

ОПТИЧЕСКИЕ ИНФОРМАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 576.08 : 535.51

НАХОЖДЕНИЕ АНИЗОТРОПИИ ПОЛЯРИЗАЦИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПО ЦИФРОВЫМ МИКРОИЗОБРАЖЕНИЯМ КЛЕТОК*

И. Г. Пальчикова^{1,2}, Л. В. Омелянчук³, Н. В. Каманина⁴,
С. Н. Макаров^{1,2}, Е. С. Смирнов^{1,2}

¹Конструкторско-технологический институт научного приборостроения СО РАН,
630058, г. Новосибирск, ул. Русская, 41

²Новосибирский государственный университет,
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

³Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН,
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

⁴ОАО «Научно-производственная корпорация
"Государственный оптический институт им. С. И. Вавилова"»,
199034, Санкт-Петербург, Биржевая линия, 12
E-mail: palchikova@tdisie.nsc.ru

Созданы методы регистрации и обработки микроизображений, пригодные для получения количественной информации об анизотропии поляризации флуоресценции, вызванной резонансным транспортом энергии между белками, маркированными GFP (Green Fluorescent Protein) в живой клетке. Рассматриваемые методы позволяют с высокой точностью детектировать димеры и ассоциаты более высоких порядков для белков, маркированных GFP. Зарегистрировано белок-белковое взаимодействие, возникающее между субъединицами в тримерном белке GFP. Выявлены источники аппаратных неточностей, найдены пути их устранения, что позволило уменьшить коэффициенты вариации данных на порядок по сравнению с полученными ранее.

Ключевые слова: цифровая обработка микроизображения, анизотропия поляризации флуоресценции, гомо-FRET, белки, маркированные GFP.

Введение. Измерения анизотропии поляризации флуоресценции позволяют получить информацию о вращательной диффузии, ориентации флуоресцирующих молекул и используются при исследовании ферментативной активности, сворачивания белков и взаимодействий белок — ДНК в гомогенных растворах [1]. Резонансный перенос энергии между идентичными хромофорами (гомо-FRET — Fluorescence Resonance Energy Transfer), допустимый только для сближенных в пространстве белков, также может выявляться по изменению анизотропии поляризации флуоресценции [2], что позволяет экспериментально изучать связи белков и конформационные переходы белка на модели живых клеток. Задача создания современных методик детектирования микроскопических изображений [3] и гомо-FRET является актуальной. В частности, такие методики предоставят возможность использования данных ведущихся полногеномных проектов по насыщению геномов GFP (Green Fluorescent Protein) белковыми ловушками [4, 5] для построения карты пар взаимодействующих белков.

*Работа выполнена при поддержке Сибирского отделения РАН (междисциплинарные интеграционные проекты № М51 и № К41) и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 09-08-00651-а и № 12-08-00396-а).

Цель предлагаемой работы состоит в экспериментальном определении количественных параметров гомо-FRET между белками, маркированными GFP, и в рассмотрении конструктивных и метрологических особенностей созданной экспериментальной установки поляризационно-флуоресцентной микроскопии и алгоритмов обсчёта оцифрованных микроскопических изображений с расширенным динамическим диапазоном.

Методы и материалы. *Установка поляризационно-флуоресцентной микроскопии.* Экспериментальная установка поляризационно-флуоресцентной микроскопии, собранная на основе исследовательского микроскопа "Dialux 20 EB" (фирма "Leitz", США), представлена на рис. 1, *a*. Для возбуждения GFP в качестве источника света выбран твердотельный лазер с диодной накачкой 473 нм "Blue Laser" BWB-10-OEM (фирма "B&W Tek", США). Разработан и изготовлен осветитель микроскопа, в котором линейно поляризованный свет лазера через блок «диспекл» и эпи-флуоресцентный осветительный канал попадает на стандартный светоделительный кубик светофильтров, затем полностью и равномерно освещает поле зрения в предметной плоскости на столике микроскопа. Угловое положение плоскости поляризации выбиралось таким образом, чтобы минимизировать деполяризацию в предметной плоскости. На рис. 1, *b, c* показаны поля, освещённые лазером и ртутной лампой соответственно. В нашем случае конденсором является микрообъектив. Стабильные неоднородности освещения при необходимости учитываются в процессе обработки изображения путём нормировки на изображение поля в отсутствие препарата. Контроль мощности излучения достигается применением стабилизированных источников питания. Для разделения световых пучков по спектру используется стандартный светоделительный дихроичный кубик *I2* (Ex: 450–490 нм/Em: >515 нм) фирмы "Leitz", который позволяет освещать препарат длинами волн синего диапазона и регистрировать излучение в длинах волн от зелёных до красных в видимом спектре. Измерение анизотропии

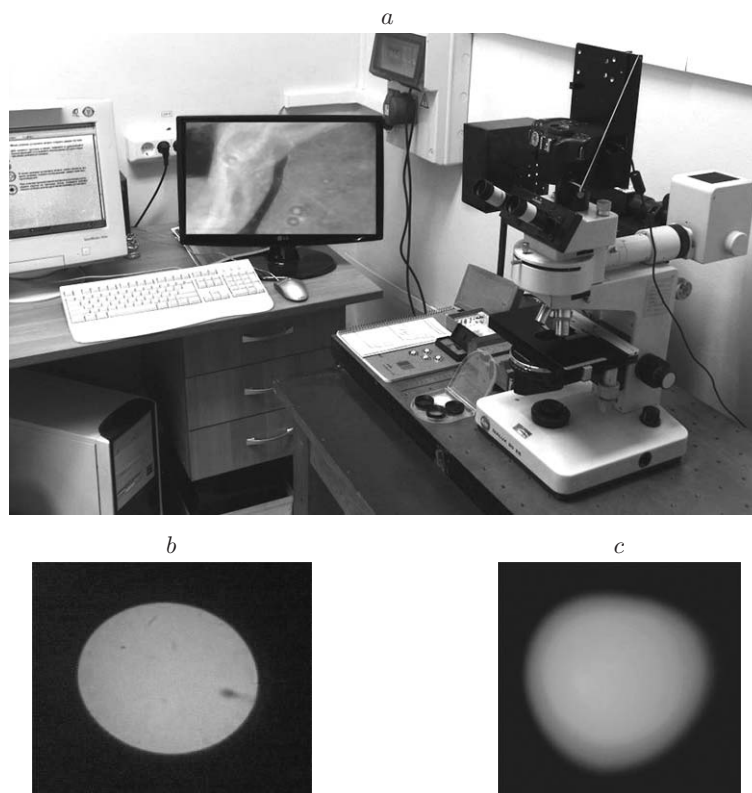


Рис. 1

осуществлялось с помощью высокоэффективных плёночных поляризаторов (поляризаторы изготовлены Научно-производственной корпорацией «Государственный оптический институт им. С. И. Вавилова», Санкт-Петербург) со степенью поляризации $>98\%$ и высокой однородностью положения плоскости поляризации по сечению поляроида [6]. Анализатор с известной осью поляризации помещался в поляризационный блок канала регистрации на специальном поворотном механизме с возможностью жёсткой фиксации углов его поворота с шагом 90° , что позволяло ориентировать его ось параллельно и перпендикулярно поляризации лазерного света и упростить регистрацию изображений в поляризованном свете. Тестирование углового положения оси анализатора проводилось перед каждой серией экспериментов. Анализатор был удалён от плоскости изображения препарата и располагался вблизи изображения апертурной диафрагмы, чтобы исключить влияние даже незначительных неоднородностей его поверхности на величину интенсивности в пикселях изображений для двух ориентаций поляризации флуоресценции.

Флуоресцентное изображение препарата строилось с помощью микрообъектива "NPL Fluotar 25/0,55" (фирма "Leitz Wetzlar") в плоскости фотоматрицы камеры "Canon EOS 500D" (динамический диапазон 14 бит). Камера устанавливалась таким образом, чтобы обеспечивалось воздушное охлаждение фотоматрицы. Установка режимов [3] и регистрация изображения осуществлялись с компьютера под управлением программы.

Получение и обработка экспериментальных данных предполагают подготовку препаратов, регистрацию цифровых микроизображений и их обработку. Каждый из этих этапов имеет свои особенности, влияющие на точность измерений. Цифровая обработка микроизображений, связанная с извлечением количественных данных об изучаемом препарате, происходит последней. Как правило, регистрация производится на пределе чувствительности камер по шумам, контрасту и линейности диапазона. Режимы работы камеры по отношению к динамическому диапазону яркости микроизображения тщательно выбирались и оптимизировались [3]. Величина чувствительности устанавливалась 100 единиц ISO, что обеспечивает максимальный динамический диапазон, даёт возможность минимизировать шумы матрицы и работать в пределах линейного участка передаточной характеристики фотоматрицы. Время выдержки варьируется и может достигать нескольких минут.

Коэффициент вариации по выборке средних значений величины уровня серого тестового объекта (клина серого [3]), вычисленных по участкам матрицы с различным количеством пикселей (от 2×2 до 200×200 пикселей), зависит от яркости изображения (величины уровня серого) и характеризует шумовые компоненты сигнала. В результате тестирования камеры было найдено, что в случае определения уровней освещённости матрицы камеры "Canon EOS 500D" в середине динамического диапазона величина коэффициента вариации среднего значения составляет менее $0,25\%$, а для камеры с 16384 градациями серого — $20,5$ градаций.

Для измерения анизотропии флуоресценции регистрировались два микроизображения одного и того же препарата, снятые при взаимно перпендикулярных положениях анализатора. Определение количественной информации о степени анизотропии при обработке микроизображений повышенной дигитализации осуществляется в следующем порядке. Сначала данные, полученные в raw-формате, преобразуются в удобный для работы формат: tiff (sRGB, 16 бит). Затем проводится сегментация: выбор одной светящейся клетки (прямоугольное вырезание) на изображениях препарата. Изображения клетки, выбранные одновременно на обеих микрофотографиях препарата, программно совмещаются с точностью до одного пикселя. В расчётах используются два изображения одной и той же клетки, полученные при взаимно перпендикулярных расположениях поляризатора и анализатора. В целях дополнительной спектральной фильтрации выполняется разделение выбранных изображений по цветовым слоям R, G и B и сохранение информации только из зелёных

слоёв в отдельные «зелёные» файлы. Далее производится численный подсчёт зелёных файлов для расчёта анизотропии. Один и тот же кадр изображения препарата может содержать несколько разных флуоресцирующих клеток, поэтому он используется неоднократно для цифровой обработки выборки клеток.

Численный подсчёт зелёных файлов требуется в целях нахождения анизотропии как для каждого пикселя изображения выбранного участка, так и для средних значений по области интереса на изображении.

Анизотропия r^i рассчитывается в каждом i -м пикселе по общепринятым формулам и зависит от единственного параметра b :

$$r^i = \frac{1 - I_{\perp}^i / I_{\parallel}^i}{1 + 2I_{\perp}^i / I_{\parallel}^i} = \frac{1 - b^i}{1 + 2b^i}, \quad (1)$$

где $b = I_{\perp} / I_{\parallel}$ — отношение интенсивностей (на изображении — это уровни серого).

Анизотропия r определяется параметром b и рассчитывается попиксельно, а затем усредняется по всему изображению или области интереса. Расчёты средних по выборке значений и коэффициентов вариации выполняются стандартным образом [7].

В работах [2, 8] при расчёте анизотропии флуоресценции r учитывалась поправка, возникающая вследствие того, что ход лучей в микроскопе отличается от параллельного хода лучей в спектрометре. Возникающее в объективах перемешивание ортогональных компонент вектора поляризации зависит от апертуры объектива и коэффициента преломления среды, в которой заключён препарат [8]. Оценка этой поправки для использованного нами объектива при условии равенства коэффициентов преломления среды и воды (1,33) показала увеличение анизотропии. Численно величина поправки в диапазоне $0,12 < r < 0,17$ составила менее 0,4 %. Это значение в полтора раза превышает уровень шумов камеры. Однако в расчётах мы не учитывали эту поправку, поскольку неясно, насколько точна теория Аксельрода [8] в нашем случае.

Культура клеток и трансфекция. В эксперименте по детектированию гомо-FRET объектом изучения служили мономерные и тримерные белки GFP. Экспрессирующие векторы (pEGFP1-C1 и pEGFP3-C1), содержащие мономер и тример GFP, получены от авторов работы [2]. Была проведена проверка рестрикционных карт векторов. Тестирование экспрессии белков GFP осуществлялось визуально с помощью флуоресцентного микроскопа. Нарботано значительное количество ДНК векторов pEGFP1-C1 и pEGFP3-C1 для экспериментов. Трансфекция клеток фибробластов человека MCF7 (линия 293T) выполнялась с использованием набора "FuGENE[®] HD Transfection Reagent" (фирма "Roche", Франция) согласно прилагаемой инструкции: клетки выращивались на покровном стекле в питательной среде в течение суток в CO₂-инкубаторе. При таком способе выращивания клетки фибробластов естественным образом прикрепляются к стеклу в силу адгезивных свойств клеточной мембраны.

Результаты и обсуждение. Отработка поляризационного метода выполнялась с помощью тестового препарата пропидиума иодида, разведённого в глицерине и помещённого в кювету. Измерялся коэффициент вязкости раствора. Точность позиционирования оценивалась по гистограмме распределения яркости в изображении. Полученные результаты подтвердили возможность точных измерений анизотропии биологических препаратов. Визуальное сравнительное изучение микроизображений биологических препаратов (имагинальных дисков, экспрессирующих белок GFP повсеместно, и семенников, экспрессирующих химерные белки дрозофилы с хвостом GFP), полученных по флуоресцентному методу и с использованием различных осветителей, подтвердило наличие достаточного уровня флуоресценции не только для живой, но также и для фиксированной ткани. На

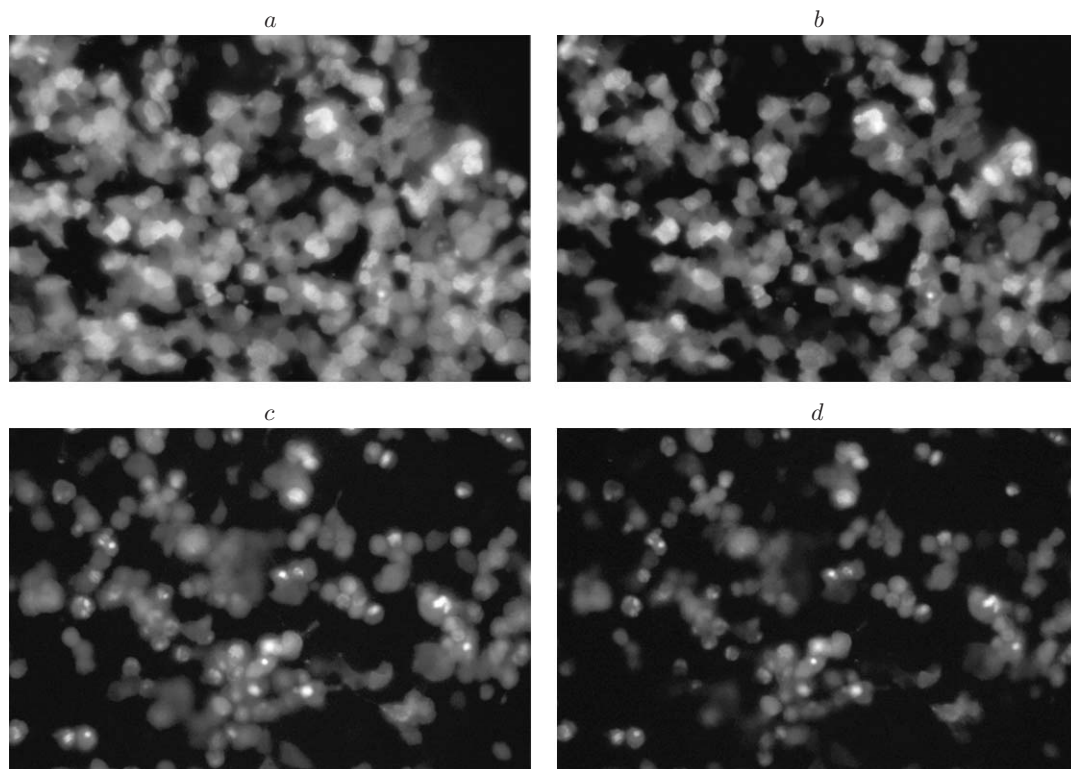


Рис. 2

тестовых флуоресцентных препаратах, подготовленных специальным образом, были определены оптимальные для регистрации изображений параметры установки.

Экспериментальные препараты помещались на предметное стекло микроскопической системы и фотографировались. Микроизображения флуоресцентных препаратов pEGFP1-C1 (GFP-мономер) показаны на рис. 2, *a, b* и pEGFP3-C1 (GFP-тример) — на рис. 2, *c, d*. Микроизображения получены при взаимно перпендикулярных положениях поляризатора и анализатора, при освещении твердотельным лазером с диодной накачкой 473 нм "Blue Laser".

Поскольку анизотропия r зависит от единственного параметра b , то для анализа данных применили специальное графическое представление зависимости $I_{\parallel}(I_{\perp})$. На рис. 3, *a* приведено такое представление для одной клетки, изображение которой дано на рис. 4 (препарат GFP-мономер, см. рис. 2, *a, b*). Графическое представление выглядит как «облако данных», каждая точка соответствует одному пикселю изображения. В таком представлении полностью теряется информация о местоположении пикселей на изображении. Графическое представление отражает точность совмещения пикселей на изображении, а также самих изображений. Коэффициент b — тангенс угла наклона прямой, построенной методом наименьших квадратов внутри набора точек графического представления, однозначно определяющий анизотропию. Более точное совмещение приводит к сужению области представления. Ширина облака минимальна при точном совмещении изображений. Мы выявили, что это свойство может использоваться как критерий, оценивающий качество выполнения процедуры совмещения изображений.

Изображение клетки обладает своей текстурой и состоит из субобластей различной яркости (см. рис. 4). Эти субобласти не имеют чётко выраженных границ, можно лишь догадываться, что они соответствуют некоему внутреннему строению клетки, которое и обуславливает неравномерное распределение белка GFP внутри клетки. Было проанализ-

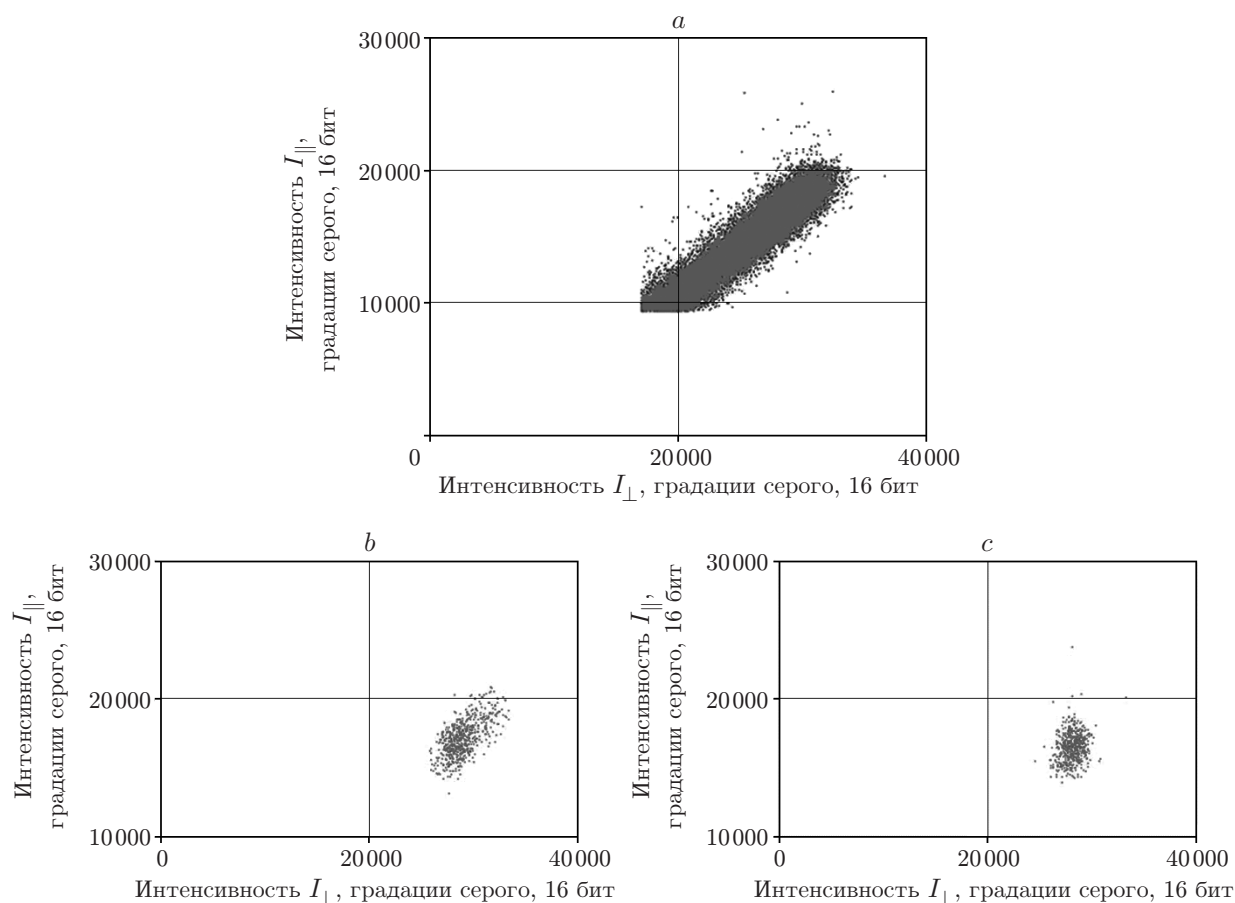


Рис. 3

зировано влияние этого эффекта на точность вычисления анизотропии путём расчётов и выявлено, что величина анизотропии существенно зависит от расчётной области. На рис. 3, b, c показаны графические представления для первой и второй субобластей изображения клетки ($b = 0,716, c = 0,163$ соответственно). Обычно анизотропия вычисляется для среднего значения набора экспериментальных данных для отношения интенсивностей. Из рисунка наглядно видно, что среднее значение в значительной степени зависит от выбора субобласти. Параметр b может изменяться на 20 % в зависимости от сегментации (рис. 5). Изображения расчётной области, полученные для взаимно перпендикулярных положений поляризатора и анализатора, приведены на рис. 5, a, b , графическое представление, на котором величина параметра b показана градациями серого, дано на рис. 5, c .

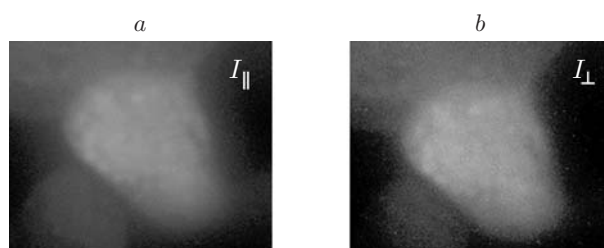


Рис. 4

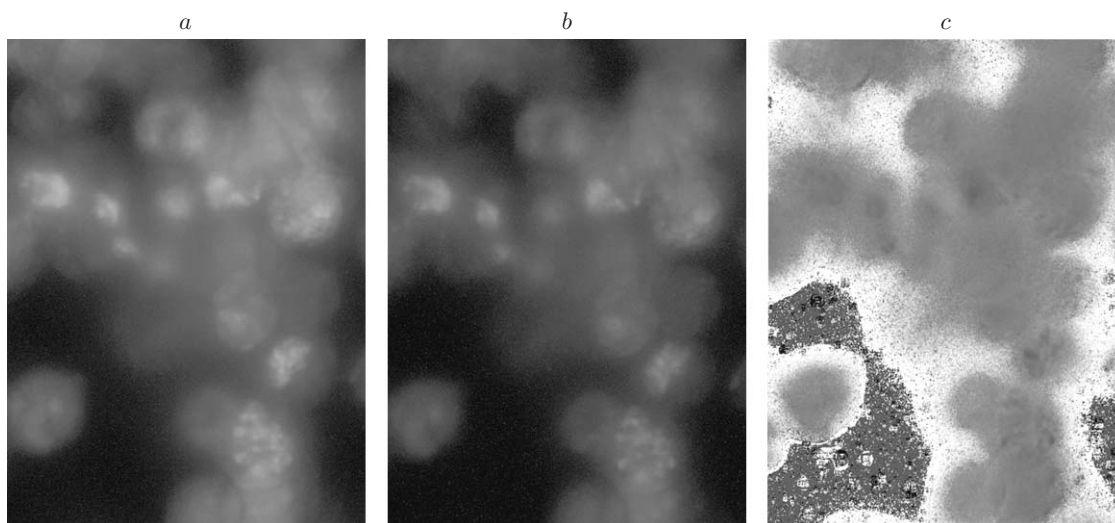


Рис. 5

В связи с этим возникает не простой вопрос о точности данных, используемых в случаях усреднения по всему изображению клетки, когда её граница устанавливается вручную. Чтобы исключить эту неточность, нами был разработан специальный алгоритм определения границы изображения клетки. На рис. 6 показано распределение уровней серого, усреднённых по 17 пикселям, в направлении, перпендикулярном границе изображения клетки. Кривая 1 описывает дифракционное распределение интенсивности флуоресценции в изображении клетки, кривая 2 — расчётный график для производной от распределения 1 (для наглядности величина градаций серого нормирована). Местоположение максимумов производной определяет местоположение точек перегиба кривой 1. Граница клетки может быть установлена непосредственно в этих точках, как следует из теории дифракции Френеля. Кривая 3 обозначает задаваемый уровень границы клетки для дальнейшего обчёта.

Рассчитываются значения параметра b и анизотропии r для каждого пикселя и проводится усреднение по всей области клетки. Расчёты повторяются для нескольких клеток. Превосходные шумовые характеристики камеры позволили выявить незначительные вариации разностей яркости при регистрации микроизображений в поляризованном свете и вычислить анизотропию.

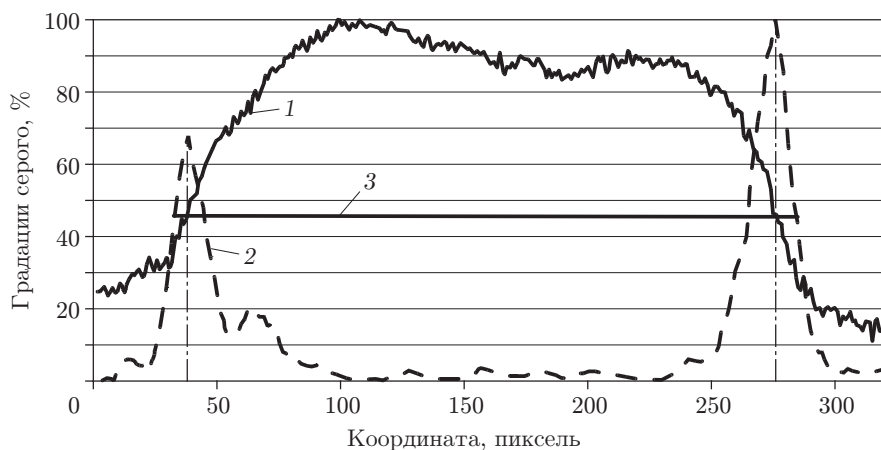


Рис. 6

Препарат	Отношение интенсивностей I_{\perp}/I_{\parallel} (средние значения по 10 клеткам)	Анизотропия r (средние значения по 10 клеткам)	Средние значения стационарной анизотропии GFP в клетках MCF7 [2]
GFP-мономер	$0,55682 \pm 0,00860$	$0,16891 \pm 0,00727$	$0,291 \pm 0,013$
GFP-тример	$0,59228 \pm 0,00592$	$0,13984 \pm 0,00462$	$0,221 \pm 0,014$

Средние значения параметра b и анизотропии r для двух препаратов приведены в таблице. Различие в величинах фиксируется и составляет 20,79 % для анизотропии. Экспериментальные результаты близки к опубликованным в [2] (см. таблицу, четвёртый столбец), где различие в величинах анизотропии составляет 15 %. Зарегистрировано белок-белковое взаимодействие, возникающее между субъединицами GFP в тримерном белке GFP.

Заключение. В предлагаемой работе созданы методы регистрации и обработки изображений, пригодные для получения количественной информации об анизотропии поляризации флуоресценции, вызванной резонансным транспортом энергии между белками, маркированными GFP в живой клетке. Данные методы позволяют с высокой точностью детектировать димеры и ассоциаты более высоких порядков для белков, маркированных GFP.

Экспериментальные результаты определения количественных параметров (в частности, анизотропии флуоресценции) близки к опубликованным в [2]. Здесь мы не только зарегистрировали белок-белковое взаимодействие, возникающее между субъединицами GFP в тримерном белке GFP, но и выявили источники аппаратных неточностей, а также нашли пути их устранения. Этот факт проявляется в том, что коэффициенты вариации в данной работе на порядок меньше, чем в [2].

Созданные поляризационно-флуоресцентная установка и метод обладают следующими особенностями: разработаны тестовые объекты и методы калибровки установки [3], произведён правильный выбор теплового режима камеры и крепежа, предложен метод совмещения изображений с контролем по трендовому тангенсу угла наклона графического представления $I_{\parallel}^i(I_{\perp}^i)$, выявлена зависимость величины анизотропии от сегментации клетки, найдены объективные критерии, позволяющие устанавливать границу единообразно для всех клеток, принятых в расчёт.

Авторы выражают благодарность профессору доктору Philippe Bastiaens (Институт молекулярной физиологии общества Марка Планка, г. Дортмунд, Германия) за предоставленную возможность использования в данном исследовании генно-инженерной конструкции pEGFP3-C1, содержащей тримерную форму белка GFP, а также сотруднице Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН Л. В. Мечетиной за техническую помощь при работе с клетками.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Лакович Дж.** Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986. 496 с.
2. **Squire A., Verveer P. J., Rocks O. et al.** Red-edge anisotropy microscopy enables dynamic imaging of homo-FRET between green fluorescent proteins in cells // Journ. Struct. Biol. 2004. 147, N 1. P. 62–69.
3. **Пальчикова И. Г., Омелянчук Л. В., Пальчиков Е. И. и др.** Особенности применения цифровых камер для цитофотометрического определения количества ДНК в ядрах клеток // Датчики и системы. 2012. № 3. С. 2–12.

4. **Yeow E., Claytony A.** Enumeration of oligomerization states of membrane proteins in living cells by homo-FRET // Spectroscopy and Microscopy: Theory and Appl. Biophys. Journ. 2007. **92**, N 9. P. 3098–3104.
5. **Bader A., Hofman E., Voortman J. et al.** Homo-FRET imaging enables quantification of protein cluster sizes with subcellular resolution // Biophys. Journ. 2009. **97**, N 9. P. 2613–2622.
6. **Пальчикова И. Г., Смирнов Е. С., Боев Н. П. и др.** Изучение характеристик современных поляризационных пленок для целей микроскопии // Сб. матер. VI Междунар. науч. конгр. «ГЕО-Сибирь-2010». Новосибирск: СГГА, 2010. Т. 5. Специализированное приборостроение, метрология, теплофизика, микротехника, нанотехнологии. Ч. 1. С. 91–97.
7. **Платонов А. Е.** Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. М.: Изд-во РАМН, 2000. 52 с.
8. **Axelrod D.** Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization // Biophys. Journ. 1979. **26**, Is. 3. P. 557–574.

Поступила в редакцию 28 января 2013 г.
