

# Анализ кривых восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания

Антоненко М.В.<sup>1</sup>; Головатый А.А.<sup>2</sup>; Яцков Н.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра системного анализа и компьютерного моделирования

Факультет радиофизики и компьютерных технологий

Белорусский государственный университет

Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>University of Luxembourg, Luxembourg

e-mail: misha.antonenko.minsk@gmail.com, yatskou@bsu.by

**Аннотация**—В работе исследованы методы нормировки кривых восстановления флуоресценции, полученные в ходе экспериментов на основе фотообесцвечивания (Fluorescence Recovery After Photobleaching – FRAP). Анализ методов одинарной, стандартизированной одинарной, двойной, стандартизированной двойной нормировки, Рэйнера и нормировки обратного умножения выполнен на смоделированных данных, представляющих две модельные системы – диффузии G-актина и неподвижных ловушек G-актина. Рассмотрены подходы к анализу данных с усреднением и без усреднения репликантных кривых восстановления флуоресценции, исследовано влияние выбросов.

**Ключевые слова:** актин, диффузия, фотообесцвечивание, кривая восстановления флуоресценции, методы нормировки, имитационная модель, анализ данных

## I. ВВЕДЕНИЕ

Одним из методов, позволяющим проводить анализ внутриклеточных процессов, является метод восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (далее используется аббревиатура FRAP от Fluorescence Recovery After Photobleaching) [1]. Данный метод позволяет получить качественное и количественное описание протеин-протеиновых взаимодействий, выполняющих регуляторную функцию в клетках [2], описать латеральную диффузию мембранных протеинов [3], кинетику протеинов в клетке [4].

Результаты анализа данных, получаемых из экспериментов FRAP, крайне чувствительны к способам нормировки “сырых” данных. На практике применяются различные стратегии нормировки [5]. В настоящее время не существует единой классификации, позволяющей определить, какой из методов нормировки кривых FRAP и при каких условиях наиболее эффективен с точки зрения точности полученных результатов.

Целью данной работы является исследование методов и моделей анализа полимеризации белка актина с учетом экспериментальных особенностей метода восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания.

## II. ОСНОВЫ МЕТОДА FRAP

Перед проведением эксперимента исследуемый образец (белки в клетках) окрашивается флуоресцирующим красителем (чаще всего это green fluorescence protein – GFP). Затем в течение относительно короткого промежутка времени с

помощью света лазера высокой интенсивности происходит необратимое фотообесцвечивание небольшой области в клетке [6]. Из-за диффузии и транспортных процессов, а также химического взаимодействия в клетке, флуоресцирующие молекулы из необесцвеченной области проникают в исследуемую область. Таким образом, происходит частичное или полное восстановление флуоресценции. После фотообесцвечивания образец облучают пучком лазера относительно низкой мощности, чтобы измерить интенсивность флуоресценции. Однако ослабленный пучок лазера обесцвечивает часть флуорофоров. Этот эффект называется «приобретенное обесцвечивание» (acquisition bleaching) [5].

## III. СИМУЛЯТОР FRAP ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Симулятор FRAP экспериментов был разработан для трех модельных систем (область засветки в виде круга).

*A. Модель диффузии и неподвижных ловушек G-актина (глобулярный актин) [7].*

$$\left\{ \begin{array}{l} I_{frap}(p) = \frac{1}{p} - \frac{F_{eq}}{p} [1 - 2K_1(qw)I_1 * (qw)] * \\ * \left( 1 + \frac{k_{on}^*}{p+k_{off}} \right) - \frac{C_{eq}}{p+k_{off}} \\ F_{eq} = \frac{k_{off}}{k_{on}^*+k_{off}}; \\ C_{eq} = \frac{k_{on}}{k_{on}^*+k_{off}}; q = \sqrt{\frac{p}{D_f} \left( 1 + \frac{k_{on}^*}{p+k_{off}} \right)} \end{array} \right. , (1)$$

где  $p$  – переменная преобразования Лапласа в пространстве изображений;  $I_{frap}$  – интенсивность флуоресценции;  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  – константы скоростей связывания (ассоциации) и освобождения (диссоциации) соответственно;  $D_f$  – коэффициент диффузии мономеров белка актина;  $F_{eq}$ ,  $C_{eq}$  – концентрации в состоянии равновесия свободных белков и неподвижных ловушек белка актина соответственно;  $I_1, K_1$  – модифицированные функции Бесселя первого и второго рода соответственно;  $w$  – радиус пятна засветки. Для получения зависимости интенсивности флуоресценции от времени, необходимо выполнить обратное преобразование Лапласа. Данная операция реализована в функции *ivalp.m* [8].

B. Модель диффузии G-актина ( $k_{on}/k_{off} \ll 1$ ) [7].

$$I_{frap}(t) = e^{-\frac{w^2}{2D_f t}} * [I_0(\frac{w^2}{2D_f t}) + I_1(\frac{w^2}{2D_f t})], \quad (2)$$

где  $t$  – время восстановления флуоресценции.

C. Модель неподвижных ловушек G-актина

$$\left(\frac{k_{on}^* w^2}{D_f} \ll 1 \text{ и } \frac{k_{off}}{k_{on}^*} \ll 1\right) [7].$$

$$I_{frap}(t) = 1 - C_{eq} e^{-k_{off} t}. \quad (3)$$

Моделирование проводилось для семейства кривых восстановления: непосредственно кривой *frap* – средняя интенсивность флуоресценции в исследуемой фотообесцвеченной области; *whole* – во всей клетке; *base* – вне клетки, фон; *reference* – часть клетки вне исследуемой области. На все модельные кривые накладывался шум.

$$I(t) = I(t) + C_{disp} * \xi * \sqrt{I(t)}, \quad (4)$$

где  $C_{disp}$  – коэффициент разброса, регулирующий высоту шума;  $\xi$  – реализация стандартной нормальной случайной величины  $N(0,1)$ . Эффект приобретенного обесцвечивания учитывался введением параметра  $\tau_{decay}$ . Пример для кривой восстановления флуоресценции *whole* (5)

$$I_{whole}(t) = A_{decay} * e^{-\tau_{decay} * t} + y_0, \quad (5)$$

где  $y_0$  – некоторое значение интенсивности флуоресценции для  $t \rightarrow \infty$ ;  $\tau_{decay}$  – параметр, учитывающий уменьшение флуоресценции.

#### IV. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОВ НОРМИРОВОК

Для исследования влияния методов нормировок “сырых” данных FRAP на результаты проводимого анализа была разработана специальная методика. Выполнен анализ следующих нормировок: одинарная (*Single*), стандартизированная одинарная (*Single FS*), двойная (*Double*), стандартизированная двойная с (*Double FS*), Рэйнера (*Rainer's*) и нормировка обратного умножения (*Back Multiply*) [4].

Исследование проводилось для следующих моделей: 1) неподвижных ловушек G-актина, 2) диффузии мономеров G-актина, в зависимости от уровня шума (коэффициент  $C_{disp}$ ) и величины параметра  $\tau_{decay}$ , коэффициента диффузии  $D_f$ , коэффициента диссоциации  $k_{off}$ . В процессе оценки параметров кривых восстановления флуоресценции использовался алгоритм оптимизации Левенберга-Марквардта [9] и метод генерации начальных приближений в узлах сетки. Процедура выбора начальных приближений позволяет избежать попадания в локальный минимум в процессе оптимизации. Для оценки качества процесса подгонки использовалась нормированная сумма квадратов разностей отклонений смоделированных и теоретических данных  $RMSE$  (Root Mean Squared Error) [9]:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_i^T)^2}{n-m}}, \quad (6)$$

где  $y_i$ ,  $y_i^T$  – соответственно смоделированные и теоретические точки;  $n$  – размер выборки;  $m$  – количество оцениваемых параметров.  $RMSE$  близок к 0 при успешной подгонке. Качество методов нормировок оценивалось по относительной ошибке ( $RE$  – relative error) оцененных и исходных

параметров, заданных в модели:  $RE = (a - a_0/a_0) * 100\%$ , где  $a$  и  $a_0$  – оцененное и действительное значение некоторого параметра соответственно.

В случае значительного эффекта приобретенного фотообесцвечивания применимы двойная ( $RE < 2\%$ ,  $RMSE < 0.1$ ) и стандартизированная двойная ( $RE$ : 10-20%,  $RMSE < 0.1$ ) нормировки. Однако нормировки проявили неустойчивость к шуму ( $RE > 35\%$ ,  $RMSE > 0.15$  при большом шуме), что допускает возможность их применения лишь при малых шумах ( $RE < 15\%$ ,  $RMSE < 0.1$ ). В остальных случаях данные методы дают неудовлетворительный результат ( $RE$ : 35-60%).

Одинарная нормировка устойчива к шуму для всех моделей ( $RE$ : 10-15% и  $RMSE$ : 0.01-0.1 на всем диапазоне). Нормировка показывает хороший результат при различных значениях параметров системы ( $RE < 10\%$ ,  $RMSE \sim 0.05$  для  $k_{off}$ ;  $RE$ : 18-20%,  $RMSE < 0.05$  для  $D_f$ ), кроме случая эффекта приобретенного фотообесцвечивания ( $RE$ : 75-85%,  $RMSE > 0.15$ ). Данный эффект одинарная нормировка не позволяет учесть. Стоит отметить, что нормировка является наиболее устойчивой и универсальной.

Стандартизированная одинарная нормировка показала пригодность лишь для модели ловушек, причем на всем диапазоне изменения шума ( $RE < 5\%$ ,  $RMSE < 0.1$ ) и скорости диссоциации ( $RE$ : 2-8%,  $RMSE \sim 0.05$ ).

Нормировки Рэйнера и обратного умножения дают большую погрешность в случае наличия значимого эффекта приобретенного фотообесцвечивания ( $RE$ : 20-60%). Данные методы могут использоваться лишь при малых величинах коэффициента диффузии  $D_f$  ( $D_f < 5 \text{ мкм}^2/\text{с}$ ) в модели диффузии мономеров G-актина (тогда  $RE < 20\%$ ,  $RMSE < 0.1$ ).

#### V. СРАВНЕНИЕ ПОДХОДОВ К АНАЛИЗУ ДАННЫХ С УЧЕТОМ УСРЕДНЕНИЯ КРИВЫХ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И БЕЗ

Методика исследований в данном случае заключается в том, что для выбранной теоретической модели проводилось моделирование набора кривых с близкими значениями параметров, причем использовалось три стратегии: 1) все параметры одинаковые, но различные реализации шума; 2) все параметры теоретической модели одинаковые, но различался уровень шума; 3) незначительно различающиеся параметры моделей. В подходе с усреднением смоделированный набор кривых усреднялся в каждой точке (рис. 1).

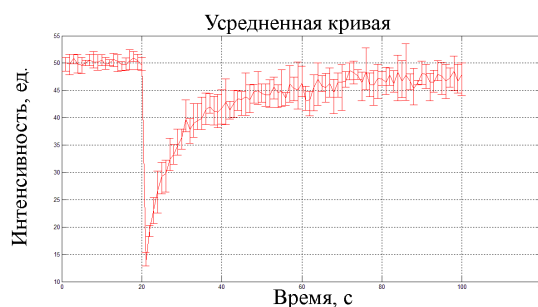


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции от времени усредненная по 10 наборам данных. Пример смоделированных

данных для модели диффузии с усреднением.  $D$  – в пределах от 2 мкм<sup>2</sup>/с до 4 мкм<sup>2</sup>/с.

Затем, для усредненной кривой проводилась нормировка и последующая подгонка параметров. В подходе без усреднения для всего набора кривых проводилась нормировка и подгонка параметров (рис. 2). По полученной выборке параметров рассчитывались медиана и математическое ожидание. Сравнение двух подходов проводилось по относительной ошибке с исходными параметрами. Несмотря на то, что исследование проводилось для всех описанных стратегий нормировок, ниже приведены результаты для одиночной нормировки, как показавшей наилучший результат для исследуемой модели в предыдущей части исследований.

Подходы дают практически одинаковые результаты (различие в RE<1%) в случае расчета мат. ожидания для подхода без усреднения. При расчете медианы подходы одинаковы в случае различной реализации шума (различие в RE<0,5%) и в случае различного уровня шума (различие в RE<1%). В случае незначительно отличающихся параметров модели лучшим является подход с усреднением (различие в RE~4%).

Методика исследований устойчивости к выбросам идентична (рис. 2).

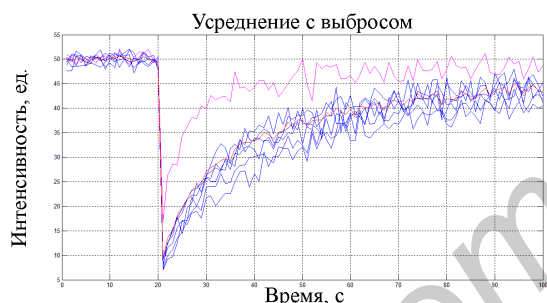


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции от времени. Пример 5 смоделированных наборов данных для модели диффузии с выбросом. Фиолетовая кривая является выбросом.  $D$  – в пределах от 2 мкм<sup>2</sup>/с до 4 мкм<sup>2</sup>/с, выброс – 14 мкм<sup>2</sup>/с.

Различие заключается в том, что одна из кривых моделируется со значительно различающимся параметром модели (в частности,  $D_j$ ). При расчете

медианы в подходе без усреднения, подходы дают практически одинаковый результат (различие в RE<0,5%), а в случае расчета мат. ожидания предпочтительным оказывается подход без усреднения (RE 11% против 36%).

## VI. ВЫВОДЫ

Наиболее универсальной нормировкой является одинарная, неприменимая лишь в случае эффекта приобретенного фотообесцвечивания. Этот эффект хорошо учитывают двойная и стандартизированная двойная нормировки. Нормировки Рэйнера и обратного умножения показывают хороший результат лишь при малом значении коэффициента диффузии.

В случае незначительно отличающихся параметров процесса предпочтительнее пользоваться подходом с усреднением, а в случае наличия выбросов – без усреднения.

- [1] Mueller F, Wach P, McNally JG. "Evidence for a common mode of transcription factor interaction with chromatin as revealed by improved quantitative fluorescence recovery after photobleaching". *Biophysical Journal*. 94. 2008. 3323-39.
- [2] Plastino J, Sykes C. "The actin slingshot", *Biol. Curr Opin Cell*. 2005. Т. 17(1). pp.62-6.
- [3] G. Rayan, J.-E. Guet, N. Taulier, F. Pincet and W. Urbach, "Recent Applications of Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) to Membrane Bio-Macromolecules", *Sensors*, 2010, 10(6), 5927-5948.
- [4] Carrero G, McDonald D, Crawford E, de Vries G, Hendzel MJ. "Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins.", *Methods*, V. 29, I. 1, J2003, P. 14-28
- [5] K. Miura, "Analysis of FRAP curves, Heidelberg", 2005, <http://www.embl.de/eamnet/frap/FRAP6.html>.
- [6] Nathan W. Goehring, Debanjan Chowdhury, Anthony A. Hyman, and Stephan W. Grill, "FRAP Analysis of Membrane-Associated Proteins: Lateral Diffusion and Membrane-Cytoplasmic Exchange", *Biophysical Journal*. Volume 99. 2010. 2443-2452.
- [7] Brian L. Sprague, Robert L. Pego, Diana A. Stavreva, and James G. McNally. "Analysis of Binding Reactions by Fluorescence Recovery after Photobleaching", *Biophysical Journal*. Т. 86. № 6. 2004. С. 3473-3495
- [8] K. J. Hollenbeck., "INVLAP.M: A matlab function for numerical inversion of Laplace transforms by the de Hoog algorithm", 1 Oct 1998
- [9] Philip R. Bevington, D. Keith Robinson. *Data Reduction and Error Analyses*. 3-d edition. McGrawHill 2003.