
ПРИБОРЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

RESEARCH INSTRUMENTS AND METHODS

УДК 303.732.4

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОВ НОРМИРОВКИ ДАННЫХ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОТООБЕСЦВЕЧИВАНИЯ

М. В. АНТОНЕНКО¹⁾, А. А. ГОЛОВАТЫЙ²⁾, Н. Н. ЯЦКОВ¹⁾, В. В. СКАКУН¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет,
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь
²⁾Европейская молекулярно-биологическая лаборатория,
Мейерхофштрассе, 1, 69117, г. Гейдельберг, Германия

Исследованы алгоритмы нормировки данных эксперимента по восстановлению флуоресценции после фотообесцвечивания на примерах моделей диффузии и молекулярных взаимодействий белка актина, отражающих особенности проведения эксперимента. Представлен сравнительный анализ методов нормировки данных

Образец цитирования:

Антоненко М. В., Головатый А. А., Яцков Н. Н., Скакун В. В. Исследование методов нормировки данных в экспериментах с использованием фотообесцвечивания // Журн. Белорус. гос. ун-та. Физика. 2017. № 1. С. 108–117.

For citation:

Antonienka M. V., Halavaty A. A., Yatskou M. M., Skakun V. V. Analysis of data normalization methods for photo-bleaching experiments. *J. Belarus. State Univ. Phys.* 2017. No. 1. P. 108–117 (in Russ.).

Авторы:

Михаил Владимирович Антоненко – аспирант кафедры системного анализа и компьютерного моделирования факультета радиоп физики и компьютерных технологий. Научный руководитель – В. В. Скакун.

Александр Александрович Головатый – кандидат физико-математических наук; научный сотрудник.

Николай Николаевич Яцков – кандидат физико-математических наук; доцент кафедры системного анализа и компьютерного моделирования факультета радиоп физики и компьютерных технологий.

Виктор Васильевич Скакун – кандидат физико-математических наук; заведующий кафедрой системного анализа и компьютерного моделирования факультета радиоп физики и компьютерных технологий.

Authors:

Mikhail Antonienka, postgraduate student at the department of systems analysis and computer simulation, faculty of radiophysics and computer technologies.

misha.antonienko.minsk@gmail.com

Aliaksandr Halavaty, PhD (physics and mathematics); researcher. *aliaksandr.halavaty@embl.de*

Mikalai Yatskou, PhD (physics and mathematics); associate professor at the department of systems analysis and computer simulation, faculty of radiophysics and computer technologies.

yatskou@bsu.by

Victor Skakun, PhD (physics and mathematics); head of the department of systems analysis and computer simulation, faculty of radiophysics and computer technologies.

skakun@bsu.by

и впервые предложена их классификация по признакам, характеризующим биологическую систему. Проведено сравнение подходов к усреднению экспериментальных данных и оценок параметров. Показано, что усреднение оценок параметров, а не самих экспериментальных данных позволяет получить менее смещенные оценки параметров биологической системы.

Ключевые слова: фотообесцвечивание; анализ данных; имитационная модель; кривая восстановления флуоресценции; методы нормировки; диффузия.

ANALYSIS OF DATA NORMALIZATION METHODS FOR PHOTOBLEACHING EXPERIMENTS

M. V. ANTONENKA^a, A. A. HALAVATYI^b, M. M. YATSKOU^a, V. V. SKAKUN^a

^a*Belarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus*

^b*European Molecular Biology Laboratory, Meierkhofshtrasse, 1, 69117, Heidelberg, Germany*

Corresponding author: misha.antonenko.minsk@gmail.com

The research of normalization methods of fluorescence recovery after photobleaching experimental data for diffusion and chemical interactions models taking into account experimental features is performed. The comparison of data normalization methods is performed, and the classification of normalization methods based on biological system's features is first proposed. The comparison of averaging experimental data method and averaging parameter estimation method is performed. It is shown that parameter estimation values averaging rather than experimental data values averaging leads to less biased estimates of biological system's parameters.

Key words: photobleaching; data analysis; simulation model; fluorescence recovery curve; normalization methods; diffusion.

Введение

Одним из методов, позволяющих выполнять анализ внутриклеточных процессов, является восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания (ВФФ; в литературе на английском языке – Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP) [1]. Метод широко используется ввиду относительно невысокой стоимости проведения экспериментов, позволяет получить качественное и количественное описание белков, выполняющих регуляторную функцию в клетках, и их взаимодействий. Среди проводимых исследований особый интерес вызывает изучение полимеризации белка актина в живых клетках, так как нарушение актиновых клеточных структур связано с различного рода заболеваниями [2].

Существующие модели анализа кинетических процессов полимеризации белка актина, такие как диффузии Элленберга и Соупмэсиса, модель химических взаимодействий [3; 4], не учитывают экспериментальных особенностей, связанных с частичным обесцвечиванием исследуемого биологического образца, конечным временем засветки, переходом части флуорофоров в триплетное состояние при изменении режима работы лазера. В свою очередь, разработка моделей кинетических процессов белка актина для анализа данных без учета экспериментальных искажений приводит к смещению оценок параметров [5]. Методы анализа результатов FRAP-экспериментов используют различные способы преобразования и нормировки данных [6; 7]. Исследование влияния алгоритмов нормировки на точность оценок параметров моделей диффузии и взаимодействия белка актина с нелюминесцирующими молекулами, сайтами связывания, или ловушками, является одной из важнейших задач. В настоящее время в литературе не представлены научные работы по единой классификации и исследованию методов нормировки данных FRAP-экспериментов, дающие рекомендации к практическому использованию алгоритмов нормировки данных.

Цель настоящей работы – исследование алгоритмов нормировки данных FRAP-экспериментов на примерах моделей диффузии и молекулярных взаимодействий белка актина. Представлен алгоритм моделирования кривых восстановления флуоресценции в различных областях клеток для моделей диффузии и молекулярных взаимодействий белка G-актина. Разработана методика исследования влияния различных способов преобразования (нормировок) экспериментальных данных на качество получаемых оценок параметров. Представлена классификация применимости различных методов нормировок в зависимости от признаков биологической системы, проведено сравнение подходов к усреднению экспериментальных данных и оценок параметров.

Восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания

Во FRAP-методе в результате применения лазера высокой интенсивности в течение относительно короткого промежутка времени происходит необратимое фотообесцвечивание небольшой области, так называемой области интереса, в клетке ROI (от англ. *region of interest*). Затем вследствие различных транспортных и миграционных процессов с участием белков в клетке флуоресцирующие молекулы из необесцвеченной области проникают в область интереса. Таким образом, происходит восстановление флуоресценции молекул до некоторого постоянного значения – области плато. При этом скорость достижения плато, а также форма кривой восстановления зависят от диффузии и взаимодействия белков и их комплексов в клетке.

Полный набор данных FRAP-эксперимента включает следующие кривые флуоресценции: $I_{\text{frap}}(t)$ – средняя интенсивность флуоресценции в области фотообесцвечивания; $I_{\text{base}}(t)$ – средняя интенсивность флуоресценции вне клетки («фон»); $I_{\text{whole}}(t)$ – средняя интенсивность всей исследуемой клетки; $I_{\text{ref}}(t)$ – средняя интенсивность в области клетки вне фотообесцвечивания. Минимальным объемом данных, пригодных для анализа, является набор из двух кривых флуоресценции – $I_{\text{frap}}(t)$ и $I_{\text{whole}}(t)$.

Алгоритмы нормировок кривых восстановления флуоресценции

Рассмотрим нормировки, не учитывающие приобретенное обесцвечивание образца вследствие работы лазера в режиме измерения интенсивности флуоресценции после фотообесцвечивания. В нормировках Рэйнера и обратного умножения [8] кривая FRAP нормируется ($I_{\text{frap-norm}}$) в соответствии с выражением

$$I_{\text{frap-norm}} = \frac{I_{\text{frap}}(t) - I_{\text{frap-bleach}}}{I_{\text{frap-pre}} - I_{\text{frap-bleach}}},$$

где $I_{\text{frap-bleach}}$ – значение интенсивности флуоресценции сразу после обесцвечивания; $I_{\text{frap-pre}}$ – средняя интенсивность флуоресценции в исследуемой области клетки до фотообесцвечивания.

Затем процессу нормировки подлежит одна из доступных кривых эксперимента – $I_{\text{whole}}(t)$ или $I_{\text{ref}}(t)$. Для определенности запишем нормировку Рэйнера для кривой $I_{\text{whole}}(t)$

$$I_{\text{whole-norm}} = \frac{I_{\text{whole}}(t) - I_{\text{frap-bleach}}}{I_{\text{frap-pre}} - I_{\text{frap-bleach}}}.$$

Нормировка обратного умножения над кривой $I_{\text{whole}}(t)$ выполняется в два этапа:

$$I_{\text{whole-norm}_1}(t) = (I_{\text{whole}}(t) - I_{\text{base}}(t)) \frac{I_{\text{frap-pre}}}{I_{\text{whole-pre}}};$$

$$I_{\text{whole-norm}_2}(t) = \frac{I_{\text{whole-norm}_1}(t)}{I_{\text{frap-pre}} - I_{\text{frap-bleach}}}.$$

Приобретенное обесцвечивание в нормировках учитывается в процессе регрессионного анализа. Рассмотрим параметр уменьшения флуоресценции (τ_{decay}):

$$I_{\text{frap-norm}}(t) = \frac{I_{\text{frap-norm}}(t)}{e^{-\tau_{\text{decay}} t}}.$$

В двойной (Double) нормировке [8] учитывается эффект приобретенного обесцвечивания путем введения в нормировку данных из кривой $I_{\text{whole}}(t)$:

$$I_{\text{frap-norm}} = \frac{I_{\text{whole-pre}}}{I_{\text{whole}}(t) - I_{\text{base}}(t)} \frac{I_{\text{frap}}(t) - I_{\text{base}}(t)}{I_{\text{frap-pre}}}.$$

Для одинарной (Single) нормировки [8] необходимы только кривые I_{frap} и $I_{\text{base}}(t)$:

$$I_{\text{frap-norm}} = \frac{I_{\text{frap}}(t) - I_{\text{base}}(t)}{I_{\text{frap-pre}}}$$

В методах двойной и одинарной шкалированных нормировок [8] дополнительно проводят нормировку к полной шкале (Full scale):

$$I_{\text{frap-norm}}(t) = \frac{I_{\text{frap-norm}}(t) - I_{\text{frap-norm}}(t_{\text{bleach}})}{I_{\text{frap-norm-pre}} - I_{\text{frap-norm}}(t_{\text{bleach}})}$$

Модели G-актина для кривой восстановления флуоресценции

Для глобулярных молекул G-актина существуют два основных фактора, влияющих на их подвижность: диффузия, зависящая от условий биологической среды (вязкость цитоплазмы, температура и др.) [4], взаимодействие с нелюминесцирующими молекулами, сайтами связывания, или ловушками. В общем случае изменения концентраций сайтов связывания, свободных и связанных белков во времени описываются системой

$$\begin{cases} \frac{\partial f}{\partial t} = D_f \nabla^2 f - k_{\text{on}} f s + k_{\text{off}} c, \\ \frac{\partial s}{\partial t} = D_s \nabla^2 s - k_{\text{on}} f s + k_{\text{off}} c, \\ \frac{\partial c}{\partial t} = D_c \nabla^2 c + k_{\text{on}} f s - k_{\text{off}} c, \end{cases} \quad (1)$$

где f – концентрация свободных белков; s – концентрация ловушек (сайтов связывания); c – концентрация связанных комплексов; D_f, D_s, D_c – коэффициенты диффузии для свободных белков, ловушек и комплексов соответственно; $k_{\text{on}}, k_{\text{off}}$ – скорости ассоциации и диссоциации соответственно.

В случае влияния процессов диффузии и взаимодействия с ловушками на восстановление флуоресценции решение данной системы представляет собой преобразование Лапласа от функции восстановления флуоресценции. Для получения зависимости интенсивности флуоресценции от времени необходимо провести обратное преобразование Лапласа: $\text{frap}(t) = L^{-1}[\text{frap}(p)]$, где L^{-1} – оператор обратного преобразования Лапласа.

$$\begin{cases} \text{frap}(p) = \frac{1}{p} - \frac{F_{\text{eq}}}{p} (1 - 2K_1(qw)I_1(qw)) \left(1 + \frac{k_{\text{on}}}{p + k_{\text{off}}}\right) - \frac{C_{\text{eq}}}{p + k_{\text{off}}}, \\ F_{\text{eq}} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}} + k_{\text{off}}}; C_{\text{eq}} = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{on}} + k_{\text{off}}}; q = \sqrt{\left(\frac{p}{D_f}\right) \left(1 + \frac{k_{\text{on}}}{p + k_{\text{off}}}\right)}, \end{cases} \quad (2)$$

где $F_{\text{eq}}, C_{\text{eq}}$ – концентрации в состоянии равновесия свободных протеинов и неподвижных ловушек соответственно, причем $F_{\text{eq}} + C_{\text{eq}} = 1$; I_1, K_1 – модифицированные функции Бесселя первого и второго рода соответственно; w – радиус пятна засветки.

В частном случае, при $\frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} \ll 1$, система описывается моделью диффузии:

$$\left\{ \text{frap}(t) = e^{-2\frac{\tau_D}{t}} \left[I_0\left(2\frac{\tau_D}{t}\right) + I_1\left(2\frac{\tau_D}{t}\right) \right]; \tau_D = \frac{w^2}{4D_f}, \right. \quad (3)$$

где I_0, I_1 – модифицированные функции Бесселя первого рода нулевого и первого порядков соответственно. Ограничения применимости – двумерная диффузия и круглая засветка [9].

В случае большой концентрации ловушек и малой скорости ассоциации $\left(\frac{k_{\text{on}} w^2}{D_f} \ll 1 \text{ и } \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \ll 1 \right)$ целесообразно использовать модель ловушек G-актина

$$\text{frap}(t) = 1 - C_{\text{eq}} e^{-k_{\text{off}} t}. \quad (4)$$

В этой модели процесс диффузии происходит быстро относительно процессов химического взаимодействия и шкалы времени проведения эксперимента [4].

Моделирование G-актина для кривой восстановления флуоресценции

Моделирование экспериментальных данных осуществляется для трех кривых – $I_{\text{frap}}(t)$, $I_{\text{whole}}(t)$, $I_{\text{base}}(t)$. Первоначально выбираются интервал и шаг по времени, в течение которого происходит моделирование. Затем в сформированных отсчетах времени рассчитываются теоретические значения $I_{\text{theory}}(t)$ для выбранной модели согласно математическому описанию соответствующей модели (формулы (1)–(4)).

При моделировании *кривой восстановления в области интереса* после расчета теоретических значений I_{theory} к полученной кривой добавляется шум:

$$I_{\text{frap}} = \begin{cases} I_{\text{theory}} + C_{\text{disp}} P_{\lambda}, & I_{\text{theory}} \ll I_{\text{max}}, \\ I_{\text{theory}} + C_{\text{disp}} \xi \sigma, & I_{\text{theory}} \sim I_{\text{max}}, \end{cases} \quad (5)$$

где C_{disp} – коэффициент разброса, регулирующий высоту шума в интервале $[0,01; 0,12]$; ξ – реализация нормальной случайной величины с математическим ожиданием 0 и дисперсией 1; $\sigma = \sqrt{I_{\text{theory}}}$ – коэффициент, учитывающий неравномерную величину шума в зависимости от значения интенсивности; P_{λ} – реализация пуассоновской случайной величины, в качестве параметра пуассоновского распределения при относительно малых значениях интенсивности (до 20 единиц при максимальном значении 255) выступает теоретическая интенсивность $\lambda = I_{\text{theory}}$. Фаза до обесцвечивания

$$I_{\text{frap-pre}} = C_{\text{frap-pre}} + C_{\text{disp}_2} \xi \sqrt{C_{\text{frap-pre}}}, \quad (6)$$

где коэффициент $C_{\text{frap-pre}}$ соответствует максимальному значению теоретической интенсивности $C_{\text{frap-pre}} = I_{\text{theory}}^{\text{max}} = I_{\text{theory}}(t \rightarrow \infty)$; C_{disp_2} – коэффициент разброса в интервале $[0,01; 0,12]$, характеризующий флуктуации системы до обесцвечивания.

Кривая восстановления в области вне клетки вычислялась по формуле

$$I_{\text{base}} = C_{\text{base}} + C_{\text{disp}} \xi \sqrt{C_{\text{base}}}, \quad (7)$$

где коэффициент C_{base} может варьироваться в интервале $[0,01; 0,5]$ (в настоящей работе принималось $C_{\text{base}} = 0,1$). В предположении, что фоновая интенсивность вне клетки не меняется при проведении эксперимента, отдельного моделирования кривой восстановления флуоресценции до обесцвечивания не требуется.

Кривая восстановления в области всей клетки в случае обретенного обесцвечивания

$$I_{\text{whole}} = A_{\text{decay}} e^{-\tau_{\text{decay}} t} + y_0, \quad (8)$$

где τ_{decay} – параметр, учитывающий уменьшение флуоресценции; y_0 – значение, к которому стремится интенсивность при $t \rightarrow \infty$. В смоделированной кривой значение y_0 выбиралось как $y_0 = \max(I_{\text{base}})$ на том основании, что средняя интенсивность флуоресценции во всей клетке не может стать ниже уровня «фоновой» интенсивности вне клетки; A_{decay} – коэффициент, определяющий максимальный уровень интенсивности. Далее, на всю кривую $I_{\text{whole}}(t)$ накладывался шум в соответствии с выражением (5).

При переключении лазера в режим снятия изображения часть флуорофоров переходит в триплетное состояние [10], уменьшая число флуорофоров, участвующих в процессе флуоресценции, что оказывает непосредственное влияние на кривую восстановления. Для учета эффекта изменения концентрации

флуоресцирующих частиц необходимо исключить из анализа первые экспериментальные точки. В алгоритм анализа данных добавлена возможность задавать время изменения частоты снятия изображения, чтобы исключить из последующего анализа увеличение средней интенсивности, которое не связано с процессами, проходящими в клетке, а представляет собой особенность проведения эксперимента.

В большинстве FRAP-экспериментов не производят полного выжигания флуорофоров в интересующей области образца [11]. Это связано с тем, что воздействие лазера высокой интенсивности может привести к выжиганию не только флуоресцирующего красителя, но и частиц самого образца. Существенным фактором неполной засветки может быть конечное время засветки. В результате влияния данных факторов кривая восстановления изначально имеет ненулевой уровень интенсивности. Для учета подобных эффектов в имитационной модели введен параметр φ , характеризующий обесцвеченную часть:

$$\varphi = \frac{I_{\text{frap-bleach}}}{I_{\text{frap-pre}}} \quad (9)$$

Для общей модели диффузии и неподвижных ловушек G-актина справедливо выражение

$$\text{frap}(t) = 1 - \varphi + \varphi [L^{-1}(\text{frap}(p))], \quad (10)$$

где L^{-1} – оператор обратного преобразования Лапласа.

Алгоритм анализа кривых восстановления флуоресценции

Для исследования влияния методов нормировки на качество анализа данных предложена методика изучения и моделирования последних, основные этапы которой представлены на рис. 1, а. На рис. 1, б, приведены методы усреднения для работы с набором клеток.



Рис. 1. Методики исследования влияния различных способов нормировок (а) на качество анализа данных (начало)

Fig. 1. Methods of investigation normalization (a) impact on the data analysis quality (beginning)

б/б

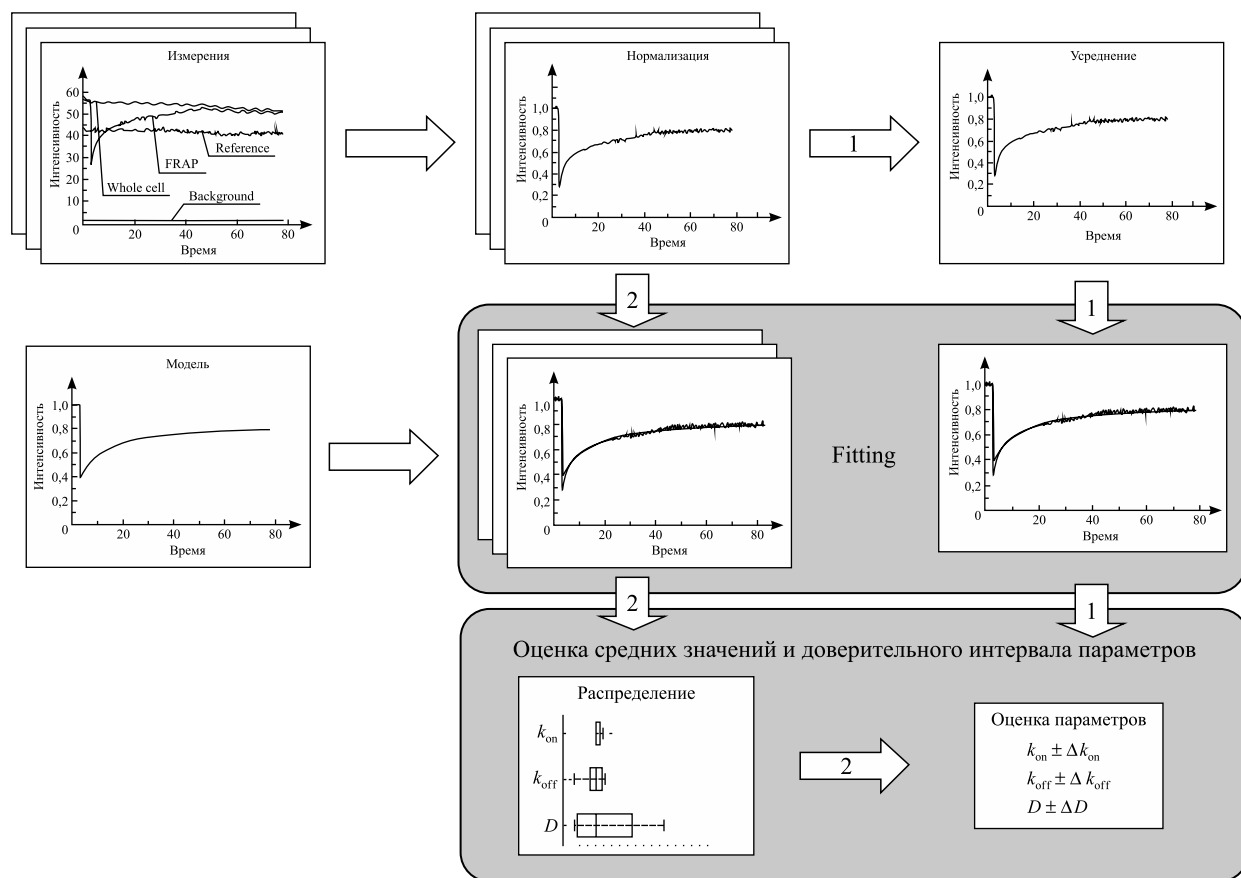


Рис. 1. Методики исследования усредняющих подходов (б) на качество анализа данных (окончание)
Fig. 1. Methods of investigation averaging technics (b) impact on the data analysis quality (ending)

Прежде всего необходимо выбрать модель G-актина для кривой восстановления, для которой будет проводиться сравнительный анализ, и исследуемый параметр (блок 1) (см. рис. 1), например уровень шума, коэффициент диффузии и др. Затем устанавливается интересующий интервал для выбранного параметра (блок 2). В цикле по всем отсчетам анализируется набор N реализаций, а именно производится моделирование набора кривых флуоресценции (блок 3) в соответствии с выражениями (5)–(10), затем применяются методы нормировок (блок 4) – одиночная, двойная, одиночная шкалированная, двойная шкалированная, нормировка Рэйнера и нормировка обратного умножения. Последние две нормировки идентичны в случае отсутствия эффекта уменьшения флуоресценции после фотообесцвечивания. В блоке 5 выполняется процедура аппроксимации нормированных кривых (блок 6), в качестве целевой функции используется евклидово расстояние, применяется алгоритм минимизации Левенберга – Марквардта. В результате выполнения анализа предоставляется набор оценок параметров моделей – медианное значение и их 95 % доверительные интервалы (блок 6). По медианному значению для текущего отсчета вычислялась относительная ошибка (RE – relative error) $RE = \frac{\Delta x}{x_{true}}$. На последнем

шаге строились графики относительной ошибки для всего диапазона исследуемого параметра (блок 7).

В целях определения метода усреднения, с помощью которого можно получить более состоятельные оценки параметров, по идентичной схеме проводилось исследование двух подходов к анализу набора клеток, имеющих определенный биологический шум. Различие в подходах заключается в том, что в первом случае усреднение происходит до процесса аппроксимации параметров и анализируется усредненная кривая, во втором – после процесса аппроксимации параметров, т. е. усредняются оценки параметров.

Результаты эксперимента и их обсуждение

Исследование влияния методов нормировки на качество анализа данных проводилось для следующих параметров и моделей G-актина: уровня шума (C_{disp}) и коэффициента диссоциации (k_{off}) для модели ловушек G-актина, коэффициента диффузии (D_f) для модели диффузии. Результаты сравнительного анализа алгоритмов нормировки данных представлены на рис. 2.

Проведенные исследования позволили сделать следующие выводы.

- Единичная нормировка является наиболее универсальной. Устойчива к шуму ($RE < 15\%$), для всех моделей показывает приемлемый результат ($RE < 13\%$), а для модели диффузии – наилучший результат ($RE < 10\%$).

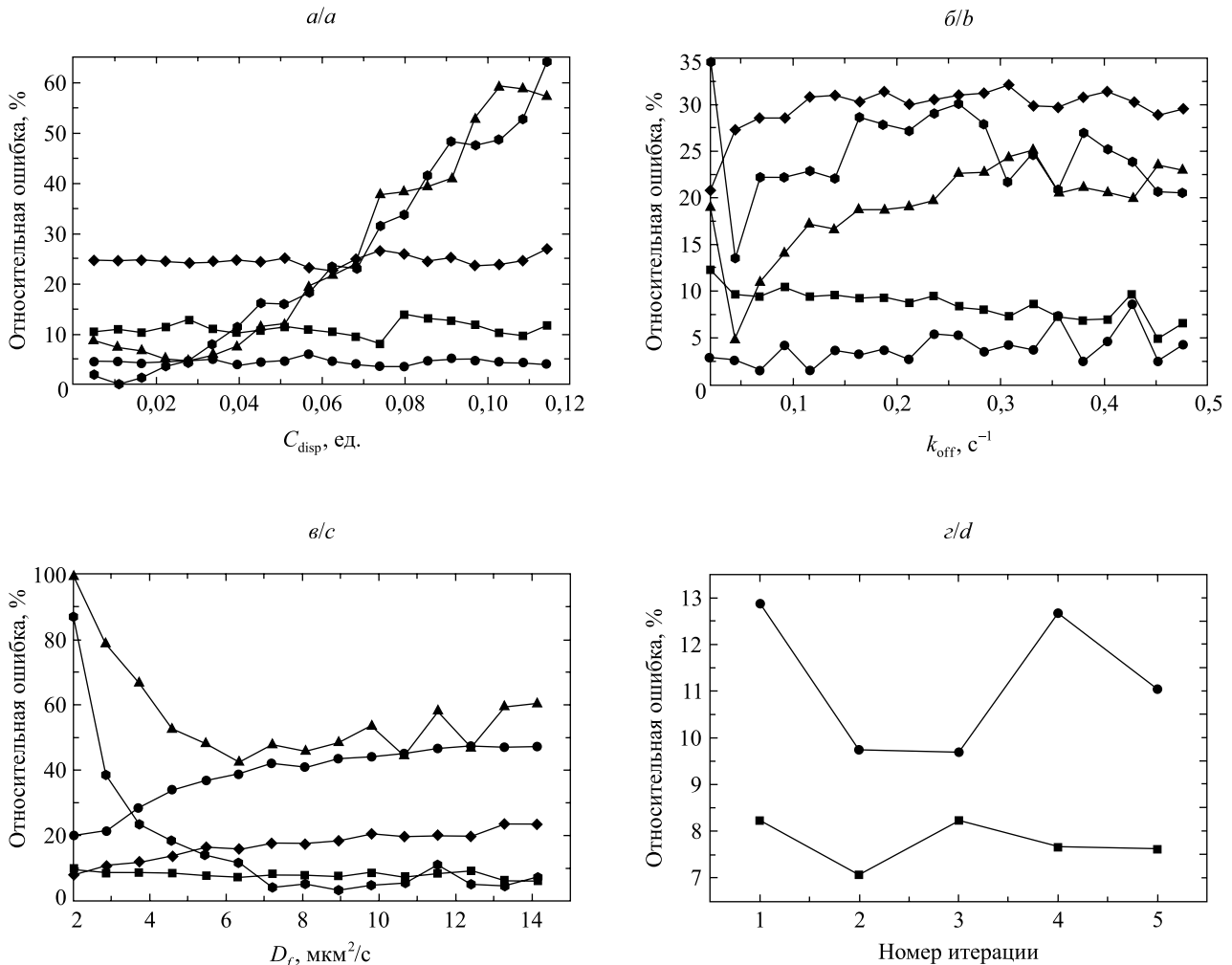


Рис. 2. Относительная ошибка для различных алгоритмов нормировки данных в зависимости:

от уровня шума C_{disp} для модели ловушек G-актина (а), параметры системы $k_{\text{on}} = 5 \text{ c}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 0,05 \text{ c}^{-1}$; коэффициента диссоциации k_{off} для модели ловушек G-актина (б), параметры системы $C_{\text{disp}} = 0,03$, $k_{\text{on}} = 5 \text{ c}^{-1}$; коэффициента диффузии D_f для модели диффузии G-актина (в), параметры системы $C_{\text{disp}} = 0,04$, $w = 12 \text{ мкм}$; метода усреднения кривых восстановления флуоресценции (г), параметры системы $D = 4 \text{ мкм}^2/\text{c}$, $w = 5 \text{ мкм}$;

—■— единичная, —●— единичная шкалированная, —▲— двойная, —●— двойная шкалированная,

—◆— Рэйнера (а, б, в); —■— после аппроксимации, —●— до аппроксимации (г)

Fig. 2. Relative error for different normalization algorithms: dependent on the noise level C_{disp} for the G-actin binding sites model (a), parameters of the system $k_{\text{on}} = 5 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 0.05 \text{ s}^{-1}$; dependent on the diffusion coefficient k_{off} for the G-actin binding sites model (b), parameters of the system $C_{\text{disp}} = 0.03$, $k_{\text{on}} = 5 \text{ s}^{-1}$; dependent on the diffusion coefficient D_f for the G-actin diffusion model (c), parameters of the system $C_{\text{disp}} = 0.04$, $w = 12 \text{ }\mu\text{m}$; dependent on the averaging fluorescence recovery curves methods (d), parameters of the system $D = 4 \text{ }\mu\text{m}^2/\text{s}$, $w = 5 \text{ }\mu\text{m}$;

—■— single, —●— full scale, —▲— double, —●— double full scale,

—◆— Rainer (a, b, c); —■— after approximation, —●— before approximation (d)

- Единичная шкалированная нормировка наиболее применима для модели ловушек G-актина ($RE \approx 5\%$). Однако данная нормировка не учитывает эффект приобретенного фотообесцвечивания.
- Нормировки Рэйнера (и обратного умножения) наиболее эффективны для использования в случае значительного эффекта приобретенного фотообесцвечивания, однако уступают в точности оценки параметров моделям при отсутствии этого эффекта (RE составляет 25–30 %).
- Двойная и двойная шкалированная нормировки демонстрируют неустойчивость к шуму (так как при увеличении коэффициента разброса возрастает относительная ошибка, достигая 60 %), и в то же время последняя показывает приемлемый результат в системах со значительным преобладанием процесса диффузии ($RE < 10\%$ при $D > 7 \text{ мкм}^2/\text{с}$).

Изучение методов анализа набора данных с флуктуирующими значениями биологических параметров показало (см. рис. 2, з), что усреднение оценок параметров, а не самих экспериментальных данных позволяет получить менее смещенные оценки (до 7 %).

Заключение

В работе проведено исследование алгоритмов нормировки данных FRAP-экспериментов на примерах моделей диффузии и молекулярных взаимодействий белка актина, представлен сравнительный анализ методов нормировок данных и впервые предложена классификация методов нормировок по признакам, характеризующим биологическую систему: единичная нормировка является наиболее универсальной и устойчивой к шуму; двойная и двойная шкалированная нормировки максимально эффективны в системах с преобладанием процесса диффузии; единичная шкалированная нормировка наиболее действенна при преобладании химических взаимодействий G-актина; в случае значительного эффекта приобретенного фотообесцвечивания наилучшую точность показала нормировка Рэйнера. Исследовано влияние подходов с усреднением до и после процесса аппроксимации параметров при биологическом шуме параметров, характеризующих процесс в клетке. При использовании подхода с усреднением параметров после аппроксимации оценка среднего значения для параметра получается ближе к истинному (теоретическому) среднему для биологических шумов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Carnell M., Macmillan A., Whan R. FRAP: Acquisition, Analysis, and Applications // *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1232. P. 255–271.
2. A mathematical model of actin filament turnover for fitting FRAP data / A. Halavatyi [et al.] // *Eur. Biophys. J.* 2010. Vol. 39, № 4. P. 669–677.
3. Sustr D., Duschl C., Volodkin D. FRAP-based evaluation of protein diffusion in polyelectrolyte multilayers // *Eur. Polym. J.* 2015. Vol. 68. P. 665–670.
4. Sprague B. L. FRAP analysis of binding: proper and fitting // *Trends Cell Biol.* 2005. Vol. 15, № 2. P. 84–91.
5. Антоненко М. В., Головатый А. А., Яцков Н. Н. Анализ кривых восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания // ИТС-2012 : материалы XI Междунар. науч. конф. (Минск, 24 окт. 2012 г.). Минск, 2012. С. 295–297.
6. Kang M., Andreani M., Kenworthy A. K. Validation of Normalizations, Scaling, and Photofading Corrections for FRAP Data Analysis // *PLoS One.* 2015. Vol. 10 (5). P. 1–28.
7. Yuste S. B., Abad E., Baumgaertner A. Anomalous diffusion and FRAP dynamics in the random comb model // *Phys. Rev.* 2016. Vol. 94. P. 1–35. Article ID 012118.
8. Miura K. Analysis of FRAP Curves. 2005 [Electronic resource]. URL: www.embl.de/eamnet/frap/FRAP.html (date of access: 03.05.2016).
9. Soumpasis D. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments // *Biophys. J.* 1983. Vol. 41, issue 1. P. 95–97.
10. Donnert G. Major signal increase in fluorescence microscopy through dark-state relaxation // *Nat. Methods.* 2007. Vol. 4. P. 81–86.
11. Habuchi S. Reversible single-molecule photo switching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. Vol. 102, № 27. P. 9511–9516.

REFERENCES

1. Carnell M., Macmillan A., Whan R. FRAP: Acquisition, Analysis, and Applications. *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1232. P. 255–271. DOI: 10.1007/978-1-4939-1752-5_18.
2. Halavatyi A., Nazarov P., Tanoury Z., et al. A mathematical model of actin filament turnover for fitting FRAP data. *Eur. Biophys. J.* 2010. Vol. 39, No. 4. P. 669–677. DOI: 10.1007/s00249-009-0558-2.
3. Sustr D., Duschl C., Volodkin D. FRAP-based evaluation of protein diffusion in polyelectrolyte multilayers. *Eur. Polym. J.* 2015. Vol. 68. P. 665–670. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.03.063.
4. Sprague B. L. FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends Cell Biol.* 2005. Vol. 15, No. 2. P. 84–91. DOI: 10.1016/j.tcb.2004.12.001.
5. Antonenko M. V., Golovatyi A. A., Yatskov N. N. Analiz krivyykh vosstanovleniya fluorestsentsii posle fotoobestvechivaniya. *ITS-2012 : materialy XI Mezhdunar. nauchn. konf. (Minsk, 24 Oct. 2012)*. Minsk, 2012. P. 295–297 (in Russ.).

6. Kang M., Andreani M., Kenworthy A. K. Validation of Normalizations, Scaling, and Photofading Corrections for FRAP Data Analysis. *PLoS One*. 2015. Vol. 10 (5). P. 1–28. DOI: 10.1371/journal.pone.0127966.
7. Yuste S. B., Abad E., Baumgaertner A. Anomalous diffusion and FRAP dynamics in the random comb model. *Phys. Rev.* 2016. Vol. 94. P. 1–35. Article ID 012118. DOI: 10.1103/PhysRevE.94.012118.
8. Miura K. Analysis of FRAP Curves. 2005 [Electronic resource]. URL: www.embl.de/eamnet/frap/FRAP.html (date of access: 03.05.2016).
9. Soumpasis D. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys. J.* 1983. Vol. 41, issue 1. P. 95–97. DOI: 10.1016/S0006-3495(83)84410-5.
10. Donnert G. Major signal increase in fluorescence microscopy through dark-state relaxation. *Nat. Methods*. 2007. Vol. 4. P. 81–86. DOI: 10.1038/nmeth986.
11. Habuchi S. Reversible single-molecule photo switching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005. Vol. 102, No. 27. P. 9511–9516. DOI: 10.1073/pnas.0500489102.

Статья поступила в редколлегию 22.06.2016.
Received by editorial board 22.06.2016.