

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623257>

Экспансионная микроскопия для визуализации кластеров белков в культивируемых клетках и тканях головного мозга

А.В. Раковская^{1*}, М.Е. Чигряй¹, Е.И. Пчицкая¹, И.Б. Безпрозванный^{1,2}¹ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Российская Федерация;² Юго-Западный медицинский центр Техасского университета, Даллас, США

АННОТАЦИЯ

Многие биологические исследования требуют получения изображений с высоким разрешением для последующего анализа клеточных органелл и молекул. Экспансионная микроскопия (ЭМ) позволяет достичь нанометрового разрешения с помощью обычного флуоресцентного микроскопа за счёт физического расширения исследуемого образца в геле в несколько раз. В данной работе при использовании ЭМ проанализированы белковые кластеры, образованные кальций-связывающим белком STIM1 (stromal interacting molecule) и проницаемыми для кальция каналами IP3R (рецептор инозитолтрифосфата). Сенсор кальция эндоплазматического ретикулума (ЭР) STIM1 перемещается к контактам ЭР с плазматической мембраной, где он образует кластеры, чтобы активировать депо-управляемый вход кальция (ДУВК) после падения концентрации кальция в ЭР [1]. Одним из преимуществ экспансионной микроскопии является то, что образец расширяется по трём осям, включая ось Z, поэтому можно обнаружить мембранные белки без помощи TIRF-микроскопии. Известно, что STIM1 взаимодействует с end-binding белком 1 (EB1), расположенным на плюс-концах микротрубочек, который регулирует ДУВК. В данной работе представлен количественный метод анализа кластеров белков на примере STIM1 и его мутантной формы STIM1-TR/NN, не связывающейся с EB-белками, с использованием метода экспансионной микроскопии.

Инозитол-1,4,5-трифосфатные рецепторы (IP3R) являются основными каналами высвобождения Ca²⁺ из ЭР в цитоплазму. Ранее было показано, что в эндотелиальных клетках IP3-рецептор аналогично белкам STIM взаимодействует с белком EB через SxIP аминокислотный мотив, и это регулирует его кластеризацию и кальциевую сигнализацию [2]. В гиппокампальных нейронах IP3-рецептор 1 типа также формирует кластеры, необходимые для эффективного выхода кальция через канал в ответ на стимул. Для изучения роли изоформы 1 рецептора IP3 в функционировании головного мозга были проанализированы кластеры IP3R у мышей дикого типа и мышей 5xFAD, моделирующих болезнь Альцгеймера (БА), поскольку известно, что этот рецептор характеризуется повышенной активностью во время этого патологического состояния [3].

Для анализа кластеризации белков STIM1 клетки HEK293T с конфлюэнтностью 50–70% трансфицировались плазмидами mCherry-STIM1 и mCherry-STIM1-TR/NN. Клетки фиксировались и окрашивались первичными антителами к белку mCherry и вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором Alexa Fluor 594, для усиления интенсивности флуоресценции. На следующем этапе клетки подвергались процедуре изотропного расширения в геле с помощью экспансионной микроскопии. Метод экспансионной микроскопии проводился так, как описано в [4]. Образец расширялся путём двукратного добавления бидистиллированной воды на 20 минут.

Для анализа кластеризации белков IP3R были получены фронтальные срезы толщиной 50 мкм мозга двух групп мышей: контрольной и 5xFAD (мышинная модель болезни Альцгеймера). После иммуногистохимического окрашивания срезов мозга первичными антителами IP3R1 и вторичными Alexa Fluor 488 был применён протокол экспансионной микроскопии [4]. Для обработки изображений использовалось программное обеспечение ImageJ и Icy. При помощи ImageJ была определена яркость каждого нейрона, и в зависимости от данного параметра было сформировано три группы нейронов с тремя типами уровней интенсивности флуоресценции. В зависимости от уровня использовался определённый порог бинаризации в Adaptive3DThreshold. Подход деления на группы позволил нивелировать влияние на анализ различий в интенсивность флуоресценции, наблюдаемой вследствие различия в степени экспрессии белка IP3R.

Анализ результатов продемонстрировал, в соответствии с литературными данными, что при разрыве связи с тубулиновыми микротрубочками STIM1 больше агрегирует при опустошении кальциевого депо по сравнению с его нормальным вариантом STIM1 [5]. В результате оценки морфометрических параметров кластеров IP3R при сравне-

Рукопись получена: 15.05.2023

Рукопись одобрена: 26.11.2023

Опубликована online: 20.01.2024

нии трансгенных мышей с контрольной группой получены следующие результаты: в группе с наибольшей интенсивностью нейронов и группе с наибольшей и средней интенсивностью нейронов наблюдалось увеличение размера и количество кластеров белка IP3R у мышей линии 5xFAD. Для валидации полученных результатов применялся метод вестерн-блот, полученные данные также продемонстрировали гиперэкспрессию белка IP3R у мышей линии 5xFAD. Таким образом, впервые показано, что кластеры белка IP3R больше агрегируют на мышинной модели БА, что согласуется с литературными данными о высокой активности IP3R при БА [3].

Ключевые слова: экспансионная микроскопия; InsP3R; STIM1; гиппокамп; эндоплазматический ретикулум.

Как цитировать:

Раковская А.В., Чиграй М.Е., Пчицкая Е.И., Безпрозванный И.Б. Экспансионная микроскопия для визуализации кластеров белков в культивируемых клетках и тканях головного мозга // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 4. С. 536–539. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623257>

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Поддержано РФФ № 21-74-00028 (ЕП).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liou J., Fivaz M., Inoue T., Meyer T. Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca^{2+} store depletion // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007. Vol. 104, N 22. P. 9301–9306. doi: 10.1073/pnas.0702866104
2. Geyer M., Huang F., Sun Y., et al. Microtubule-Associated Protein EB3 Regulates IP3 Receptor Clustering and Ca^{2+} Signaling in Endothelial Cells // *Cell Reports*. 2015. Vol. 12, N 1. P. 79–89. doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.001
3. Egorova P.A., Bezprozvanny I.B. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and neurodegenerative disorders // *FEBS Journal*. 2018. Vol. 285, N 19. P. 3547–3565. doi: 10.1111/febs.14366
4. Wassie A.T., Zhao Y., Boyden E.S. Expansion microscopy: principles and uses in biological research // *Nature Methods*. 2019. Vol. 16, N 1. P. 33–41. doi: 10.1038/s41592-018-0219-4
5. Chang C.L., Chen Y.J., Quintanilla C.G., et al. EB1 binding restricts STIM1 translocation to ER-PM junctions and regulates store-operated Ca^{2+} entry // *Journal of Cell Biology*. 2018. Vol. 217, N 6. P. 2047–2058. doi: 10.1083/jcb.201711151

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

* А.В. Раковская; адрес: Российская Федерация, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 29;
e-mail: rakovskaya.av@edu.spbstu.ru

DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623257>

Expansion microscopy for visualization of protein clusters in cultured cells and brain tissues

A.V. Rakovskaya^{1*}, M.E. Chigriai¹, E.I. Pchitskaya¹, I.B. Bezprozvanny^{1,2}¹ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russian Federation;² UT Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, USA

ABSTRACT

Many biological studies necessitate high-resolution imaging and further analysis of cellular organelles and molecules. Expansion microscopy (ExM) enables achieving nanometer-level resolution with a standard fluorescence microscope by physically expanding the sample in the gel by multiple factors. In the present study, ExM was used to examine protein clusters of STIM1, a calcium-binding protein, and IP3R, a calcium-gated channel (inositol triphosphate receptor). The endoplasmic reticulum (ER) calcium sensor STIM1 translocates to the ER-plasma membrane junctions, forming clusters to activate store-operated calcium entry (SOCE) upon ER calcium decrease [1]. Expansion microscopy provides the advantage of expanding the sample in all three axes, including the Z-axis, enabling detection of premembrane proteins without relying on TIRF microscopy. STIM1 interacts with end-binding protein 1 (EB1) located at the plus ends of microtubules, which regulates SOCE. This study presents a quantitative approach for analyzing protein clusters using expansion microscopy. STIM1 and its non-EB-binding mutant, STIM1-TR/NN, were used as examples.

In endothelial cells, Ca²⁺ is released into the cytoplasm from the ER through the main channels of Inositol-1,4,5-triphosphate receptors (IP3R). A previous study demonstrated that these receptors interact with the EB protein through the SxIP amino acid motif, similarly to STIM proteins, regulating clustering and calcium signaling [2]. In hippocampal neurons, the type 1 IP3 receptor forms clusters required for efficient calcium release through the channel in response to stimuli. To investigate the function of IP3 receptor isoform 1 in the brain, IP3R clusters were analyzed in wild-type mice and 5xFAD mice modeling Alzheimer's disease (AD) since this receptor was observed to exhibit increased activity during this pathological condition [3]. HEK293T cells at 50–70% confluence underwent transfection using mCherry-STIM1 and mCherry-STIM1-TR/NN plasmids to assess the clustering of STIM1 proteins. Cells were fixed and stained with primary mCherry protein antibodies and secondary antibodies conjugated to the Alexa Fluor 594 fluorophore to enhance fluorescence. Next, the cells underwent isotropic expansion in the gel using expansion microscopy. The ExM method was executed following the protocol outlined by Asano et al. [4]. The sample was expanded through dual addition of sterile, distilled water for a period of 20 minutes.

To examine the clustering of IP3R proteins, we obtained frontal slices of the brains of two groups of mice: control and 5xFAD (a mouse model for Alzheimer's disease), which were 40–50 microns thick. Brain slices were immunohistochemically stained with IP3R1 primary antibody and Alexa Fluor 488 secondary antibody followed by expansion microscopy protocol [4]. The ImageJ and Icy software were used for processing images. Using ImageJ, the neurons' intensity was determined, leading to the formation of three groups with different fluorescence intensity levels. A certain binarization threshold was implemented in Adaptive3DThreshold, depending on the level. The grouping approach enabled neutralizing the effect of potential disparities in IP3R protein expression levels on the analysis of differences in fluorescence intensity.

According to the literature data, analysis of the results indicates that when the bond with tubulin microtubules is disrupted, STIM1 aggregates more when the calcium store is depleted in comparison to its standard STIM1 variant [5]. Upon evaluation of IP3R cluster morphometric parameters in transgenic mice compared to the control group, we observed an increase in the size and number of IP3R protein clusters in mice of the 5xFAD line within the groups exhibiting the highest neuronal intensity and the groups with the highest and average neuronal intensity. The Western blot method was used to validate the results and demonstrated overexpression of the IP3R protein in 5xFAD mice. This study represents the first time that IP3R protein clusters aggregate more in a mouse model of AD, which is congruent with the literature regarding high IP3R activity in AD [3].

Keywords: expansion microscopy; InsP3R; STIM1; hippocamp; endoplasmic reticulum.

To cite this article:

Rakovskaya AV, Chigriai ME, Pchitskaya EI, Bezprozvanny IB. Expansion microscopy for visualization of protein clusters in cultured cells and brain tissues. *Genes & Cells*. 2023;18(4):536–539. DOI: <https://doi.org/10.17816/gc623257>

Received: 15.05.2023

Accepted: 26.11.2023

Published online: 20.01.2024

ADDITIONAL INFORMATION

Funding sources. This study was supported by RSF, grant No. 21-74-00028 (EP).

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, and final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

1. Liou J, Fivaz M, Inoue T, Meyer T. Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca^{2+} store depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(22):9301–9306. doi: 10.1073/pnas.0702866104
2. Geyer M, Huang F, Sun Y, et al. Microtubule-Associated Protein EB3 Regulates IP3 Receptor Clustering and Ca^{2+} Signaling in Endothelial Cells. *Cell Reports*. 2015;12(1):79–89. doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.001
3. Egorova PA, Bezprozvanny IB. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and neurodegenerative disorders. *FEBS Journal*. 2018;285(19):3547–3565. doi: 10.1111/febs.14366
4. Wassie AT, Zhao Y, Boyden ES. Expansion microscopy: principles and uses in biological research. *Nature Methods*. 2019;16(1):33–41. doi: 10.1038/s41592-018-0219-4
5. Chang CL, Chen YJ, Quintanilla CG, et al. EB1 binding restricts STIM1 translocation to ER-PM junctions and regulates store-operated Ca^{2+} entry. *Journal of Cell Biology*. 2018;217(6):2047–2058. doi: 10.1083/jcb.201711151

AUTHORS' CONTACT INFO

* A.V. Rakovskaya; address: 29 Polytechnicheskaya street, 195251 Saint Petersburg, Russian Federation;
e-mail: rakovskaya.av@edu.spbstu.ru