Московская школа на Юго-западе № 1543

Разработка генетически кодируемых далеко-красных кальциевых индикаторов на основе бактериофитохромов

Котельникова Анастасия

Научный руководитель:

Федор Васильевич Субач

Москва 2020

Оглавление

Введение.....2
Первые красные GECI: R-GECO1, R-CaMP1.....4
Первый далеко-красный GECI: NIR-GECO1.....10
Пополняя ряды: NIR GECI GAF-CaMP2.....13
Заключение и дальнейшие перспективы.....16
Литература.....17

Введение

Современные нейрологические исследования строятся на наблюдении за активностью различных групп нейронов, которое стало возможно благодаря флуоресцентной микроскопии [1], и на соотнесении поведения животного с активностью клеток его мозга [2]. Динамика кальция служит показателем изменения активности клетки, поэтому в последние годы широко применяются генетически кодируемые кальциевые индикаторы (GECI), созданные на основе флуоресцентных белков (FP), которые в настоящее время лучше всего подходят для визуализации динамики кальция в живых культивируемых клетках [1,3].

Первый GECI был спроектирован в 1997-ом году, одновременно с первыми генетически кодируемыми потенциальными индикаторами (GEVI), которые создавались преимущественно на основе потенциал-зависимых калиевых каналов [4]. GECI решали такие проблемы GEVI, как медленный ответ и неточное маркирование (ранние GEVI плохо связывались с мембраной клетки-мишени). Преимущество GECI перед другими классами генетически кодируемых сенсоров заключалось в возможности специфичного окрашивания (как отдельных групп клеток, так и разных участков самой клетки) и в стабильной длительной экспрессии [1].

На данный момент в приоритете при создании кальциевых индикаторов стоят такие цели, как достижение большей глубины визуализации в тканях (в т.ч. для сканирования и воссоздания 3D-моделей), визуализации с использованием нескольких цветовых спектров (для одновременного наблюдения активности разных типов клеток или разных органелл одной клетки), а также совместимость с оптогенетикой [5], про которую более подробно будет сказано далее. Кроме того, важную роль играет увеличение SNR – отношения яркости индикатора к шуму окружающей среды [6].

Лучше всего в отношении первых трех требований себя показали индикаторы, созданные на основе ближне-инфракрасных (NIR) FP, благодаря их совместимости с другими, уже существующими индикаторами для получения многоспектровой визуализации [7-8] и возможностям применения в оптогенетике [9-11] (см. след. раздел). Поскольку при использовании далеко-красных FP меньше света поглощается и рассеивается – а таже переизлучается эндогенными молекулами – по сравнению с FP других спектров (таких, как синий, зеленый, оранжевый или желтый), то они также предпочтительнее для наблюдения за клетками *in vivo* [12].

Наиболее перспективные NIR-FP хорошо экспрессируются в клетках млекопитающих и связывают биливердин (пигмент желчи, участвующий в реакциях обмена веществ и почти не испускающий собственной флуоресценции) [5,13]. Они создаются на основе бактериофитохромов (сине-зеленых белковых пигментов, извлеченных из бактерий) либо других

биливердин-связывающих белков, длина волны во время пиков их эмиссии в среднем приходится на промежуток ~670-720 нм [11].

Несмотря на недавние значительные продвижения в области разработки NIR-GECI, они по-прежнему остаются скорее исключением среди большого разнообразия индикаторов, не в последнюю очередь за счет долгого пути к их созданию [14]. Судя по эволюционному дереву (рис. 1), красная флуоресценция – позднее приобретение живых организмов, возникавшее независимо несколько раз [15]. Из этого следует, что,

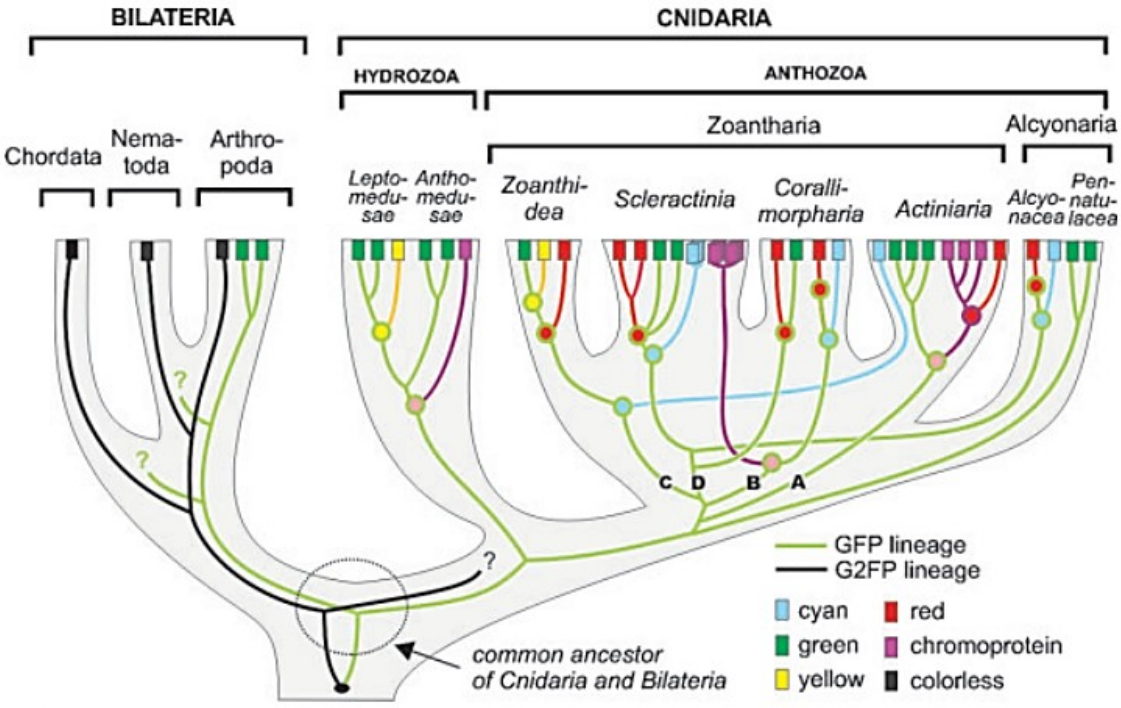
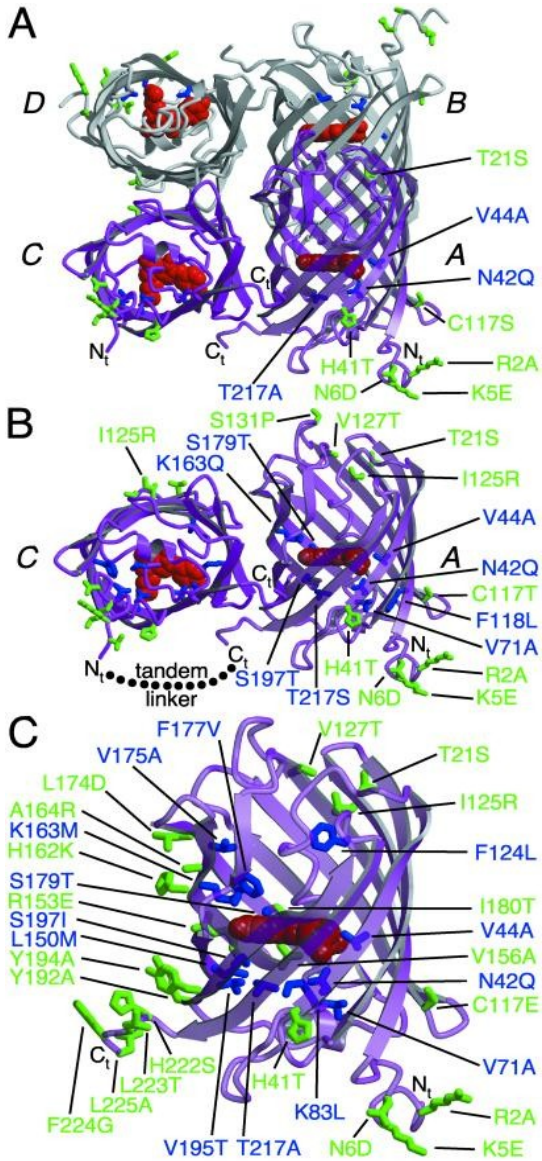


Рис. 1 *– Таксономическое древо животных, на котором показан филогенез GFP-подобных белков (цветные и черные линии); буквами A, B, C, D обозначены основные клады класса Anthozoa; знаки вопроса проставлены там, где не хватает данных для выводов; места расхождения цветов флуоресценции отмечены*

вероятнее всего, эволюция – та причина, по которой путь возникновения красной флуоресценции, как и хромофор (структура внутри свернутого белка, обуславливающая цвет испускаемой им флуоресценции) красных флуоресцентных белков (RFP), устроен сложнее и созревает дольше, чем, например, у зеленых или синих FP [16,17]. Время, потребовавшееся для разработки подходящих, проще устроенных RFP, привело к распространенному использованию в нейробиологии других спектров, чаще зеленого и желтого; однако с открытием новых преимуществ NIR-FP последним, наконец, стали уделять больше внимания [14,16].

Первые красные GECI: R-GECO1, R-CaMP1

В 2002-ом году группе исследователей под руководством Р. Кэмпбелла удалось создать первый мономерный RFP (mRFP1) [18] вследствие работы над тетрамеризированным RFP под названием DsRed (рис. 2), выделенным из коралловых полипов рода *Discosoma* тремя годами ранее [19]. Несмотря на более низкую фотостабильность, чем у DsRed, mRFP1 созревал в как минимум 10 раз быстрее предшественника, поэтому в итоге давал схожую с ним яркость в живых клетках [18,20]. На основе mRFP1 была разработана библиотека различных мономерных FP, за вариабельность цветов названных mFruits (в их числе были такие, как оранжевый FP mOrange или желтый mBanana); их характеристики послужили для дизайна нового, улучшенного RFP mApple, который оказался почти втрое ярче mRFP1 со вдвое меньшим временем созревания [20].



Именно mApple было решено использовать в 2011-ом году в проектировании потенциального красного GECI (R-GECO). Ю. Чжао с коллегами взяли за основу зеленый GECI GCaMP [21], который состоит из β-бочонка зеленого FP (GFP), прикрепленного одним концом к кальмодулину (CaM), который связывает кальций, а другим концом – к участку киназы легких цепей миозина, который связывает кальмодулин (M13) (рис.3). Присутствие кальция заставляет CaM и киназу взаимодействовать, изменяя структуру хромофора, что в конечном счете приводит к возрастанию флуоресценции [21-22].

Рис. 2 *– Структура RFP DsRed в качестве тетрамера* ***(A)****, димера* ***(B)*** *и мономера* ***(C)****; красным цветом показан хромофор, зеленым и синим – мутации в цепях FP относительно исходной версии; линией из точек обозначена связь между субъединицами димера. Источник – статья [18], см.* ***Литературу.***

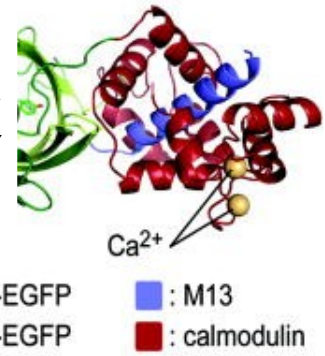


Рис. 3 *– Структура GCaMP индикатора в связанном с кальцием состоянии показана с двух ракурсов; оттенками зеленого отмечен β-бочонок GFP с хромофором, синим цветом – M13-участок киназы, красным – кальмодулин (CaM). Ионы кальция изображены светлыми кружками. Источник – статья [22], см.* ***Литературу****.*

Для создания красной версии этого индикатора ему оставили CaM/M13 пептидную пару, но участок с GFP в улучшенном варианте GCaMP, G-GECO1.1, заменили на mApple RFP. Первая библиотека кандидатов была создана репликацией гена mApple при помощи подверженной ошибкам полимеразы – процесс, названный PCR. Из полученных клонов был выбран один, R-GECO0.1, который, будучи встроенным в геном колонии бактерий, после множества раундов направленной эволюции (искусственного отбора) привел к появлению улучшенного R-GECO1 [21]. Этот GECI по интенсивности поглощения и излучения света не уступал синему и зеленому индикаторам из серии G-GECO, однако его максимумы были на ∼80 нм смещены в сторону красного спектра относительно G-GECO1 (рис. 4).

В том же исследовании красный индикатор был применен для многоспектровой визуализации совместно с зеленым G-GECO1 и зелено-синим GEM-GECO1 (рис. 5), который предположительно

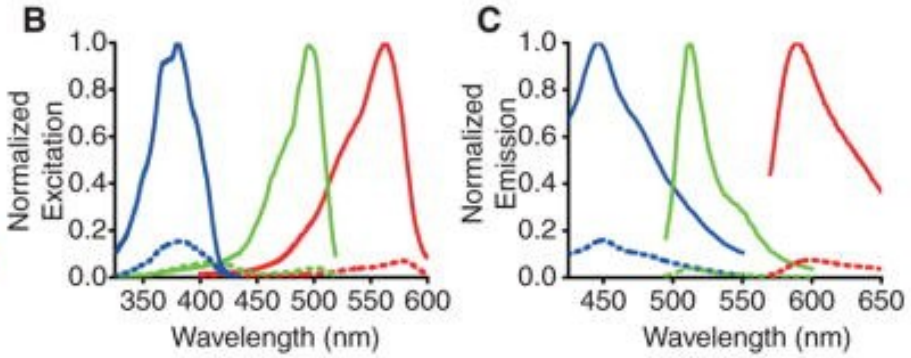


Рис. 4 *– Спектральные данные по серии G-GECO; спектры возбуждения* ***(B)*** *и излучаемого света* ***(C)****; цвета линий соответствуют цветам индикаторов; сплошные линии – в присутствии кальция, пунктир – в отсутствие. Источник –*

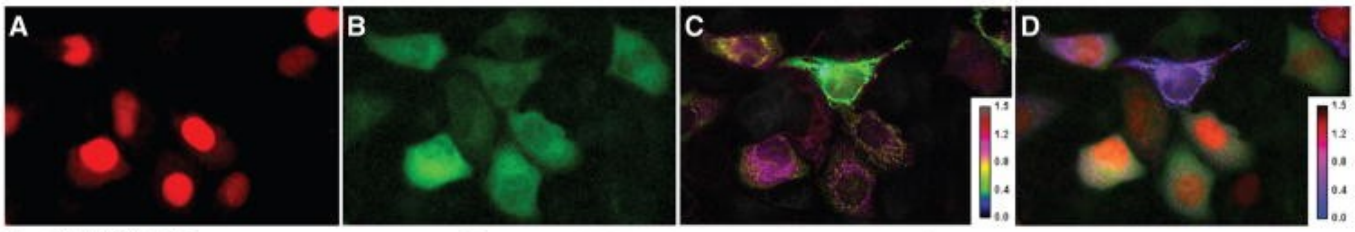


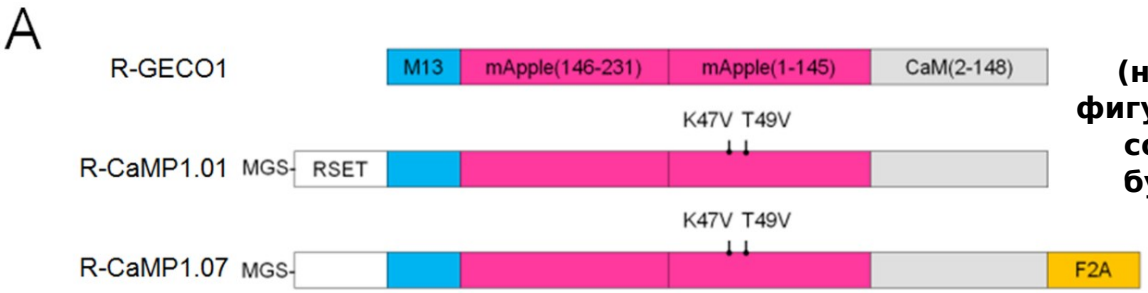
Рис. 5 *– Многоцветовая визуализация с использованием GECO в клетках HeLa: R-GECO1 локализован в ядрах* ***(A)****, G-GECO1 – в цитоплазме* ***(B)****, GEM-GECO1 – в митохондриях* ***(C)****; в* ***(C)*** *с помощью разных цветов показано соотношение разноспектровой флуоресценции индикатора при поглощении УФ (∼380 нм);* ***(D)*** *–*

флуоресцировал зеленым в свободном от кальция состоянии, а синим – в состоянии,

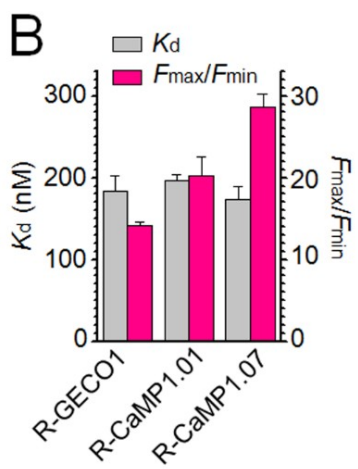
связанном с кальцием. В конечном счете, R-GECO1 продемонстрировал себя как индикатор, подходящий для использования в клеточной визуализации и, кроме того, превзошедший оригинальную серию GCaMP-ов в сродстве к кальцию [21].

Улучшить этот GECI в 2012-ом году взялись М. Окура с коллегами. Новый вариант, R-CaMP1.07, был получен через мутагенезирование R-GECO1. По словам исследователей, красные индикаторы оказались предпочтительнее зеленых при использовании в клетках, экспрессирующих светочувствительные катионные каналы, необходимые для фотостимуляции нейронов (такие, как каналородопсин-2, или ChR2). Поскольку длина волн света, поглощаемого зелеными индикаторами, также возбуждает и эти каналы, то необходим был GECI, который бы позволил использовать для визуализации динамики кальция и для фотостимуляции разные лазеры [23].

После введения случайных мутаций в прототип R-GECO1 с меткой RSET, кодирующей гексагистидин, полученные варианты были протестированы *in vitro.* Лучший из вариантов, R-CaMP1.01, с двумя мутациями в участке mApple (рис. 6A) продемонстрировал увеличение яркости в 1.4 раза по сравнению с R-GECO1. Следующий шаг – слияние индикатора с саморасщепляющимся пептидом F2A – привел к получению R-CaMP1.07, чей динамический диапазон (разница между уровнями сильнейшего и слабейшего полученных сигналов) вдвое превышал таковой у R-GECO1 (рис. 6B), хотя индикаторы почти не отличались по спектральным данным (рис. 6D) и сродству к кальцию.



(некоторые фигуры убраны, сохранены буквенные



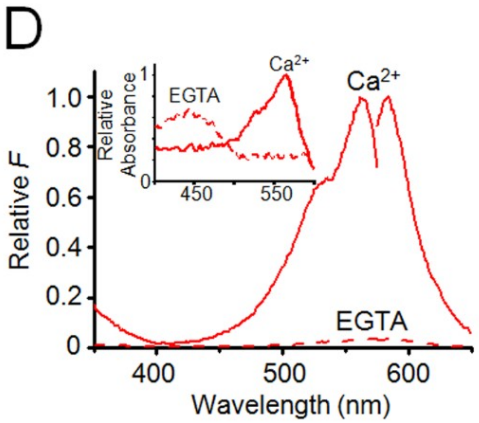


Рис. 6 *– Характеристики R-CaMP-ов in vitro; схематичные структуры индикаторов с указанием разных участков и пары мутаций* ***(A)****, сравнение сродства кальцию (K_d) и динамического диапазона индикаторов* ***(B)*** *и данные R-CaMP1.07: спектры поглощения и излучения в присутствии 1μM Ca^{2+} или 1*

Затем экспрессию трех индикаторов сравнили в клетках HeLa: оказалось, что фоновая флуоресценция схожа для R-GECO1 и R-CaMP1.07, однако последний давал в 1.5-2 раза более яркую эмиссию в ответ на стимуляцию клеток АТФ (рис. 7). Индикаторы R-GECO1 и R-CaMP1.07 также по-разному показали себя в культурных срезах пирамидальных нейронов гиппокампа крысы. R-CaMP1.07 регистрировал перепады уровня кальция, вызванные одиночными потенциалами действия (ПД), со 100%-ной вероятностью в 7 из 8 клеток (и с вероятностью 95% в общей сложности, в противовес 70% для R-GECO1) (рис. 8), а его SNR и уровень сигнала в среднем продолжали превышать таковые для R-GECO1 в 1.5-2 раза (рис. 8D).

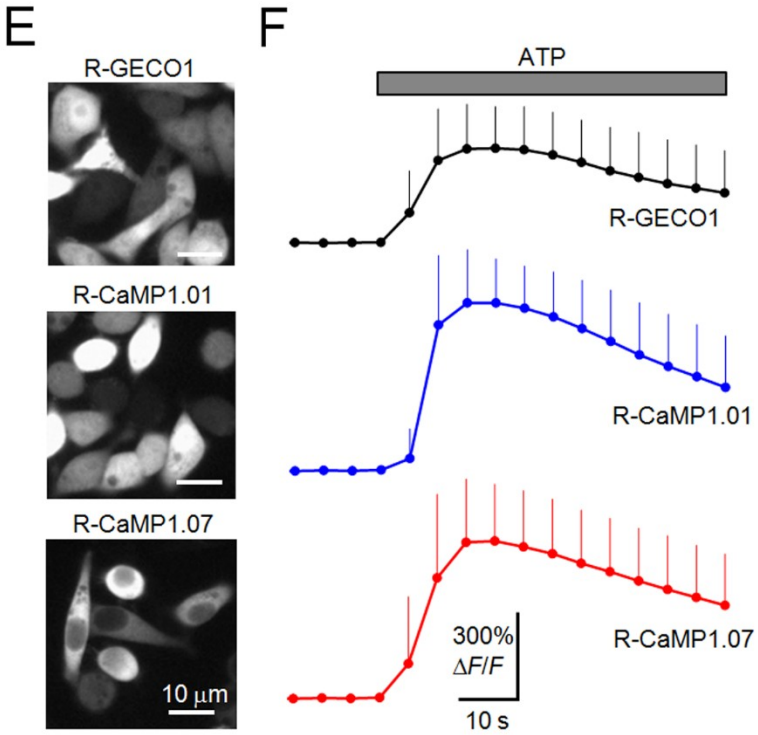
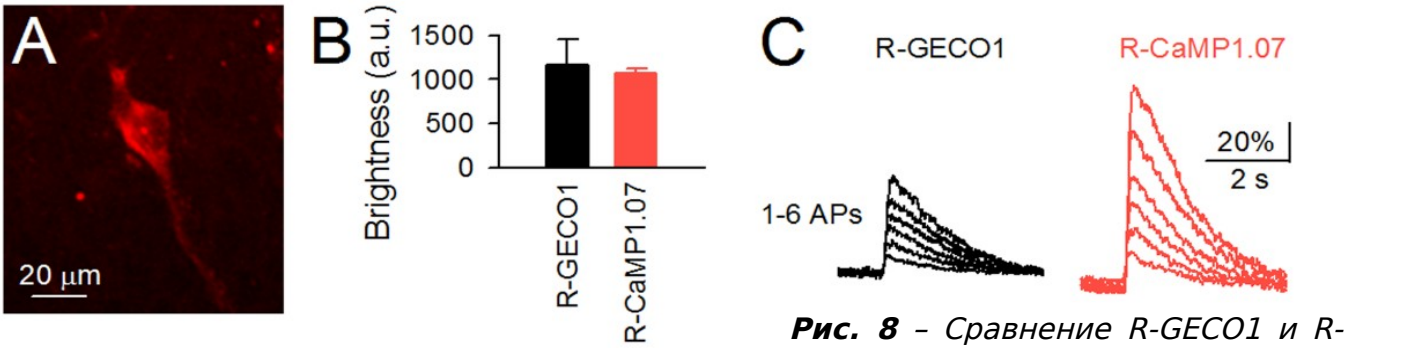


Рис. 7 *– Сравнение экспрессии индикаторов в клетках HeLa;* ***(E)*** *– флуоресцентные изображения клеток, экспрессирующих разные GECI;* ***(F)*** *– средние ΔF/F ответов GECI на введение в клетки 100 μM АТФ.*

Наконец, разность в длинах волн, поглощаемых созданным индикатором и необходимых для фотостимуляции, позволила успешно применить этот индикатор в клетках с ChR2 – оказалось, что R-CaMP1.07 улавливает перепады, вызванные активацией катионных каналов,



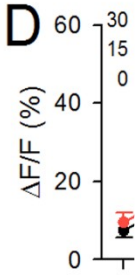


Рис. 8 *– Сравнение R-GECO1 и R-CaMP1.07 в пирамидальных клетках гиппокампа;* ***(A)*** *– конфокальное изображение клетки, экспрессирующей R-CaMP1.07;* ***(B)*** *– средняя интенсивность экспрессии нейронов с разными индикаторами;* ***(C)*** *– показательная средняя сила ответов индикаторов на череду 1-6 ПД, поставлявшихся с частотой 50 Гц;* ***(D)*** *– средние ΔF/F ответа и*

однако изменений в потенциале мембраны в течение независимой работы индикаторов замечено не было [23].

Таким образом, начало работе над красными GECI было положено. Как видно из исследования, проведенного над R-CaMP1.07, эти индикаторы стали не только улучшать путем случайных мутаций в ходе PCR, увеличивая яркость или длину волны флуоресценции, но и направленно отбирать варианты, совместимые с инструментами оптогенетики, и даже тестировать в культуре нервных клеток как отдельно, так и совместно с индикаторами других спектров.

В последующие годы некоторые лаборатории занимались улучшением и адаптацией для разных целей R-GECO1 (как, например, команда, создавшая улучшенный R-GECO1.2 и темно-красный CAR-GECO [24]), другие же экспериментировали с дизайном новых индикаторов на основе уже известных данных – так, разработчики, ранее занимавшиеся серией GCaMP, произвели на свет собственную серию RCaMP, заменив в индикаторах участок mApple на другой красный FP, mRuby. Получившиеся GECI сравнили *in vitro,* а также *in vivo* (в нематодах *Caenorhabditis elegans,* личинках мух рода *Drosophila* и молоди рыб *Danio rerio*), тем самым продемонстрировав широту возможностей их применения [10].

Первый далеко-красный GECI: NIR-GECO1

В 2019-ом году международная группа ученых задалась целью пополнения разнообразия красных GECI за счет привлечения инфракрасного спектра [11]. В основу индикатора лег биливердин-связывающий инфракрасный FP mIFP (рис. 9b) – подлинный мономер, спроектированный за несколько лет до этого при помощи анализа структуры бактериофитохрома (прежние IFP либо функционировали как сложные комплексы, либо изначально считались мономерными [25], но при высокой концентрации образовывали димеры) [26].

Дизайн GECI дополнили взаимодействующей с кальцием пептидной парой, схожей по свойствам с CaM/M13, однако место M13 занял другой участок киназы легких цепей миозина, RS20. Конечная структура привела к тому, что индикатор получил обратный фенотип (т.е. давал яркую эмиссию в отсутствие кальция и приглушенную – в присутствии) (рис. 9a, c-e).

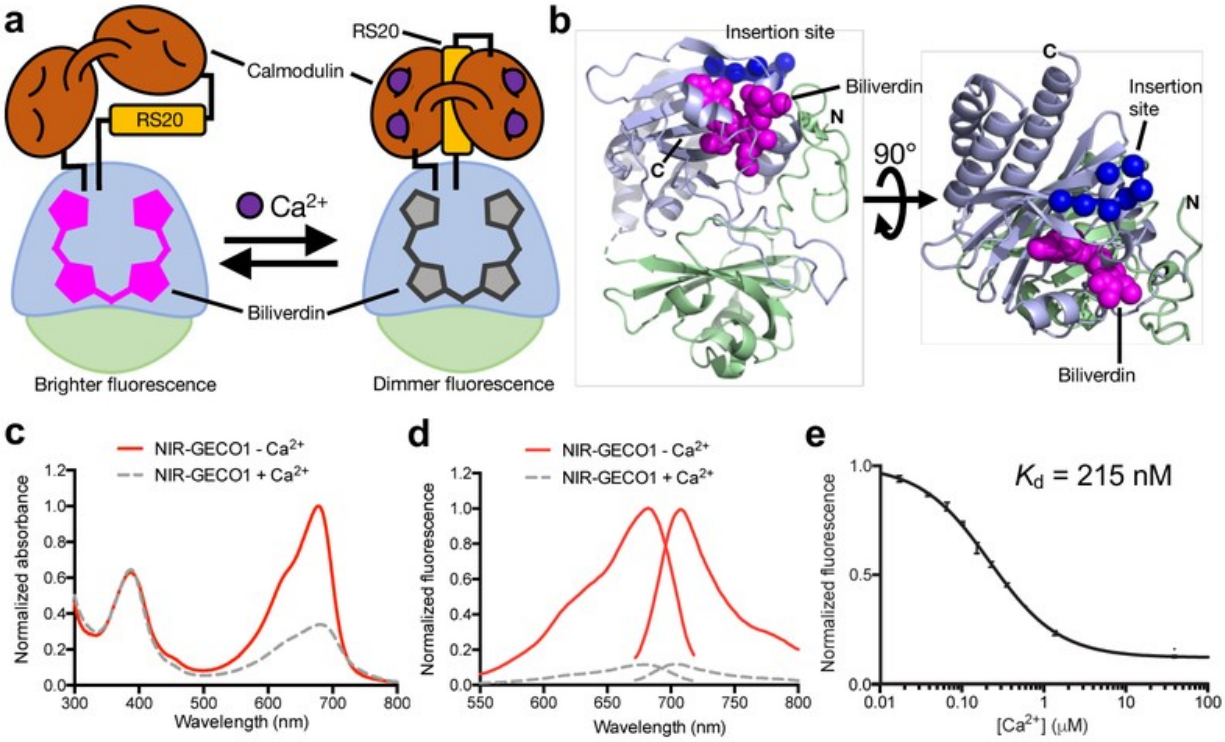


Рис. 9 *– Характеристики NIR-GECO1. На схематичной структуре индикатора* ***(a)*** *показано взаимодействие домена CaM/RS20 при наличии кальция (справа), а также более яркая флуоресценция (розовым цветом) в его отсутствие (слева); голубым показан GAF-домен, связывающий биливердин;* ***(b)*** *– два ракурса структуры бактериофитохрома, близкого гомолога mIFP; голубым показан GAF-домен, розовым – биливердин, синим – участки, замененные на CaM/RS20; спектры поглощения* ***(c)*** *и излучения* ***(d)*** *света NIR-GECO1, красным – в отсутствие кальция, серым – в присутствии; в* ***(e)*** *показано изменение флуоресценции индикатора в зависимости от концентрации кальция (в μM). Источник – статья [11], см.* ***Литературу****.*

Чтобы охарактеризовать экспрессию NIR-GECO1 *in vivo,* ген индикатора был внедрен в клетки слоя моторной коры мыши путем электропорации (техники, использующей электрическое поле для увеличения проницаемости клеточной мембраны) (рис. 10a). Для эксперимента мышам (возрастом по четыре недели) в одно из полушарий мозга ввели вирус, несущий ген NIR-GECO1. Через неповрежденную кожу (шерсть была удалена) и череп анестезированных мышей визуализация выявила снижение связанной с индикатором флуоресценции (примерно на 0.3%) в ответ на серии стимулов (рис. 10f-g). В тех же условиях другие,

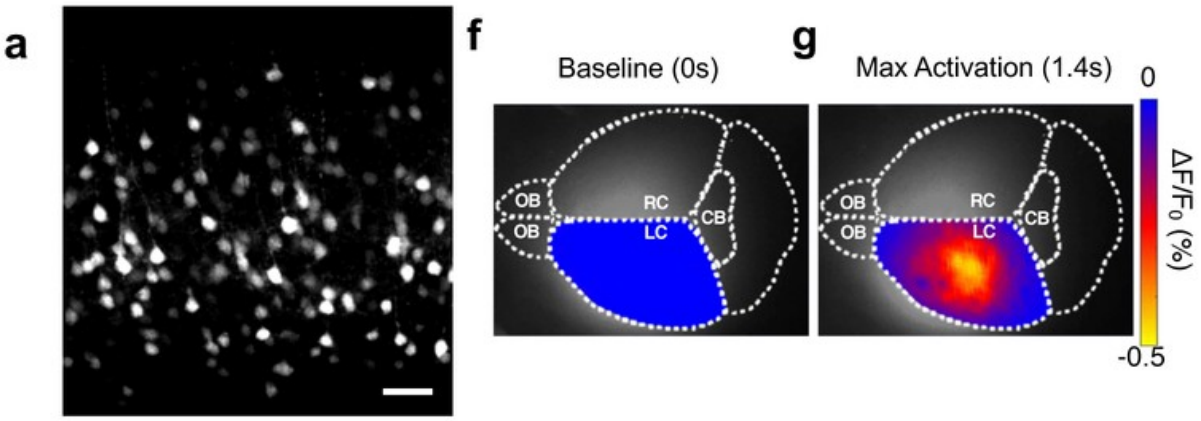
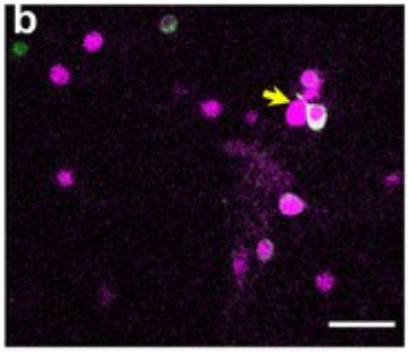


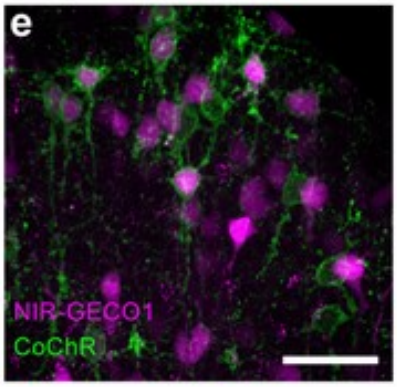
Рис. 10 *– Визуализация in vivo экспрессированного NIR-GECO1.* ***(a)*** *– конфокальное изображение среза живого мозга мыши, экспрессирующего NIR-GECO1, белый отрезок соответствует 50 µm;* ***(f)*** *– карта мозга мыши до стимуляции, индикатор введен в левое полушарие: OB – обонятельная луковица, CB – мозжечок, R/LC – правое и левое полушария соотв.;* ***(g)*** *– карта мозга мыши через 1.4 сек. после стимуляции (чем больше процент снижения флуоресценции, тем выше*

более чувствительные и коротковолновые индикаторы серии GCaMP6 (созданные в ходе мутагенеза зеленого GCaMP [27]) дали в 10 раз более существенные изменения флуоресценции. Одной из причин этого, по-видимому, является лучшая способность GCaMP6 к связыванию кальция [11]. Следующим шагом стало применение NIR-GECO1 совместно с другими индикаторами, в частности GCaMP6f (рис. 11b). При использовании двухфотонного микроскопа с возбуждением 1250 или 880 нм было показано, что NIR-GECO1 самодостаточен для визуализации нейронов как в культуре, так и в тканях мозга мыши, в т.ч. *in vivo.* При возбуждении 1250 нм также были замечены изменения флуоресценции индикатора, связанные с активностью нейронов, которая подтвердилась изменениями в совместно экспрессированном GCaMP6f. При возбуждении 880 нм NIR-GECO1 продемонстрировал яркость и фотостабильность, слегка превышающие таковые у mIFP. Тем не менее, успешной визуализации активности нейронов *in vivo* с помощью нового GECI на данном этапе добиться не удалось.

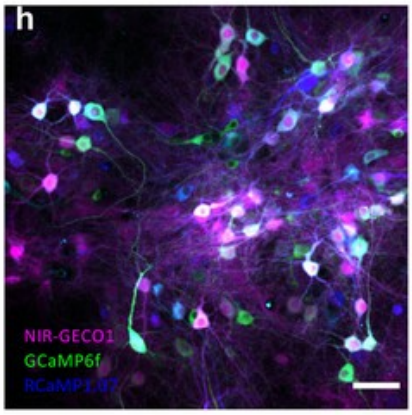
Для проверки возможности совместного применения NIR-GECO1 и инструментов оптогенетики были приготовлены срезы живого мозга с экспрессией NIR-GECO1 и фоточувствительного каналородопсина CoChR (рис. 11e). Как и итог, активация CoChR светом синего спектра приводила к

перепадам кальция, кот -GECO1. Использование
же этого индикатора сов 6f и RCaMP1.07) сделало
возможной трехцве
спонтанной активности
11h). Кроме прочего, кле
и двумя индикаторами
синем и желтом FP инди
ПКА) [28] и Pink Flamin
индикатор цАМФ) [29] по
mM хлорида тетраэтила
фармакологическую с
кальция – ответом
синхронные колебания
цАМФ и ПКА [11].





Так, NIR-GECO1 г
как полезное дополнен
набору красных GECI. О
для наблюдений за акти
и, как любой инди
биливердин-связывающем FP, он по яркости уступает прочим. Тем не менее, благодаря инфракрасному спектру, NIR-GECO1 удобен для использования в комбинации с оптогенетическими инструментами, возбуждающимися синим светом, и открыт для совмещения с различными другими индикаторами.



Как объяснили разработчики, будучи в своем роде индикатором первого поколения, этот GECI не может соревноваться со многими улучшенными индикаторами в ряде важных параметров, однако повышение эффективности связывания биливердина, сродства к кальцию и фотостабильности должно увеличить его яркость и, как следствие, сделать возможным его использование для визуализации *in vivo*.

Пополняя ряды: NIR GECI GAF-CaMP2

В том же 2019-ом году российские исследователи представили второй NIR кальциевый индикатор [5]. Этого требовали недостатки NIR-GECO1, в числе которых важную роль играл его обратный фенотип [11], способствовавший быстрому выгоранию индикатора при длительном использовании. В состав нового GECI вошли CaM/M13 пептидная пара, заимствованная у серии GCaMP [22], а также NIR FP под названием GAF-FP, разработанный на основе связывающего биливердин GAF-домена бактериофитохрома [30] и выбранный за его рекордно малые размеры (в 2 раза меньше других NIR FP, полученных из бактериофитохромов, и в 1.4 раза меньше GFP-подобных белков), а также за его максимум возбуждения, совпадающий по длине волны с 640-нм лазерами. Полученный индикатор был назван GAF-CaMP2 (рис. 12а).

Среди первых созданных библиотек с колониями бактерий только в одной библиотеке были флуоресцирующие варианты. Вариант с самой высокой чувствительностью к кальцию подвергли восьми последовательным раундам мутагенеза – во время каждого из них около 20,000 колоний были исследованы с целью поиска бактерий с наибольшими изменениями NIR флуоресценции, вызванными перепадами кальция [5]. Лучший выбранный вариант, GAF-CaMP, был опробован на клетках млекопитающих, однако разработчикам не удалось зафиксировать флуоресценцию, с добавлением биливердина и без него. При слиянии гена индикатора с sfGFP (GFP с серией мутаций, позволяющих ему, в т.ч. при слиянии с другими, плохо сворачивающимися FP,

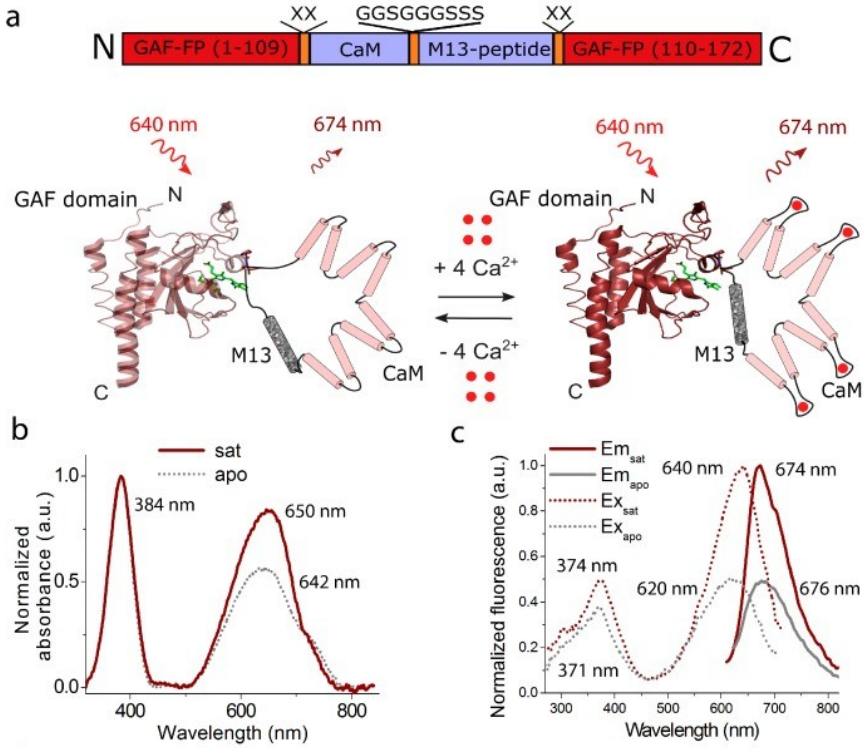


Рис. 12 *– Характеристики NIR GECI GAF-CaMP2;* ***(a)*** *– схема строения индикатора и его взаимодействия с кальцием (зеленым отмечен хромофор); спектры поглощения* ***(b)*** *и флуоресценции* ***(c)*** *света индикатором; красные линии – без кальция, серые – с кальцием; в* ***(c)*** *пунктиром показан спектр возбуждения. Источник – статья [5], см.* ***Литературу***

сворачиваться и созревать быстрее [31]) GAF-CaMP продемонстрировал положительный, пусть и слабый, ответ на ионы кальция.

Было выдвинуто предположение, что индикатор невозможен для использования в клетках млекопитающих с высокой концентрацией кальция в состоянии покоя из-за высокого сродства GAF-CaMP к кальцию – как следствие, дальнейший мутагенез был направлен на снижение этого сродства и увеличения динамического диапазона GECI в клетках. Конечному результату девяти раундов мутаций, отобранному по вышеуказанным критериям, присвоили название GAF-CaMP2 [5].

GAF-CaMP2 по итогам имел в 2-2.6 раза меньшую яркость в присутствии кальция, чем его предшественник GAF-FP, но выгорал в 2.9-3.1 медленнее, чем белок smURFP (RFP со схожими характеристиками спектра); таким образом, фотостабильность этого GECI может в некоторой степени компенсировать его недостаток яркости во время визуализации. Слияние индикатора с sfGFP дало флуоресценцию в клетках млекопитающих, в отличие от индикатора в чистом виде; подобное явление может объясняться плохой сворачиваемостью этого GECI или низкой стабильностью в клеточном окружении, отличном от бактериального.

Оптимизация GAF-CaMP2 для визуализации в культуре клеток HeLa показала, что коэкспрессия индикатора и sfGFP в разных плазмидах не давала инфракрасной флуоресценции даже в присутствии биливердина (рис. 13a), тогда как слияние двух белков позволило проявиться флуоресценции, равномерно распределенной по цитозолю клеток (рис. 13b), но только после добавления биливердина (в его отсутствие флуоресценции не было при любых концентрациях кальция). Добавление в клетки иономицина

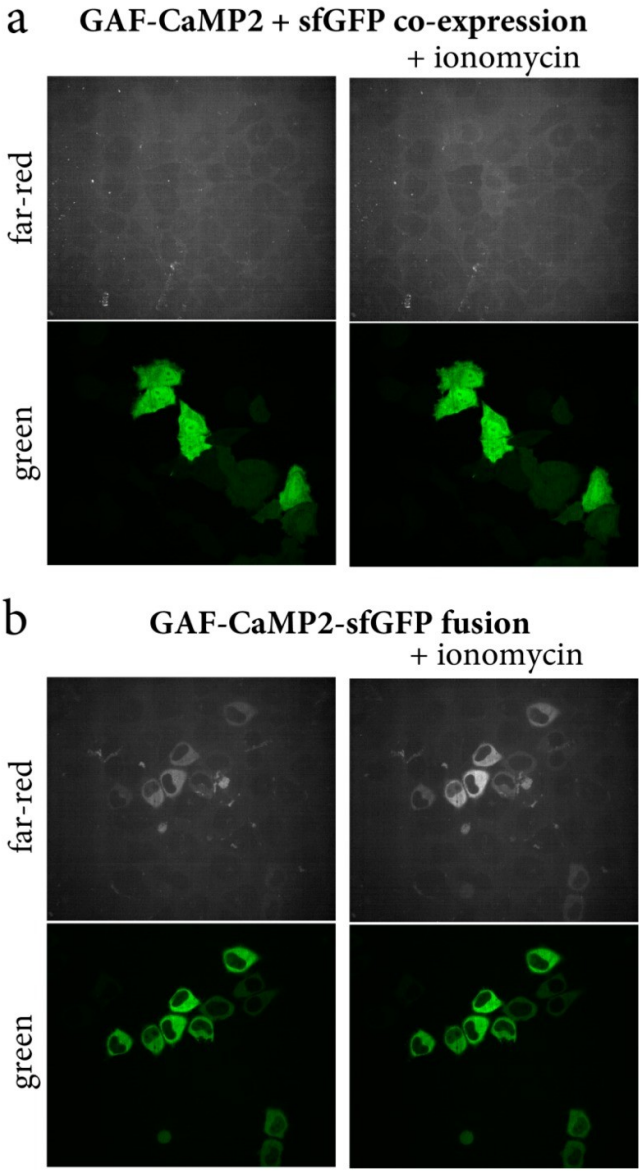


Рис. 13 *– Оптимизация GAF-CaMP2 для визуализации в клетках млекопитающих после добавления 20 μM биливердина. В* ***(a)*** *– конфокальные изображения клеток HeLa, коэкспрессирующих GAF-CaMP2 и sfGFP;* ***(b)*** *– экспрессия слияния GAF-CamP2-sfGFP до и после добавления 2.5 μM иономицина – показаны инфракрасный и зеленый каналы. Источник – статья [5].*

(антибиотика, повышающего концентрацию кальция в клетке) привело к возрастанию яркости GAF-CaMP2, никак не отразившись на зеленой флуоресценции sfGFP.

Путем коэкспрессии GAF-CaMP2 с красным R-GECO1 и синим B-GECO1 [21] в цитозоле, межмембранном пространстве митохондрий и ядрах клеток HeLa соответственно (с предварительным добавлением 20 μM биливердина) было показано, что спектр нового индикатора позволяет использовать его совместно с основанными на FP красными и синими GECI для одновременной многоцветовой визуализации перепадов кальция в трех различных органелах клеток млекопитающих [5].

Так, на данный момент NIR-GECO1 и GAF-CaMP2 остаются самыми длинноволновыми индикаторами из существующих, и, благодаря некоторой разнице в спектрах, последний может быть использован в комбинации с NIR-GECO1, чтобы предоставить дополнительный цвет. Несмотря на то, что GAF-CaMP2 в 1.4 раза меньше NIR-GECO1, обязательное слияние с sfGFP увеличивает его размеры в 1.2 раза. Индикаторы имеют прямой и обратный ответы на кальций соответственно, что может быть обусловлено их структурой. Слияние с sfGFP ускоряет процесс сворачивания GAF-CaMP2 в 2.6 раза, однако не улучшает выявленную экспериментально (с белком smURFP в качестве контроля) и без того высокую фотостабильность индикатора. Следовательно, отсутствие флуоресценции GECI в чистом виде можно объяснить либо его плохой сворачиваемостью, либо быстрым распадом в клетках млекопитающих. Создатели отмечают, что, на их взгляд, исправление этих дефектов, а также работа над яркостью GAF-CaMP2 и сродству хромофора к биливердину должно вывести этот NIR-GECI на новый уровень.

Подводя итоги, следует сказать и о недавней (вышедшей в сентябре 2020 года) статье, в которой разработчики GAF-CaMP2 представляют его улучшенную версию GAF-CaMP3 (или, если точнее, GAF-CaMP3-sfGFP). По их словам, новый индикатор не отличается от предшественника по спектральным характеристикам, яркости и сродству к кальцию, однако ΔF/F его ответа возросли в 2.9 раза. Этот индикатор продемонстрировал большие ΔF/F ответа в культуре нейронов, чем R-GECO1, но медленнее реагировал на изменение концентрации кальция [32].

Заключение и дальнейшие перспективы

Несмотря на то, что создание первых GECI датируется концом прошлого века, их преимущества перед другими типами индикаторов (например, синтетическими красками или индикаторами потенциала) были замечены не сразу [1]. Множество спектров GECI было испробовано в поисках тех, которые подходят для нейрологических исследований, – большей популярностью пользовались зеленый, желтый или синий спектры [14]. Красный спектр стал доступен для использования в разработке не так давно (2002-ой год) и только после мономеризации (упрощения сложной структуры до одной функциональной субъединицы) тетрамера красного FP [18], полученного из кораллов.

Первые красные индикаторы ставили своей основной целью не уступать прочим спектрам по яркости флуоресценции и динамическому диапазону, однако их применение сразу же стало расширяться: R-GECO1 с потомками с успехом был испытан в многоспектровой визуализации [21], а его улучшенная версия R-CaMP1.07 показала свою эффективность в клетках млекопитающих, в частности пиромидальных нейронах крысы, а также в комбинировании с такими инструментами оптогенетики, как светочувствительные каналы, необходимые для фотостимуляции нейронов [23]. Дальнейшие исследования продемонстрировали возможности использования красных GECI в культуре клеток и в различных живых организмах (нематоды, мухи, мыши и т.п.) [10].

Большая длина волны инфракрасного спектра (позволяющая производить глубокое сканирование тканей [5]), а также меньшее поглощение и рассеивание света [12] поставили далеко-красные FP и основанные на них индикаторы в выигрышное положение по сравнению с сенсорами других характеристик. Инфракрасные FP зачастую основаны на бактериальных фитохромах и связывают биливердин [13]; для создания кальциевого индикатора к хромофору FP необходимо прикрепить активирующийся кальцием домен [21-22], который во многих случаях представляет собой кальмодулин на одном конце хромофора и участок киназы легких цепей миозина – на втором.

На данный момент, с учетом новизны области, для описания NIR GECI доступны три варианта: NIR-GECO1 и GAF-CaMP2(3). Эти индикаторы имеют обратный и прямой фенотипы соответственно и пока плохо приспособлены для визуализации динамики кальция в клетках млекопитающих (в т.ч. *in vivo*): первый GECI в них имеет недостаточную яркость и динамический диапазон [11], у других по неясным причинам флуоресценция вовсе отсутствует без присоединения к нему дополнительного комплекса sfGFP [5]. Разработчики, однако, настроены оптимистично и предполагают различные способы улучшения свойств обоих индикаторов, поэтому, по-видимому, в ближайшем будущем следует

ожидать как второго, усовершенствованного поколения NIR GECI, так и новых разработок в посвященной им сфере нейробиологии.

Литература

1. *Looger L.L., Griesbeck O.* Genetically encoded neural activity indicators // Curr. Opin. Neurobiol., 2012. V. 22, pp. 18–23.
2. *Kerr J.N.D, Nimmerjahn A.* Functional imaging in freely moving animals // Curr. Opin. Neurobiol., 2012. V. 22, pp. 45-53.
3. *Rodriguez E.A., Campbell R.E., Lin J.Y., Lin M.Z., Miyawaki A., Palmer A.E., Shu X., Zhang J., TsienTsien R.Y.* The growing and glowing toolbox of fluorescent and photoactive proteins // Trends Biochem. Sci., 2017. V.42, pp. 111–129.
4. *Siegel M.S., Isacoff E.Y.* A genetically encoded optical probe of membrane voltage // Neuron, 1997. V. 19, pp. 735-741.
5. *Subach O.M., Barykina N.V., Anokhin K.V., Piatkevich K.D., Subach F.V.* Near-infrared genetically encoded positive calcium indicator based on GAF-FP bacterial phytochrome // Int. J. Mol. Sci., 2019. V. 20(14), № 3488.
6. *Nakai J., Ohkura M., Imoto K.* A high signal-to-noise Ca2+ probe composed of a single green fluorescent protein // Nat. Biotech., 2001. V. 19, pp. 137-141.
7. *Shcherbakova D.M., Cammer N.C., Huisman T.M., Verkhusha V.V., Hodgson L.* Direct multiplex imaging and optogenetics of RhoGTPases enabled by near-infrared FRET // Nat. Chem. Biol., 2018. V. 14, pp. 591–600.
8. *Mehta S., Zhang Y., Roth R.H., Zhang J.F., Mo A., Tenner B., Huganir R.L., Zhang J.* Single-fluorophore biosensors for sensitive and multiplexed detection of signalling activities // Nat. Cell Biol., 2018. V. 20, pp. 1215–1225.
9. *Piatkevich K.D., Jung E.E., Straub C., Linghu C., Park D., Suk H.J., Hochbaum D.R., Goodwin D., Pnevmatikakis E., Pak N., et al.* A robotic multidimensional directed evolution approach applied to fluorescent voltage reporters // Nat. Chem. Biol., 2018. V. 14, pp. 352–360.

10. *Akerboom J., Carreras Calderon N., Tian L., Wabnig S., Prigge M., Tolo J., Gordus A., Orger M.B., Severi K.E., Macklin J.J., et al.* Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics // Front Mol. Neurosci., 2013. V. 6, Article 2.

11. *Qian Y., Piatkevich K.D., Mc Larney B., Abdelfattah A.S., Mehta S., Murdock M.H., Gottschalk S., Molina R.S., Zhang W., Chen Y., et al.* A genetically encoded near-infrared fluorescent calcium ion indicator // Nat. Methods, 2019. V. 16, pp. 171–174.

12. *Rodriguez E.A., Tran G.N., Gross L.A., Crisp J.L., Shu X., Lin J.Y., Tsien R.Y.* A far-red fluorescent protein evolved from a cyanobacterial phycobiliprotein // Nat. Methods, 2016. V. 13, pp. 763-769.

13. *Shu X., Royant A., Lin M.Z., Aguilera T.A., Lev-Ram V., Steinbach P.A., Tsien R.Y.* Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome // Science, 2009. V. 324(5928), pp. 804-807.

14. *Oheim M., van ’t Hoff M., Feltz A., Zamaleeva A., Mallet J.-M., Collot M.* New red-fluorescent calcium indicators for optogenetics, photoactivation and multi-color imaging // BBA – Mol. Cell Research, 2014. V. 1843(10), pp. 2284–2306.

15. *Shagin D.A., Barsova E.V., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Labas Y.A., Semenova T.N., Ugalde J.A., Meyers A., Nunez J.M., et al.* GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity // Mol. Biol. Evol., 2004. V. 21, pp. 841-850.

16. *Remington S.J.* Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics // Curr. Op. Struct. Biol., 2006. V. 16(6), pp. 714–721.

17. *Shu X., Shaner N.C., Yarbrough C.A., Tsien R.Y., Remington S.J.* Novel Chromophores and buried charges control color in mFruits // Biochem., 2006. V. 45(32), pp. 9639–9647.

18. *Campbell R.E., Tour O., Palmer A.E., Steinbach P.A., Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y.* A monomeric red fluorescent protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002. V. 99, pp. 7877-7882.

19. *Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zaraisky A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A.* Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species // Nat. Biotech., 1999. V. 17(10), pp. 969–973.

20. *Shaner N.C., Lin M.Z., McKeown M.R., Steinbach P.A., Hazelwood K.L., Davidson M.W., Tsien R.Y.* Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins // Nat. Methods, 2006. V. 5(6), pp. 545–551.

21. *Zhao Y., Araki S., Wu J., Teramoto T., Chang Y.-F., Nakano M., et al.* An expanded palette of genetically encoded Ca2+ indicators // Science, 2011. V. 333(6051), pp. 1888–1891

22. *Wang Q., Shui B., Kotlikoff M. I., Sondermann H.* Structural basis for calcium sensing by GCaMP2 // Structure, 2008. V. 16(12), pp. 1817–1827.

23. *M. Ohkura, T. Sasaki, C. Kobayashi, Y. Ikegaya, J. Nakai.* An improved genetically encoded red fluorescent Ca2+ indicator for detecting optically evoked action potentials // PLoS One, 2012. V. 7, e39933.

24. *Wu J., Liu L., Matsuda T., Zhao Y., Rebane A., Drobizhev M., Chang Y.-F., Araki S., Arai Y., March K., et al.* Improved orange and red Ca2+ indicators and photophysical considerations for optogenetic applications // ACS Chem. Neurosci., 2013. V. 4(6), pp. 963–972.

25. *Yu D., Gustafson W.C., Han C., Lafaye C., Noirclerc-Savoye M., Ge W.-P., Thayer D.A., Huang H., Kornberg T.B., et al.* An improved monomeric infrared fluorescent protein for neuronal and tumour brain imaging // Nat. Comm., 2014. V. 5(1), Article 3626.

26. *Yu D., Baird M.A., Allen J.R., Howe E.S., Klassen M P. Reade A., Makhijani K., Song Y., Liu S., et al.* A naturally monomeric infrared fluorescent protein for protein labeling in vivo // Nat. Methods, 2015. V. 12(8), pp. 763–765.

27. *Chen T.-W., Wardill T J., Sun Y., Pulver S.R., Renninger S.L., Baohan A., Schreiter E.R., Kerr R.A., Orger M.B., et al.* Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity // Nature, 2013. V. 499(7458), pp. 295–300.

28. *Depry C., Allen M.D., Zhang J.* Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains // Mol. BioSyst., 2011. V. 7(1), pp. 52–58.

29. *Harada K., Ito M., Wang X., Tanaka M., Wongso D., Konno A., Hirai H., Hirase H.,Tsuboi T., Kitaguchi T.* Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging // Sci. Rep., 2017. V. 7(1), Article 7351.

30. *Rumyantsev K.A., Shcherbakova D.M., Zakharova N.I., Emelyanov A V., Turoverov K.K., Verkhusha V.V.* Minimal domain of bacterial phytochrome required for chromophore binding and fluorescence // Sci. Rep., 2015. V. 5, Article 18348.

31. *Pédelacq J.-D., Cabantous S., Tran T., Terwilliger T.C., Waldo G.S.* Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein // Nat. Biotech., 2005. V. 24(1), pp. 79–88.

32. *Subach O.M., Subach F.V.* GAF-CaMP3–sfGFP, An enhanced version of the near-infrared genetically encoded positive phytochrome-based calcium indicator for the visualization of neuronal activity // Int. J. Mol. Sci., 2020. V. 21(18), № 6883.