

TOMASZ WĘGIERSKI

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej
Ks. Trojdena 4, 02-109 Warszawa
E-mail: twegierski@iimcb.gov.pl

MIKROSKOPOWE METODY REJESTRACJI WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH ODPOWIEDZI WAPNIOWYCH

WPROWADZENIE

Jony wapnia (Ca^{2+}) pełnią bardzo ważną funkcję w różnorodnych procesach komórkowych takich jak przekazywanie sygnałów, transkrypcja, wydzielanie, przewodnictwo nerwowe czy apoptoza (CLAPHAM 2007). W przeciwieństwie do pozostałych wtórnych przekazywaczy, których ilość w komórce regulowana jest przez syntezę i rozkład, stężenie jonów wapnia w cytozolu ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) jest efektem kontrolowanego wypływu z komórkowych magazynów wapniowych lub napływu ze środowiska zewnętrznego. Efekt sygnałów wapniowych jest ściśle zależny od ich umiejscowienia w czasie i przestrzeni, a także od obecności odpowiednich białek efektorowych. Z kolei niekontrolowany, nadmierny wzrost stężenia jonów wapnia w cytozolu może doprowadzić do śmierci komórki. Do dogłębnego poznania procesów regulowanych przez Ca^{2+} nieodzowne było

opracowanie metod pomiarów $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Choć istniejące metody analityczne (atomowa spektrometria absorpcyjna) umożliwiają określenie ilości całkowitego wapnia w tkance, a biochemiczne metody radioizotopowe przy użyciu $^{45}\text{Ca}^{2+}$ określenie jego inkorporacji, nie nadają się one do rejestracji dynamicznych sygnałów wapniowych w komórce (TSIEN 1999). Stało się to możliwe dopiero wraz z rozwojem technik mikroskopii świetlnej ukierunkowanych na pomiary wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia i odpowiedzi wapniowych. W niniejszej pracy przeglądowej omówione zostaną zagadnienia związane z niezbędnym wyposażeniem mikroskopowym i obecnie stosowanymi sondami wapniowymi, jak również omówione zostaną najważniejsze kierunki badań, w których mikroskopowe pomiary $[\text{Ca}^{2+}]_i$ odgrywają kluczową rolę.

HOMEOSTAZA WAPNIOWA

Stężenie wolnych jonów Ca^{2+} w komórkach eukariotycznych wynosi ok. 100 nM. Znacznie wyższe stężenie (ok. 400 μM) wykrywane jest w retikulum endoplazmatycznym (ER), które pełni funkcję głównych komórkowych magazynów wapniowych. Z kolei stężenie Ca^{2+} na zewnątrz komórki utrzymuje się w granicach 1–2 mM, czyli cztery rzędy

wielkości więcej niż w cytozolu (CLAPHAM 2007). Utrzymanie tak znacznego gradientu stężeń jonów wapnia zapewniane jest przez błonowe pompy wapniowe, które nieustannie wypompowują Ca^{2+} z cytozolu przy wykorzystaniu energii zmagazynowanej w ATP. W błonie komórkowej jest to PMCA (ang. plasma membrane calcium ATPase), a w bło-

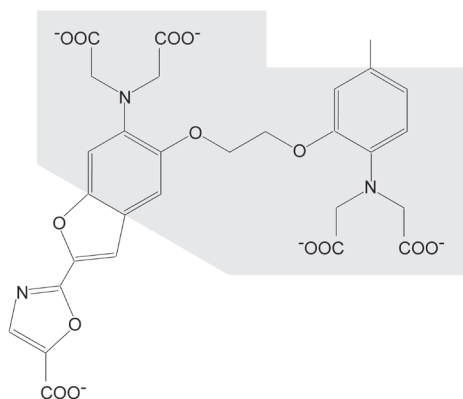
nie ER – SERCA (ang. sarcoendoplasmic reticular calcium ATPase). W usuwaniu jonów wapnia dużą rolę, zwłaszcza w neuronach, odgrywa wymiennik sodowo-wapniowy, wykorzystując przy tym potencjał błonowy zgromadzony przez pompę sodowo-potasową. Jak widać, komórka przeznacza znaczne zasoby energii na utrzymanie niskiego spoczynkowego $[Ca^{2+}]_i$. Przypuszcza się, że pierwotną tego przyczyną było zapobieganie wytrącaniu się fosforanu wapnia, a dopiero w toku ewolucji gradient Ca^{2+} zaczął być wykorzystywany w przekazywaniu sygnałów (CLAPHAM 2007). Do kontrolowanego napływu jonów wapnia przez błonę komórkową służą kanały wapniowe. Pod względem pełnionej funkcji, można wśród nich wyróżnić kilka klas. Są wśród nich kanały bramkowane napięciem, odgrywające kluczową rolę w komórkach pobudliwych, kanały regulowane przez magazyny wapniowe (określane jako kanały SOCE; ang. store-operated calcium entry), jak również kanały przepuszczalne dla Ca^{2+} zależne od ligandów, jak np. neuronalne receptory NMDA czy wiele kanałów z rodziny TRP (ang. transient receptor potential). W błonie ER wyróżnia się dwa główne typy regulowanych kanałów przepuszczalnych dla Ca^{2+} : receptory IP_3 oraz receptory rianodynowe (RyR). Te pierwsze ulegają aktywacji po związaniu cząsteczki IP_3 wyprodukowanej na błonie komórkowej w odpowiedzi na bodziec zewnętrzny, natomiast receptory rianodynowe regulowane są przez lokalne stężenie jonów wapnia i są kluczowym ogniwem pozytywnego sprzężenia zwrotnego, w którym napływ Ca^{2+} do komórki stymuluje wyrzut Ca^{2+} z magazynów wewnątrzkomórkowych. Ostatnim elementem homeostazy wapniowej są białka buforujące Ca^{2+} w cytozolu, zapobiegające niekontrolowanemu wzrostowi $[Ca^{2+}]_i$ oraz przedłużające odpowiedź wapniową. W białkach tych znaleźć można domeny wiążące Ca^{2+} , najczęściej jest to domena określana w języku angielskim jako EF-hand. Funkcje buforujące pełnią też organelle, zwłaszcza mitochondria. Od dawna było wiadomo, że mitochondria mogą aktywnie transportować Ca^{2+} z cytozolu, wykorzystując elektroche-

miczny gradient na wewnętrznej błonie mitochondrialnej, wytworzony przez łańcuch oddechowy. Jednak dopiero stosunkowo niedawno udało się zidentyfikować białko odpowiedzialne za ten proces (PATRON i współaut. 2013). Co więcej, mitochondria zwykle lokalizują się w bezpośrednim sąsiedztwie ER, ułatwiając przepływ Ca^{2+} do ich wnętrza po aktywacji receptorów IP_3 (DE BRITO i SCORRANO 2010). Białko odpowiedzialne za fizyczne połączenie tych dwóch organelli również zostało niedawno zidentyfikowane (DE BRITO i SCORRANO 2008). Niewątpliwie, bardzo dużo zasobów komórkowych przeznaczonych jest na utrzymanie właściwej homeostazy wapniowej. Jest ona niezbędna do prawidłowego przebiegu procesów kontrolowanych przez Ca^{2+} , a jej zachwianie może doprowadzić do uruchomienia mechanizmów apoptozy i śmierci komórki. Komórka w odpowiedzi na bodziec zewnętrzny, na przykład związanie liganda przez receptor na błonie plazmatycznej, może zareagować odpowiednim sygnałem wapniowym, którego lokalizacja i czas trwania są kluczowe dla jego właściwej interpretacji (CLAPHAM 2007). Sygnały wapniowe mogą przybierać dość skomplikowaną postać, na przykład oscylacji lub fal wapniowych rozchodzących się w obrębie komórki. Odpowiedź komórki zależy od aktywacji konkretnych białek efektorowych regulowanych przez Ca^{2+} , wśród których wyróżnić można enzymy takie jak kinazy, proteazy czy fosfatazy. Część z nich wiąże Ca^{2+} bezpośrednio, inne natomiast pośrednio, poprzez wyspecjalizowane w tym białka, jak np. kalmodulinę. Możliwość rejestracji sygnałów wapniowych, ich wielkości i czasu trwania, jest niezbędna dla poznania procesów komórkowych regulowanych przez Ca^{2+} oraz identyfikacji i charakterystyki białek zaangażowanych w homeostazę wapniową. Obecnie, metodą najczęściej stosowaną w tym celu przez badaczy jest mikroskopia fluorescencyjna. Do badanych komórek wprowadzona zostaje odpowiednia sonda wapniowa, której właściwości fluorescencyjne zależą od ilości związanej przez nią Ca^{2+} , co z kolei odzwierciedla $[Ca^{2+}]_i$ w badanej komórce.

MIKROSKOP FLUORESCENCYJNY DO REJESTRACJI WEWNĄTRZKOMÓRKOWEGO STĘŻENIA JONÓW WAPNIA

Zdecydowana większość sond wapniowych to cząsteczki fluorescencyjne. Takie cząsteczki po pochłonięciu fotonu, ulegają

wzbudzeniu, a następnie emitują część zaabsorbowanej energii w postaci światła o długości fali zawsze większej niż światło wzbudzenia.



Ryc. 1. Wzór chemiczny sondy wapniowej fura-2.

Część sondy pochodząca od chelatora wapnia, BAPTA, zaznaczona jest na szarym tle. W często stosowanej wersji fura-2/AM, ujemny ładunek grup karboksylowych zneutralizowany jest przez estry acetoksymetylowe (AM), co gwarantuje przechodzenie sondy przez błony komórkowe.

dzenia. Fluorescencja jest zjawiskiem bardzo szybkim; czas połowicznego zaniku mierzony jest w nanosekundach, w przeciwieństwie do fosforescencji, w której światło emitowane jest przez minuty, a nawet godziny. Do pomiarów $[Ca^{2+}]$ *in vitro* wystarczającym urządzeniem jest spektrofluorometr kuwetyowy. W badaniach przesiewowych, na komórkach z sondami wapniowymi, często wykorzystywany jest fluorescencyjny czytnik szalek wielodołkowych. Jednak do precyzyjnych pomiarów wewnątrzkomórkowego $[Ca^{2+}]$ najlepszym rozwiązaniem jest mikroskop fluorescencyjny, ponieważ umożliwia on obrazowanie i analizę pojedynczych komórek, podczas gdy wyżej wymienione urządzenia odczytują jedynie średnią wartość fluorescencji dla badanej próbki. Najczęściej stosowany jest odwrócony mikroskop fluorescencyjny szerokiego pola z oświetleniem episkopowym (PALMER i TSIEN 2006). W przypadku obrazowania komórek w hodowli, sekcjonowanie optyczne w osi z, oferowane przez mikroskopy konfokalne, jest zwykle zbędne, ponieważ analiza najczęściej sprowadza się do uśrednienia sygnału pochodzącego z całej komórki. Niemniej jednak, mikroskopy konfokalne także są z powodzeniem używane do pomiarów $[Ca^{2+}]_i$, a w przypadku obrazowania tkanek możliwość odcięcia niepożądanego sygnału spoza płaszczyzny ogniskowania może być kluczowa dla powodzenia eksperymentu (HASDEMIR i współaut. 2006). W takich sytuacjach jeszcze większą korzyść

oferuje mikroskop dwufotonowy, który jest niezbędnym, choć bardzo kosztownym, narzędziem do obrazowania komórek głębiej położonych w tkance i jest często wykorzystywany w badaniach *in vivo* na myszach i innych organizmach.

Jak w każdym badaniu z użyciem fluorescencji, mikroskop powinien być wyposażony w odpowiednie zestawy filtrów, umożliwiające ograniczenie światła wzbudzenia (pochodzącego tradycyjnie z rtęciowej lub ksenonowej lampy łukowej, albo z coraz częściej stosowanych lamp metalohalogenkowych i LED) do odpowiedniego zakresu długości fal, jak również do zbierania światła fluorescencji i jego odseparowania od światła wzbudzenia. Szczególne wymagania niosą ze sobą sondy ratiometryczne (patrz niżej), dla których należy wyposażyć mikroskop w urządzenie do szybkiej zmiany filtrów wzbudzenia i/lub filtrów emisyjnych (w zależności od typu sondy). Alternatywą dla tego pierwszego jest monochromator, który daje możliwość płynnej i szybkiej zmiany zakresu światła wzbudzenia. Szczególnie istotny jest także wybór kamery zbierającej obrazy komórek. Na rynku jest wiele różnych kamer, stosowanych w badaniach naukowych, opartych zarówno na technologii CCD, jak i coraz częściej CMOS, różniących się wydajnością kwantową detektorów, poziomem szumów, rozpiętością tonalną, szybkością czy rozdzielczością matrycy. Przy pomiarach $[Ca^{2+}]_i$, wielkość (w pikselach) uzyskiwanych obrazów ma zwykle drugorzędne znaczenie, znacznie istotniejsze są szybkość kamery i czułość matrycy (rozumiana jako zdolność do detekcji niewielkiej ilości fotonów ponad poziom szumu). Chociaż konstrukcja mikroskopu fluorescencyjnego zasadniczo nie ulega obecnie większym zmianom (za wyjątkiem pewnych innowacyjnych rozwiązań oraz mikroskopów do specjalistycznych zastosowań, jak badania wysokoprzepustowe), to jednak postęp technologiczny umożliwia wytwarzanie coraz doskonalszych komponentów mikroskopu, takich jak obiektywy o wysokiej aperturze i niewielkim poziomie aberacji optycznych, filtry o coraz większej transmisji światła, coraz lepsze kamery, nie wspominając o komputerach sterujących wszystkimi komponentami współczesnego mikroskopu i umożliwiającymi obróbkę danych. Wszystko to zapewnia uzyskiwanie wysokiej jakości obrazów, nawet w czasie rzeczywistym

(30 klatek na sekundę), co ma szczególnie istotne znaczenie dla obrazowania szybko zachodzących sygnałów wapniowych.

Przy omawianiu zestawu mikroskopowego do pomiarów $[Ca^{2+}]_i$, należy wspomnieć o dodatkowym wyposażeniu mikroskopów, bardzo przydatnym do przyżyciowego obrazowania komórek, a mianowicie inkubatorach lub specjalnych nakładkach na stoliki mikroskopowe, zapewniających kontrolę temperatury i atmosfery. Eksperymenty często wymagają podawania różnych związków chemicznych bądź zmiany czynników fizycznych (np. temperatury), wywołujących lub modulujących odpowiedź wapniową. Zdaniem autora, najlepszym sposobem na kontrolowaną zmianę warunków doświadczenia jest perfuzja. Komórki umieszcza się na szkiełku mikroskopowym w specjalnej

komorze do obrazowania, przez którą przepływa roztwór fizjologiczny, napędzany pompą strzykawkową lub grawitacyjnie. Perfuzja umożliwia wielokrotne podawanie i odpłukiwanie związków chemicznych w ramach jednego eksperymentu, bez ryzyka poruszenia preparatu, zwykle towarzyszącemu próbom ich podawania za pomocą pipety.

Na rynku oferowane są także mikroskopowe systemy do badań wysokoprzepustowych, w których obrazowane są komórki rosnące w szalkach wielodołkowych. Podawanie związków chemicznych do komórek i obrazowanie są w pełni zautomatyzowane. Systemy takie doskonale nadają się do badań przesiewowych na komórkach z sondą wapniową, mających na celu identyfikację poszukiwanych białek lub związków chemicznych o pożądanym działaniu farmakologicznym.

DZIAŁANIE I CHARAKTERYSTYKA SOND WAPNIOWYCH

Działanie wapniowych sond fluorescencyjnych polega na związaniu jonów wapnia i emisji fluorescencji o intensywności zależnej od ilości związanego Ca^{2+} (TSIEN 1999). Po wprowadzeniu do komórki, sondy umożliwiają oznaczenie poziomu wolnych jonów wapnia w cytozolu bądź poszczególnych organellach. Chociaż sondy bezpośrednio nie dają informacji o stężeniu jonów wapnia, jednostki sygnału fluorescencji można zazwyczaj przeliczyć na absolutne wartości stężenia po przeprowadzeniu kalibracji. Polega ona na zmierzeniu fluorescencji w warunkach zarówno wysycenia sondy Ca^{2+} , jak również zerowego $[Ca^{2+}]$ w komórce (osiągane poprzez całkowitą chelację Ca^{2+}) na koniec eksperymentu (PALMER i TSIEN 2006). Przy znanej stałej dysocjacji sondy dla Ca^{2+} (K_d), możliwe jest wtedy obliczenie stężenia jonów wapnia w molach/litr w trakcie zarejestrowanego pomiaru.

Obecnie dostępnych jest wiele sond wapniowych, różniących się właściwościami. Nie ma sondy idealnej, każda ma swoje zalety i wady, i w trakcie planowania eksperymentu należy zastanowić się, która sonda będzie najwłaściwsza. Jakie więc można wymienić pożądane cechy? Część z nich będzie taka sama jak dla wszystkich barwników fluorescencyjnych używanych do badań przyżyciowych komórek. Pozostałe będą specyficzne dla sond wapniowych. Być może najważniejszą cechą jest jasność. W przeciwieństwie do obrazowania w świetle przechodzącym, w mikroskopii

fluorescencyjnej każdy zebrany foton „jest na wagę złota”, stąd stawiane są bardzo duże wymagania co do barwników fluorescencyjnych (pożądany jest wysoki współczynnik absorpcji i wydajność kwantowa) oraz mikroskopowej aparatury (pożądana jest wysoka transmisja elementów optycznych i wysoka wydajność kwantowa detektorów, takich jak kamery). Właściwe obrazowanie przyżyciowe komórek wyznakowanych markerami fluorescencyjnymi zawsze polega na znalezieniu odpowiedniego kompromisu pomiędzy intensywnością oświetlenia, szybkością zbierania obrazów i ich jakością (mierzona jako stosunek sygnału do szumu). Zwiększenie intensywności oświetlenia prowadzi do lepszych jakościowo obrazów i/lub większej rozdzielczości czasowej (więcej obrazów w jednostce czasu), ale to pociąga za sobą niepożądane zjawiska fototoksyczności i wyświecania barwnika fluorescencyjnego. Ponieważ jasność sond wapniowych zależy od $[Ca^{2+}]$, warunki obrazowania muszą być tak dobrane, aby zapewnić akceptowalną jakość obrazu zarówno dla minimalnego, jak i maksymalnego mierzonego $[Ca^{2+}]$. Jasność sond wapniowych ma jeszcze jedno istotne znaczenie. Ponieważ wiążą one Ca^{2+} , siłą rzeczy zawsze działają jak bufor wapniowy i tym samym ingerują w homeostazę wapniową (HASDEMIR i współaut. 2006). Sondy o dużej jasności mogą być używane w mniejszym stężeniu by osiągnąć odpowiednią jakość obrazów i tym samym będą mniej zaburzać badany proces. Kolejną istotną cechą barwników fluorescencyjnych

cyjnych, która już została wspomniana, jest odporność na wyświecanie (HASDEMIR i współaut. 2006). Wyświecanie polega na nieodwracalnej utracie właściwości fluorescencyjnych cząsteczki w wyniku intensywnej iluminacji, i bardzo niekorzystnie wpływa na możliwy czas trwania obrazowania, a także komplikuje interpretację wyników, ponieważ często trudno odróżnić osłabienie sygnału fluorescencji z powodu zmiany $[Ca^{2+}]$ od osłabienia sygnału w wyniku wyświecania. Jest jednak pewna kategoria sond wapniowych, która umożliwia rejestrację zmian $[Ca^{2+}]$, zasadniczo niewrażliwą na zmiany sygnału spowodowane wyświecaniem czy zmianą płaszczyzny ogniskowania w trakcie prowadzenia eksperymentu. Są to tak zwane sondy ratiometryczne. Takie sondy charakteryzują się odmienną odpowiedzią na zmieniającą się $[Ca^{2+}]$ w zależności od długości fali światła iluminacji bądź emisji. W przypadku ratiometrycznego wzbudzenia, stosuje się naprzemiennie naświetlanie dwiema różnymi długościami fali, z których jedna daje wzrost intensywności fluorescencji przy rosnącym stężeniu jonów wapnia, a druga – przy malejącym. W przypadku ratiometrycznych sond emisyjnych, stosuje się jedną długość fali wzbudzenia, natomiast fluorescencję rejestruje się naprzemiennie dla dwóch różnych długości fali, przy których sonda cechuje się przeciwnym kierunkiem zmiany intensywności fluorescencji na zmianę $[Ca^{2+}]$. Uzyskane w ten sposób intensywności fluorescencji dzieli się jedna przez drugą (stąd nazwa „ratiometryczne”; ang. ratio – stosunek). W przypadku rzeczywistej zmiany stężenia jonów wapnia w układzie eksperymentalnym, licznik i mianownik zmieniają wartość w odwrotnym kierunku, i iloraz ulegnie zmianie. Natomiast na skutek spadku sygnału w wyniku wyświecania bądź utraty właściwej płaszczyzny ogniskowania, licznik i mianownik ulegną zmniejszeniu i nie wpłyną na ratiometryczny wynik. Jest to niewątpliwie zaleta, i nic dziwnego, że sondy ratiometryczne są często preferowane przez badaczy nad zwykłymi sondami, cechującymi się prostą zależnością intensywności fluorescencji od stężenia jonów wapnia. Co także istotne, odczyty z sond ratiometrycznych są łatwiejsze do skalibrowania, czyli do przekształcenia na absolutne wartości stężenia. Sondy ratiometryczne mają jednak swoje wady. Ratiometryczne sondy wzbudzenia wymagają użycia urządzeń do szybkiej zmiany filtrów wzbudzenia lub monochromatora. Sondy emisyjne wymagają szybkiego zmieniacza filtrów emisyjnych, zastosowania dwóch kamer z układem rozdziału światła bądź mikroskopu

konfokalnego z dwoma detektorami (a najlepiej z detektorem spektralnym). Poza tym zastosowanie sond ratiometrycznych, zwłaszcza tych opartych na dwufalowym wzbudzeniu, często wyklucza szybkie obrazowanie w czasie rzeczywistym, ponieważ jeden punkt czasowy wymaga zarejestrowania dwóch obrazów, a czas poświęcony na zmianę układu optycznego pomiędzy obrazami dodatkowo zmniejsza rozdzielczość czasową.

Specyficzne cechy sond to zakres dynamiki i kinetyka (PALMER i TSIEN 2006). Zakres dynamiki jest definiowany jako stosunek intensywności fluorescencji sondy przy maksymalnym wysyceniu Ca^{2+} (F_{max}) do intensywności fluorescencji przy zerowym $[Ca^{2+}]$ (F_{min}). W przypadku sond ratiometrycznych stosuje się odpowiednio wyliczone stosunki intensywności fluorescencji (R_{max} i R_{min}). Preferowane są sondy o dużym zakresie dynamiki, ponieważ umożliwiają one zarejestrowanie nawet niewielkich zmian stężenia jonów wapnia, które mogą zostać przeoczone w przypadku użycia sond o niewielkiej dynamice. Kinetyka z kolei zależy od wartości stałej szybkości wiązania Ca^{2+} (k_{ON}) i stałej szybkości dysocjacji (k_{OFF}). Sondy o dużej kinetyce nadają się do rejestracji szybkich zmian $[Ca^{2+}]$, np. oscylacji wapniowych. W przypadku użycia sond o słabej kinetyce, oscylacje mogą zostać zarejestrowane jako pojedyncza odpowiedź. Natomiast znajomość stałej dysocjacji w równowadze (K_d), definiwanej jako iloraz k_{OFF} i k_{ON} , jest kluczowa w doborze sondy do odpowiedniej lokalizacji wewnątrzkomórkowej. Sondy o niskim K_d są odpowiednie do rejestracji $[Ca^{2+}]$ w cytozolu, gdzie stężenie tego kationu jest niewielkie, podczas gdy sondy o wysokim K_d powinny być używane do oznaczania stężenia jonów wapnia w organellach.

Przy wyborze sondy należy też pamiętać o tym, że ich specyficzność wobec Ca^{2+} nie jest absolutna, a w niektórych przypadkach wręcz niewielka (TSIEN 1999). Niektóre sondy oprócz Ca^{2+} mogą wiązać inne jony, np. Mg^{2+} , z takim samym efektem na emisję światła fluorescencji. Obecność niektórych jonów, a także pH środowiska, może z kolei dość znacznie wpływać na właściwości sond wapniowych, włącznie z tłumieniem ich fluorescencji. Taka interferencja ze strony innych jonów w układzie eksperymentalnym jest rzecz jasna, zwykle niepożądana (z wyjątkiem pewnych typów eksperymentów, w których tłumienie fluorescencji sondy można z powodzeniem wykorzystać). Ponieważ

gradient jonów wapnia na błonach komórkowych jest bardzo wysoki, wpływ innych jonów na rejestrację odpowiedzi wapniowych nie jest zwykle duży, natomiast mogą

one dość znacznie zaburzyć wartość K_d sondy względem tej oznaczonej *in vitro*, i w ten sposób zafalszować obliczenia absolutnych stężeń jonów wapnia w komórce.

RODZAJE SOND WAPNIOWYCH

Sondy wapniowe najłatwiej podzielić na sondy chemiczne i genetycznie kodowane. Te pierwsze są niskocząsteczkowymi związkami syntetyzowanymi chemicznie, te drugie zwykle wprowadza się do komórek jako cDNA, które ulega ekspresji do fluorescencyjnego białka wiążącego Ca^{2+} . Stąd też genetycznie kodowane sondy będą w niniejszej pracy również określane jako białkowe sondy wapniowe. W rozwoju jednych i drugich ogromny wkład miał amerykański biochemik chińskiego pochodzenia Roger Tsien. W 2008 r. otrzymał on Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii za prace nad białkiem zielonej fluorescencji (ang. green fluorescent protein, GFP). Jednak należy pamiętać, że Tsien opublikował też wiele pionierskich prac na temat sond wapniowych, zarówno tych chemicznych, jak i genetycznie kodowanych, i trudno wyobrazić sobie postęp w tej dziedzinie bez jego zasług.

Sondy chemiczne oparte są na związku wiążącym Ca^{2+} , zwanym BAPTA, który z kolei pochodzi od bardziej znanej cząsteczki chelatującej jony wapnia, EGTA (TSIEN 1999). Choć już sama BAPTA ma pewną zdolność do fluorescencji, w sondach wapniowych połączona jest ona z odpowiednim fluoroforem. Związanie Ca^{2+} przez grupy karboksylowe BAPTA powoduje zmianę właściwości fluorescencyjnych fluoroforu. Prawdopodobnie najczęściej stosowaną sondą chemiczną jest fura-2, posiadająca grupę benzofuranową (stąd nazwa sondy), zsyntetyzowaną przez polskiego chemika Grzegorza Grynkiwicza w laboratorium Tsiena (GRYNKIEWICZ i współaut. 1985). Wzór chemiczny fura-2 jest przedstawiony na Ryc. 1. Jest to sonda ratiometryczna, którą standardowo wzbudza się naprzemiennie światłem o długości fali 340 i 380 nm, a fluorescencję rejestruje się dla długości fali powyżej 500 nm. Związanie Ca^{2+} przez fura-2 powoduje wzrost intensywności fluorescencji przy wzbudzaniu 340 nm i spadek przy wzbudzaniu 380 nm. Z kolei przy wzbudzaniu światłem o długości fali 357 nm, fura-2 jest niewrażliwa na zmiany stężenia jonów wapnia; jest to jej punkt izobestyczny. Fura-2 ma niskie K_d (140 nM) i świetnie na-

daje się do pomiarów $[Ca^{2+}]$ w cytozolu. Inna często stosowana sonda chemiczna to fluo-4 (i podobna do niej fluo-3), która zawiera fluorofor w postaci grupy ksantenowej, przypominający fluoresceinę, i która wymaga standardowego zestawu filtrów do fluoresceiny lub GFP. Fluo-4 nie jest sondą ratiometryczną, ale intensywność jej fluorescencji ulega dramatycznemu zwiększeniu po związaniu Ca^{2+} . Jej K_d , choć trochę wyższe niż w przypadku fura-2, wciąż jest odpowiednie do monitorowania $[Ca^{2+}]$ w cytozolu. Fluo-4 bardzo dobrze nadaje się do rejestracji szybkich odpowiedzi wapniowych, jak np. spontaniczne iskry wapniowe w izolowanych komórkach mięśnia serca, generowane przez receptory rianodynowe. Sonda ta jest też często stosowana w badaniach przesiewowych.

Z powodu ujemnego ładunku grup karboksylowych, błony komórkowe nie są przepuszczalne dla niskocząsteczkowych sond wapniowych, które muszą być wprowadzane do komórek za pomocą mikroinjekcji. Użycie sond w postaci estrów acetoksymetylowych (AM), dostępnych komercyjnie dla wielu z nich, umożliwia prostszy, bo oparty na zwykłej inkubacji, sposób wprowadzania ich do komórek. Estry AM przechodzą przez błony, a następnie ulegają deesteryfikacji przez natywne enzymy komórkowe i zostają uwięzione w cytozolu. W pewnych warunkach sondy wapniowe mogą akumulować się nie tylko w cytozolu, ale również w organellach. Sonda rhod-2/AM ma dodatkowo naładowany fluorofor i dużą tendencję do akumulacji wewnątrz mitochondriów, stąd jej częste zastosowanie do pomiarów $[Ca^{2+}]$ w tych organellach. Długotrwała inkubacja w podwyższonej temperaturze (37°C) także sprzyja gromadzeniu się estrów sond chemicznych w organellach. Zjawisko to można wykorzystać do pomiarów $[Ca^{2+}]$ wewnątrz ER za pomocą mag-fura-2. Sonda ta spektralnie jest podobna do fura-2, ale ma dużo wyższe K_d , odpowiednie do pomiarów $[Ca^{2+}]$ w tym organellum. Dodatkowo, selektywne usunięcie błony komórkowej, bez jednoczesnego uszkodzenia błony ER, za pomocą łagodnego detergentu, np. digitoniny, umożliwia pozbycie się resztek

cytozolowej frakcji sondy mag-fura-2 i daje łatwą kontrolę nad środowiskiem zewnętrznym ER. Podanie Ca^{2+} w obecności ATP, daje wtedy możliwość zmierzenia szybkości pompowania Ca^{2+} do ER przez SERCA. Zasadniczo jednak większość sond chemicznych jest używana do pomiarów $[\text{Ca}^{2+}]$ w cytozolu, ponieważ ich specyficzna lokalizacja w wybranych organellach jest trudna do osiągnięcia.

Drugim rodzajem sond wapniowych są sondy białkowe. Pierwszą stosowaną sondą tego rodzaju jest białko akworyna, wyizolowane z meduzy *Aequorea victoria* (RIZZUTO i współaut. 1992). W przeciwieństwie do pozostałych omawianych sond w tym artykule, akworyna nie jest białkiem fluorescencyjnym, a bioluminescencyjnym. Związanie jonów wapnia przez Akworynę prowadzi do reakcji enzymatycznej i emisji niebieskiego światła. Jednak niewielka ilość emitowanych fotonów stanowiła bardzo poważną przeszkodę w szerokim zastosowaniu tej sondy. Stąd wyniknęła potrzeba rozwoju genetycznie kodowanych sond działających na innej zasadzie. Obecnie używane sondy oparte są na białku zielonej fluorescencji (GFP), wyizolowanym z tego samego organizmu co akworyna (MCCOMBS i PALMER 2008, WHITAKER 2010). Chociaż samo GFP nie wiąże jonów wapnia, metodami inżynierii genetycznej stworzono rozmaite fuzje tego białka (lub białek pokrewnych, takich jak CFP (ang. cyan fluorescent protein) lub YFP (ang. yellow fluorescent protein) z fragmentami białek wiążących Ca^{2+} : kalmoduliny (CaM) lub troponiny C, w taki sposób, aby sonda zmieniała właściwości fluorescencyjne w odpowiedzi na zmianę $[\text{Ca}^{2+}]$. Jeden typ sond białkowych, określanych jako kameleony, wykorzystuje w tym celu zjawisko rezonansowego transferu energii (FRET). Polega ono na nieradiacyjnym transferze energii z cząsteczki wzbudzonej do cząsteczki akceptorowej, pozostającej w jej bezpośredniej bliskości (zwykle w zasięgu 1–10 nm). Cząsteczka akceptorowa przechodząc następnie do stanu spoczynkowego, emituje światło. Kameleony zawierają dwa białka fluorescencyjne, najczęściej jest to para CFP i YFP (lub ich warianty), połączone kalmoduliną i peptydem M13 pochodzącym z kinazy lekkiego łańcucha miozyny (MLCK). Związanie Ca^{2+} przez kalmodulinę ułatwia jej oddziaływanie z peptydem M13, co z kolei prowadzi do zmiany konformacyjnej całej sondy, zmniejszenia odległości pomiędzy CFP i YFP, i w efekcie do transferu energii. Wzrost $[\text{Ca}^{2+}]$ powoduje więc zwiększenie

fluorescencji YFP, przy jednoczesnym spadku fluorescencji CFP. Jak łatwo z tego wnioskować, kameleony są sondami ratiometrycznymi. Pozostałe sondy białkowe składają się z pojedynczego białka fluorescencyjnego oraz peptydów wiążących Ca^{2+} . W sondach tego typu, oddziaływanie z Ca^{2+} wpływa na otoczenie fluoroforu i zmienia jego właściwości fluorescencyjne. Efektem zwykle jest wzrost intensywności fluorescencji, i tylko w nielicznych przypadkach monomeryczne sondy białkowe są ratiometryczne.

Genetycznie kodowane sondy wapniowe mają wiele zalet w porównaniu z sondami niskocząsteczkowymi. Metodami inżynierii genetycznej można dodać do nich odpowiednie peptydy sygnałowe i zapewnić wysoce specyficzną lokalizację w organellach komórkowych (WHITAKER 2010). Stąd te sondy są używane do pomiarów $[\text{Ca}^{2+}]$ w mitochondriach i ER. Częste zastosowanie znajdują w pomiarach *in vivo*, w organizmach. Ich trwałą ekspresję z genomu można uzyskać za pomocą transdukcji rekombinowanym wirusem, ewentualnie za pomocą klasycznych metod tworzenia linii transgenicznych (MCCOMBS i PALMER 2008). Co więcej, przy zastosowaniu odpowiedniego promotora, można uzyskać ich tkankowo specyficzną ekspresję. Genetycznie kodowane sondy zatem świetnie nadają się do długotrwałej rejestracji stężenia jonów wapnia w tkankach *in vivo*. Do tego typu eksperymentów sondy niskocząsteczkowe są mniej przydatne, ponieważ ich wprowadzenie do tkanek już nie jest takie proste jak do komórek w hodowli, a poza tym są aktywnie wypompowywane z komórek i ich lokalizacja wewnątrzkomórkowa jest ograniczona w czasie. Sondy białkowe są szczególnie atrakcyjne do monitorowania $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w mózgu, np. w transgenicznych organizmach modelowych dla chorób neurodegeneracyjnych. KUCHIBHOTLA i współaut. (2008) za pomocą kameleona YC3.60 stwierdzili wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w neuronach zlokalizowanych w sąsiedztwie złogów beta-amyloidu (tworów charakterystycznych dla choroby Alzheimera) u myszy. Sondy wapniowe mogą być także stosowane jako metoda rejestracji potencjałów czynnościowych w mózgu, ponieważ przebieg potencjału związany jest z napływem Ca^{2+} do neuronów przez kanały wapniowe bramkowane napięciem. Do tego celu szczególnie przydatna wydaje się być monomeryczna sonda GCaMP3, którą pomyslnie zastosowano do pomiarów aktywności neuronalnej zarówno u kręgowców, jak i

bezkęgowców (TIAN i współaut. 2009). To zastosowanie dobrze wpasowuje się w nowoczesne techniki optogenetyczne, mające na celu sterowanie przewodnictwem nerwowym w mózgu za pomocą światła lasera. Do określonych grup neuronów wprowadza się światłoczułe kanały jonowe, opsyny, pochodzące z alg lub pewnych bakterii, których stymulacja prowadzi do aktywacji bądź hamowania neuronów, w zależności od użytej opsyny (KNOPFEL i współaut. 2010). Genetycznie kodowane sondy wapniowe są więc potencjalnymi detektorami optogenetycznych manipulacji.

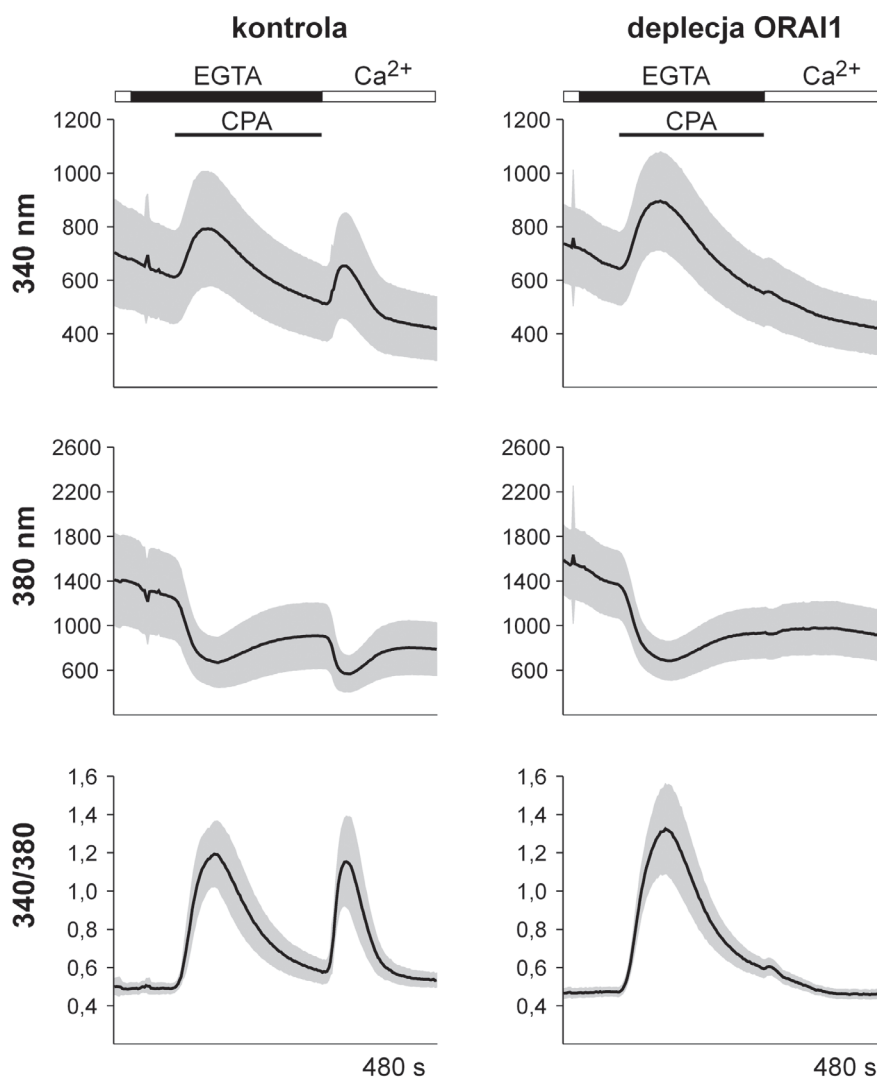
Sondy białkowe mają jednak też swoje wady. Przede wszystkim nie dorównują sondom niskocząsteczkowym pod względem kinetyki i zakresu dynamiki (MCCOMBS i PALMER 2008, WHITAKER 2010). Zakres dynamiki wspomnianej sondy GCaMP3 wyliczony został na poziomie 12, co stanowi ok. 10% zakresu jej niskocząsteczkowego odpowiednika, sondy fluo-4. Wśród ratiometrycznych

kameleonów największy zakres dynamiki uzyskano dla sondy YC3.60, wynoszący 6.6. Jeszcze niższy zakres dynamiki, bo wynoszący zaledwie 2, oferuje kameleon D1ER, często stosowany do pomiarów jonów wapnia wewnątrz ER (PALMER i współaut. 2004, MCCOMBS i PALMER 2008). Niewątpliwie poprawa tego parametru w sondach kolejnych generacji byłaby bardzo pożądana. Należy też pamiętać, że sondy genetycznie kodowane powstają wewnątrz komórki w wyniku ekspresji wprowadzonego cDNA. Ich składanie, a zwłaszcza dojrzewanie fluoroforu są zależne od czynników chemicznych i fizycznych, np. temperatury, i może przebiegać odmiennie w różnych komórkach i organellach (MCCOMBS i PALMER 2008, WHITAKER 2010). Wybór sond białkowych pod względem spektralnym jest także dość ograniczony; większość sond emituje światło zielone bądź żółte, choć ostatnio uzyskano sondy emitujące światło o większej długości fali (ZHAO i współaut. 2011).

NAPŁYW WAPNIA REGULOWANY PRZEZ MAGAZYNY WAPNIOWE

Chociaż pomiary $[Ca^{2+}]_i$ okazały się nieodzowne w zrozumieniu wielu różnorodnych procesów i szlaków sygnałowych, wyrzut Ca^{2+} z ER i następujący po nim napływ zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} do cytozolu jest prawdopodobnie najczęściej badaną odpowiedzią komórkową za pomocą sond wapniowych, takich jak fura-2. Związanie ligandu, np. histaminy lub ATP, przez odpowiedni metabotropowy receptor sprzężony z białkiem G_q (GPCR) na błonie komórkowej prowadzi do aktywacji enzymu fosfolipazy C i produkcji cząsteczki IP_3 (CLAPHAM 2007). IP_3 następnie dyfunduje do cytozolu i oddziałuje z receptorem IP_3 na błonie ER, w wyniku czego dochodzi do wyrzutu Ca^{2+} z ER do cytozolu. Od dawna wiadomo było, że ten proces nieodłącznie powiązany jest z następującym po nim napływem Ca^{2+} ze środowiska zewnątrzkomórkowego do cytozolu (PUTNEY 2009). Jednak mechanizm odpowiedzialny za tę sekwencję zdarzeń pozostawał długo nieznany. W 1986 r. James Putney sformułował hipotezę głoszącą, że napływ Ca^{2+} do komórki jest bezpośrednio zależny od spadku jego stężenia w magazynach wapniowych. Zjawisko to zostało pierwotnie nazwane pojemnościowym napływem wapnia (ang. capacitative calcium entry, CCE), choć obecnie częściej stosowane jest określenie

napływ wapnia regulowany przez magazyny wapniowe (ang. store-operated calcium entry, SOCE) (PUTNEY 2009). Funkcją SOCE jest zwiększenie $[Ca^{2+}]_i$ do poziomu niezbędnego do aktywacji szlaków sygnałowych, jak również uzupełnienie magazynów wapniowych (ER) przy wykorzystaniu aktywności pompy SERCA. Hipotezę Putneya umocniło odkrycie tapsigarginy, związku pochodzenia roślinnego, który jest inhibitorem pompy SERCA. Podanie tapsigarginy (lub podobnie działającego kwasu cyklopiazonowego) także prowadzi do napływu zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , choć w tym przypadku jest to konsekwencja pasywnego i stosunkowo wolnego wycieku Ca^{2+} z ER do cytozolu, który daje się zaobserwować po inaktywacji pompy SERCA. To pokazało, że szlak sygnałowy zależny od IP_3 nie jest bezpośrednio zaangażowany w aktywację napływu wapnia do komórki. Na to samo wskazywała też obserwacja, że napływ Ca^{2+} można eksperymentalnie opóźnić poprzez usunięcie zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} na czas aktywacji receptorów GPCR, aż do momentu jego ponownego dodania po ustaniu produkcji IP_3 . Jednak białka odpowiedzialne za SOCE pozostawały nieuchwytnie przez wiele lat, mimo że nad ich identyfikacją pracowało wiele grup badawczych. Wy-suwane po kolei kandydatury kanałów wap-



Ryc. 2. Napływ jonów wapnia regulowany przez magazyny wapniowe (SOCE) jest silnie zredukowany w komórkach z deplecją kanału wapniowego ORAI1.

Hodowane komórki HeLa szczepu dzikiego (kontrola) albo z deplecją białka ORAI1, naładowano sondą wapniową fura-2/AM (przez 20 minut w temperaturze pokojowej), a następnie obrazowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Do perfuzji użyto roztworów fizjologicznych zawierających 1,5 mM Ca^{2+} albo 2 mM EGTA, w kolejności takiej jak przedstawiono nad wykresami. Aktywność SERCA została zablokowana przez podanie 10 μM kwasu cyklopiazonowego (CPA) w roztworze z EGTA, w celu wywołania opóźnionej odpowiedzi SOCE. Wykresy przedstawiają względne jednostki fluorescencji sondy rejestrowane w czasie 480 sekund przy wzbudzeniu światłem o długości fali 340 nm (górny rząd), 380 nm (środkowy rząd), a także ratiometryczny wynik (340/380; dolny rząd). Czarna krzywa przedstawia średnią pomiaru dla wszystkich komórek w polu widzenia, a szary obszar – odchylenie standardowe dla pomiaru. Pierwszy wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jest spowodowany pasywnym wpływem Ca^{2+} z ER po zablokowaniu aktywności SERCA, a drugi (widoczny tylko dla kontroli) jest spowodowany odpowiedzią SOCE. Ich względna amplituda może się znacząco różnić, w zależności od typu badanych komórek.

niowych, głównie z rodziny TRP, jako kanały SOCE, były zwykle szybko odrzucane, ponieważ ich charakterystyka elektrofizjologiczna odbiegała od tej zademonstrowanej dla endogennego kanału SOCE. W tym przypadku pomiary napływu Ca^{2+} za pomocą sond wapniowych

ych i metody elektrofizjologiczne dawały niejednoznaczne wyniki. Dopiero w 2005 r. dwóm grupom badawczym udało się zidentyfikować pierwszy niepodważalny komponent maszynierii SOCE, a mianowicie białko STIM1 (LIU i współaut. 2005, Roos i współ-

aut. 2005). Obydwie grupy zastosowały badania przesiewowe na komórkach, w których przeprowadzono deplecję białek za pomocą metody interferencji RNA, a pomiar SOCE odbywał się we fluorescencyjnym czytniku szalek wielodołkowych z wykorzystaniem sond fluo-4 lub fura-2. STIM1 lokalizuje się w ER oraz zawiera domenę EF-hand wiążącą Ca^{2+} wewnątrz tego organelum. STIM1 nie jest kanałem wapniowym, lecz pełni kluczową funkcję jako sensor jonów wapnia w ER. Rok później udało się zidentyfikować właściwy kanał wapniowy, tj. białko ORAI1 (FESKE i współaut. 2006, VIG i współaut. 2006, ZHANG i współaut. 2006). Na podstawie wielu kolejnych prac badawczych ustalono, że obniże-

nie stężenia jonów wapnia w ER, powoduje odłączenie Ca^{2+} od białka STIM1, oligomeryzację i przemieszczenie się STIM1 w obrębie ER w pobliże błony komórkowej, gdzie następnie aktywuje kanał wapniowy ORAI1 (SOBOLOFF i współaut. 2012). Tak więc prawie dwadzieścia lat od powstania hipotezy Putneya, sukcesem zakończyły się poszukiwania kluczowych białek zaangażowanych w SOCE, przy wykorzystaniu nowoczesnych metod biologii molekularnej i komórkowej, w tym sond wapniowych. Przykład eksperymentu demonstrującego odpowiedź SOCE w komórkach Hela jest zaprezentowany na Ryc. 2.

PODSUMOWANIE

Rozwój mikroskopowych metod pomiarów wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia był kluczowy dla dogłębnego poznania procesów i szlaków sygnałowych z udziałem tego ważnego wtórnego przekaźnika. Koszt podstawowego mikroskopowego systemu obrazowania zdatnego do tego typu badań jest relatywnie niewielki i obecnie wiele laboratoriów dysponuje odpowiednią aparaturą. Co więcej, rejestracja i analiza komórkowych odpowiedzi wapniowych w hodowanych komórkach za pomocą niskocząsteczkowych sond wapniowych jest nieskomplikowana, a metodologia może być szybko przyswojona przez nowych adeptów. W ostatnich latach, stosując niskocząsteczkowe sondy wapniowe, udało się zidentyfikować dwa kluczowe białka odpowiedzialne za napływ Ca^{2+} regulowany przez magazyny wap-

niowe, a mianowicie STIM1 i ORAI1. Z kolei intensywny rozwój genetycznie kodowanych sond wapniowych, jaki ma miejsce ostatnio, umożliwia rejestrację $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w komórkach *in vivo*, zarówno w bezkręgowcach, jak i kręgowcach. Pomiar $[\text{Ca}^{2+}]_i$ w żywych organizmach mają niewątpliwą przewagę nad pomiarami w hodowanych komórkach; umożliwiają śledzenie odpowiedzi wapniowych w komórkach w ich naturalnym środowisku. To oczywiście daje szansę na znalezienie odpowiedzi na wiele ważnych pytań naukowych. Co jest szczególnie atrakcyjne, genetycznie kodowane sondy wapniowe mogą być z powodzeniem stosowane jako reportery aktywności neuronalnej w mózgu. Obok aktywatorów optogenetycznych, stanowią więc ważne narzędzie w badaniach nad przewodnictwem i sterowaniem układu nerwowego.

MIKROSKOPOWE METODY REJESTRACJI WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH ODPOWIEDZI WAPNIOWYCH

Streszczenie

Jony wapnia to wtórny przekaźnik sygnałów odgrywający ważną rolę w różnorodnych procesach wewnątrz komórki, takich jak przekaźnictwo sygnałów, transkrypcja, wydzielanie, przewodnictwo nerwowe czy apoptoza. Mikroskopia fluorescencyjna przy wykorzystaniu specyficznych sond wapniowych jest metodą niezbędną dla ich pełnego zrozumienia. Umożliwia precyzyjne i szybkie (nawet w czasie rzeczywistym) śledzenie zmian stężenia jonów wapnia w pojedynczych komórkach w odpowiedzi na zewnętrzne bodźce. Niniejszy artykuł przeglądowy ma na celu zapoznanie czytelnika z podstawowymi mechanizmami komórkowej homeostazy wapniowej,

a także ze stosowaną w ich badaniach metodologią. Omówione są najważniejsze cechy mikroskopowych systemów obrazowania używanych do rejestracji stężenia jonów wapnia. W dalszej części przedstawione są rodzaje oraz zalety i ograniczenia obecnie stosowanych sond wapniowych, w kontekście konkretnych typów realizowanych badań naukowych. Przyszły kierunek tych badań został wyznaczony i umożliwiony przez intensywnie rozwijane genetycznie kodowane sondy wapniowe, dobrze dostosowane do długotrwałego monitorowania odpowiedzi wapniowych *in vivo* w modelowych organizmach badawczych, takich jak myszy.

MICROSCOPIC METHODS FOR RECORDING OF INTRACELLULAR CALCIUM RESPONSES

Summary

Calcium ion is an important second messenger molecule for many various processes inside the cell, such as signalling, transcription, secretion, neurotransmission and apoptosis. Fluorescence microscopy with the use of calcium sensors is an indispensable method for our complete understanding of those processes. It enables accurate and fast (even in real-time) recording of changes in calcium concentration in individual cells in response to extracellular stimuli. This review article aims at getting the reader familiar with the basics of calcium homeosta-

sis and the methodology to investigate it. Presented are the most important features of imaging systems used to monitor calcium levels. Subsequently, various types of as well as advantages and limitations of modern calcium sensors are discussed, in the context of current lines of scientific investigations. The future directions of research have been set and enabled by the intensively developed genetically-encoded calcium sensors, well suited for long-term monitoring of calcium responses *in vivo* in model organisms, such as mice.

LITERATURA

- CLAPHAM D. E., 2007. *Calcium signaling*. Cell 131, 1047-1058.
- DE BRITO O. M., SCORRANO L., 2008. *Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria*. Nature 456, 605-610.
- DE BRITO O. M., SCORRANO L., 2010. *An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship*. EMBO J. 29, 2715-2723.
- FESKE S., GWACK Y., PRAKRIYA M., SRIKANTH S., PUPPEL S. H., TANASA B., HOGAN P. G., LEWIS R. S., DALY M., RAO A., 2006. *A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function*. Nature 441, 179-185.
- GRYNKIEWICZ G., POENIE M., TSIEN R. Y., 1985. *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties*. J. Biol. Chem. 260, 3440-3450.
- HASDEMIR B., BURGOYNE R., TEPIKIN A., 2006. *Imaging calcium and calcium-binding proteins*. [W:] *Cell Imaging*. STEPHENS D. (red.). Scion Publishing Limited, Bloxham, 143-164.
- KNOPFEL T., LIN M. Z., LEVSKAYA A., TIAN L., LIN J. Y., BOYDEN E. S., 2010. *Toward the second generation of optogenetic tools*. J. Neurosci. 30, 14998-15004.
- KUCHIBHOTLA K. V., GOLDMAN S. T., LATTARULO C. R., WU H. Y., HYMAN B. T., BACSKAI B. J., 2008. *Abeta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks*. Neuron 59, 214-225.
- LIU J., KIM M. L., HEO W. D., JONES J. T., MYERS J. W., FERRELL J. E., JR., MEYER T., 2005. *STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx*. Curr. Biol. 15, 1235-1241.
- MCCOMBS J. E., PALMER A. E., 2008. *Measuring calcium dynamics in living cells with genetically encodable calcium indicators*. Methods 46, 152-159.
- PALMER A. E., JIN C., REED J. C., TSIEN R. Y., 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.
- PALMER A. E., TSIEN R. Y., 2006. *Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators*. Nat. Protoc. 1, 1057-1065.
- PATRON M., RAFFAELLO A., GRANATIERO V., TOSATTO A., MERLI G., DE STEFANI D., WRIGHT L., PALLAFACCHINA G., TERRIN A., MAMMUCARI C., RIZZUTO R., 2013. *The Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU): molecular identity and physiological roles*. J. Biol. Chem. 288, 10750-10758.
- PUTNEY J. W., 2009. *Capacitative calcium entry: from concept to molecules*. Immunol. Rev. 231, 10-22.
- RIZZUTO R., SIMPSON A. W., BRINI M., POZZAN T., 1992. *Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin*. Nature 358, 325-327.
- ROOS J., DIGREGORIO P. J., YEROMIN A. V., OHLSEN K., LIODYNO M., ZHANG S., SAFRINA O., KOZAK J. A., WAGNER S. L., CAHALAN M. D., VELICELEBI G., STAUDERMAN K. A., 2005. *STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function*. J. Cell Biol. 169, 435-445.
- SOBOLOFF J., ROTHBERG B. S., MADESH M., GILL D. L., 2012. *STIM proteins: dynamic calcium signal transducers*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 13, 549-565.
- TIAN L., HIRES S. A., MAO T., HUBER D., CHIAPPE M. E., CHALASANI S. H., PETREANU L., AKERBOOM J., MCKINNEY S. A., SCHREITER E. R., BARGMANN C. I., JAYARAMAN V., SVOBODA K., LOOGER L. L., 2009. *Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators*. Nat. Methods 6, 875-881.
- TSIEN R. Y., 1999. *Monitoring Cell Calcium*. [W:] *Calcium as a Cellular Regulator*. KLEE E. C. A. C. (red.). Oxford University Press, New York, 28-54.
- VIG M., PEINELT C., BECK A., KOOMOA D. L., RABAH D., KOBLAN-HUBERSON M., KRAFT S., TURNER H., FLEIG A., PENNER R., KINET J. P., 2006. *CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry*. Science 312, 1220-1223.
- WHITAKER M., 2010. *Genetically encoded probes for measurement of intracellular calcium*. Methods Cell Biol. 99, 153-182.
- ZHANG S. L., YEROMIN A. V., ZHANG X. H., YU Y., SAFRINA O., PENNA A., ROOS J., STAUDERMAN K. A., CAHALAN M. D., 2006. *Genome-wide RNAi screen of Ca²⁺ influx identifies genes that regulate Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 9357-9362.
- ZHAO Y., ARAKI S., WU J., TERAMOTO T., CHANG Y. F., NAKANO M., ABDELFATTAH A. S., FUJIWARA M., ISHIHARA T., NAGAI T., CAMPBELL R. E., 2011. *An expanded palette of genetically encoded Ca²⁺ indicators*. Science 333, 1888-1891.