пределах 4.8–7.6 % в случае расчета без учета весов и 4.9–6,6 % в случае расчета с учетом весов. Для оценки среднего с усреднением *до подгонки* $RE_{\beta} < 0.8$ %.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы: учет экспериментальных особенностей метода FRAP существенно влияет на качество анализа данных и оценку биологических параметров; в случае подхода с усреднением кривых, оценка среднего значения для биологического параметра получается ближе к теоретическому среднему, в то время как относительная ширина доверительного интервала данного получается большей, чем в подходе без усреднения. Расчет среднего значения по параметрам предпочтительнее производить с учетом весовых факторов.

Литература

1. Mueller F., James G McNally. FRAP and kinetic modeling in the analysis of nuclear protein dynamics: what do we really know? // *Biol. Curr Opin Cell*, 2010, 22:403-411.
2. Muller F. Numerical Simulations of FRAP. Graz, Mai 2005.
3. Murray J. M. Practical aspects of quantitative confocal microscopy.// *Methods in cell biology*, vol. 81, no. 06, pp. 467–78, Jan. 2007.
4. Bancaud G. Rabut, Jan Ellenberg. Fluorescence-Perturbation Techniques to Study Mobility and Molecular Dynamics of Proteins in Live Cells // *LiveCell*, Ch.5, 8/11/09.
5. Miura K., Analysis of FRAP curves, Heidelberg, 2005.
6. Bevington Philip R. Data Reduction and Error Analyses. 3-d edition. McGrawHill 2003.