

Mikroskopowe obrazowanie jonów wapnia za pomocą genetycznie kodowanych sond

Kinga Gazda

Michał Bazała

Tomasz Węgiński✉

Laboratorium Neurodegeneracji, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa

✉Laboratorium Neurodegeneracji, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, ul. Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa; e-mail: twegierski@iimcb.gov.pl

Artykuł otrzymano 12 stycznia 2017 r.

Artykuł zaakceptowano 17 stycznia 2017 r.

Słowa kluczowe: jony wapnia, genetycznie kodowane sondy wapniowe, kameleon, GCaMP, akworyna, neuron

Wykaz skrótów: BRET (ang. *bioluminescence resonance energy transfer*) – bezpromienisty rezonansowy transfer energii bioluminescencji; CaM (ang. *calmodulin*) – kalmodulina; CFP (ang. *cyan fluorescent protein*) – białko błękitnej fluorescencji; ER (ang. *endoplasmic reticulum*) – siateczka endoplazmatyczna; FRET (ang. *Förster resonance energy transfer*) – bezpromienisty rezonansowy transfer energii Förstera; GECI (ang. *genetically encoded calcium indicator*) – genetycznie kodowana sonda wapniowa; GEVI (ang. *genetically encoded voltage indicator*) – genetycznie kodowana sonda potencjału błonowego; GFP (ang. *green fluorescent protein*) – białko zielonej fluorescencji; OGB-1 (ang. *Oregon Green BAPTA-1*) – chemiczna sonda Oregon Green BAPTA-1; YFP (ang. *yellow fluorescent protein*) – białko żółtej fluorescencji

STRESZCZENIE

Jony wapnia są wtórnym przekaźnikiem odgrywającym kluczową rolę w różnych procesach komórkowych. Monitorowanie poziomu jonów wapnia jest niezbędne do zrozumienia tych procesów. Pierwszymi sondami pozwalającymi na mikroskopowe pomiary stężeń jonów wapnia było luminescencyjne białko akworyna oraz sondy chemiczne. Te sondy mają jednak wady ograniczające ich skuteczne zastosowanie w wielu typach eksperymentów. Poznanie sekwencji białka zielonej fluorescencji pochodzącego z meduzy *A. victoria* i stworzenie jego pierwszych spektralnych wariantów metodami inżynierii genetycznej zainicjowało rozwój genetycznie kodowanych, fluorescencyjnych sond wapniowych. Powstały one z połączenia białka fluorescencyjnego z białkiem wiążącym jony wapnia, najczęściej kalmoduliną. Związanie jonów wapnia przez domenę sensoryczną sondy wpływa na właściwości fluorescencyjne chromoforu, co umożliwia rejestrację sygnałów wapniowych w postaci światła fluorescencji. Sondy tego typu mają wiele zalet i są nieodzowne w prowadzeniu długotrwałych eksperymentów *in vivo*. Niniejszy artykuł daje przegląd dostępnych obecnie genetycznie kodowanych sond wapniowych, historii ich rozwoju, zastosowań, a także mikroskopowych systemów obrazowania.

WPROWADZENIE

Jony wapnia (Ca^{2+}) są wtórnym przekaźnikiem sygnałów pozakomórkowych, odgrywającym ważną rolę w wielu procesach jak np. transkrypcja genów, wydzielanie neurotransmiterów, plastyczność synaps czy apoptoza [1]. W warunkach spoczynkowych ich stężenie w cytosolu komórek ssaków wynosi zaledwie ok. 100 nM, podczas gdy w siateczce endoplazmatycznej (ER, ang. *endoplasmic reticulum*) oraz przestrzeni pozakomórkowej jest ono 3–4 rzędy wielkości większe [2]. Utrzymanie tak dużego gradientu stężeń Ca^{2+} jest kosztowne energetycznie, pozwala jednak na szybką i dokładnie zlokalizowaną aktywację sygnałów wapniowych, a w efekcie na precyzyjną regulację maszyneryi białkowej zależnej od jonów wapnia. Pomiary stężeń Ca^{2+} są nieodzowne do zrozumienia procesów przez nie regulowanych, a techniką badawczą od wielu lat z powodzeniem używaną do tego celu jest mikroskopia świetlna. Już w latach 70-tych naukowcy jako sondę wapniową powszechnie zaczęli stosować akworynę, luminescencyjne białko wiążące Ca^{2+} , wyizolowane z meduzy *Aequorea victoria* [3]. Akworyna jako sonda wapniowa ma jednak pewne wady, z których najpoważniejszą jest mała ilość generowanych fotonów. W latach 80., w znacznej mierze dzięki pracom R. Tsien i jego współpracowników, rozpoczęła się era chemicznych, fluorescencyjnych sond wapniowych. Sondy takie jak Fura-2, Mag-fura-2, Rhod-2 czy Oregon Green BAPTA-1 (OGB-1) charakteryzują się dużą jasnością, zakresem dynamiki i kinetyką. Jednak i one nie są pozbawione wad. Do nich zaliczyć można brak możliwości długotrwałego (dni, tygodnie) obrazowania oraz trudności z uzyskaniem specyficznej lokalizacji w określonych organellach lub typach komórek *in vivo*. Naturalnym dążeniem było więc stworzenie nowego typu sondy, pozbawionego wszystkich wymienionych powyżej niedociągnięć, czego zwieńczeniem było pojawienie się pod koniec lat 90. fluorescencyjnych, genetycznie kodowanych sond wapniowych (GECI, ang. *genetically encoded calcium indicators*). Również i w tym procesie kluczową rolę odegrał wspomniany powyżej R. Tsien, jeden z trzech laureatów Nagrody Nobla w 2008 r. Została ona przyznana za prace nad białkiem zielonej fluorescencji (GFP, ang. *green fluorescent protein*), pochodzącym z tego samego organizmu co akworyna. Niniejszy artykuł ma na celu przybliżyć czytelnikowi budowę i właściwości GECI, systemy ich obrazowania oraz przykłady ich zastosowania w badaniach.

BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI GENETYCZNIE KODOWANYCH SOND WAPNIOWYCH

Sklonowanie cDNA dla białka GFP z meduzy *A. victoria* w 1992 roku [4] i zastosowanie GFP jako fluorescencyjnego znacznika w analizie lokalizacji białek było niewątpliwie przełomowym momentem w historii badań nad biologią komórki. Pierwsze fluorescencyjne GECI powstały niedługo później, bo już w 1997

r. Podstawowy przepis na GECl jest w teorii prosty: jedną lub dwie cząsteczki białka GFP (lub jednego z jego licznych spektralnych wariantów, jak np. CFP lub YFP) należy połączyć z białkiem wiążącym Ca²⁺, takim jak np. kalmodulina [1]. Związanie jonów wapnia przez domenę sensoryczną (maks. 4 kationy Ca²⁺ w przypadku kalmoduliny; [5]) prowadzi do zmiany właściwości fluorescencyjnych sondy. Zmianie może ulec tylko intensywność świecenia (sonda intensywnościowa) albo też widmo wzbudzenia/emisji fluorescencji (sonda ratiometryczna) [6]. W ciągu ostatnich dwudziestu lat ten podstawowy przepis był na wiele sposobów implementowany, wielokrotnie modyfikowany i ulepszany, czego efektem jest cały wachlarz dostępnych obecnie GECl [5,7]. Najważniejsze z nich zostały omówione poniżej.

KAMELEONY

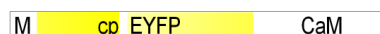
Kameleony powstały w laboratorium R. Tsien i były jednymi z pierwszych GECl [8,9]. Nazwa tej rodziny sond (ang. *Cameleons*) pochodzi od obecności kalmoduliny (w skrócie CaM) i zmiany koloru światła fluorescencji po związaniu jonów wapnia. Kameleony są więc sondami ratiometrycznymi. Kameleon YC2 składa się z dwóch wariantów białka GFP, a mianowicie świecącego na błękitno CFP i świecącego na żółto YFP, pomiędzy które wstawiono cząsteczkę kalmoduliny i peptydu M13, pochodzącego z kinazy lekkich łańcuchów miozyny (schematyczną budowę wybranych przedstawicieli różnych rodzin GECl zaprezentowano na rycinie 1). Kalmodulina po związaniu jonów Ca²⁺ oddziałuje z M13, co prowadzi do zmiany konformacyjnej sondy i przekazania energii wzbudzenia cząsteczki CFP (donor) na cząsteczkę YFP (akceptor) bez udziału promieniowania. Ten mechanizm nazywany jest

bezpromienistym transferem energii Förstera (FRET, ang. *Förster Resonance Energy Transfer*). Fotony światła fluorescencji zbierane są w dwóch kanałach: CFP/480 nm (dla sondy bez Ca²⁺) i YFP/530 nm (dla sondy z Ca²⁺; właściwości biofizyczne wybranych sond GECl przedstawiono w tabeli 1). Sonda YC2 charakteryzuje się bardzo niewielkim zakresem dynamiki, zaledwie na poziomie 1,6, obliczanym jako krotność zmiany stosunku sygnału YFP/CFP w warunkach wysycenia jonami wapnia do warunków bez jonów wapnia (zakres dynamiki definiowany jako R_{max}/R_{min} ; [7]). W praktyce oznacza to, że małe zmiany stężenia Ca²⁺ mogą zostać nie wykryte przez sondę. Właściwości kinetyczne sondy były jednak wystarczające do detekcji oscylacji poziomu Ca²⁺ w cytosolu komórek HeLa po podaniu histaminy [8].

Właściwości kameleonów były sukcesywnie poprawiane [9]. W pierwszej kolejności usunięto znaczną podatność sondy YC2 na zmiany pH poprzez zamianę dwóch aminokwasów w sekwencji YFP (sonda YC2.1; [10]). W dalszej kolejności YFP zastąpiono nowym fluorescencyjnym wariantem nazwanym *Citrine*, charakteryzującym się mniejszą wrażliwością na aniony chlorkowe, większą fotostabilnością i wydajniejszą ekspresją w 37°C (sonda YC2.3; [11]). Podstawienie kolejnego wariantu YFP, zwanego *Venus*, znacznie przyspieszyło dojrzewanie akceptora FRET w komórkach, zbliżając go do czasu dojrzewania donora – CFP (sonda YC2.12; [12]). Następnie udało się zasadniczo zwiększyć zakres dynamiki kameleonów, wykorzystując w tym celu znajomość struktury krystalicznej GFP. Cząsteczka GFP tworzy zwartą strukturę przestrzenną beta-beczulki, z blisko zlokalizowanymi względem siebie N- i C-końcami. Dzięki temu cząsteczka GFP jest zadziwiająco odporna na zmianę kolejności N- i C-końcowych fragmentów, jak również na wstawianie między nie fragmentów innych białek. Cząsteczkę *Venus* poddano cyklicznej permutacji i odkryto, że wariant z nowym N-końcem w pozycji 173 sekwencji aminokwasowej zwiększa zakres dynamiki sondy kameleon do wartości 6,6 (sonda YC3.60; [13]). Spowodowane jest to zmianą względnej orientacji chromoforów w cząsteczkach CFP i *Venus*. Wykorzystując jako materiał wyjściowy sondy YC3.60 i YC2.60, stworzono także serię wysokoczułych kameleonów określaną jako YC-Nano [14]. Bardzo niskie pozorne stałe dysocjacji ($K'_d = 16-65$ nM) osiągnięto poprzez wydłużenie łącznika między CaM i M13, co wpłynęło na zwiększenie stałej szybkości oddziaływania tych regionów. Sondy YC-Nano doskonale nadają się do analizy niewielkich wzrostów stężenia Ca²⁺ w cytosolu, jednak wcześniej ulegają wysyceniu w trakcie rejestracji szybko następujących po sobie zmian, tracąc rozdzielczość czasową. Równoległe prowadzono prace zmierzające do ograniczenia niepożądanego oddziaływania kameleonów z endogenną kalmoduliną. W tym celu wprowadzono komplementarne mutacje w regiony CaM i M13, tworząc serię sond oznaczonych kolejno D1-D4 [15,16]. Jako akceptor FRET wykorzystano w nich warianty *Citrine* lub poddaną cyklicznej permutacji *Venus* (np. sonda D3cpv; [15]).

Inną strategią ograniczenia wpływu endogennych białek na zachowanie sondy było zastosowanie troponiny C zamiast kalmoduliny. Troponina C jest białkiem wiążącym Ca²⁺ występującym tylko w mięśniach, dzięki czemu prawdopodobieństwo jej oddziaływania z endogennymi białkami w innych tkankach jest niewielkie. Pierwszą sondą powstałą na bazie tej strategii była TN-L15, powstała z połączenia CFP i *Citrine*, przedzie-

Pericam



GCaMP3



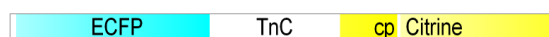
R-GECO1



YC3.60



TN-XXL



erGAP1



Nano-lantern (Ca²⁺)



100 200 300 400 500 600 700 aa

Rycina 1. Porównanie budowy wybranych przedstawicieli najważniejszych rodzin GECl. Oś przedstawia długość sekwencji aminokwasowej. Objasnienia skrótów: cp, wariant białka fluorescencyjnego (EGFP, EYFP, *Venus*, *Citrine*, *mApple*) z cykliczną permutacją; CaM, kalmodulina; TnC, troponina C; Aeq, akworyna; RLuc8, wariant lucyferazy; M, peptyd M13; H-M, peptyd M13 poprzedzony metką polihistydynową.

Tabela 1. Właściwości biofizyczne wybranych fluorescencyjnych sond GECI oraz chemicznej sondy OGB-1. Kolumna 1: nazwa sondy. Kolumna 2: lokalizacja komórki (Lok); cytosol (cyt), ER lub mitochondria (mito). Kolumna 3: długość fali maksymalnej emisji (Em). W przypadku gdy wartości są różne dla sondy niezwiązanej z Ca²⁺ i związanej z Ca²⁺, przedzielono je ukośnikiem. Dla sond wykorzystujących FRET podano zwyczajowe kanały akwizycji sygnałów. Kolumna 4: zakres dynamiki (ZD) definiowany jako I_{\max}/I_{\min} dla sond intensytmetrycznych oraz R_{\max}/R_{\min} dla sond ratiometrycznych. Różne wartości literaturowe przedzielono średnikiem. Kolumna 5: pozorna stała dysocjacji (K'_d). Dla sond cechujących się dwufazowymi krzywymi miareczkowania Ca²⁺, podano obydwie wyliczone wartości K'_d przedzielone przecinkiem. Różne wartości literaturowe przedzielono średnikiem. Kolumna 6: stała szybkości dysocjacji (k_{off}). Gwiazdką oznaczono wartości obliczone z czasu połowicznego zaniku sygnału ($t_{1/2}$) na podstawie wzoru: $k_{\text{off}} = -\ln(0.5)/t_{1/2}$. Różne wartości literaturowe przedzielono średnikiem.

Sonda	Lok	Em [nm]	ZD	K'_d [μM]	k_{off} [s^{-1}]
OGB-1	cyt	523	$I_{\max}/I_{\min} = 14$ [33]	0.24 [33]	139* [33]
YC2.60	cyt	480/530	$R_{\max}/R_{\min} = 6.6$ [13]; 14 [14]	0.04 [13]; 0.09 [14]	-
YC3.60	cyt	480/530	$R_{\max}/R_{\min} = 6.6$ [13]; 15 [14]	0.25 [13]; 0.215 [14]	0.34 [14]
D3cpv	cyt	480/530	$R_{\max}/R_{\min} = 5.1$ [15]	0.6 [50]	-
YC-Nano15	cyt	480/530	$R_{\max}/R_{\min} = 15.5$ [14]	0.0158 [14]	-
TN-XXL	cyt	480/530	$R_{\max}/R_{\min} = 3.3$ [7]	0.8 [19]	-
GCaMP3	cyt	517/515 [32]	$I_{\max}/I_{\min} = 12$ [27,33,35]; 12.3 [31]; 13.5 [32]	0.66 [27]; 0.405 [31]; 0.345 [32]; 0.25 [33]; 0.542 [35]	2.57 [32]; 4.6* [33]; 0.7 [35]
GCaMP5G	cyt	517/515 [32]	$I_{\max}/I_{\min} = 32.7$ [31]; 45.4 [32]; 34.4 [33]	0.46 [31]; 0.447 [32]; 0.41 [33]	2.52 [32]; 4.5* [33]
GCaMP6f	cyt	517/515 [32]	$I_{\max}/I_{\min} = 51.8$ [32]	0.375 [32]	3.93 [32]
GCaMP7	cyt	~ 510 [34]	$I_{\max}/I_{\min} = 36.6$ [34]	0.243 [34]	-
Fast-GCaMP-RS06	cyt	512 [33]	$I_{\max}/I_{\min} = 6.5$ [33]	0.31 [33]	20.4* [33]
G-GECO1	cyt	512 [35]	$I_{\max}/I_{\min} = 25$ [35]	0.749 [35]	0.7 [35]
R-GECO1	cyt	600/589 [35]	$I_{\max}/I_{\min} = 16$ [35]; 12 [39]	0.482 [35]; 0.337 [39]	0.752 [35]; 7 [39]
YC4er	ER	480/530	$R_{\max}/R_{\min} = 1.6$ [8]	0.083, 700 [8]	-
D1ER	ER	480/530	$R_{\max}/R_{\min} = 2$ [50]	0.8, 60 [50]	250 [50]
GEM-CEPIA1er	ER	510/460 [52]	$R_{\max}/R_{\min} = 21.7$ [52]	558 [52]	-
4mtD2cpv	mito	480/530	$R_{\max}/R_{\min} = 5.3$ [15]	0.03, 3 [50]	-
CEPIA3mt	mito	508 [52]	$I_{\max}/I_{\min} = 1.6$ [52]	11 [52]	-

lonych fragmentem białka troponiny C [17]. Ta sonda cechowała się jeszcze niewielkim zakresem dynamiki na poziomie 2, a także umiarkowanie wysoką pozorną stałą dysocjacji ($K'_d = 1,2 \mu\text{M}$). Kolejne warianty TN-XL i TN-XXL zawierały już poddany cyklicznej permutacji wariant *Citrine* (*Citrine-cp174*), co pozwoliło na zwiększenie zakresu dynamiki [18,19]. Najczulsza z tych sond w zakresie fizjologicznych zmian stężenia Ca²⁺ w cytosolu, TN-XXL, podobnie jak wspomniane wcześniej YC3.60, D3cpv oraz opisana poniżej sonda GCaMP3, są często stosowane w analizie aktywności neuronalnej [20,21]. Najnowsze sondy z tej serii, nazwane *Twitch*, zawierają tylko 1 lub 2 (zamiast czterech) domeny *EF-hand* wiążące Ca²⁺, co ma minimalizować efekt buforowania komórkowego Ca²⁺ przez sondę [22]. Sondy *Twitch* rejestrują aktywność neuronalną sprawniej niż sondy YC3.60 i TN-XXL, a porównywalnie z sondą GCaMP5G (patrz poniżej) oferując przy tym ratiometryczną akwizycję sygnałów.

SONDY ZAWIERAJĄCE JEDNO BIAŁKO FLUORESCENCYJNE

Podstawą działania GECI zawierających tylko jedno białko fluorescencyjne jest zmiana konformacyjna sondy po związaniu jonów wapnia przez CaM, wpływając na otoczenie chromoforu i jego zdolność do fluorescencji. W większości przypadków związanie Ca²⁺ powoduje wzrost intensywności świecenia (sonda intensytmetryczna), tylko nieliczne mogą działać jako sondy ratiometryczne. Pierwsze tego typu sondy także były rozwijane przez R. Tsien i jego współpracowników. Sonda *Camgaroo-1*, powstała w 1999 r., składa się z fragmentu CaM umieszczonego między dwiema połówkami cząsteczki YFP [23]. Intensywność świecenia *Camgaroo-1* zwiększała się

7-krotnie w warunkach maksymalnego wysycenia jonami wapnia względem warunków pozbawionych jonów wapnia (zakres dynamiki definiowany jako I_{\max}/I_{\min} ; [7]), a pozorna stała dysocjacji wynosiła $7 \mu\text{M}$, co jest dużą wartością jak na sondę cytosolową. Problemem sondy była także słaba ekspresja w komórkach w 37°C, co zostało poprawione w następnej wersji, *Camgaroo-2* [9]. Z kolei w sondach typu *Pericam* zastosowano odporny na zmiany pH wariant YFP (V68L/Q69K), dodatkowo poddany cyklicznej permutacji (cpYFP; [24]). Fragment CaM umieszczony został na C-końcu, a peptyd M13 na N-końcu. Podstawowa wersja tej sondy dała początek trzem ciekawym wariantom. *Flash-Pericam* charakteryzuje się podobnym zakresem dynamiki co *Camgaroo-1*, ale znacznie niższą stałą dysocjacji ($0,7 \mu\text{M}$). Zamiana tyrozyny-203 na fenyloalaninę (Y203F) w YFP zmieniła *Pericam* w sondę ratiometryczną o 10-krotnym zakresie dynamiki. Uzyskano też intensytmetryczną sondę, której intensywność malała po związaniu jonów wapnia: *Inverse Pericam*. Właściwości wymienionych powyżej sond były na tyle obiecujące, że zdecydowano się na przygotowanie transgenicjnych myszy z ekspresją sond *Camgaroo-2* i *Inverse Pericam* pod kontrolą promotora indukowanego tetracykliną [25].

W tym samym czasie, w którym powstały sondy *Pericam*, czyli w 2001 r. zapoczątkowana została najintensywniej rozwijana rodzina GECI określana jako GCaMP [26]. Jak sugeruje nazwa, sondy GCaMP zawierają GFP (zamiast CFP lub YFP). Poza tym budową bardzo przypominają sondy *Pericam*, wliczając w to cykliczną permutację białka fluorescencyjnego (cpGFP). Pierwsza sonda GCaMP rozczarowywała jednak parametrami. Zakres dynamiki osiągał zaledwie 4, a więc wyraźnie mniej niż w sondach *Camgaroo* i *Pericam*, a ponadto

problemem GCaMP była bardzo niska intensywność światła fluorescencji. W kolejnych wersjach (GCaMP 1.6 i GCaMP2) zdołano znacznie poprawić ten drugi parametr, jednak w dalszym ciągu sonda świeciła 100 razy słabiej niż GFP [27]. Dalsze wersje GCaMP rozwijane były w różnych laboratoriach, w tym w laboratorium L. Loogera z Janelia Research Campus. Opierając się na strukturze krystalicznej białka GCaMP2, wytypowano regiony dla ukierunkowanej mutagenazy. Efektem była pierwsza w pełni użyteczna w badaniach *in vivo* wersja sondy, GCaMP3 [27]. Cechowała się ona 12-krotnym zakresem dynamiki i wysoką fotostabilnością. Udało się też jeszcze bardziej poprawić jasność sondy w warunkach spoczynkowych [27,28]. Sonda GCaMP3 przewyższała sondy GCaMP2, TN-XXL oraz D3cpv w rejestracji wielokrotnych potencjałów czynnościowych w neuronach. Jednak rejestracja pojedynczego potencjału wciąż pozostawała niepewna [29-31]. Ukierunkowana mutagenaza skierowana przede wszystkim na peptydy łączące M13 z cpGFP oraz cpGFP z CaM dała w efekcie aż 12 nowych wariantów sondy GCaMP kolejnej generacji [31]. Spośród nich trzy konsekwentnie najlepiej wypadły w licznych układach eksperymentalnych. GCaMP5G wydaje się być najbardziej uniwersalną sondą, podobną do GCaMP3, ale wyraźnie przewyższającą ją zakresem dynamiki. GCaMP5A działała najlepiej w organizmach zmiennocieplnych takich jak *C. elegans* i *D. rerio*, a GCaMP5K charakteryzowała się najwyższą jasnością w hodowlach pierwotnych neuronów szczurzych w warunkach spoczynkowych, prawdopodobnie z powodu jej wysokiego powinowactwa do jonów wapnia ($K_d = 189$ nM). Rok później ci sami autorzy opublikowali sondy szóstej generacji [32]. Ponownie stosując ukierunkowaną mutagenezę opartą na analizie krystalicznych struktur dotychczasowych sond GCaMP, a także zaawansowane metody selekcji nowych wariantów w hodowlach neuronów hipokampalnych, uzyskali trzy sondy wyraźnie przewyższające osiągnięciami dotychczasowe sondy. Te trzy sondy różniły się parametrami kinetycznymi i zostały nazwane GCaMP6s, 6m oraz 6f, w kolejności od najwolniejszej do najszybszej. Zaletą sondy GCaMP6s było najbardziej skuteczne wykrywanie pojedynczych potencjałów (jednak kosztem wydłużenia czasu połowicznego zaniku sygnału), choć wszystkie trzy nowe sondy były wyraźnie lepsze pod tym względem od sond GCaMP3 i GCaMP5G. Stworzenie szybkiej sondy na bazie GCaMP3 było także celem innej grupy badawczej [33]. Autorzy wytypowali miejsca podstawień aminokwasów w motywach *EF-Hand* i peptydzie M13. Efektem było stworzenie serii sond Fast-GCaMP, z których najlepsze osiągały czas połowicznego zaniku sygnału na poziomie 25–34 milisekund (mierząc metodami biofizycznymi) i wyraźnie przewyższały pod tym względem sondy GCaMP3 i GCaMP5G. Podobnie jak miało to miejsce w przypadku sond GCaMP szóstej generacji, czułość detekcji sygnałów wapniowych negatywnie korelowała z możliwościami kinetycznymi. Jest to przewidywalny efekt, ponieważ sondy o wolniejszej kinetyce świecą dłużej i pozwalają na otrzymanie obrazów o wyższym stosunku sygnał/szum. Szybkie sondy, takie jak Fast-GCaMP-RS06 umożliwiały jednak precyzyjne określenie czasu trwania aktywacji neuronów i rozdział czasowy szybko następujących po sobie impulsów stymulacyjnych [33]. Ponieważ sondy Fast-GCaMP i GCaMP6 zostały opublikowane w podobnym czasie, zabrakło ich bezpośredniego porównania.

Sondy GCaMP były ulepszane również przez swoich twórców, naukowców z Uniwersytetu Saitama. Bazując na stwo-

rzony przez siebie sondzie GCaMP2, stworzyli oni trzy nowe sondy nazwane kolejno GCaMP6-8 ([34]; nie należy ich mylić z sondami GCaMP6 z Janelia Research Campus). Sondy GCaMP7 i GCaMP8 charakteryzują się bardzo dużym zakresem dynamiki (powyżej 30). W eksperymentalnym porównaniu wydajności wykrywania niewielkiej ilości potencjałów czynnościowych przez GECI pochodzące z kilku laboratoriów, sonda GCaMP7 wypadła zdecydowanie najlepiej [28]. Z kolei sonda GCaMP3 posłużyła jako materiał wyjściowy do opracowania nowej linii sond w laboratorium R. Campbella, nazwanych GECO [35]. W tym przypadku zastosowano nieukierunkowaną mutagenezę i badania przesiewowe w bakteriach w celu otrzymania nowych sond o jak największym zakresie dynamiki. Cel został osiągnięty, jednak kosztem obniżenia ogólnej jasności sondy względem GCaMP3 [28,31,35]. Przy okazji opracowania zielono świecącej sondy G-GECO1 udało się też stworzyć dwie sondy ratiometryczne: GEX-GECO1, która po związaniu Ca^{2+} uzyskuje nowe pasmo wzbudzenia z maksimum przy 482 nm, oraz sondę GEM-GECO1, w której związanie Ca^{2+} powoduje przesunięcie pasma emisji ze światła zielonego w kierunku pasma niebieskiego [35].

Dotychczas omawiane sondy charakteryzowały się światłem fluorescencji w zakresie od niebieskiego do żółtego. W mikroskopowym obrazowaniu, zwłaszcza *in vivo*, preferowane są znaczniki fluorescencyjne o większej długości fali [36]. Dzięki temu redukuje się takie niepożądane zjawiska jak autofluorescencja (emitowana przez endogenne fluorofory jak np. FAD, NADH), fototoksyczność czy rozpraszanie światła wzbudzenia i fluorescencji. W tym celu, przy okazji prac nad sondami G-GECO, stworzono czerwono świecącą sondę R-GECO1, poprzez wprowadzenie poddanego cyklicznej permutacji białka *mApple* w miejsce cpGFP, a następnie poddanie tak powstałej sondy kilku rundom mutagenazy [35]. Maksimum absorpcji sondy R-GECO1 przypada na 561 nm, a maksimum pasma fluorescencji na 589 nm. Stworzenie czerwono świecącej sondy wapniowej pozwalało na wykorzystanie dwóch sond jednocześnie, zbierając ich fluorescencję w kanałach zielonym i czerwonym. W kolejnych latach ci sami autorzy kontynuowali prace nad R-GECO1, chcąc uzyskać sondę o dużym przesunięciu Stokesa (różnica w długości fali pomiędzy maksimum dla światła wzbudzenia i fluorescencji). Sondę R-GECO1 poddano najpierw ukierunkowanej mutagenzie, w celu uzyskania znacznego przesunięcia Stokesa, a następnie kilku rundom losowej mutagenazy w celu optymalizacji parametrów. W efekcie uzyskano sondę REX-GECO1, różniącą się od R-GECO1 aż w 14 pozycjach sekwencji aminokwasowej, o maksimum pasma wzbudzenia przy 480 nm i maksimum fluorescencji przy 585 nm [37]. Sonda o takich parametrach ma dwie zalety: po pierwsze, w mikroskopii dwufotonowej może być wzbudzana światłem lasera z optymalnego dla badań *in vivo* zakresu bliskiej podczerwieni (650–1000 nm), w którym absorpcja i rozpraszanie światła w tkance są najmniejsze. Po drugie, może być rejestrowana równolegle z zielono świecącą sondą innego typu (np. wykrywającą glutaminian sondą iGluSnFR [37]), z możliwością wzbudzenia obydwu sond jedną linią lasera (np. 488 nm w mikroskopii konfokalnej). Odpowiedzią z laboratorium L. Loogera na R-GECO1 były czerwono świecące sondy oparte na białku mRuby, określane jako RCaMP1 [38]. Są one jaśniejsze niż R-GECO1, mają mniejsze powinowactwo do Ca^{2+} , a także nieznacznie mniejszy zakres dynamiki. Według autorów, zaletą sond RCaMP1 jest jednak

stabilna fluorescencja, podczas gdy sonda R-GECO1 ulega odwracalnej fotoaktywacji, co może prowadzić do artefaktów w uzyskanych sygnałach. Następnie, korzystając z rozwiązań technologicznych wypracowanych przy okazji prac nad sondami GCaMP piątej i szóstej generacji, stworzono nowe wersje czerwono świecących sond, określanych jako jRCaMP1 i jR-GECO1 [39]. Sondy te dorównują większością parametrów biofizycznych sondom GCaMP6, ustępując im jedynie pod względem zakresu dynamiki. W ten sposób w ciągu kilku lat udało się wypełnić dużą lukę w paśmie fluorescencji dostępnych sond wapniowych, co daje możliwość zastosowania dwóch, a nawet trzech sond jednocześnie [35].

BIOLUMINESCENCYJNE SONDY WAPNIOWE

Chociaż niniejszy artykuł koncentruje się na sondach fluorescencyjnych, nie sposób nie wspomnieć o bioluminescencyjnych GECl, opartych głównie na akworynie, białku wiążącym Ca^{2+} pochodzącym z meduzy *A. victoria*. Funkcjonalna akworyna powstaje z połączenia części białkowej, apoakworyny oraz aromatycznego kofaktora, koelenterazyny [3]. Związanie 2-3 jonów wapnia przez domeny *EF-Hand* akworyny inicjuje utlenienie koelenterazyny, z czym związana jest emisja niebieskiego światła o długości fali 465 nm. W narządach świetlnych meduzy akworyna występuje razem z GFP. Transfer energii z akworyny do GFP, określaný jako BRET (ang. *bioluminescence resonance energy transfer*), wywołuje emisję zielonego światła zamiast niebieskiego. Mimo, że obecnie GECl są oparte przede wszystkim na białkach fluorescencyjnych takich jak GFP, to pierwszą białkową sondą do detekcji zmian Ca^{2+} była właśnie bioluminescencyjna akworyna. Pierwotnie, do analizowanych komórek wprowadzono pozyskiwane z naturalnych źródeł, oczyszczone białko [3]. Po poznaniu sekwencji cDNA dla akworyny w 1985 r., zaczęto wprowadzać do komórek plazmidy kodujące modyfikowaną metodami inżynierii genetycznej, rekombinowaną sondę. Akworyna jest ceniona jako sonda wapniowa, która pozwala na ilościowe oznaczanie jonów Ca^{2+} metodami mikroskopowymi [40]. Po dodaniu odpowiednich sekwencji sygnałowych wysoce specyficznie lokalizowała się w organellach takich jak ER czy mitochondria, gdzie pozostawała w pełni funkcjonalna. Użycie akworyny jako sondy ma jednak dwie zasadnicze wady: konieczność dostarczenia koelenterazyny oraz bardzo niewielka emisja fotonów, praktycznie uniemożliwiająca obrazowanie w pojedynczych komórkach z dużą rozdzielczością czasową. Ten drugi problem może być częściowo rozwiązany poprzez stworzenie fuzji GFP (lub innego białka fluorescencyjnego) z N-końcem akworyny, naśladując naturalnie występujący układ tych dwóch białek [41]. Ponieważ wydajność kwantowa białek fluorescencyjnych jest znacznie wyższa niż akworyny, BRET zapewnia większą intensywność świecenia sondy, nawet przy niecałkowitej wydajności transferu energii. W takiej sondzie akworyna pełni funkcję sensora jonów Ca^{2+} i donora BRET, a GFP – akceptora BRET. W analogiczny sposób skonstruowano następnie fuzję akworyny z białkami fluorescencyjnymi świecącymi na czerwono [42]. Podobny układ białko luminescencyjne – białko fluorescencyjne występuje też u innych parzydełkowców, np. w koralowcu *Renilla reniformis*. W tym organizmie rolę donora BRET pełni lucyferaza, a akceptora również GFP, a transfer BRET zachodzi praktycznie ze stuprocentową wydajnością. Podobnie jak akworyna, lucyferaza z *R. reniformis* wymaga obecności koelenterazyny, ale

w przeciwieństwie do akworyny nie wiąże Ca^{2+} . W wyniku połączenia *Venus* z RLuc8 (stabilny wariant lucyferazy) powstało białko luminescencyjne *Nano-lantern*, o jasności ponad 5-krotnie większej niż samo RLuc8 [43]. Wprowadzając w środek lucyferazy domeny wiążące Ca^{2+} , cAMP lub ATP, stworzono serię bioluminescencyjnych sond o różnym przeznaczeniu. Sonda wapniowa *Nano-lantern* wykrywa wzrosty Ca^{2+} po stymulacji komórek zwiększając emisję światła o 25-100%. Jednak jasność sondy wapniowej *Nano-lantern* wciąż pozostaje dwa rzędy wielkości mniejsza niż sond fluorescencyjnych [43]. Mimo to, sondy luminescencyjne mogą w przyszłości znaleźć duże zastosowanie jako sondy stosunkowo mało inwazyjne, ponieważ do emisji nie potrzebują światła wzbudzenia, a jedynie uprzedniego wprowadzenia kofaktora – koelenterazyny.

OBRAZOWANIE JONÓW WAPNIA W NEURONACH

Chociaż GECl są stosowane w wielu typach komórek, niewątpliwie największe praktyczne zastosowanie znalazły w neurobiologii. Neurony zawierają znacznie bardziej bogatą maszynię białkową do sterowania jonami wapnia niż inne komórki, a sygnały wapniowe odgrywają w ich funkcjonowaniu szczególną rolę. Zastosowanie sond wapniowych w neuronach można zasadniczo podzielić na dwa typy eksperymentów [29,44]. Pierwszy to rejestrowanie napływu jonów wapnia przez postsynaptyczne kanały takie jak jonotropowe receptory glutaminianowe zlokalizowane w kolcach dendrytycznych oraz przez wapniowe kanały bramkowane napięciem w zakończeniach presynaptycznych. Tego typu eksperymenty dostarczają informacji na temat funkcjonowania synaps, ich plastyczności, a także roli Ca^{2+} w tych procesach. W drugim typie eksperymentów napływ jonów wapnia do neuronów jest wskaźnikiem biegnących potencjałów czynnościowych, i co za tym idzie, aktywności neuronalnej. W tym przypadku rejestrowany jest przede wszystkim napływ Ca^{2+} w proksymalnych dendrytach przez kanały wapniowe, aktywowane w przebiegu wstecznych potencjałów czynnościowych. Chociaż aktywność neuronalną można bardziej precyzyjnie badać metodami elektrofizjologicznymi, metody optyczne oferują mniejszą inwazyjność, a także globalną i powtarzalną rejestrację sygnałów przez długi czas [21]. Teoretycznie, najlepiej do tego celu powinny nadawać się genetycznie kodowane sondy potencjału błonowego (GEVI, ang. *genetically encoded voltage indicators*), rozwijane od tego samego czasu co GECl [6]. Jednak wymagania stawiane sondom GEVI są znacznie wyższe od tych dla sond GECl. Potencjał czynnościowy trwa zaledwie kilka milisekund, co daje mało czasu na emisję fotonów przez sondę. Co więcej, lokalizacja sond GEVI jest ograniczona tylko do błony komórkowej, co znacznie ogranicza ilość sondy w neuronie [6]. W efekcie, obecnie dostępne sondy GECl rejestrują przebieg potencjału czynnościowego wydajniej niż GEVI i stały się standardowym narzędziem w badaniach aktywności neuronów, mapowaniu połączeń neuronalnych i ich stabilności w czasie [29,44,45]. Ponieważ rejestracja potencjałów czynnościowych jest tak ważnym aspektem działania sond GECl w neurobiologii, w większości prac nad nowymi sondami stosuje się rygorystyczne testy czułości na wykrywanie pojedynczych i większej ilości potencjałów czynnościowych, precyzyjnie wywoływanych elektrodami stymulującymi. Istotna jest także liniowość odpowiedzi wapniowej na ilość indukowanych potencjałów [28,36]. Wiele nowych sond bez problemu wykrywa pojedyncze potencjały, a także nadaje się

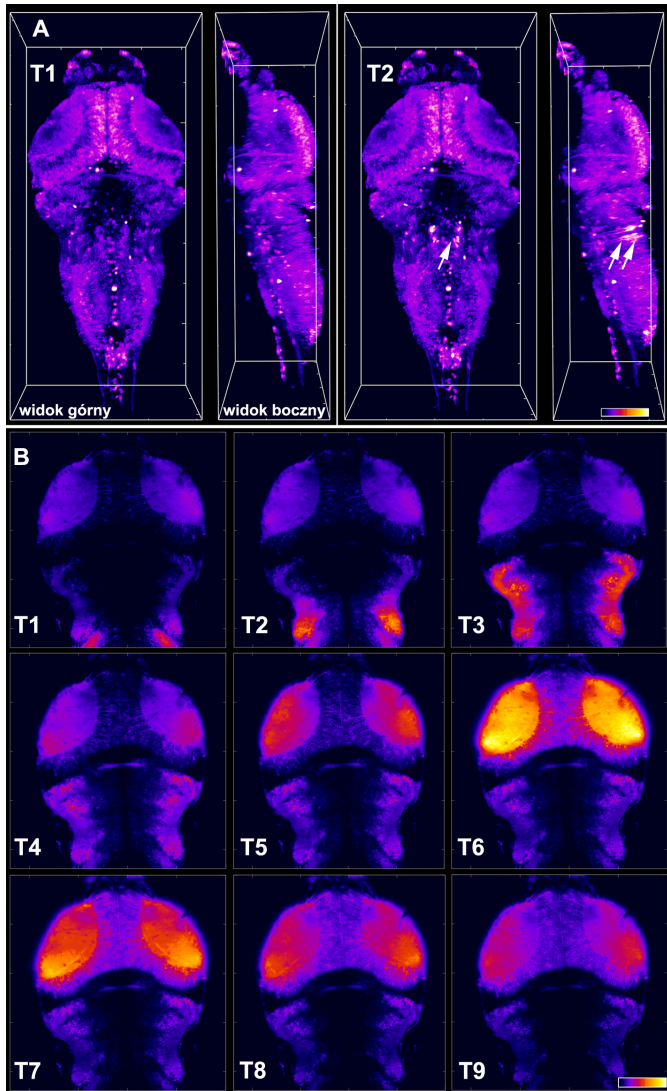
do rejestracji spontanicznej aktywności neuronalnej [29]. Pod tym względem zrównały się już z niektórymi sondami chemicznymi jak np. OGB-1 [32], często stosowaną w neurobiologii. Sondy chemiczne wciąż górują nad GECI dużymi stałymi szybkości reakcji *in vitro* [7,36], jednak z powodu stosunkowo długiego czasu trwania sygnałów wapniowych (w porównaniu z czasem trwania potencjału czynnościowego [29]), najszybsze GECI wykazują podobną kinetykę zaniku sygnału w komórkach co OGB-1 [32]. Ponieważ stężenia Ca^{2+} w cytosolu neuronów są dość niskie, a sygnały wapniowe osiągają niewielkie amplitudy, do rejestracji aktywności neuronalnej bardziej odpowiednie są sondy o niskiej stałej dysocjacji i dużym zakresie dynamiki [30,32]. Obecnie wydaje się, że najbliższe ideałowi są sondy z rodziny GCaMP, których rozwój postępował w największym tempie. Brak ratiometrycznej akwizycji dla tych sond wydaje się nie być dużym problemem, a czasami nawet zaletą. W neurobiologii istotniejsze są względne zmiany poziomu jonów wapnia niż możliwość policzenia absolutnych wartości stężeń. Wahania sygnału spowodowane niestabilnością w osi Z, samoistnie wyrównywane w przypadku użycia sond ratiometrycznych, mogą być także korygowane przez zbieranie referencyjnego sygnału innego białka fluorescencyjnego w drugim kanale. Sondy intensytmetryczne, z racji prostszego widma wzbudzenia i fluorescencji, łatwiej natomiast niż sondy ratiometryczne łączyć z innymi sondami i narzędziami optogenetycznymi, jak np. opsyna Chr2, w ramach tego samego eksperymentu [36,38].

Dużą zaletą GECI w neurobiologii jest możliwość stabilnej ekspresji sondy i prowadzenia badań przez długi czas [21,36,45]. Istnieją trzy główne metody trwałego wprowadzania GECI w badaniach *in vivo* u gryzoni: transgeneza, elektroporacja *in utero* i transdukcja za pomocą wirusów [29,44]. Sondy najczęściej ekspresjonowane są pod kontrolą neuronalnych promotorów genów Synapsyny 1 lub Thy-1. Dla długoterminowych badań ważne jest aby sonda nie miała właściwości toksycznych, a sygnał fluorescencji był stabilny w czasie i równomiernie rozmieszczony w cytosolu [36,44]. To ostatnie może być problemem zwłaszcza w przypadku części sond o czerwonym spektrum emisji, które wykazują pewne tendencje do agregacji i akumulacji w lizosomach [39]. Wiele sond daje się jednak obrazować przez długi czas. Za pomocą metod elektrofizjologicznych potwierdzono, że sonda GCaMP3 nie powoduje zmian aktywności neuronów po upływie 2-3 tygodni od momentu transdukcji wirusowej [27]. Następnie użyto tej sondy do korelacji aktywności neuronalnej w korze motorycznej z aktywnością ruchową myszy na przestrzeni 120 dni. Rejestrując sygnały sondy TN-XXL przez okres 3 tygodni wykazano z kolei stabilność odpowiedzi konkretnych neuronów w korze wzrokowej na bodźce wizualne w jednej z ośmiu orientacji [19]. Podobnie, za pomocą GECI badano długoterminowe kształtowanie odpowiedzi neuronów w korze baryłkowej na sygnały pochodzące od poszczególnych mysich wibrystów [46]. Co więcej, niedawno wykazano nawet możliwość długotrwałej rejestracji aktywności w neuronach położonego pod korą mózgową hipokampu, poprzez specjalnie przygotowany otwór czaszkowy [47]. Sondy GECI stosowane są w badaniach aktywności neuronalnej nie tylko u ssaków, ale też u niższych kręgowców i bezkręgowców. Z powodu niewielkich rozmiarów i dużego stopnia transparentności powłok ciała niektórych z nich (zwłaszcza *D. rerio* i *C. elegans*), obrazowanie sieci neuronalnych *in vivo* zwykle jest znacznie uła-

twione w porównaniu z gryzoniami. Sondy wapniowe są często używanym narzędziem w badaniach prowadzonych nad danio pręgowanym (*Danio rerio*), a dostępne metody zebrano w obszernym opracowaniu [48]. W naszym laboratorium stosujemy linię danio pręgowanego ze stabilną produkcją sondy GCaMP5G [49] do badania spontanicznej i indukowanej aktywności neuronalnej (Ryc. 2). W nicieniu *C. elegans* obrazowano aktywność neuronów motorycznych w trakcie ruchu [34], a także zmiany w poziomie Ca^{2+} w neuronach węchowych po podaniu alkoholu izoamyloвого [27,38,39]. W muszce owocowej (*Drosophila melanogaster*) wykazano użyteczność sond GECI w badaniach reakcji na bodźce zapachowe neuronów zlokalizowanych w płatach czułkowych [27,32] oraz analizie aktywności neuronalnej w odpowiedzi na pieśni godowe i inne sygnały dźwiękowe [33]. Podsumowując, GECI są stosowane w badaniach aktywności neuronalnej w wielu różnych układach eksperymentalnych i organizmach, a wybór optymalnej sondy zależy od konkretnego eksperymentu i obiektu badań [20,27,30,31].

OBRAZOWANIE JONÓW WAPNIA W ORGANELLACH

Bardzo ważnym zastosowaniem GECI jest rejestrowanie poziomu jonów wapnia w organellach, zwłaszcza w ER i mitochondriach, dzięki możliwości ich specyficznego kierowania do organelli za pomocą odpowiednich sekwencji sygnałowych. Uzyskanie specyficznego lokalizacji dla sond chemicznych jest natomiast praktycznie niemożliwe. Dla przykładu, stosując odpowiednie warunki inkubacji komórek z estrami acetoksymetylowymi sondy Mag-fura-2 można uzyskać jej wzbogacenie wewnątrz ER (ale też i innych organelli), jednak aby pozbyć się resztek sondy z cytosolu należy zwiększyć przepuszczalność błony plazmatycznej za pomocą detergentów. Taki układ eksperymentalny jest odpowiedni do analizy kinetyki zmian stężeń Ca^{2+} w ER po zahamowaniu lub aktywacji pompy SERCA, ale nie nadaje się do pomiarów fizjologicznych stężeń Ca^{2+} . ER pełni funkcję głównego komórkowego magazynu jonów wapnia, uwalnianych w trakcie stymulacji komórek. W tym procesie najważniejszą rolę odgrywają receptory IP_3 i rianodynowe. Jony wapnia „uciekają” też z ER w sposób ciągły przez wciąż słabo poznane kanały (ang. „leak channels”), a za uzupełnianie właściwego poziomu Ca^{2+} odpowiedzialna jest pompa SERCA. Ponieważ stężenie Ca^{2+} w ER jest znacznie wyższe niż w cytosolu i wynosi 0,1–1 mM, do pomiaru konieczne jest zastosowanie sond o niskim lub bardzo niskim powinowactwie do Ca^{2+} . Pierwsze GECI przeznaczone dla ER pojawiły się wraz z pierwszymi kameleonami [8]. Sondy YC3er i YC4er są wariantami YC2, w których dokonano podstawień aminokwasów w obrębie motywów wiążących Ca^{2+} , podwyższając pozorną stałą dysocjacji sond odpowiednio do wartości 4,4 μM i 700 μM . Dodano także sekwencję sygnałową dla ER pochodzącą z białka kalretikuliny oraz C-końcowy peptyd KDEL, zatrzymujący sondy w ER. Chociaż te pierwsze sondy dla ER miały dość ograniczone parametry biofizyczne, były często wykorzystywane do pomiarów stężeń spoczynkowych jonów wapnia i dynamiki zmian po stymulacji [9]. W sondzie kolejnej generacji, D1ER, zastąpiono YFP wariantem Citrine oraz zminimalizowano możliwość oddziaływania z endogenną kalmoduliną [16]. D1ER charakteryzuje się wysoką stałą szybkości zaniku sygnału (250 s^{-1}) i pozorną stałą dysocjacji o wartości pośredniej (60 μM) między wartościami dla YC3er i YC4er oraz zbliżonej do tej wyliczonej dla Mag-fura-2

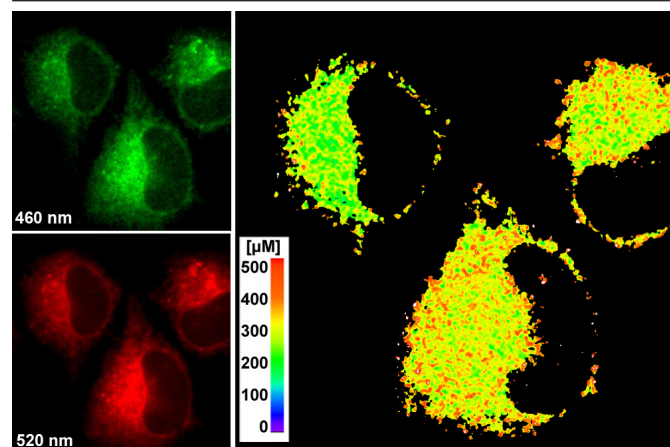


Rycina 2. Obrazowanie neuronów w mózgu 3-dniowej ryby *Danio rerio* za pomocą sondy GCaMP5G. W panelu A przedstawiono trójwymiarowy, perspektywiczny rzut maksymalnej projekcji fluorescencji całego mózgu, złożony z 58 warstw. Widoczny obszar ma wymiary 410 x 1200 x 230 µm. W kolejnych punktach czasowych (T1, T2) rejestrowano spontaniczną aktywność neuronów. Białe strzałki wskazują na pojedyncze ciała komórkowe i aksony, w których znacznie wzrosł poziom fluorescencji w T2 w porównaniu do T1. W panelu B przedstawiono pojedynczą płaszczyznę mózgu w przekroju poziomym. Kolejne punkty czasowe (T1..T9) przedstawiają gwałtowny napływ wapnia do neuronów, indukowany podaniem do środowiska kwasu glutaminowego. Skale przedstawiają intensywność fluorescencji i odcinek 100 µm. Obserwując aktywność neuronów z sondą GCaMP, można porównywać ich liczbę i częstotliwość z jaką są aktywne. W rezultacie możliwe jest zidentyfikowanie różnic w działaniu i budowie układu nerwowego pomiędzy rybami dzikimi, a tymi, które są modelami chorób neurodegeneracyjnych. Zdjęcia zostały wykonane przy pomocy mikroskopu Zeiss Lightsheet Z.1.

(25 µM). W efekcie sonda D1ER znacznie lepiej nadaje się do pomiarów dynamicznych zmian wewnątrz ER niż poprzednie GECl, czego dowodem była rejestracja oscylacyjnych zmian Ca^{2+} w komórkach HeLa po stymulacji ATP [16]. Mankamentem sondy D1ER był wciąż niewielki zakres dynamiki, na poziomie $R_{max}/R_{min} = 2$ [50]. Zastosowanie poddanej cyklicznej permutacji sondy *Venus* zamiast wariantu *Citrine* zwiększało zakres dynamiki w sondzie D1 do wartości 5, jednak takie sondy nie akumulowały się wydajnie w ER [50,51]. Również stała dysocjacji wynosząca 60 µM jest za niska do pomiarów spoczynkowych stężeń Ca^{2+} w ER i może prowadzić do ich niedoszacowania. Te mankamenty zostały poprawione w kolejnych

sondach, powstałych na bazie sond GECO. Stworzono intensytmetryczne sondy G-CEPIA1er (zielona fluorescencja), R-CEPIA1er (czerwona fluorescencja), a także ratiometryczną sondę GEM-CEPIA1er [52]. Zwłaszcza ta ostatnia zasługuje na uwagę jako ratiometryczny zamiennik dla sondy D1ER charakteryzujący się wysoką stałą dysocjacji (558 µM) i imponującym zakresem dynamiki ($R_{max}/R_{min} = 21,7$). Zastosowanie sond ratiometrycznych takich jak kameleon czy GEM-CEPIA1er w badaniach nad homeostazą wapniową wewnątrz ER jest bardzo pożądane, ponieważ umożliwia obliczenie absolutnych wartości stężeń (Ryc. 3), co jest bardzo utrudnione lub wręcz niemożliwe w przypadku sond intensytmetrycznych.

Mitochondria mają dużą zdolność przejściowej akumulacji jonów wapnia dzięki aktywności uniportera MCU, po czym jony Ca^{2+} uwalniane są z powrotem do cytosolu przez wymiennik sodowo-wapniowy [53]. Pierwsze GECl dla mitochondriów powstały na bazie sond *Pericam*, *Camgaroo* i kameleonów [54], poprzez dodanie do nich sekwencji kierującej pochodzącej z jednej z podjednostek oksydazy cytochromowej. Wykorzystując niskoczuły kameleon YC4.1mito ($K'_d = 104$ µM) udało się wykazać, że stężenie jonów wapnia w mitochondriach po stymulacji komórek może osiągać chwilowe wartości przekraczające 100 µM [55]. Dla porównania, K_d dla często używanej w badaniach nad mitochondriami chemicznej sondy Rhod-2 wynosi zaledwie 570 nM. Oczywiście jest więc, że sonda Rhod-2 w warunkach znacznej stymulacji komórek będzie bardzo szybko ulegał wysyceniu. Mitochondrialne kameleon pierwszej generacji nie wykazywały się całkowitą specyficznością lokalizacji i ustępowały pod tym względem mitochondrialnej wersji sondy *Pericam* [54]. Ten problem poprawiono w kolejnej generacji kameleonów opartej na bazie sond D2, D3 i D4, do których dołączono podwójną lub poczwórną presekwencję mitochondrialną [15]. Sondy te miały też większy zakres dynamiki niż wcześniejsze kameleon, z racji zastosowania wariantu *Venus* poddanego cyklicznej permutacji, którego ekspresja w mitochondriach okazała się mniej problematyczna niż w ER. Co ważne, sondy te razem pokrywały znaczny zakres roboczych stężeń Ca^{2+} (K'_d od 760 nM do 49,68 µM). Ponieważ różnice stężeń Ca^{2+} w mitochondriach mogą sięgać aż trzech rzędów wielkości, dla uzyska-



Rycina 3. Pomiar stężenia Ca^{2+} w ER w komórkach HeLa za pomocą sondy GEM-CEPIA1er. Sondę wzbudzano laserem o długości fali 405 nm, a fluorescencję zbierano jednocześnie w dwóch kanałach (oznaczonych jako 460 i 520 nm) mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM800. Kanał 460 nm (kolor zielony) reprezentuje sygnał sondy związanej z Ca^{2+} , natomiast kanał 520 nm (kolor czerwony) reprezentuje sygnał sondy bez Ca^{2+} . Prawy panel przedstawia mapę stężenia Ca^{2+} w ER uzyskaną po kalibracji sondy.

nia pełnego obrazu konieczne może okazać się zastosowanie sond o różnym K'_d . Podobny zakres pracy oferuje seria trzech intensytmetrycznych sond powstałych na bazie GECO: CEPIA2mt (160 nM), CEPIA3mt (11 μ M) i CEPIA4mt (56 μ M) [52]. Podobnie jak w przypadku ER, dostępna jest też wersja ratiometryczna mito-GEM-GECO1 [35]. Zaletą sond opartych na GECO są ich niewielkie rozmiary, co może ułatwić uzyskanie specyficznej lokalizacji mitochondrialnej. Badania z użyciem mitochondrialnych GECI ugruntowały obraz mitochondriów jako organelli nie tylko buforujących jony wapnia wyrzucane przez ER, lecz również aktywnie dekodujących i transformujących sygnały wapniowe [40]. Jak wielokrotnie zademonstrowano, sygnały wapniowe w mitochondriach po stymulacji cechują się znaczną różnorodnością, co może być spowodowane różną siłą połączeń między konkretnymi mitochondriami a miejscami wyrzutu Ca^{2+} z ER oraz aktywnością MCU [2,52,54,55].

Nowym typem sondy, który może znaleźć duże zastosowanie w badaniu dynamiki wapniowej w organellach jest sonda GAP [56]. GAP strukturalnie bardzo przypomina wspomniane wyżej sondy luminescencyjne, a mianowicie jest połączeniem GFP i akworyny. W toku prac nad sondami luminescencyjnymi autorzy odkryli, że niektóre warianty wykazują zdolność fluorescencji w zależności od poziomu jonów wapnia bez obecności koelenterazyny. W tym przypadku akworyna funkcjonuje tylko jako sensor jonów wapnia, ale nie jako donor BRET. Sonda GAP ma różne pasma wzbudzenia w zależności od stężenia Ca^{2+} , jest więc sondą ratiometryczną. Warianty z odpowiednimi sekwencjami kierującymi wydajnie lokalizują się w organellach, gdzie zachowują dość wysoki, czterokrotny zakres dynamiki (w sondzie erGAP1 dodatkowo obniżono powinowactwo do Ca^{2+} , uzyskując wartość $K'_d = 12 \mu$ M). Zaletą sond GAP jest zastosowanie akworyny jako sensora Ca^{2+} , która, jako białko pochodzące z bezkręgowca, nie powinna oddziaływać z białkami w komórkach ssaczych.

Sondy wapniowe można łączyć nie tylko z sekwencjami sygnałowymi kierującymi je do określonych organelli, ale także z innymi białkami i ich domenami, uzyskując specyficzną lokalizację sond w komórce. Sondy zawierające domeny palmitylacyjne i/lub mirystoilacyjne umożliwiają analizę sygnałów wapniowych bezpośrednio pod błoną plazmatyczną [15,57]. Co więcej, fuzja z kanałami wapniowymi takimi jak kanały bramkowane napięciem lub Orai1 umożliwia analizę zdarzeń w nanodomach wapniowych, a nawet daje mechanistyczny wgląd w działanie kanałów [58,59]. Szerszy przegląd sond wapniowych kierowanych do ER, mitochondriów i innych organelli, a także w konkretne domeny komórkowe, można znaleźć w pracach przeglądowych innych autorów [2,40,60].

SYSTEMY OBRAZOWANIA SOND WAPNIOWYCH

Nie istnieje jeden idealny system obrazowania sygnałów wapniowych, a wybór konkretnego zestawu jest głównie zdefiniowany przez obiekt obrazowania i rodzaj sondy. W najprostszej sytuacji, w przypadku obrazowania komórek w hodowli wystarcza mikroskop fluorescencyjny szerokiego pola, z odpowiednio dobranymi filtrami fluorescencyjnymi i wysokiej jakości monochromatyczną kamerą naukową (preferowane są kamery typu EM-CCD lub sCMOS). Bardziej wymagające dla sprzętu jest obrazowanie sond ratiometrycznych [51]. Sondy

ratiometryczne wzbudzeniowe wymagają zmotoryzowanego koła filtrów wzbudzenia lub monochromatora. Akwizycja kanałów tego typu sond jest siłą rzeczy sekwencyjna i co za tym idzie stosunkowo powolna. Sondy ratiometryczne emisyjne wymagają zastosowania albo koła filtrów emisyjnych (którego implementacja w praktyce może okazać się trudniejsza niż koła filtrów wzbudzenia) lub dzielnika światła kierującego obraz na dwie kamery lub dwie połówki sensora tej samej kamery. Dobrym rozwiązaniem jest użycie mikroskopu konfokalnego (jeśli sekcjonowanie optyczne nie jest potrzebne, szczelina konfokalna (ang. *pinhole*) może pozostać otwarta) i rejestracja sygnałów na dwóch fotopowielaczach (Ryc. 3). Jest to szczególnie łatwe w systemach z detekcją spektralną (pryzmaty, siatka dyfrakcyjna, zmotoryzowane gradientowe lustra dichroiczne). Rozdział światła fluorescencji na dwa detektory umożliwia równoczesne obrazowanie obydwu kanałów i co za tym idzie jest to obrazowanie równie szybkie jak w przypadku sond intensytmetrycznych. W wielu układach eksperymentalnych zwykły mikroskop fluorescencyjny nie wystarcza i niezbędne jest zastosowanie jednej z technik sekcjonowania optycznego w celu zwiększenia rozdzielczości i kontrastu w rejestrowanych obrazach. W przypadku obrazowania sond zakotwiczonych w błonach lub związanych z białkami błonowymi stosuje się zwykle mikroskopię TIRF (ang. *Total Internal Reflection Fluorescence*), aby jeszcze bardziej ograniczyć źródło sygnałów wapniowych do błony komórkowej [58]. W przypadku obrazowania małych organizmów, takich jak larwy danio pręgowanego, doskonale sprawdza się mikroskopia typu *light sheet*, w której wzbudzenie sondy fluorescencyjnej ograniczone jest do płaszczyzny ogniskowania obiektywu (Ryc. 2; [61]). W przypadku obrazowania neuronów w skrawkach lub *in vivo* w mózgu gryzoni, standardem jest mikroskopia konfokalna lub dwufotonowa [29,44]. Mikroskopia dwufotonowa jest preferowana, ponieważ stosowane w niej światło wzbudzenia z regionu bliskiej podczerwieni (700–1000 nm) jest stosunkowo mało absorbowane i rozpraszane przez tkanki, a więc umożliwia rejestrację sygnałów z głęboko położonych warstw. Zakres ten jest kompatybilny ze wzbudzeniem zielono świecących sond, takich jak GCaMP (zwykle 910–920 nm). Więcej problemów może przysparzać obrazowanie czerwono świecących sond takich jak R-GECO czy RCaMP, ponieważ ich optymalny zakres wzbudzenia dwufotonowego (ok. 1040 nm) najczęściej przekracza zakres pracy używanych w mikroskopii dwufotonowej femtosekundowych laserów tytanowo-szafirowych. Rozwiązaniem zapewniającym większe długości fal wzbudzenia jest doposażenie systemów w oscylatory OPO (np. Chameleon Compact OPO, Coherent lub Opal/Inspire, Spectra-Physics) lub zastosowanie laserów światłowodowych emitujących powyżej 1000 nm. Użytecznym kompromisem w przypadku jednoczesnego obrazowania sond świecących na zielono i czerwono było zastosowanie jednej linii wzbudzenia 1000 nm dla jR-GECO1a i GCaMP6s [39]. Niewątpliwie, systemy do obrazowania Ca^{2+} w mózgu gryzoni osiągają często duży stopień skomplikowania; muszą być dodatkowo wyposażone w uchwyty mocujące dla zwierząt (aktywnych lub pod narkozą), jak również często zawierają osprzęt elektrofizjologiczny (elektrody stymulujące i pomiarowe).

PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich 20 lat dokonał się bardzo intensywny rozwój genetycznie kodowanych, fluorescencyjnych sond

wapniowych. Znaczny udział miał w nim niedawno zmarły Roger Tsien; duża część opisanych w tej pracy sond powstała w jego laboratorium lub w laboratoriach jego wychowanków. Obecnie dostępne sondy parametrami biofizycznymi niejednokrotnie dorównują sondom chemicznym, umożliwiając przy tym prowadzenie długoterminowych badań *in vivo*. Również kolorystyczna gama dostępnych sond jest obecnie szeroka, co pozwala na jednoczesne zastosowanie dwóch lub większej ilości fluoroforów. Duży wybór genetycznie kodowanych sond wapniowych i innych optogenetycznych narzędzi powoli zmienia sposób prowadzenia eksperymentów neurobiologicznych; metody elektrofizjologiczne zastępowane są metodami całkowicie optycznymi. Odkrycia naukowe związane z wykorzystaniem genetycznie kodowanych sond wapniowych na pewno będą też inspiracją dla dalszych prac nad innymi typami sond, zwłaszcza nad sondami potencjału błonowego, które niewątpliwie będą coraz częściej stosowane w neurobiologii.

PIŚMIENNICTWO

- Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 131: 1047-1058
- Suzuki J, Kanemaru K, Iino M (2016) Genetically Encoded Fluorescent Indicators for Organellar Calcium Imaging. *Biophys J* 111: 1119-1131
- Shimomura O (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc* 217: 1-15
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233
- Horikawa K (2015) Recent progress in the development of genetically encoded Ca²⁺ indicators. *J Med Invest* 62: 24-28
- Rodriguez EA, Campbell RE, Lin JY, Lin MZ, Miyawaki A, Palmer AE, Shu X, Zhang J, Tsien RY (2016) The growing and glowing toolbox of fluorescent and photoactive proteins. *Trends Biochem Sci* doi:10.1016/j.tibs.2016.09.010
- Perez Koldenkova V, Nagai T (2013) Genetically encoded Ca²⁺ indicators: properties and evaluation. *Biochim Biophys Acta* 1833: 1787-1797
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388: 882-887
- Whitaker M (2010) Genetically encoded probes for measurement of intracellular calcium. *Methods Cell Biol* 99: 153-182
- Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R, Tsien RY (1999) Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2135-2140
- Griesbeck O, Baird GS, Campbell RE, Zacharias DA, Tsien RY (2001) Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol Chem* 276: 29188-29194
- Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20: 87-90
- Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A (2004) Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 10554-10559
- Horikawa K, Yamada Y, Matsuda T, Kobayashi K, Hashimoto M, Matsui-ura T, Miyawaki A, Michikawa T, Mikoshiba K, Nagai T (2010) Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca²⁺ indicators, yellow Cameleon-Nano. *Nat Methods* 7: 729-732
- Palmer AE, Giacomello M, Kortemme T, Hires SA, Lev-Ram V, Baker D, Tsien RY (2006) Ca²⁺ indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem Biol* 13: 521-530
- Palmer AE, Jin C, Reed JC, Tsien RY (2004) Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca²⁺ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 17404-17409
- Heim N, Griesbeck O (2004) Genetically encoded indicators of cellular calcium dynamics based on troponin C and green fluorescent protein. *J Biol Chem* 279: 14280-14286
- Mank M, Reiff DF, Heim N, Friedrich MW, Borst A, Griesbeck O (2006) A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. *Biophys J* 90: 1790-1796
- Mank M, Santos AF, Drenth S, Mrcsic-Flogel TD, Hofer SB, Stein V, Hendl T, Reiff DF, Levelt C, Borst A, Bonhoeffer T, Hubener M, Griesbeck O (2008) A genetically encoded calcium indicator for chronic *in vivo* two-photon imaging. *Nat Methods* 5: 805-811
- Tian L, Akerboom J, Schreiner ER, Looger LL (2012) Neural activity imaging with genetically encoded calcium indicators. *Prog Brain Res* 196: 79-94
- Aramuni G, Griesbeck O (2013) Chronic calcium imaging in neuronal development and disease. *Exp Neurol* 242: 50-56
- Thestrup T, Litzlbauer J, Bartholomaeus I, Mues M, Russo L, Dana H, Kovalchuk Y, Liang Y, Kalamakis G, Laukat Y, Becker S, Witte G, Geiger A, Allen T, Rome LC, Chen TW, Kim DS, Garaschuk O, Griesinger C, Griesbeck O (2014) Optimized ratiometric calcium sensors for functional *in vivo* imaging of neurons and T lymphocytes. *Nat Methods* 11: 175-182
- Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (1999) Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11241-11246
- Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A (2001) Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3197-3202
- Hasan MT, Friedrich RW, Euler T, Larkum ME, Giese G, Both M, Dube J, Waters J, Bujard H, Griesbeck O, Tsien RY, Nagai T, Miyawaki A, Denk W (2004) Functional fluorescent Ca²⁺ indicator proteins in transgenic mice under TET control. *PLoS Biol* 2: e163
- Nakai J, Ohkura M, Imoto K (2001) A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19: 137-141
- Tian L, Hires SA, Mao T, Huber D, Chiappe ME, Chalasani SH, Petreanu L, Akerboom J, McKinney SA, Schreiner ER, Bargmann CI, Jayaraman V, Svoboda K, Looger LL (2009) Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Methods* 6: 875-881
- Podor B, Hu YL, Ohkura M, Nakai J, Croll R, Fine A (2015) Comparison of genetically encoded calcium indicators for monitoring action potentials in mammalian brain by two-photon excitation fluorescence microscopy. *Neurophotonics* 2: 021014
- Broussard GJ, Liang R, Tian L (2014) Monitoring activity in neural circuits with genetically encoded indicators. *Front Mol Neurosci* 7: 97
- Yamada Y, Michikawa T, Hashimoto M, Horikawa K, Nagai T, Miyawaki A, Hauser M, Mikoshiba K (2011) Quantitative comparison of genetically encoded Ca²⁺ indicators in cortical pyramidal cells and cerebellar Purkinje cells. *Front Cell Neurosci* 5: 18
- Akerboom J, Chen TW, Wardill TJ, Tian L, Marvin JS, Mutlu S, Calderon NC, Esposti F, Borghuis BG, Sun XR, Gordus A, Orger MB, Portugues R, Engert F, Macklin JJ, Filosa A, Aggarwal A, Kerr RA, Takagi R, Kracun S, Shigetomi E, Khakh BS, Baier H, Lagnado L, Wang SS, Bargmann CI, Kimmel BE, Jayaraman V, Svoboda K, Kim DS, Schreiner ER, Looger LL (2012) Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J Neurosci* 32: 13819-13840
- Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiner ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS (2013) Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499: 295-300
- Sun XR, Badura A, Pacheco DA, Lynch LA, Schneider ER, Taylor MP, Hogue IB, Enquist LW, Murthy M, Wang SS (2013) Fast GCaMPs for improved tracking of neuronal activity. *Nat Commun* 4: 2170
- Ohkura M, Sasaki T, Sadakari J, Gengyo-Ando K, Kagawa-Nagamura Y, Kobayashi C, Ikegaya Y, Nakai J (2012) Genetically encoded green fluorescent Ca²⁺ indicators with improved detectability for neuronal Ca²⁺ signals. *PLoS One* 7: e51286

35. Zhao Y, Araki S, Wu J, Teramoto T, Chang YF, Nakano M, Abdelfattah AS, Fujiwara M, Ishihara T, Nagai T, Campbell RE (2011) An expanded palette of genetically encoded Ca²⁺ indicators. *Science* 333: 1888-1891
36. Rose T, Goltstein PM, Portugues R, Griesbeck O (2014) Putting a finishing touch on GECIs. *Front Mol Neurosci* 7: 88
37. Wu J, Abdelfattah AS, Miracourt LS, Kutsarova E, Ruangkittisakul A, Zhou H, Ballanyi K, Wicks G, Drobizhev M, Rebane A, Ruthazer ES, Campbell RE (2014) A long Stokes shift red fluorescent Ca²⁺ indicator protein for two-photon and ratiometric imaging. *Nat Commun* 5: 5262
38. Akerboom J, Carreras Calderon N, Tian L, Wabnig S, Prigge M, Tolo J, Gordus A, Orger MB, Severi KE, Macklin JJ, Patel R, Pulver SR, Wardill TJ, Fischer E, Schuler C, Chen TW, Sarkisyan KS, Marvin JS, Bargmann CI, Kim DS, Kugler S, Lagnado L, Hegemann P, Gottschalk A, Schreiter ER, Looger LL (2013) Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics. *Front Mol Neurosci* 6: 2
39. Dana H, Mohar B, Sun Y, Narayan S, Gordus A, Hasseman JP, Tseng G, Holt GT, Hu A, Walpita D, Patel R, Macklin JJ, Bargmann CI, Ahrens MB, Schreiter ER, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS (2016) Sensitive red protein calcium indicators for imaging neural activity. *Elife* 5 doi: 10.7554/eLife.12727
40. Pozzan T, Rudolf R (2009) Measurements of mitochondrial calcium in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1317-1323
41. Baubet V, Le Mouellic H, Campbell AK, Lucas-Meunier E, Fossier P, Brulet P (2000) Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca²⁺ reporters at the single-cell level. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7260-7265
42. Bakayan A, Vaquero CF, Picazo F, Llopis J (2011) Red fluorescent protein-aequorin fusions as improved bioluminescent Ca²⁺ reporters in single cells and mice. *PLoS One* 6: e19520
43. Saito K, Chang YF, Horikawa K, Hatsugai N, Higuchi Y, Hashida M, Yoshida Y, Matsuda T, Arai Y, Nagai T (2012) Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging. *Nat Commun* 3: 1262
44. Grienberger C, Konnerth A (2012) Imaging calcium in neurons. *Neuron* 73: 862-885
45. Lutcke H, Margolis DJ, Helmchen F (2013) Steady or changing? Long-term monitoring of neuronal population activity. *Trends Neurosci* 36: 375-384
46. Margolis DJ, Lutcke H, Schulz K, Haiss F, Weber B, Kugler S, Hasan MT, Helmchen F (2012) Reorganization of cortical population activity imaged throughout long-term sensory deprivation. *Nat Neurosci* 15: 1539-1546
47. Pilz GA, Carta S, Stauble A, Ayaz A, Jessberger S, Helmchen F (2016) Functional Imaging of Dentate Granule Cells in the Adult Mouse Hippocampus. *J Neurosci* 36: 7407-7414
48. Kettunen P (2012) Calcium imaging in the zebrafish. *Adv Exp Med Biol* 740: 1039-1071
49. Ahrens MB, Orger MB, Robson DN, Li JM, Keller PJ (2013) Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nat Methods* 10: 413-420
50. McCombs JE, Palmer AE (2008) Measuring calcium dynamics in living cells with genetically encodable calcium indicators. *Methods* 46: 152-159
51. Palmer AE, Tsien RY (2006) Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nat Protoc* 1: 1057-1065
52. Suzuki J, Kanemaru K, Ishii K, Ohkura M, Okubo Y, Iino M (2014) Imaging intraorganellar Ca²⁺ at subcellular resolution using CEPIA. *Nat Commun* 5: 4153
53. Drago I, Pizzo P, Pozzan T (2011) After half a century mitochondrial calcium in- and efflux machineries reveal themselves. *EMBO J* 30: 4119-4125
54. Filippin L, Magalhaes PJ, Di Benedetto G, Colella M, Pozzan T (2003) Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. *J Biol Chem* 278: 39224-39234
55. Arnaudeau S, Kelley WL, Walsh JV, Jr., Demaurex N (2001) Mitochondria recycle Ca²⁺ to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions. *J Biol Chem* 276: 29430-29439
56. Rodriguez-Garcia A, Rojo-Ruiz J, Navas-Navarro P, Aulestia FJ, Gallego-Sandin S, Garcia-Sancho J, Alonso MT (2014) GAP, an aequorin-based fluorescent indicator for imaging Ca²⁺ in organelles. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 2584-2589
57. Shigetomi E, Kracun S, Sofroniew MV, Khakh BS (2010) A genetically targeted optical sensor to monitor calcium signals in astrocyte processes. *Nat Neurosci* 13: 759-766
58. Dynes JL, Amcheslavsky A, Cahalan MD (2016) Genetically targeted single-channel optical recording reveals multiple Orai1 gating states and oscillations in calcium influx. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 440-445
59. Tay LH, Dick IE, Yang W, Mank M, Griesbeck O, Yue DT (2012) Nanodomain Ca²⁺ of Ca²⁺ channels detected by a tethered genetically encoded Ca²⁺ sensor. *Nat Commun* 3: 778
60. Kwon SK, Hirabayashi Y, Polleux F (2016) Organelle-Specific Sensors for Monitoring Ca²⁺ Dynamics in Neurons. *Front Synaptic Neurosci* 8: 29
61. Bazala M, Jedrychowska J, Kuznicki J (2016) Przyżyciowe badania nad funkcjonowaniem mózgu przy użyciu mikroskopii SPIM. *Wszechświat* 117: 263-269

Microscopic imaging of calcium ions with genetically encoded calcium indicators

Kinga Gazda, Michal Bazala, Tomasz Wegierski✉

Laboratory of Neurodegeneration, International Institute of Molecular and Cell Biology, 4 Ks. Trojdena St., 02-109 Warsaw, Poland

✉e-mail: twegierski@iimcb.gov.pl

Key words: calcium; genetically encoded calcium indicators; cameleon; GCaMP; aequorin; neuron

ABSTRACT

Calcium is a second messenger that plays a key role in various cellular processes. Monitoring calcium levels is a prerequisite to their understanding. The first calcium indicators for microscopy were the luminescent protein aequorin and chemical probes. These indicators, however, have serious drawbacks, limiting their use in many types of experiments. Cloning of cDNA for the *A. victoria* GFP and creation of its first spectral variants has initiated the development of fluorescent, genetically encoded calcium indicators (GECI). They are composed of a fluorescent protein and a calcium-binding protein, usually calmodulin. The binding of calcium to the sensory domain of the indicator affects the fluorescent properties of the chromophore, which enables recording of calcium signals as fluorescent light. GECIs have many advantages and are essential for conducting long-term experiments *in vivo*. This article gives an overview of the currently available GECIs, the history of their development, applications and microscopic imaging systems.