

## **Реализация метода количественной фотоактивируемой локализационной микроскопии (qPALM) сверхвысокого разрешения**

И.В. Маслов, В.И. Борщевский

Московский физико-технический институт (государственный университет)

### **Введение**

Методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения [1], преодолевающие предел Аббе, произвели революцию в молекулярной и клеточной биологии, позволив ученым одновременно наблюдать локализацию многих различных целевых белков с разрешением на уровне единичных молекул. Стало возможно увидеть многие ключевые детали структурной организации и физиологии клетки, которые прежде были недоступны для исследования.

Существенным ограничением широко применяемых методов микроскопии сверхвысокого разрешения является трудность количественной интерпретации результатов измерения. Флуорофоры, которые играют роль метки, после возбуждения стохастически переходят от флуоресцентного к темновому состоянию и обратно — таким образом, одна возбужденная молекула производит несколько вспышек. Вследствие этого возникает проблема количественной интерпретации данных: два неразрешимых пространственно сигнала, близких по времени, могут относиться к одной или к двум разным молекулам.

В данном докладе мы предлагаем план реализации (возможно, с последующим усовершенствованием) метода анализа данных микроскопии, предложенного и подробно описанного в [2]. Метод основан на введении в анализ временных треков константы времени терпимости (tolerance time), которая определяет, на сколько должны быть разделены по времени флуоресцентные сигналы, чтобы система анализа данных интерпретировала их как имеющие разные источники.

Предлагаемый план подразумевает создание необходимого программного обеспечения, проведение серии калибровочных экспериментов, определение на основе их статистической обработки времени терпимости и проведение контрольного эксперимента, результаты которого будут проверены методами электронной микроскопии.

### **Методы**

#### **Калибровочный эксперимент**

Для калибровочного эксперимента требуется подготовить образец, где флуоресцентные сигналы с большой степенью достоверности разрешены пространственно – тогда несколько сигналов с одной локализацией можно с уверенностью отнести к единственному источнику.

Для подготовки такого образца предлагается иммобилизовать флуоресцентный белок (Dendra2) с Strep-tag на стеклянной подложке, прошедшей плазменную очистку, из аminosилана (APTES) и полиэтиленгликоля (PEG), конъюгированного с биотином. Связующим в звеном при иммобилизации служит стрептавидин. Аналогичный метод связывания описан в [3] и уже применяется в других проектах лаборатории перспективных исследований мембранных белков МФТИ.

Оптические измерения в режиме сверхвысокого разрешения планируется провести на флуоресцентном наноскопе LSM-780 (Carl Zeiss).

#### **Программное обеспечение**

Обработка сырых микроскопических данных должна проходить в 4 шага:

Во-первых, необходимо выделить из XY-t данных интенсивности сигнала микроскопа массив одиночных вспышек. Эта задача решена в штатном пакете обработки PALM-данных. Эти данные фитируются ступенчатой диаграммой (ON-OFF), пользуясь алгоритмами Браума-Велша и Витерби [4].

Во-вторых, необходимо обработать данные контрольного эксперимента: определить средние величины и распределения времен нахождения флуорофора в сияющем и темном состояниях по отдельным временным зависимостям.

В-третьих, для обработки данных реального эксперимента необходимо произвести симуляцию большого количества временных трэков разного количества частиц на основе полученных в контрольном эксперименте данных.

Четвертая часть программы сравнивая полученные в реальном эксперименте данные с симулированными, определяет оптимальное для анализа время терпимости.

## **Перспективы**

Предлагается применять метод, которому посвящен этот доклад в исследованиях сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR) в клетках различных линий (экспрессионные линии и клетки млекопитающих).

## **Литература**

1. *Patterson G., Davidson M., Manley S. and Lippincott-Schwartz J.* Superresolution Imaging using Single-Molecule Localization // *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2010.61:345-367.
2. *Lee S., Shin J.Y., Lee A. and Bustamante C.* Counting single photoactivatable fluorescent molecules by photoactivated localization microscopy (PALM) // *PNAS*, October 23, 2012 | vol. 109 | no. 43
3. *Lamichhane R., Liu J.J., Pljevaljcic G., White K.L., Edwin van der Schans, Katritch V., Stevens R., Wüthrich K. and Millar D.P* Single-molecule view of basal activity and activation mechanisms of the G protein-coupled receptor  $\beta$ 2AR // *PNAS*, November 2015 vol. 112 no. 46
4. *McKinney S., Joo C., and Ha T.* Analysis of Single-Molecule FRET Trajectories Using Hidden Markov Modeling // *Biophysical Journal*, September 2006, Volume 91,1941–1951