

Анализ 3D-конформации репликативных доменов хроматина при мутациях когезинового комплекса

Научный руководитель – Киреев Игорь Игоревич

Босов Дмитрий Валерьевич

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: dimabosov123@yandex.ru

Стохастическая оптическая реконструкционная микроскопия (STORM)[1] является одним из методов локализационной микроскопии с суперразрешением. В её основе лежит способность некоторых типов флуорохромов менять свои флуоресцентные свойства в ответ на облучение. Некоторые флуорохромы способны при возбуждении интенсивным лазерным пучком переходить в долгоживущее темновое состояние, но при определенных условиях они способны спонтанно и ненадолго возвращаться в исходное состояние и флуоресцировать. Получение большого количества снимков, на которых флуоресцируют единичные молекулы, легко отличимые друг от друга, и их локализация на каждой отдельной снимке, позволяет создать высококачественное изображение клеточных структур с субдифракционным разрешением.

Данный метод также позволяет локализовать флуорофоры в 3D, используя для этого специальную цилиндрическую линзу и предварительную калибровку.

В данной работе 3D STORM-микроскопия была использована для анализа структурной организации реплицирующейся ДНК. Для этой цели клетки HEK 293 инкубировали с 10 мкМ EdU с последующим присоединением флуорохрома Alexa-647.

Результаты анализа чувствительны к различным параметрам, влияющим на точность локализации и размер популяции анализируемых флуорохромов, что определяет структурное разрешение.

Поэтому основными задачами данной работы было подобрать оптимальный алгоритм для кластеризации доменов, сравнение 2D и 3D STORM, а также показать применимость данного метода в задаче изучения репликативных доменов хроматина.

В ходе работы было проведено сравнение нескольких алгоритмов для кластеризации, и в качестве наиболее предпочтительного был выбран DBSCAN.[2,3]

Также было показано, что изображения, получаемые при помощи цилиндрической линзы могут быть обработаны алгоритмами для 2D STORM.

Было обнаружено, что аксиальное разрешение метода 3D STORM обратно пропорционально плотности распределения флуорохромов, что указывает на важность оптимизации режимов мечения для получения адекватных результатов.

Источники и литература

- 1 Rust, M. J. et al. Nature Methods, DOI:10.1038/nmeth929
- 2 Ismail M. K. et al. Cell, Doi:10.1016/j.patter.2020.100038
- 3 David J. W. et al Nature Communications, Doi:10.1038/s41467-020-15293-x