

УДК 576.32/36:577.35

## ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ FLIM-ИНДИКАТОРОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПАРАМЕТРОВ

© 2022 г. А. В. Мамонтова<sup>а</sup>, \*, Т. Р. Симонян<sup>а</sup>, А. М. Богданов<sup>б</sup><sup>а</sup>Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия<sup>б</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

\*e-mail: sphingozin@gmail.com

Поступила в редакцию 12.04.2022 г.

После доработки 12.04.2022 г.

Принята к публикации 25.04.2022 г.

На основе флуоресцентных белков создано большое число генетически кодируемых индикаторов, позволяющих детектировать изменения различных параметров: мембранного потенциала, рН, концентраций пероксида водорода, лактата, пирувата,  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , АТФ, катионов кальция и других. Некоторые из них (например, индикаторы катионов кальция и пероксида водорода) успешно применяются многочисленными группами исследователей в экспериментах *in vivo*. Фундаментальным ограничением большинства флуоресцентных индикаторов считается их способность лишь качественно оценивать изменение исследуемого параметра в клетке. Природа этого недостатка состоит в том, что сопоставление абсолютной величины измеряемого параметра и детектируемого флуоресцентного сигнала по разным причинам затруднительно. Количественные измерения предъявляют к сигналу индикатора дополнительное требование: он не должен зависеть от технических особенностей постановки эксперимента (таких как уровень экспрессии белка, тип и мощность источника возбуждения, набор флуоресцентных фильтров и т.д.). Выполнение этого требования может быть связано с детекцией сигнала индикаторов во временном домене, где основной характеристикой сигнала служит время жизни флуоресценции. Время жизни флуоресценции — это абсолютная величина, нечувствительная к изменению интенсивности источника возбуждения, настройкам детектирования, потерям в оптическом тракте или образце, изменению концентрации флуорофора в образце, фотообесцвечиванию. Таким образом, при калибровке индикатора во временном домене конкретному значению измеряемого параметра сопоставляется конкретная величина времени жизни флуоресценции. Время разрешенный режим визуализации накладывает свои ограничения на свойства флуоресцентного ядра индикатора. Так, время жизни его флуоресценции должно изменяться пропорционально величине измеряемого параметра, что характерно не для всякого флуорофора. В представленной работе мы даем краткий обзор принципов детекции флуоресцентного сигнала генетически кодируемых индикаторов, делая акцент на актуальных подходах, связанных с анализом время разрешенных данных.

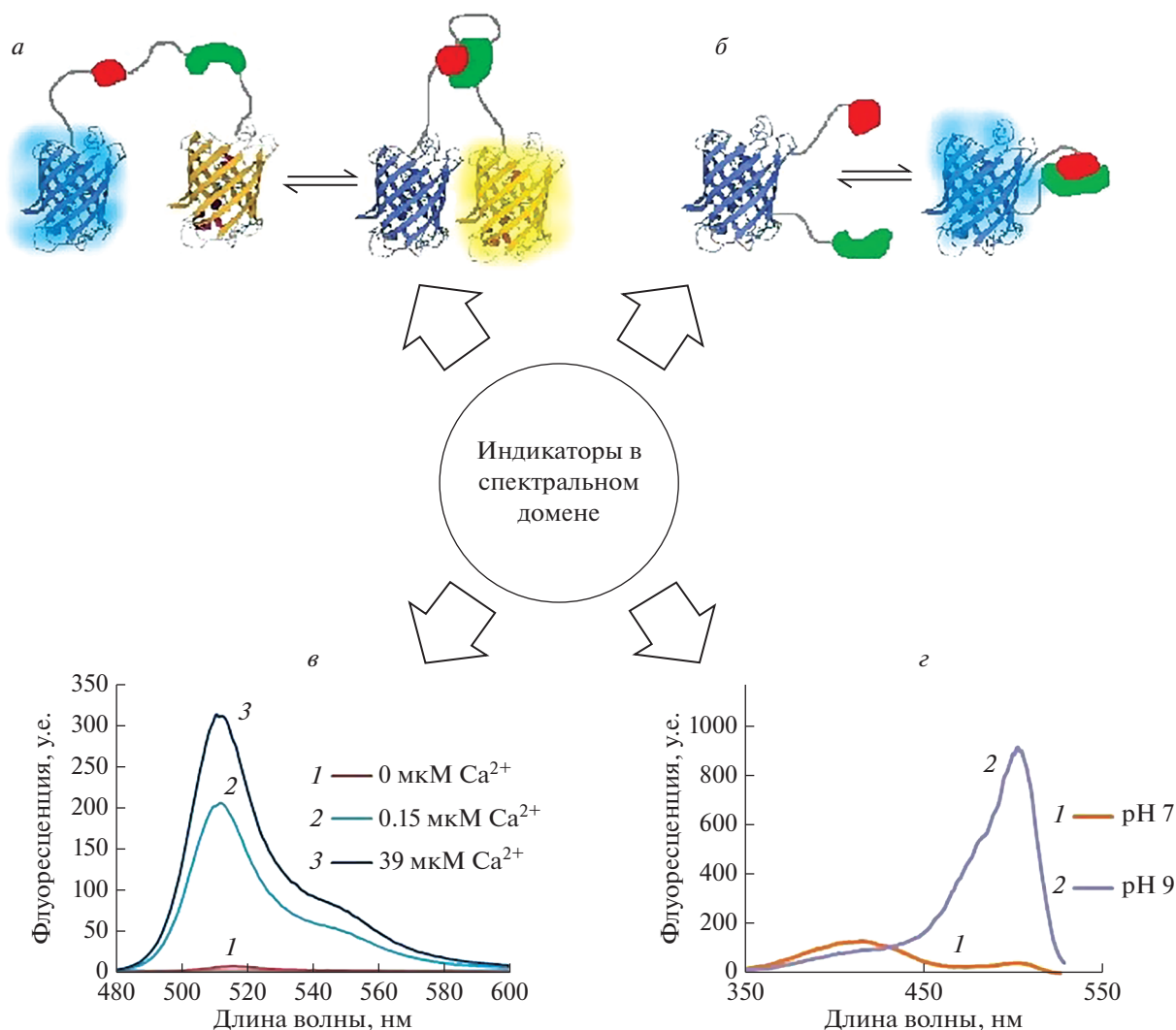
**Ключевые слова:** флуоресцентные индикаторы, время жизни флуоресценции, FLIM**DOI:** 10.31857/S0026898422050093

### ВВЕДЕНИЕ

С момента клонирования гена зеленого флуоресцентного белка, выделенного из медузы *Aequorea victoria* (avGF), в начале 1990-х флуоресцентные белки (ФБ) стали незаменимым инструментом в биологии. Среди ключевых методов флуоресцентного анализа с использованием ФБ особое место занимает визуализация молекулярных индикаторов. Детекция их сигнала может происходить как в спектральном домене (измерение интенсивности флуоресценции), так и во временном домене (измерение времени жизни флуоресценции при помощи микроскопии визуализации — Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM).

### ТИПЫ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ИНДИКАТОРОВ В СПЕКТРАЛЬНОМ ДОМЕНЕ

С точки зрения характера флуоресцентного ответа генетически кодируемые индикаторы можно разделить на группы как по типу регистрации флуоресцентного ответа, так и по архитектуре химерной молекулы (рис. 1). По типу регистрации ответа индикаторы можно условно разделить на две группы. Представители первой из них — так называемые интенсивметрические индикаторы — характеризуются простым изменением интенсивности флуоресценции в ответ на изменение исследуемого параметра. Радиометрические индикаторы,



**Рис. 1.** Основные типы генетически кодируемых флуоресцентных индикаторов. Вверху показаны варианты молекулярного дизайна на основе FRET (*a*) и циркулярно пермутированного флуоресцентного белка (*б*). Красным и зеленым показаны два взаимодействующих друг с другом исследуемых белка. Внизу показаны варианты регистрации флуоресцентного сигнала индикаторов. Пример флуоресцентного ответа интенсимоетрического индикатора кальция: показано изменение спектра эмиссии флуоресценции индикатора в ответ на изменение концентрации кальция (*в*). Пример флуоресцентного ответа радиометрического индикатора pH: показаны спектры возбуждения флуоресценции при различных значениях pH (*г*).

составляющие вторую группу, обладают более сложной характеристикой ответа: например, изменением соотношения амплитуд пиков возбуждения флуоресценции на разных длинах волн. Индикаторы обеих групп имеют похожую молекулярную организацию: флуоресцентный белок (рис. 1б) или FRET-пара (рис. 1а) соединен с чувствительным доменом, претерпевающим значительные конформационные сдвиги в ответ на специфическую стимуляцию. Примечательно, что в качестве флуоресцентного ядра вместо обычных ФБ могут применяться конформационно лабильные циркулярно пермутированные ФБ. Такие белки сохраняют типичную для ФБ третичную структуру β-бочки, но обладают измененной то-

пологией полипептидной цепи. Оригинальные N- и C-концы пермутанта соединены коротким пептидным линкером, а новые концы расположены на “боку” бочки, рядом с хромофором. Такая манипуляция позволяет снизить стабильность аминокислотного окружения хромофора по сравнению с таковой для интактного ФБ.

На сегодняшний день имеются как интенсимоетрические, так и радиометрические флуоресцентные индикаторы с удачным набором практических характеристик [1].

Однако даже наиболее продвинутые варианты флуоресцентных индикаторов пригодны лишь для регистрации относительного изменения изу-

чаемого параметра. Принципиально новые возможности в применении этих молекулярных инструментов мы связываем с количественной детекцией аналита, которая, в свою очередь, могла бы осуществляться при анализе флуоресцентного сигнала во временном домене вместо спектрального.

### ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ИНДИКАТОРЫ ДЛЯ ВРЕМЯРАЗРЕШЕННОЙ МИКРОСКОПИИ

За последние десятилетия микроскопия времени жизни флуоресценции совершила качественный технологический скачок. Так, фирма “Becker & Hickl GmbH” (Германия), один из лидеров по разработке и производству устройств для время-разрешенной микроскопии, выпустила на рынок десятки новых приборов и соответствующих программных решений (<https://www.beckerhickl.com/>). Важно, что при этом уровень цен на такое оборудование неуклонно снижается, поэтому время-разрешенная микроскопия становится доступной широкому кругу лабораторий. Растет и число публикаций биомедицинской тематики, в материалах которых описано поведение флуорофоров во временном домене. Так, поисковая выдача базы данных PubMed по запросу “fluorescence lifetime” составляет более 7000 статей, опубликованных за последние 10 лет.

В микроскопии визуализации времени жизни флуоресценции, FLIM, кинетика наносекундного распада электронного возбужденного состояния хромофоров, характеризующаяся временем жизни флуоресценции ( $\tau$ ), отображается пространственно с помощью микроскопа, оборудованного детектором, способным к высокочастотной модуляции, или скоррелированным во времени счетчиком фотонов. Преимущество измерения времени жизни флуоресценции хромофоров состоит в том, что этот параметр напрямую зависит от реакции в возбужденном состоянии, но не зависит от концентрации хромофора и длины оптического пути – условий, которые трудно контролировать внутри клетки [2]. Таким образом, характер затухания флуоресценции флуорофора в конкретной физико-химической среде можно считать внутренним свойством, слабо зависящим от инструментального аспекта измерения [2], что облегчает и делает целесообразным его количественный анализ.

На сегодняшний день существует относительно немного индикаторов с регистрацией сигнала во временном домене. Так, созданы флуоресцентные FLIM-индикаторы на основе органических красителей для измерения pH [3] и концентрации катионов натрия [4] в клетке, мембранного потенциала [5]. На основе квантовых точек [6] создана система для измерения внутриклеточного pH. Интересен подход с использованием в качестве индикатора эндогенного FAD, время жизни флуоресценции которого, как было показано,

зависит от pH [7]. Генетически кодируемые индикаторы с детекцией сигнала во временном домене пока немногочисленны. Так, описано измерение концентрации кальция при помощи варианта индикатора GCaMP на основе голубого флуоресцентного белка Turquoise 2 с динамическим диапазоном ответа 1.5 нс [8]. Исследовано поведение нескольких индикаторов мембранного потенциала на основе флуоресцентных белков (ASAP1, CAESR и ArcLight) во временном домене [9]. Также создан целый ряд индикаторов для измерения внутриклеточного pH [10–15]. Например, описана pH-чувствительность голубого белка ECFP [10], ряда мутантов avGFP [11, 12] и мутанта красного белка mKeima [13] во временном домене. Интересен и индикатор pH-Lemon на основе FRET-пары mTurquoise2 и EYFP [14]. Отдельно следует отметить pH-индикаторы SypHer3s и SypHerExtra, подходящие как для измерения pH в цитоплазме (SypHer3s), так и во внеклеточном примембранном пространстве (SypHerExtra) [15].

За редкими исключениями [3, 10] эксперименты во временном домене из перечисленных выше работ сводились к регистрации относительных изменений целевого параметра на основе измерения времени жизни флуоресценции без оценки его абсолютной величины. Следует также отметить, что в своем большинстве FLIM-индикаторы на основе флуоресцентных белков [8–10, 12–14] первоначально предназначались для использования в спектральном домене, поэтому в условиях время-разрешенной визуализации показывают сравнительно узкий динамический диапазон флуоресцентного ответа, не превышающий 1.5 нс (а чаще – сотни пикосекунд [9, 12, 13]), что существенно затрудняет количественное определение исследуемого параметра. Для сравнения, индикаторы на основе квантовых точек характеризуются динамическим диапазоном до 7 нс [6]. Важным фактором, определяющим возможности рационального дизайна FLIM-индикаторов, считается установление и изучение молекулярных детерминант чувствительности времени жизни флуоресценции к внешним физико-химическим воздействиям. В случае генетически кодируемых индикаторов определяющее значение в частности может иметь идентификация и/или получение вариантов белков, характеризующихся переменной конформационной стабильностью хромофора в возбужденном электронном состоянии [2].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание генетически кодируемых индикаторов для измерения ключевых внутриклеточных параметров с регистрацией сигнала во временном домене и возможностью количественного сопоставления флуоресцентного ответа с абсолютной величиной измеряемого параметра – актуальная

экспериментальная задача. Ее решение существенно расширяет функциональные возможности флуоресцентной визуализации в биологических системах и открывает новые горизонты для исследователей физиологии и биохимии живой клетки. С нашей точки зрения, прогресс в области количественного флуоресцентного анализа живых систем будет определяться в равной степени новыми технологическими решениями для времяразрешенной микроскопии и успехами в расшифровке структурно-химических детерминант времени жизни флуоресценции соответствующих флуорофоров.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований — грантом 19-34-60019 (руководитель А.В.М.).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Все авторы внесли равный вклад в написание статьи и заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sanford L., Palmer A. (2017) Recent advances in development of genetically encoded fluorescent sensors. *Methods Enzymol.* **589**, 1–49.
- Berezin M.Y., Achilefu S. (2010) Fluorescence lifetime measurements and biological imaging. *Chem. Rev.* **110**, 2641–2684.
- Lin H.-J., Herman P., Lakowicz J.R. (2003) Fluorescence lifetime-resolved pH imaging of living cells. *Cytometry.* **52A**, 77–89.
- Meyer J., Untiet V., Fahlke C., Gensch T., Rose C.R. (2019) Quantitative determination of cellular [Na<sup>+</sup>] by fluorescence lifetime imaging with CoroNaGreen. *J. Gen. Physiol.* **151**, 1319–1331.
- Lazzari-Dean J.R., Gest A.M., Miller E.W. (2019) Optical estimation of absolute membrane potential using fluorescence lifetime imaging. *eLife.* **8**, e44522.
- Orte A., Alvarez-Pez J.M., Ruedas-Rama M.J. (2013) Fluorescence lifetime imaging microscopy for the detection of intracellular pH with quantum dot nanosensors. *ACS Nano.* **7**, 6387–6395.
- Islam Md., Honma M., Nakabayashi T., Kinjo M., Ohta N. (2013) pH dependence of the fluorescence lifetime of FAD in solution and in cells. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 1952–1963.
- van der Linden F.H., Mahlandt E.K., Arts J.J.G., Beumer J., Puschhof J., de Man S.M.A., Chertkova A.O., Ponsioen B., Clevers H., van Buul J.D., Postma M., Gadella T.W.J., Jr., Goedhart J. (2021) A turquoise fluorescence lifetime-based biosensor for quantitative imaging of intracellular calcium. *Nat. Commun.* **12**, 7159.
- Brinks D., Klein A.J., Cohen A.E. (2015) Two-photon lifetime imaging of voltage indicating proteins as a probe of absolute membrane voltage. *Biophys. J.* **109**, 914–921.
- Poëa-Guyon S., Pasquier H., Mérola F., Morel N., Erard M. (2013) The enhanced cyan fluorescent protein: a sensitive pH sensor for fluorescence lifetime imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 3983–3987.
- Battisti A., Digman M.A., Gratton E., Storti B., Beltram F., Bizzarri R. (2012) Intracellular pH measurements made simple by fluorescent protein probes and the phasor approach to fluorescence lifetime imaging. *Chem. Commun.* **48**, 5127.
- Schmitt F.-J., Thaa B., Junghans C., Vitali M., Veit M., Friedrich T. (2014) eGFP-pHsens as a highly sensitive fluorophore for cellular pH determination by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Biochim. Biophys. Acta.* **9**, 1581–1593.
- Tantama M., Hung Y.P., Yellen G. (2011) Imaging intracellular pH in live cells with a genetically encoded red fluorescent protein sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10034–10037.
- Burgstaller S., Bischof H., Gensch T., Stryeck S., Gottschalk B., Ramadani-Muja J., Eroglu E., Rost R., Balfanz S., Baumann A., Waldeck-Weiermair M., Hay J.C., Madl T., Graier W.F., Malli R. (2019) pH-lemon, a fluorescent protein-based pH reporter for acidic compartments. *ACS Sens.* **4**, 883–891.
- Goryashchenko A.S., Pakhomov A.A., Ryabova A.V., Romanishkin I.D., Maksimov E.G., Orsa A.N., Serova O.V., Mozhaev A.A., Maksimova M.A., Martynov V.I., Petrenko A.G., Deyev I.E. (2021) FLIM-based intracellular and extracellular pH measurements using genetically encoded pH sensor. *Biosensors.* **11**, 340.

## PROSPECTS OF GENETICALLY ENCODED FLIM INDICATORS FOR THE QUANTITATIVE ASSESSMENT OF INTRACELLULAR PARAMETERS

A. V. Mamontova<sup>1</sup>, \*, T. R. Simonyan<sup>1</sup>, and A. M. Bogdanov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 121205 Russia

<sup>2</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

\*e-mail: sphingozin@gmail.com

A significant number of genetically encoded indicators based on fluorescent proteins have been created that allow detecting changes in various parameters: membrane potential shift, pH, concentrations of hydrogen peroxide, lactate, pyruvate, NAD<sup>+</sup>/NADH, ATP, calcium cations, etc. Some of them (for example, indicators of calcium cations and hydrogen peroxide) are successfully used by numerous groups of researchers in

experiments *in vivo*. The fundamental limitation of most fluorescent indicators is their ability to only qualitatively assess the change in the parameter of interest in the cell. The nature of this limitation is that it is difficult to compare the absolute value of the measured parameter and the detected fluorescent signal for various reasons. Quantitative measurements impose an additional requirement on the indicator signal: it should not depend on the technical features of the experiment (such as the level of protein expression, the type and power of the excitation source, a set of fluorescent filters, etc.). The fulfillment of this requirement may be associated with the detection of the indicator signal in the time domain, where the main characteristic of the signal is the fluorescence lifetime. The fluorescence lifetime is an absolute value, insensitive to changes in the intensity of the excitation source, detection settings, losses in the optical path or sample, changes in the concentration of the fluorophore in the sample, photobleaching. Thus, when calibrating an indicator in the time domain, a specific value of the fluorescence lifetime is associated with a specific value of the measured parameter. The time-resolved imaging mode imposes its own limitations on the properties of the indicator's fluorescent core. Thus, the lifetime of its fluorescence should change in proportion to the value of the measured parameter, which is not a characteristic of any fluorophore. In this work, we make a brief review of the detection principles of the genetically encoded indicators' fluorescent signal, focusing on current approaches related to the analysis of time-resolved data.

**Keywords:** fluorescent indicators, fluorescence lifetime, FLIM