

УДК 577.352.465

## КЛЕТОЧНАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА С ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫМИ СЕНСОРАМИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО И РЕТИКУЛЯРНОГО КАЛЬЦИЯ

© 2020 г. П. Д. Котова<sup>а</sup>, \*, О. А. Рогачевская<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

\*e-mail: p.d.kotova@gmail.com

Поступила в редакцию 05.03.2020 г.

После доработки 19.05.2020 г.

Принята к публикации 21.05.2020 г.

Ионы кальция являются универсальным вторичным посредником и регулируют множество внутриклеточных процессов. Многие агонисты и первичные посредники, вовлеченные в межклеточные коммуникации и аутокринные/паракринные регуляции, действуют через поверхностные рецепторы, сопряженные с мобилизацией внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Существующие представления о механизмах внутриклеточной  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации основаны преимущественно на мониторинге  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле. Между тем обмен  $\text{Ca}^{2+}$  между цитозолем и различными клеточными органеллами имеет ключевое значение для физиологии клеток и биологических тканей в целом. Поэтому мониторинг  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов в различных компартментах клетки представляется необходимым для анализа различных аспектов внутриклеточной  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации. До последнего времени внутриклеточную  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализацию исследовали с помощью синтетических  $\text{Ca}^{2+}$ -зондов, которые невозможно избирательно загрузить в клеточные компартменты, вовлеченные в поддержание  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаза, включая цитозоль, эндоплазматический ретикулум, митохондрии, кислые лизосомы. Поэтому специфические для компартментов  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы идентифицировали за счет использования  $\text{Ca}^{2+}$ -зондов с различной аффинностью к  $\text{Ca}^{2+}$  в сочетании с пермеабиллизацией плазматической мембраны клеток. В последние годы были разработаны генетически кодируемые  $\text{Ca}^{2+}$ -индикаторы, представляющие собой  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительные флуоресцентные белки, одним из основных преимуществ которых является возможность локализации в определенных органеллах. В настоящей работе описано получение моноклональных клеточных линий, экспрессирующих одновременно флуоресцентные сенсоры цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  GEM-GECO1 и ретикулярного  $\text{Ca}^{2+}$  R-CEPIA1er. Полученные клоны могут быть использованы как клеточная система для анализа сопряжения поверхностных рецепторов с внутриклеточной  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнальной системой и для изучения механизмов регуляции выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Ключевые слова:** генетически кодируемые сенсоры  $\text{Ca}^{2+}$ , внутриклеточная  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализация, культура клеток

**DOI:** 10.31857/S0233475520050072

### ВВЕДЕНИЕ

Ионы кальция являются универсальным внутриклеточным вторичным посредником, регулирующим множество жизненно важных процессов, включая сокращение клеток, их рост, синаптическую передачу, экспрессию генов. Благодаря активному транспорту плазматическая мембрана отделяет цитоплазму клетки, где содержание  $\text{Ca}^{2+}$  низко (~100 нМ), от внеклеточного пространства, концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в котором на четыре порядка выше (1–2 мМ). В основном  $\text{Ca}^{2+}$  внутри клетки депонирован и содержится во внутриклеточных компартментах, таких как эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, эндосомы, лизосо-

мы и митохондрии, где его концентрация составляет 10–100 мкМ. Перечисленные органеллы принимают участие в поддержании общего  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаза клетки, а также играют роль хранилища и источника  $\text{Ca}^{2+}$  в генерации локальных и глобальных  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов в ответ на внешние стимулы [1–3].

Разработка подходов для мониторинга свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в живой клетке стала методологическим вызовом для исследований в области клеточной биологии, среди предлагавшихся приемов наиболее эффективным оказалось введение в клетку  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительного агента, оптические свойства которого меняются при изменении кон-

центрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Первая относительно удачная попытка визуализации изменения концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  была предпринята еще в 1928 году путем инъекции красителя ализарина сульфоната в амебу [4]. Однако рутинным мониторинг внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  стал лишь спустя десятилетия, когда в исследовательскую практику были внедрены синтетические  $\text{Ca}^{2+}$ -зонды, флуоресценция которых зависит от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в диапазоне 50 нМ–1 мкМ. Особенно полезными оказались  $\text{Ca}^{2+}$ -зонды, флуорофор которых связан с производным ацетоксиметилового эфира, который позволяет им проникать через плазмалемму и благодаря гидролизу внутриклеточными эстеразами аккумулироваться внутри клетки [5–8]. Такие  $\text{Ca}^{2+}$ -зонды позволили установить многие ключевые механизмы внутриклеточной  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации и остаются инструментом, широко используемым в клеточной биологии. По мере развития представлений о внутриклеточной сигнализации стало ясно, что информации, получаемой путем мониторинга цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , недостаточно для анализа функционирования разветвленных внутриклеточных сигнальных систем, даже если ограничиваться только  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимыми процессами. Так, одним из основных путей стимул-зависимого увеличения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клетки является высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из ретикулума, которое требуется для регуляции различных клеточных процессов, таких как сокращение, оплодотворение, секреция везикул, синаптическая пластичность [9]. Гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$  в эндоплазматическом ретикулуме имеет решающее значение для реализации определенных клеточных функций, и его нарушение ассоциируется с развитием ряда клеточных и тканевых патологий, включая нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания, а истощение ретикулярного  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает апоптоз [10]. Таким образом, исследование гомеостаза  $\text{Ca}^{2+}$  внутри эндоплазматического ретикулума необходимо для более глубокого понимания механизмов генерации внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов и их роли в физиологии и патофизиологии клетки.

Поскольку в покое нормальный уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в ретикулуме оценивается величиной порядка 100 мкМ [1], для мониторинга опустошения  $\text{Ca}^{2+}$ -депо требуется использовать  $\text{Ca}^{2+}$ -зонды с низкой аффинностью к  $\text{Ca}^{2+}$ , такие как Mag-Fura-2 ( $K_d = 25$  мкМ), Fluo-5N ( $K_d = 90$  мкМ), Oregon Green 488 BAPTA-5N ( $K_d = 20$  мкМ) и ряд других. Хотя эти низкоаффинные  $\text{Ca}^{2+}$ -зонды принципиально позволяют осуществлять мониторинг изменения депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ , не существует методов их загрузки исключительно в люминальное про-

странство ретикулума без загрузки в другие внутриклеточные компартменты и прежде всего в цитоплазму клетки. Поэтому в тотальную  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую флуоресценцию клетки, содержащей  $\text{Ca}^{2+}$ -зонд, вносят вклад молекулы флуорофора, локализованные как в ретикулуме, так и в цитозоле. Поскольку объем цитозоля превышает объем ретикулума как минимум на два порядка, то в процессе генерации цитоплазматических  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов количество низкоаффинных флуорофоров, связанных с  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме и ретикулуме, обычно сопоставимо. В связи с этим флуоресцентный сигнал, соответствующий повышению  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме (0.1 → 1 мкМ), обычно превышает или нивелирует флуоресцентный сигнал, соответствующий падению  $\text{Ca}^{2+}$  в ретикулуме (100 → 10 мкМ). По этой причине мониторинг  $\text{Ca}^{2+}$  в ретикулуме с помощью низкоаффинных  $\text{Ca}^{2+}$ -зондов не может быть выполнен без удаления зонда из цитоплазмы с помощью диализа или пермеабилзации клетки [11], что, в свою очередь, сопровождается потерей важных внутриклеточных регуляторных компонентов. Таким образом, накопленный опыт работы с синтетическими  $\text{Ca}^{2+}$ -зондами и знания о внутриклеточных процессах выявили ряд ограничений этого поколения  $\text{Ca}^{2+}$ -индикаторов и инициировали создание индикаторов нового поколения, а именно генетически кодируемых  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров на основе флуоресцентных белков [12–14].

В связи с простотой оптического мониторинга наиболее перспективными генетически кодируемыми  $\text{Ca}^{2+}$ -индикаторами являются  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительные флуоресцентные белки, представляющие собой химеры флуоресцентного (GFP) и  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительного (кальмодулин) белков. Такие индикаторы обладают яркостью, достаточной для визуализации динамики  $\text{Ca}^{2+}$  с субклеточным разрешением, а их реакция на изменение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  обратима и не требует кофакторов. Главным же их преимуществом над синтетическими  $\text{Ca}^{2+}$ -зондами является возможность их специфической экспрессии в определенных органеллах, которая достигается благодаря внесению в молекулу индикатора специфичной сигнальной последовательности, направляющей синтезированный белок в целевые органеллы. Таким образом, флуоресцентные генетически кодируемые  $\text{Ca}^{2+}$ -индикаторы являются эффективным инструментом для мониторинга  $\text{Ca}^{2+}$  избирательно в различных клеточных компартментах [15–17].

Генетически кодируемые  $\text{Ca}^{2+}$ -индикаторы семейства GECO являются на сегодняшний день самыми совершенными представителями инди-

каторов своего класса. GECO, разработанные как сенсор цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$ , характеризуются высокими аффинностью к  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d = 300\text{--}1100$  нМ) и яркостью флуоресценции, обеспечивающей хорошее соотношение сигнал/шум регистрируемых от них сигналов. Также немаловажным для практического применения является широкая цветовая палитра представителей этого семейства: на сегодняшний день в ней присутствуют белки, флуоресцирующие в зеленой (G-GECO), синей (B-GECO) и красной (R-GECO1) областях спектра, а также сине-зеленые ратиометрические индикаторы (GEM-GECO1 и GEX-GECO1) [15]. На основе GECO было создано семейство генетически кодируемых  $\text{Ca}^{2+}$ -индикаторов SERIA, представители которого характеризуются высокой интенсивностью флуоресценции, хорошим соотношением сигнал/шум и широкой цветовой палитрой, присущими GECO, но отличаются от них пониженным сродством к  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d = 500\text{--}700$  мкМ). Благодаря внесению в аминокислотную последовательность этих сенсоров соответствующего сигнального пептида они транспортируются в эндоплазматический ретикулум, что позволяет детектировать динамические изменения концентрации исключительно ретикулярного  $\text{Ca}^{2+}$  [16, 17].

Таким образом, генетически кодируемые  $\text{Ca}^{2+}$ -индикаторы являются эффективным инструментом для более детального анализа механизмов внутриклеточной  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых процессов, позволяя, в частности, проводить независимый мониторинг ретикулярного и цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$ . Данная работа была направлена на создание моноклональных клеточных линий, экспрессирующих флуоресцентные сенсоры цитоплазматического GEM-GECO1 и ретикулярного  $\text{Ca}^{2+}$  R-SERIA1er, с целью расширения методологических возможностей изучения механизмов внутриклеточной трансдукции внешних стимулов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культура клеток.** Клетки линии НЕК 293 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных) культивировали в среде DMEM (Gibco) с высоким содержанием глюкозы с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma), 2 мМ глутамина (Sigma) (ростовая среда) во влажной атмосфере с 5% содержанием  $\text{CO}_2$  в воздухе при 37°C. Полученные моноклональные линии культивировали в присутствии 300 мкг/мл антибиотика G418 (Invivogen).

**Трансфекция клеток.** Клетки НЕК 293 трансфицировали плазмидными векторами CMV-GEM-

GECO1 (#32442, Addgene) и CMV R-SERIA1er (#58216, Addgene) одновременно с использованием набора для липофекции Lipofectamine 3000 (Invitrogen) по оптимизированному согласно рекомендациям производителя протоколу. Накануне трансфекции клетки НЕК 293 рассеивали в ростовой среде из расчета  $(2\text{--}4) \times 10^5$  клеток в 1 лунку 12-луночного планшета. К 800 мкл ростовой среды в лунку добавляли трансфекционную смесь, которая содержала 200 мкл среды OptiMEM (Gibco), 2 мкл P3000 Reagent (Invitrogen), 2 мкл Lipofectamine 3000 (Invitrogen), и по 1 мкг каждого плазмидного вектора. Через 24 ч среду заменяли на свежую ростовую и оценивали эффективность трансфекции по наличию в клетках флуоресценции экспрессируемых белков. Через 48 ч клетки обрабатывали раствором Версена (Sigma) и 0.25% раствором трипсина (Sigma), затем рассеивали в соотношении 1 : 10 в чашку Петри 60 мм и культивировали в присутствии 700 мкг/мл селективного антибиотика G418 (Invivogen) в течение 2 недель. В результате селекции на чашке оставались колонии клеток, обладающие различным уровнем флуоресценции белков интереса, обусловленным различиями в уровне их экспрессии.

**Сортировка клеток.** Полученную гетерогенную популяцию клеток использовали для получения клеточных моноклонов с высоким уровнем экспрессии обоих экспрессируемых белков. Накануне сортировки  $(3\text{--}4) \times 10^6$  клеток переносили в 25 см<sup>2</sup> культуральный флакон в 5 мл ростовой среды. Непосредственно перед сортировкой клетки однократно обрабатывали раствором Версена и затем инкубировали в 0.5 мл 0.25% раствора трипсина до полного открепления клеток от пластика, ферментативную реакцию останавливали добавлением 1 мл ростовой среды и переносили клетки в коническую микропробирку объемом 1.5 мл. Затем клетки осаждали центрифугированием при 50 g и ресуспендировали в 1 мл среды для сортировки клеток на основе фосфатного буфера (pH 7.4) и 1% эмбриональной бычьей сыворотки. Для получения суспензии одиночных клеток их пропускали через клеточное сито с размером ячейки 40 мкм (Corning cell strainer, Sigma). Полученную суспензию клеток анализировали с помощью сортера клеток FACS Aria SORP (BD Biosciences). Флуоресценцию клеток возбуждали при длинах волн 407 и 561 нм, эмиссию регистрировали в областях  $525 \pm 10$  нм и  $582 \pm 7.5$  нм для GEM-GECO1 и R-SERIA1er соответственно. Для получения моноклонов отбирали клетки, обладающие наибольшей интенсивностью флуоресценции обоих экспрессируемых белков, и помещали их по одной в каждую лунку 96-луночного план-

шета, содержащую 150 мкл ростовой среды с повышенным до 15% содержанием сыворотки.

**Наращивание моноклональных клеточных линий.** Отсортированные и помещенные по одной в лунку клетки наращивали до количества, достаточного для проведения их тестирования. Планшеты с клетками помещали в  $\text{CO}_2$ -инкубатор, на 7 день культивирования в лунки добавляли по 50 мкл ростовой среды, содержащей 10% сыворотки. На 10 день проводили первичный визуальный контроль наличия в лунках живых моноклонов и их флуоресценции с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss). Растущие клеточные моноклоны обладали разной пролиферативной активностью, в связи с этим лунки 96-луночных планшетов раз в 3 дня проверяли на наличие клонов, достигших 50–70% конфлюентности; такие клоны переносили в лунки с большей ростовой поверхностью (24-луночный планшет). Для дальнейшего наращивания отбирали клоны, флуоресценция которых была наиболее яркой и однородной. При пересеве моноклонов с лунки 12- на лунку 6-луночного планшета часть клеток каждого клона оценивали визуально и тестировали физиологически.

**Конфокальная микроскопия.** Клетки каждого полученного моноклона анализировали визуально с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica), оборудованного объективом с масляной иммерсией Plan Achromat HCX PL APO Lambda Blue 63 $\times$  1.4 Oil UV (Leica). Изображения регистрировали с помощью программы Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) ver. 2.6.4.8702 (Leica). Флуоресценцию возбуждали при 458 и 543 нм, эмиссию регистрировали в областях 490–550 и 560–660 нм для GEM-GECO1 и R-CEPIA1ег соответственно.

**Микрофотометрия.** Для создания запланированного клеточного сенсора недостаточно только визуального контроля флуоресценции белковых  $\text{Ca}^{2+}$ -индикаторов в полученных клетках. Заключительный этап отбора клонов заключался в их тестировании по физиологическим критериям, а именно по характеристикам  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов, генерируемых клетками в ответ на стимуляцию ацетилхолином. Клетки прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak и выдерживали при комнатной температуре 30 мин. Внеклеточный раствор содержал (мМ): NaCl – 110, KCl – 5.5,  $\text{CaCl}_2$  – 2,  $\text{MgCl}_2$  – 0.8, HEPES – 10, глюкозу – 10. Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20 $\times$ /0.75 и цифровой ECCD камерой LucaR (Andor Technology). Флуо-

ресценцию клеток поочередно возбуждали при  $380 \pm 5.5$  и  $572 \pm 17.5$  нм, эмиссию регистрировали в областях  $523 \pm 23$  и  $634 \pm 34$  нм для GEM-GECO1 и R-CEPIA1ег соответственно. Изменение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме и эндоплазматическом ретикулуме клетки оценивали по относительному изменению интенсивностей флуоресценции  $\Delta F/F_0$  GEM-GECO1 и R-CEPIA1ег соответственно, где  $\Delta F = F_0 - F$ ,  $F$  и  $F_0$  – текущая интенсивность эмиссии  $\text{Ca}^{2+}$ -индикатора и его эмиссия в начале регистрации соответственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS Elements (Nikon).

**Криоконсервация.** Отобранные по физиологическим критериям моноклональные линии клеток культивировали для получения клеточной массы, достаточной для криоконсервации 10 криоампул, по  $(4 - 5) \times 10^6$  клеток в каждой. Криоконсервацию осуществляли в растворе сыворотки с 10% DMSO.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящая работа была направлена на создание клеточной тест-системы с генетически кодируемыми сенсорами цитоплазматического и ретикулярного  $\text{Ca}^{2+}$ . Представляется, что такая клеточная система расширит возможности анализа сопряжения поверхностных рецепторов с внутриклеточной  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнальной системой и, в частности, будет полезна для изучения механизмов регуляции выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ . Основой для создания сенсора стали клетки НЕК 293; такой выбор был обусловлен тем, что клетки этой линии эндогенно экспрессируют множество G-белков, которые необходимы для сопряжения GPCR-рецепторов с различными внутриклеточными сигнальными системами, в том числе с мобилизацией внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . В качестве молекулярного сенсора цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  был выбран  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительный флуоресцентный белок GEM-GECO1. Высокая аффинность GEM-GECO1 к  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d = 340$  нМ) и его оптические свойства, а именно эмиссия на двух длинах волн 511 и 455 нм при возбуждении в районе 390 нм, позволяют проводить ратиометрические измерения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клетки [15]. Для мониторинга  $\text{Ca}^{2+}$  в эндоплазматическом ретикулуме использовали  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительный флуоресцентный ( $\lambda_{\text{ex}} = 562$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 584$  нм) белок R-CEPIA1ег, который обладает пониженной аффинностью к  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d = 565$  мкМ) и содержит сигнальную последовательность, позволяющую ему находиться исключительно в эндоплазматическом ретикулуме [16]. Спектры воз-

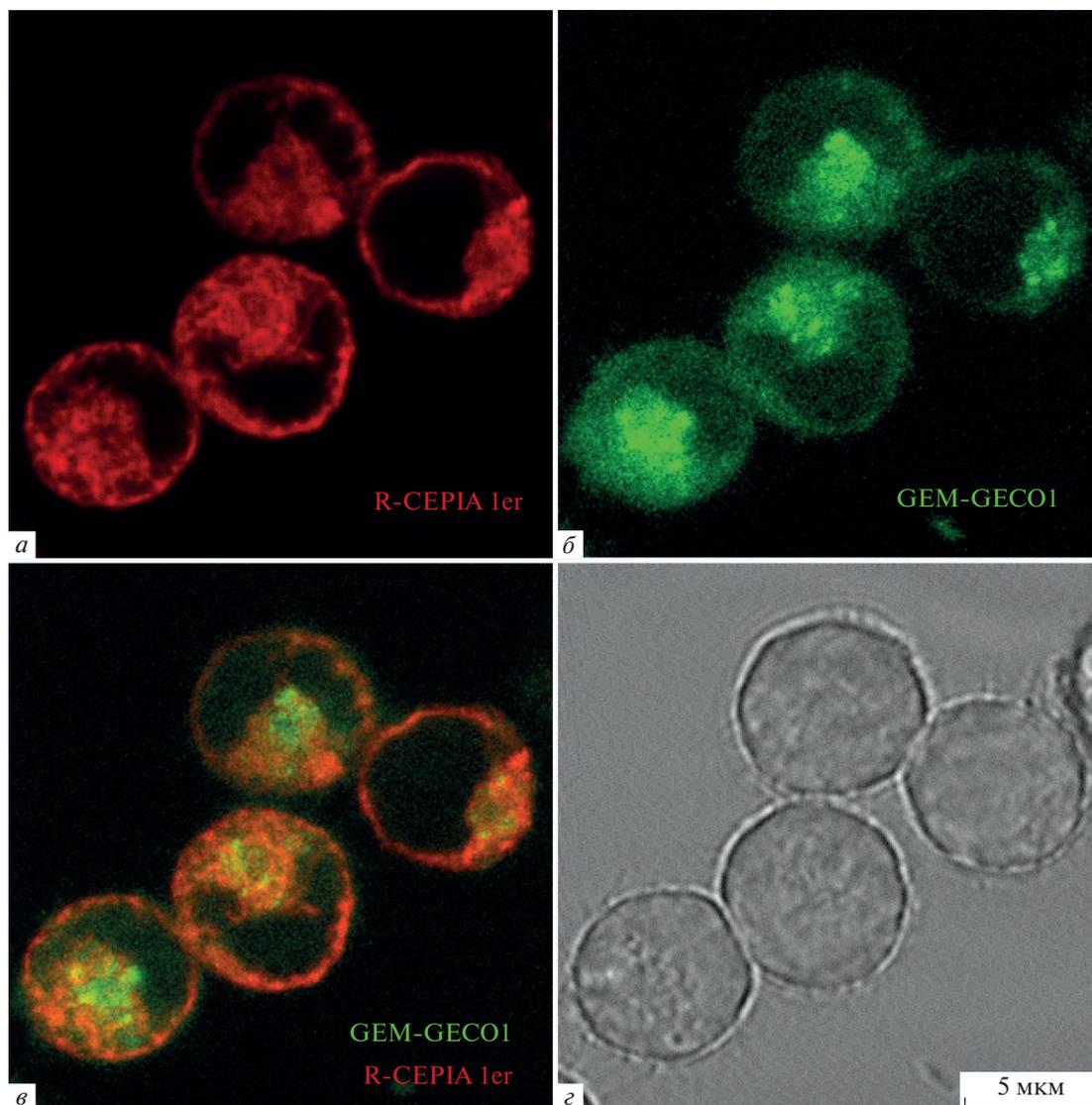
буждения и эмиссии этих белков не пересекаются, что дает возможность проводить одновременную регистрацию их флуоресценции, позволяя тем самым независимо регистрировать изменения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме и ретикулуме клетки. Следует отметить, что эффективность временной трансфекции клеток линии НЕК 293 плазмидными векторами обычно не превышает 50%, при этом получающиеся клеточные популяции гетерогенны и содержат субпопуляции клеток с весьма вариabельным уровнем экспрессии белков интереса. Между тем, анализ внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов требует стабильного и высокого уровня экспрессии обоих  $\text{Ca}^{2+}$ -индикаторов в доминирующей клеточной популяции. В связи с этим возникла необходимость создания моноклональных клеточных линий с требуемыми свойствами.

Для получения клеточных линий, стабильно экспрессирующих белки интереса, необходимо, чтобы кодирующие их последовательности встроились в геном клеток. Плазмидный вектор pCMV R-CEPIA1eg несет в себе ген устойчивости к антибиотику G-418, что позволяет производить отбор клеток на селективной среде и значительно обогащать популяцию клетками, у которых кодирующая белок последовательность встроилась в геном. Однако вектор CMV-GEM-GECO1 не несет гена устойчивости к какому-либо антибиотику. Мы предположили, что, хотя оба плазмидных вектора попадают в одну и ту же клетку примерно равновероятно, при культивировании в присутствии G-418 происходит сегрегация клеток — нуклеотидная последовательность R-CEPIA1eg закрепляется в геноме, в то время как встраивание в геном последовательности GEM-GECO1, не подверженной селекционному давлению, носит случайный характер. В эксперименте оказалось, что спустя 24 ч после трансфекции практически все клетки, экспрессирующие R-CEPIA1eg, также экспрессировали GEM-GECO1, судя по специфической флуоресценции клеток в зеленой и красной областях спектра. После 2 недель культивирования в присутствии 700 мкг/мл G418 в ростовой среде ~60% клеток содержали R-CEPIA1eg, хотя экспрессия GEM-GECO1 сохранилась только у 5% из них. Поскольку за это время клетки претерпели многократные деления, можно было полагать, что у клеток, сохранивших экспрессию обоих белков в процессе селекции, кодирующие их последовательности были встроены в геном. Поэтому полученная клеточная популяция подвергалась дальнейшей селекции с использованием клеточного сортера. В результате было приготовлено три 96-луночных планшета, и в каждой из 288 лунок должно было содержаться не более одной клетки, обладающей высоким уровнем флуоресценции

обоих  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров. На десятый день культивирования выживаемость клонов составила ~20%. В четырех выживших клонах флуоресценция GEM-GECO1 не детектировалась, а в пяти других уровень флуоресценции того или другого  $\text{Ca}^{2+}$ -индикатора заметно варьировал. Кроме того, моноклоны обладали различной способностью к пролиферации, и некоторые из них прекращали пролиферировать после нескольких делений. По пролиферативной активности, яркости и локализации флуоресценции обоих  $\text{Ca}^{2+}$ -индикаторов для дальнейшего анализа были отобраны 32 клон.

Отобранные визуально GEM-GECO1/R-CEPIA1eg клоны исследовали с использованием функциональных тестов на основе микрофотометрии ( $\text{Ca}^{2+}$  imaging). Для оценки чувствительности и динамического диапазона генетически кодируемых  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсоров клетки полученных моноклональных линий стимулировали ацетилхолином, который в немодифицированных НЕК 293 вызывал мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  в 70–80% клеток. Хотя цитоплазматический индикатор GEM-GECO1 позволяет проводить ратиометрические измерения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  благодаря эмиссии на двух длинах волн (455 и 511 нм), мы ограничились технически более простым вариантом и регистрировали эмиссию GEM-GECO1 только в области  $523 \pm 23$  нм. Практически все GEM-GECO1/R-CEPIA1eg клоны в ответ на ацетилхолин демонстрировали хорошо детектируемые  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы от цитоплазматического индикатора, однако в большинстве из них сигналы, регистрируемые от ретикулярного сенсора, обладали неудовлетворительным соотношением сигнал/шум. Хотя сам факт падения уровня ретикулярного  $\text{Ca}^{2+}$  зарегистрировать удавалось, мониторинг деталей и динамики этого процесса оказывался невозможным.

По результатам проведенных физиологических экспериментов из 32 клонов были отобраны 5, для которых был характерен высокий уровень экспрессии обоих  $\text{Ca}^{2+}$ -индикаторов практически во всех клетках. Характерно, что R-CEPIA1eg был локализован в примембранной области (рис. 1а), что соответствует расположению эндоплазматического ретикулума, GEM-GECO1 же был распределен в клетке более равномерно (рис. 1б), что свидетельствует о его цитоплазматической локализации. Зарегистрированные с помощью генетически кодируемых  $\text{Ca}^{2+}$ -индикаторов сигналы вполне соответствовали нашим представлениям о механизмах генерации  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов на ацетилхолин, которые возникают в цитоплазме клеток НЕК 293 за счет выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ . При стимуляции клеток интенсивность флуоресценции GEM-GECO1 в области 520 нм падала

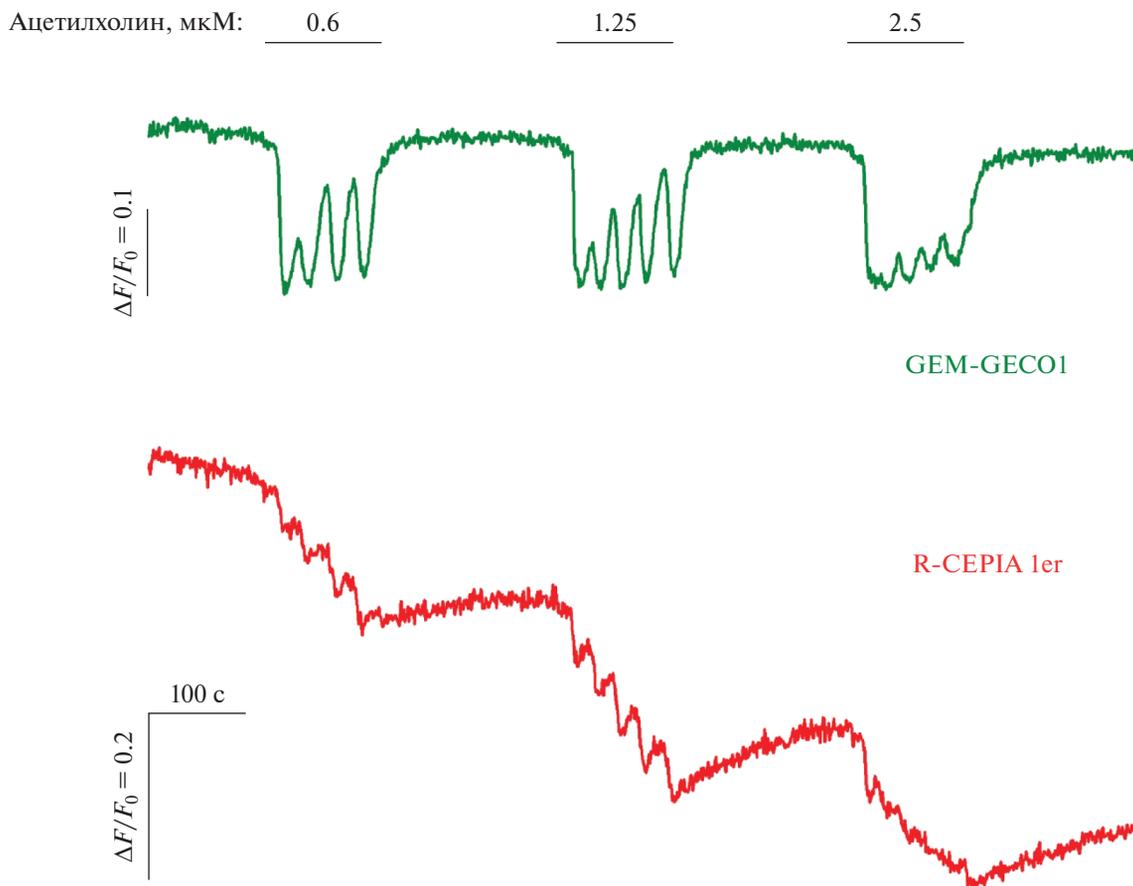


**Рис. 1.** Конфокальные изображения клеток линии GEM-GECO1/R-CEPIA1er. *a* – Специфическая (красная) флуоресценция клеток, индуцированная экспрессией R-CEPIA1er, *б* – специфическая (зеленая) флуоресценция клеток, индуцированная экспрессией GEM-GECO1, *в* – суперпозиция флуоресцентных изображений *a* и *б*; *г* – те же клетки в проходящем свете. Все изображения представлены в одном масштабе, указанном на *г*

(рис. 2, зеленая кривая), отражая повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клеток [15], интенсивность флуоресценции CEPIA1er также падала (рис. 2, красная кривая), отражая выброс ретикулярного  $\text{Ca}^{2+}$  [16]. Основным достоинством отобранных клонов было то, что сигналы, регистрируемые от сенсора ретикулярного  $\text{Ca}^{2+}$  R-CEPIA1er, обладали высоким соотношением сигнал/шум при достаточном динамическом диапазоне, что позволяло отслеживать динамику выброса  $\text{Ca}^{2+}$  из ретикулума достаточно детально. Так,  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы ряда клеток на ацетилхолин носили осцилляционный характер, и это находило отражение не только в сигнале, регистрируемом от

GEM-GECO1, но и в сигнале R-CEPIA1er, что наглядно демонстрирует способность сенсоров быстро реагировать на изменение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в обоих компартментах клетки (рис. 2).

Таким образом, полученные моноклональные клеточные линии, экспрессирующие генетически кодируемые  $\text{Ca}^{2+}$ -индикаторы с определенной внутриклеточной локализацией, позволяют эффективно проводить одновременный мониторинг  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме и ретикулуме одиночных клеток. В дальнейшем эти клеточные системы могут быть использованы для анализа функционирования эндоплазматического ретикулума как  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, в частности для изучения механизмов



**Рис. 2.** Мониторинг  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках линии GEM-GECO1/R-CEPIA1er. Синхронная регистрация флуоресценции GEM-GECO1 (зеленая кривая), отражающей динамику цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  при аппликации ацетилхолина в различных дозах, и флуоресценции R-CEPIA1er (красная кривая), отражающей динамику ретикулярного  $\text{Ca}^{2+}$ . Падение флуоресценции GEM-GECO1 соответствует повышению концентрации цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$ , падение флуоресценции R-CEPIA1er соответствует понижению концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в эндоплазматическом ретикулуме. Данные представлены как  $\Delta F/F_0$ , где  $\Delta F = F - F_0$ ,  $F$  – текущая интенсивность флуоресценции,  $F_0$  – средняя интенсивность флуоресценции в начальный момент регистрации.

$\text{Ca}^{2+}$ -индуцированного выброса  $\text{Ca}^{2+}$ . Кроме того, полученные клоны могут быть использованы как тест-система для установления сопряжения поверхностных рецепторов с внутриклеточной  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализацией.

Авторы благодарят Д.М. Поташникову за помощь в проведении работ по сортировке клеток (поддержаны Программой развития МГУ) и А.В. Кучина за помощь в работе с конфокальным микроскопом (сектор оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН).

Работа поддержана грантом РФФ № 19-75-10068.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Berridge M.J. 2016. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol. Rev.* **96**, 1261–1296.
- Patel S., Ramakrishnan L., Rahman T., Hamdoun A., Marchant J.S., Taylor C.W., Brailoiu E. 2011. The endo-lysosomal system as an NAADP-sensitive acidic  $\text{Ca}^{2+}$  store: Role for the two-pore channels. *Cell Calcium.* **50** (2), 157–167.
- López-Crisosto C., Bravo-Sagua R., Rodriguez-Peña M., Mera C., Castro P.F., Quest A.F.G., Rothermel B.A., Cifuentes M., Lavandero S. 2015. ER-to-mitochondria miscommunication and metabolic diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1852**, 2096–2105.
- Pollack H. 1928. Micrurgical studies in cell physiology: VI calcium ions in living protoplasm. *J. Gen. Physiol.* **11**, 539–545.
- Tsien R.Y. 1980. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: Design, synthesis and properties of prototype structures. *Biochemistry.* **19**, 2396–2404.
- Tsien R.Y. 1981. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature.* **290**, 527–528.
- Tsien R.Y., Pozzan T., Rink T.J. 1982. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calci-

- um monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell Biol.* **94**, 325–334.
8. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. 1985. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440–3450.
  9. Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 11–21.
  10. Mekahli D., Bultynck G., Missiaen L. 2011. Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3** (6), a004317.
  11. Khan S.A., Rossi A.M., Riley A.M., Potter B.V., Taylor C.W. 2013. Subtype-selective regulation of IP(3) receptors by thimerosal via cysteine residues within the IP(3)-binding core and suppressor domain. *Biochem. J.* **451** (2), 177–184.
  12. Raimondo J.V., Joyce B., Kay L., Schlagheck T., Newey S.E., Srinivas S., Akerman C.J. 2013. A genetically-encoded chloride and pH sensor for dissociating ion dynamics in the nervous system. *Front. Cell Neurosci.* **7**, 202.
  13. Lindenburg L., Merckx M. 2014. Engineering genetically encoded FRET sensors. *Sensors (Basel)*. **14** (7), 11691–11713.
  14. Kwon S.K., Hirabayashi Y., Polleux F. 2016. Organelle-specific sensors for monitoring  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in neurons. *Front. Synaptic Neurosci.* **8**, 29.
  15. Zhao Y., Araki S., Wu J., Teramoto T., Chang Y.F., Nakano M., Abdelfattah A.S., Fujiwara M., Ishihara T., Nagai T., Campbell R.E. 2011. An expanded palette of genetically encoded  $\text{Ca}^{2+}$  indicators. *Science*. **333** (6051), 1888–1891.
  16. Suzuki J., Kanemaru K., Ishii K., Ohkura M., Okubo Y., Iino M. 2014. Imaging intraorganellar  $\text{Ca}^{2+}$  at subcellular resolution using CEPIA. *Nat. Commun.* **5**, 4153.
  17. Suzuki J., Kanemaru K., Iino M. 2016. Genetically encoded fluorescent indicators for organellar calcium imaging. *Biophys. J.* **111** (6), 1119–1131.

## Cellular Test System with Genetically Encoded Indicators of Cytosolic and Reticular $\text{Ca}^{2+}$

P. D. Kotova<sup>1,\*</sup> and O. A. Rogachevskaja<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

*\*e-mail: p.d.kotova@gmail.com*

Calcium ions are a universal second messenger that regulates numerous intracellular processes. Many agonists and first messengers involved in cell-to-cell communications and autocrine/paracrine regulation act through surface receptors coupled to the mobilization of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . The current concept of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling is mainly based on monitoring of  $\text{Ca}^{2+}$  in the cytosol. However, the  $\text{Ca}^{2+}$  exchange between the cytosol and a variety of intracellular organelles plays an important role in cell and tissue physiology. Therefore, monitoring of  $\text{Ca}^{2+}$  signals in cell compartments is obligatory for uncovering key aspects of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. Until recently, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling was studied using synthetic  $\text{Ca}^{2+}$  probes, which cannot be selectively loaded into cell compartments involved in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, including the cytosol, endoplasmic reticulum, mitochondria, and lysosomes. Therefore, one tried to identify  $\text{Ca}^{2+}$  signals specific for compartments by using  $\text{Ca}^{2+}$  probes with different affinities in combination with the permeabilization of the plasma membrane. In the last decade, an array of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive fluorescent proteins have been engineered and used as genetically encoded  $\text{Ca}^{2+}$  indicators. One of the main advantages of these indicators is that they can be selectively expressed and retained in certain organelles. In this article we describe the elaboration of monoclonal cell lines, which functionally express both fluorescent sensors of cytosol  $\text{Ca}^{2+}$  GEM-GECO1 and reticular  $\text{Ca}^{2+}$  R-CEPIA1er. The obtained cell clones can be used as a test system for the analysis of the coupling of surface receptors to the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and for studying mechanisms controlling  $\text{Ca}^{2+}$  release.

**Keywords:** genetically encoded  $\text{Ca}^{2+}$  indicators, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, cell culture