

Dawidson Assis Gomes

Funções do cálcio nuclear e citosólico na sinalização celular

**Orientadores: Prof. Marcus Vinícius Gomez
Prof^a. Maria de Fátima Leite**

**Belo Horizonte
Minas Gerais – Brasil
2006**

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES)
- Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- NIH-RO1, NIH-R03 e NIH-PO1
- Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT)
- Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX)

Agradeço primeiramente a minha mãe, que abdicou os seus próprios sonhos para realizar os sonhos de seus filhos.

À Michele pelo amor, paciência, dedicação e também pelas inúmeras horas de discussões, é claro que científicas.

Aos meus avós Jair e Terezinha pelo exemplo de honestidade, simplicidade e responsabilidade.

À minha irmã Tatiane e meu irmão Vinicius por terem sempre me apoiado.

Aos meus primeiros orientadores Dr. Maria Aparecida Gomes e Dr. Edward Felix pelos primeiros ensinamentos, que foram fundamentais para mim até aqui.

A todos os meus amigos do Instituto de Ciências Biológicas e do Michael's Lab pelo companheirismo.

Aos meus orientadores Dr. Marcus Vinicius Gomez, Dr^a. Maria de Fátima Leite e o Dr. Michael H. Nathanson pelos ensinamentos, conselhos, confiança e acima de tudo pela amizade.

Índice

Índice

Lista de Abreviaturas	vi
Lista de Figuras e Tabelas.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
 1. Introdução	
1.1 Aspectos básicos da sinalização do Ca^{2+} intracelular	2
1.2 Sinalização de Ca^{2+} nuclear	4
1.3 Sinalização de Ca^{2+} pode ocorrer em regiões subnucleares.....	7
1.4 Ca^{2+} regula processos específicos dentro do núcleo	10
 2. Objetivos	13
 3. Materiais e Métodos	
3.1 Cultura celular e transfecção	16
3.2 Geração das construções de parvalbumina e calretinina em vetores de expressão	16
3.3 Geração dos adenovírus de parvalbumina	17

3.4 Geração das construções de InsP ₃ Sponge.....	18
3.5 Wersten Blot	19
3.6 Imunofluorescência	20
3.7 Detecção do aumento de Ca ²⁺ citosólico	20
3.8 Análise estatística.....	21
4. Resultados.....	22
5. Discussão e Conclusões.....	55
Conclusões	62
6. Referências bibliográficas	64
7. Participação em eventos e Produção Bibliográfica.....	71

Lista de Abreviaturas

Ad.....	Adenovírus
ATP.....	Adenosina trifosfato
AVP.....	Arginina vasopressina
BSA.....	Soro albumina bovina
Ca ²⁺	Cálcio
[Ca ²⁺] _i	Concentração intracelular de Ca ²⁺
CICR.....	Liberação de Ca ²⁺ induzida por Ca ²⁺
cm.....	Centímetro(s)
cm ²	Centímetro(s) quadrado(s)
CR.....	Calretinina
DAG.....	Diacilglicerol
DMEM.....	Meio mínimo essencial de Dulbecco
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
DSR.....	Proteína fluorescente de <i>Discosoma sp</i>
EGF.....	Fator de crescimento epidermal
EGTA.....	Ácido etileno glicol-bis (β-aminoetil éter) N,N,N',N'-tetraacético
EPM.....	Erro padrão da média
ERK.....	Cinase regulada por sinal extracelular
Fluo-4/AM.....	Fluo-4 aceto-metil-éster
g.....	Gravidade(s) – força
GFP.....	Proteína fluorescente verde
g/L.....	grama(s) por litro
HEPES.....	(N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfônico])
HGF.....	Fator de crescimento hepático
InsP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
InsP ₃ R.....	Receptor de inositol 1,4,5 trifosfato
K _D	Constante de dissociação
MAPK.....	Proteína cinase ativada por mitógenos

mg	Miligrama(s)
mL	Mililitro(s)
mM	Milimolar
ms	Mili segundo(s)
NES	Sinal de exclusão nuclear
NLS	Sinal de localização nuclear
µg/mL	Micrograma(s) por mililitro
µL	Microlitro(s)
µm	Micrômetro(s)
µM	Micromolar
µs	Microsegundo(s)
nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
PLC	Fosfolipase C
PKC	Proteína cinase C
PMCA	Ca ²⁺ ATPase da membrana plasmática
PV	Parvalbumina
p/v	Peso/volume
RE	Retículo endoplasmático
ROC	Canais operados por receptores
Ry	Rianodina
RyR	Receptores de rianodina
RS	Retículo sarcoplasmático
RTKs	Receptores de tirosina cinases
s	Segundo(s)
SERCA	Ca ²⁺ ATPase do retículo sarco-endoplasmá- tico
SSHT	Solução salina HEPES tamponada
u.a.	Unidades arbitrárias
UV	Ultravioleta
VOC	Canais operados por voltagem
v/v	Volume/volume
W	Watt(s)

Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismo de ativação de InsP3Rs via receptores acoplados a proteína G	3
Figura 2. Sinalização de Ca^{2+} no citoplasma e núcleo.....	6
Figura 3. O núcleo de células contém retículo endoplasmático que estoca Ca^{2+}	9
Figura 4. Ações múltiplas do Ca^{2+} nuclear	12
Figura 5. Representação esquemática e expressão da parvalbumina e calretinina fusionadas com DSR.....	24
Figura 6. Localização subcelular das construções de calretinina	25
Figura 7. Localização subcelular das construções de parvalbumina	26
Figura 8. Supressão dos sinais de Ca^{2+} em células SkHep1 por expressão de calretinina.....	30
Figura 9. Supressão dos sinais de Ca^{2+} em células SkHep1 por expressão de parvalbumina	32
Figura 10. Localização subcelular das construções de adenovírus de parvalbumina	34
Figura 11. HGF fosforila c-met em células SkHep1	35
Figura 12. HGF fosforila Erk 1.....	37
Figura 13. Ad-PV-NES bloqueia a fosforilação de Erk 1 induzida por HGF	38
Figura 14. Ad-PV-NES bloqueia a expressão de p38.....	40
Figura 15. Ad-PV-NLS bloqueia a fosforilação de CDK1	42
Figura 16. Tratamento com HGF induz translocação de c-met para o núcleo de células SkHep1	45

Figura 17. Receptor c-met transloca para o núcleo de células SkHep1	46
Figura 18. PLC γ localiza-se no núcleo de células SkHep1	48
Figura 19. Representação esquemática das construções de InsP ₃ Sponge fusionadas a mRFP	49
Figura 20. Localização subcelular das construções de InsP ₃ Sponge.....	50
Figura 21. InsP ₃ Sponge NES suprime aumento de Ca ²⁺ induzido por AVP	53
Figura 22. InsP ₃ Sponge NLS suprime aumento de Ca ²⁺ induzido por HGF	54

Lista de Tabelas

Tabela 1. Fluorescência da linha de base não é alterada em células expressando as proteínas quelantes de Ca ²⁺	31
Tabela 2. Efeito da parvalbumina e calretinina na sinalização do Ca ²⁺	33

Resumo

O cálcio (Ca^{2+}) citoplasmático e nucleoplasmático podem ser regulados independentemente. A relativa contribuição do Ca^{2+} citoplasmático e nucleoplasmático em processos biológicos tais como transcrição gênica, apoptose e proliferação celular ainda é matéria de especulação. Com a finalidade de explorar esta questão, utilizamos o aumento da expressão de parvalbumina (PV) e calretinina (CR) como ferramentas moleculares para tamponar seletivamente Ca^{2+} tanto no nucleoplasma quanto no citoplasma. Nossos dados mostram que tanto a PV quanto a CR foram eficazes em tamponar os sinais de Ca^{2+} em cada um destes compartimentos subcelulares. Para maximizar o número de células que expressam a PV, estas construções foram entregues às células SkHep1 por adenovírus (ad) permitindo assim, investigar funções celulares mediadas pelo Ca^{2+} nuclear e citosólico. A construção ad-PV-NES (Nuclear Exclusion Signal) foi eficaz no bloqueio da fosforilação da proteína Erk 1 e da expressão da proteína p38. Em contraste, a construção ad-PV-NLS (Nuclear Localization Signal) foi capaz de bloquear a fosforilação da ciclina dependente de cinase 1 (CDK1). Para estudar os mecanismos responsáveis pela geração de InsP_3 nuclear, utilizamos construções que tamponam InsP_3 seletivamente no núcleo ou no citosol, denominadas de InsP_3 Sponge NLS e NES, respectivamente. As células transfectadas com InsP_3 Sponge NLS mostraram-se eficazes em bloquear o aumento de Ca^{2+} induzido pelo fator de crescimento hepático (HGF), mas não por arginina vasopressina (AVP). Em contraste, a construção InsP_3 Sponge NES bloqueou o aumento de Ca^{2+} , induzido por AVP, mas não por HGF. Demostramos que o receptor de HGF, c-met, pode translocar para o núcleo de células SkHep1 após estimulação com HGF. Além disso, observamos que células SkHep1 possuem fosfolipase $\text{C}\gamma$ ($\text{PLC}\gamma$) no núcleo. Em conjunto, estes resultados sugerem que através de $\text{PLC}\gamma$, HGF pode gerar sinais de InsP_3 e consequentemente Ca^{2+} nuclear. Assim, sinais de Ca^{2+} no núcleo ou no citoplasma têm efeitos distintos na expressão e ativação de cinases e fatores de transcrição. Estas observações sobre o tráfego e função de c-met revelam um mecanismo pelo qual os sinais de Ca^{2+} podem ser compartimentalizados para obter efeitos celulares distintos.

Abstract

Nucleoplasmic and cytoplasmic calcium (Ca^{2+}) can be regulated independently. The relative contribution of nucleoplasmic and cytoplasmic Ca^{2+} to biological processes such as gene transcription, cell growth, apoptosis and cell cycle control remain to be fully defined. In order to address this question, we target the Ca^{2+} -binding proteins parvalbumin (PV) or calretinin (CR), to either the nucleus or cytoplasm as a molecular tool to selectively buffer either nucleoplasmic or cytoplasmic Ca^{2+} . These data showed that expression of targeted PV or CR was sufficient to buffer Ca^{2+} signals in these respective sub-cellular compartments. The PV constructs were delivered by adenovirus (ad) to explore the functions of nuclear and cytosolic Ca^{2+} . The construct ad-PV-NES (Nuclear Exclusion Signal) blocked the phosphorylation of Erk1 and expression of p38. In contrast, the construct ad-PV-NLS (Nuclear Localization Signal) blocked the phosphorylation of cyclin dependent kinase 1 (CDK1). We also investigated the mechanisms responsible for InsP_3 generation within the nucleus. In order to address this question, we employed an InsP_3 binding protein (“ InsP_3 Sponge”) as a molecular tool to selectively buffer either nucleoplasmic or cytoplasmic InsP_3 . SkHep1 cells expressing InsP_3 Sponge in the nucleus blocked the Ca^{2+} response induced by Hepatocyte Growth factor (HGF), while the Ca^{2+} response in the cells was not affected by stimulation with arginine vasopressin (AVP). In contrast, expression of InsP_3 Sponge in the cytoplasm blocked the Ca^{2+} response induced by AVP, but the Ca^{2+} response induced by HGF was not affected. In addition, stimulation with HGF induced translocation of c-met to the nucleus and led to the presence of phospholipase $\text{C}\gamma$ ($\text{PLC}\gamma$) as well within the nucleus. In summary, these results show that HGF can generate nuclear InsP_3 and Ca^{2+} signals, and that this likely results from translocation of c-met and $\text{PLC}\gamma$ to the nucleus. Since Ca^{2+} signals in the nucleus and cytoplasm have distinct effects on expression and activation of kinases and transcription factors, these observations about c-met trafficking and function reveal one mechanism by which Ca^{2+} signals can be compartmentalized to obtain these distinct cellular effects.

1. Introdução

1.1 Aspectos básicos da sinalização do Ca^{2+} intracelular

O Ca^{2+} controla grande variedade de funções celulares abrangendo respostas de curta duração como a contração muscular e a secreção, bem como respostas de longa duração tais como a transcrição, divisão e morte celular (Clapham 1995; Berridge et al. 2003). Embora não seja estabelecido como um único segundo mensageiro coordena tal diversidade de efeitos celulares, evidências sugerem que padrões espaciais de sinais de Ca^{2+} podem determinar sua especificidade (revisado por Berridge et al. 2003).

A principal organela responsável em estocar e liberar Ca^{2+} nas células é o retículo endoplasmático (RE). O RE contém canais especializados em liberar Ca^{2+} que podem ser divididos em duas famílias: os receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (InsP_3Rs) e os receptores de rianodina (RyRs). Cada uma destas famílias parece conter três diferentes isoformas. Tanto os InsP_3Rs quanto os RyRs formam grandes estruturas oligoméricas por associação de suas quatro subunidades (revisado por Berridge et al. 2003). As estruturas dos InsP_3Rs e RyR apresentam grande homologia, que é marcante especialmente nas regiões que dão origem ao poro dos canais (Mignery et al. 1989; Takeshima 1993; Shah and Sowdhamini 2001).

O RE é sensível a mensageiros intracelulares tais como: o inositol 1,4,5-trifosfato (InsP_3), o próprio íon Ca^{2+} , ADP-ribose cíclico, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAADP) (revisado por Rizzuto and Pozzan 2006), entre outros que são capazes de disparar a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares. Os InsP_3Rs requerem a presença de InsP_3 para serem estimulados (**Figura 1**), mas podem ser modulados pelo Ca^{2+} e por proteínas cinases (revisado por Leite and Nathanson 2001). Os RyRs por sua vez são ativados pelo próprio Ca^{2+} e este processo de Ca^{2+} induzindo a liberação de Ca^{2+} (CICR) pode ser desencadeado de diversas maneiras: através do acoplamento entre canais operados por receptores, canais operados por voltagem e

canais liberadores do RE, como acontece em miócitos cardíacos e nos neurônios (revisado por Berridge 2002). Entretanto, cada um destes canais liberadores de Ca^{2+} do RE tem sua característica funcional distinguível.

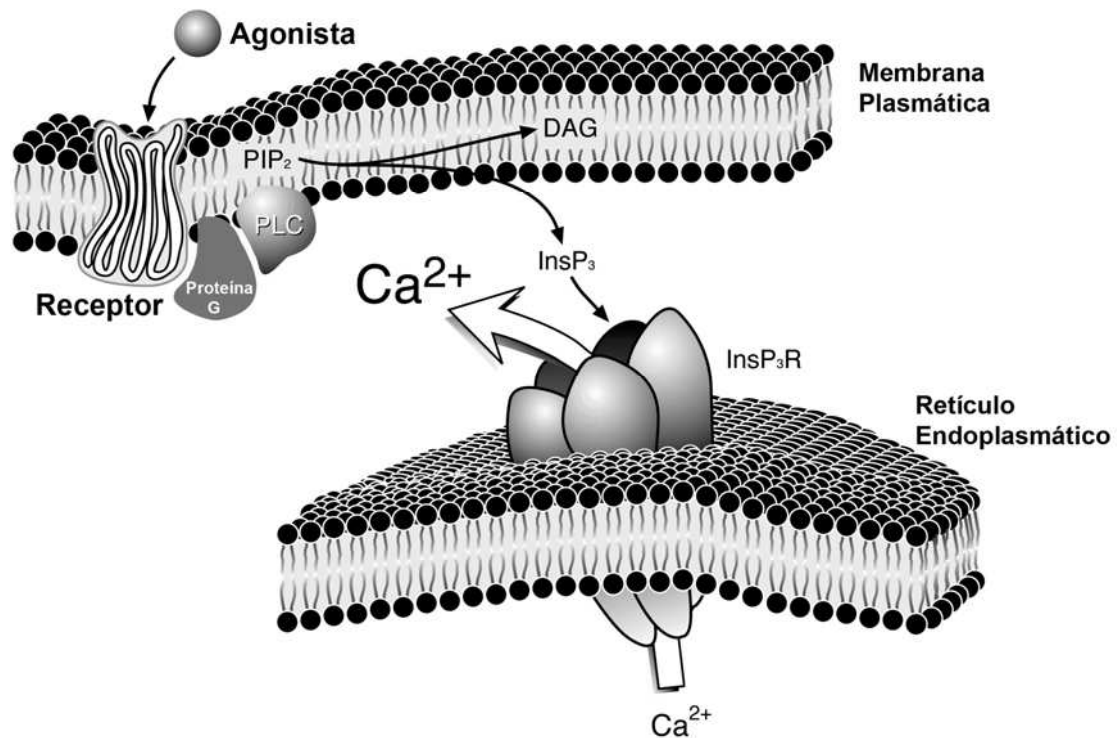


Figura 1: Mecanismo de ativação de InsP_3Rs via receptores acoplados a proteína G. Os receptores de membrana acoplados a proteína G, quando ativados por ligantes, induzem a hidrólise de fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP_2) para formar diacilglicerol (DAG) e InsP_3 , através da fosfolipase C (PLC). Os InsP_3 ligam-se aos InsP_3Rs , presentes na membrana do retículo endoplasmático, ao qual induzem a liberação de Ca^{2+} para o citosol (Leite and Nathanson 2001).

Em contraste com a intrigante variedade de mecanismos para a indução do influxo de Ca^{2+} extracelular, a extrusão do Ca^{2+} para o espaço extracelular é limitada a duas famílias de proteínas: o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e o Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática. Além disso, o Ca^{2+} intracelular pode ser removido do citoplasma através de uma variedade de bombas e transportadores organelas específicas. A recaptção do Ca^{2+} para o RE é regulada por uma família de Ca^{2+} ATPases do retículo sarcoplasmático (SERCA). A recaptção pela mitocôndria é mediada pelo Ca^{2+}

“uniporter” mitocondrial enquanto a recaptção pelo Golgi é mediada pelo transportador - Ca^{2+} ATPase do tipo P (PMR1/ATP2C1). Além de captar Ca^{2+} , a mitocôndria pode também liberá-lo através do trocador $\text{Na}^+ - \text{H}^+ / \text{Ca}^{2+}$ e em algumas circunstâncias, pelo poro de permeabilidade transitória (Nowycky and Thomas 2002).

Como descrito, existe uma enorme variedade de estoques intracelulares de Ca^{2+} que podem auxiliar na compartimentalização e na especificidade das respostas celulares controladas pelo Ca^{2+} . Os mecanismos através dos quais o Ca^{2+} pode regular diversas funções celulares continuam controversos, desse modo resolvemos estudar como o aumento de Ca^{2+} citosólico ou nuclear pode especificamente desencadear funções celulares distintas.

1.2 Sinalização de Ca^{2+} nuclear

Os padrões de sinalização de Ca^{2+} podem variar em diferentes regiões e o aumento do Ca^{2+} no núcleo tem efeitos biológicos específicos que diferem dos efeitos dos aumentos de Ca^{2+} citosólico (Hardingham et al. 1997; Hardingham et al. 1998; Carrion et al. 1999; Pusch et al. 2002; Echevarria et al. 2003; Leite et al. 2003; Thompson et al. 2003). Entretanto, os mecanismos e as vias que promovem aumentos localizados nos níveis de Ca^{2+} nuclear ainda não estão totalmente esclarecidos.

O núcleo é um compartimento funcionalmente distinto da célula. Ele é fisicamente separado do citosol por uma bicamada lipídica, nomeada de envelope nuclear (Lee et al. 1998; Perez-Terzic et al. 1996). Este envelope contém poros que permitem o transporte de moléculas e íons entre o citosol e o núcleo. Foi inicialmente proposto que a sinalização de Ca^{2+} poderia ocorrer por difusão do Ca^{2+} citosólico para o envelope nuclear (Brini et al. 1993; Allbritton et al. 1994; Hennager et al. 1995; Lipp et al. 1997). Este mecanismo explica o aumento do Ca^{2+} nuclear observado sobre certas

condições, mas isto não suporta ou exclui a idéia de regulação independente de sinais de Ca^{2+} nucleares independentes dos sinais de Ca^{2+} citosólicos.

Outra possível fonte de Ca^{2+} no núcleo é o envelope nuclear. É sabido que o lúmen do envelope nuclear é contínuo com o lúmen do RE (Bachs et al. 1992; Bustamante 1994). Tal como o RE, o envelope nuclear é capaz de estocar Ca^{2+} (Rogue et al. 1998). Observou-se que em núcleo isolado, os InsP_3Rs estão envolvidos na liberação de Ca^{2+} (Gerasimenko et al. 1995) e também em células intactas nas quais os InsP_3Rs foram bloqueados (Hennager et al. 1995). Esses dados sugerem que as atividades dependentes de Ca^{2+} nuclear podem ser reguladas de maneira independente dos estoques e sinais de Ca^{2+} citosólicos.

Os componentes envolvidos na sinalização de Ca^{2+} mediada por InsP_3Rs são encontrados não somente na membrana plasmática, mas também no envelope nuclear (Figura 2). Demonstrou-se que a membrana nuclear contém a enzima PLC, que hidrolisa PIP_2 para formar InsP_3 e diacilglicerol (DAG) (Berridge 1993; Martelli et al. 2000). Além disso, foi encontrado InsP_3Rs funcionais na membrana nuclear que está em contato com o núcleo (Koppler et al. 1993; Mak and Foskett 1994; Malviya 1994; Stehno-Bittel et al. 1995a). Estes dados sugerem que InsP_3 pode ser gerado no núcleo e mais, que InsP_3 nuclear pode levar a aumentos localizados de Ca^{2+} independentes dos aumentos dos níveis de InsP_3 no citosol (Figura 2). Deve-se salientar que alguns relatos sugerem que PIPK e PIP_2 não estão associados com estruturas da membrana nuclear, incluindo as invaginações do envelope nuclear, mas a subdomínios nucleares denominados “speckle domains” (Boronenkov et al. 1998; Osborne et al. 2001; Tabellini et al. 2004).

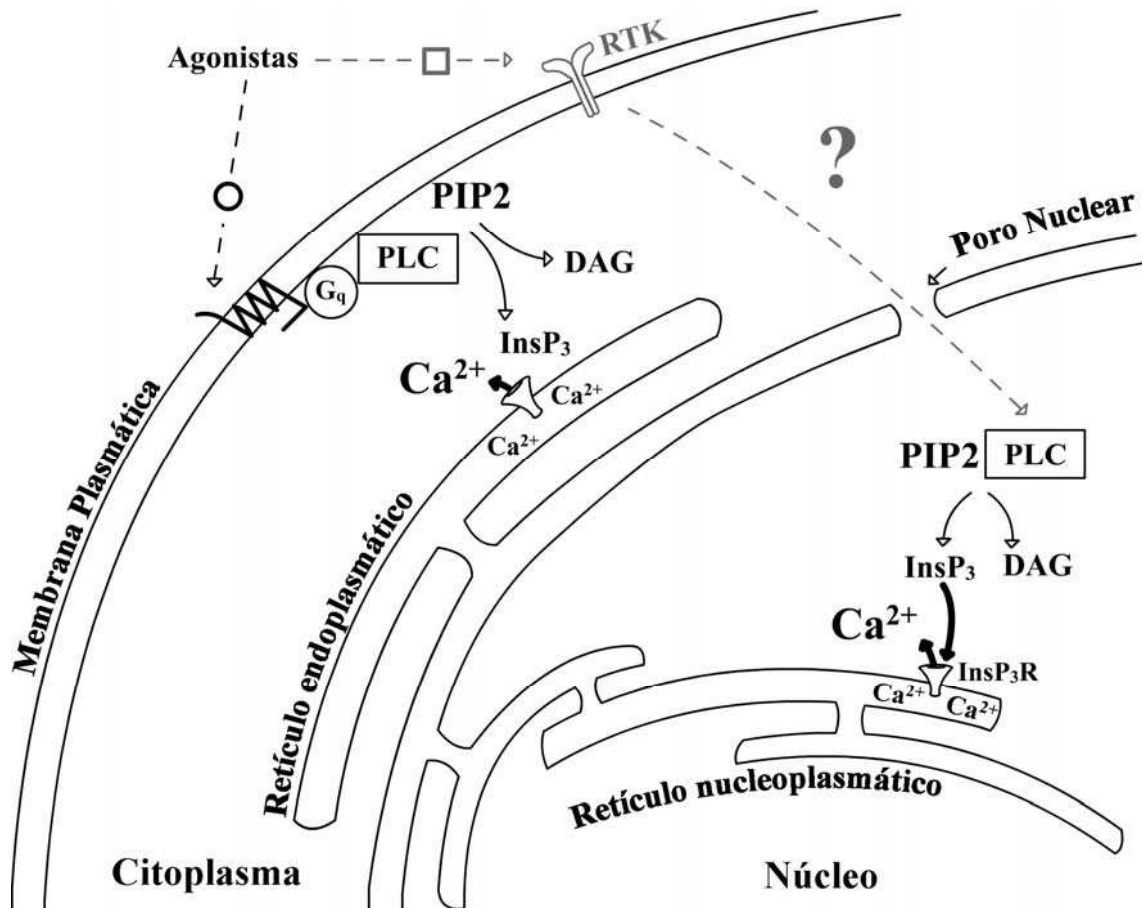


Figura 2. Sinalização de Ca^{2+} no citoplasma e núcleo. Ca^{2+} citoplasmático é elevado quando PLC hidrolisa PIP₂ para formar InsP₃, ao qual atua nos receptores de InsP₃ para liberar Ca^{2+} do retículo endoplasmático dentro do citoplasma. Diferentes isoformas de PLC podem ser ativadas por estimulação de receptores acoplados a proteína Gq ou receptores de tirosina cinases (RTKs). Isoformas nucleares de PLC hidrolisam PIP₂ para formar InsP₃ dentro do núcleo, ao qual atuam nos receptores de InsP₃ intranucleares para gerar Ca^{2+} dentro do nucleoplasma. RTKs podem ativar PLC intranucleares, embora o mecanismo não esteja completamente estabelecido.

Existem várias evidências que o InsP₃ pode liberar Ca^{2+} diretamente do envelope nuclear. Foi demonstrado que a presença de InsP₃ induz a liberação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dentro de núcleos isolados de hepatócitos (Malviya et al. 1990) e aumento do Ca^{2+} livre mesmo quando os núcleos isolados são perfundidos por quelantes de Ca^{2+} (Gerasimenko et al. 1995; Santella and Kyojuka 1997). Observou-se que a injeção direta de InsP₃ dentro do núcleo de oócitos de *Xenopus laevis* resulta em aumento do Ca^{2+} intranuclear, mesmo quando os InsP₃Rs citosólicos foram bloqueados (Hennager et al. 1995). Além disso, InsP₃Rs associados com o núcleo liberam Ca^{2+} de núcleos isolados de *Xenopus laevis*

(Stehno-Bittel et al. 1995b) e fotoliberação de “caged InsP_3 ” em núcleos isolados de oócitos de “starfish” aumenta a liberação Ca^{2+} nuclear (Santella and Kyozuka 1997). Desse modo, diversas são as evidências que InsP_3 , uma vez dentro do núcleo, pode aumentar Ca^{2+} no nucleoplasma de maneira independente de eventos citoplasmáticos.

1.3 Sinalização de Ca^{2+} pode ocorrer em regiões subnucleares

A compartimentalização de Ca^{2+} intranuclear foi inicialmente relatada utilizando uma sonda de alta afinidade ao Ca^{2+} , fluo-3/AM (Lui et al. 1998). Além disso, observou-se que o núcleo de células animais (Fricker et al. 1997) e de plantas (Collings et al. 2000) quando em interfase contém estruturas reticulares que são contíguas com o retículo endoplasmático e o envelope nuclear (Figura 3). Esta estrutura reticular foi posteriormente caracterizada e denominada de retículo nucleoplasmático (Echevarria et al. 2003). Demonstrou-se que, assim como o retículo endoplasmático, o retículo nucleoplasmático pode estocar e liberar Ca^{2+} . A relação do retículo nucleoplasmático na sinalização de Ca^{2+} foi recentemente caracterizada em células SkHep1 (Echevarria et al. 2003). As células foram marcadas com a sonda de membrana de retículo endoplasmático, ER-tracker, e posteriormente examinadas usando microscopia de dois fótons para minimizar a perda de fluorescência pela ação do laser. Uma rede de estruturas intranucleares que são contíguas com o retículo endoplasmático e o envelope nuclear foram observadas (Figura 3a e b) (Echevarria et al. 2003). A relação destas estruturas com o retículo endoplasmático foi examinada posteriormente investigando a distribuição intracelular da calreticulina, proteína de retículo endoplasmático, através de imunofluorescência. A marcação com calreticulina foi encontrada não somente no citosol, mas também no núcleo (Figura 3c). Além disso, em células SkHep1 marcadas com a sonda de baixa afinidade ao Ca^{2+} , Mag-fluo-4/AM, uma distribuição similar a da

CR e do ER-tracker foi observada (Figura 3d) (Echevarria et al. 2003), demonstrando assim que estas estruturas intranucleares estocam Ca^{2+} .

Os InsP_3Rs medeiam a sinalização de Ca^{2+} em células SkHep1 (Pusl et al. 2002) e estes receptores são encontrados ao longo do retículo endoplasmático destas células. (Echevarria et al. 2003). Demonstrou-se por fotoliberação de “caged InsP_3 ” dentro do núcleo que os InsP_3Rs intranucleares são funcionais (Echevarria et al. 2003). A fotoliberação de InsP_3 dentro do núcleo resultou em aumento gradual de Ca^{2+} neste compartimento. Investigou-se a funcionalidade dos InsP_3Rs nucleares pela estimulação das células SkHep1 com fator de crescimento de hepatócitos (HGF). Este fator de crescimento é conhecido por preferencialmente ativar sinalização de Ca^{2+} associado com a maquinaria nuclear (Clark and Brugge 1995). Observou-se que a sinalização de Ca^{2+} nuclear induzida por HGF geralmente precede aos aumentos de Ca^{2+} citosólicos (Echevarria et al. 2003). É sabido que tanto o receptor do fator de crescimento epidermal bem como o receptor do fator de crescimento de fibroblasto podem translocar para o núcleo (Reilly and Maher 2001; Lin et al. 2001). A translocação dos receptores de tirosina cinase sugere uma rota potencial pelos quais estes receptores podem seletivamente ativar as vias de sinalização nuclear.

O envelope nuclear contém todos os sistemas necessários que controlam a homeostase de Ca^{2+} no nucleoplasma. Isto inclui não somente InsP_3R e a maquinaria para produzir InsP_3 , mas também “SERCA pumps” (Gensburger et al. 2003). Uma questão intrigante é como os sinais originados da membrana plasmática induzem mudanças de Ca^{2+} no núcleo. Apesar desta pergunta não ser inteiramente sabida, alguns trabalhos mostram que receptores de tirosina cinases estão envolvidos na geração de Ca^{2+} nuclear. Foi demonstrado, que bombesina ao interagir com um receptor ligado a proteína G, causa a hidrólise de PIP_2 na membrana plasmática. Em contraste, observou-

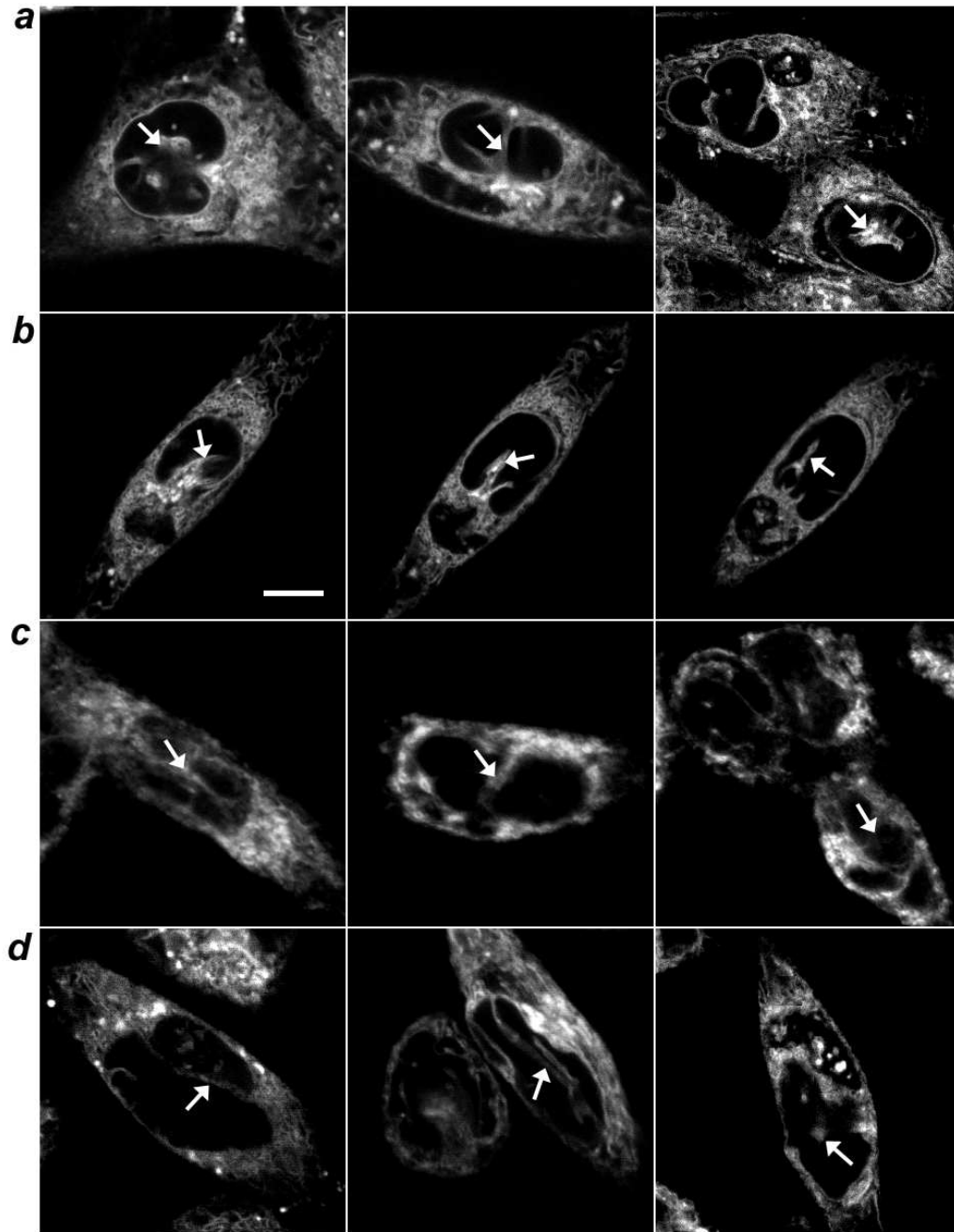


Figura 3. O núcleo de células contém um retículo endoplasmático que estoca Ca^{2+} .

(a) Diferentes campos de células SkHep1 marcadas com a sonda de membrana de retículo endoplasmático, “ER-tracker” e visualizadas por microscopia de dois fótons mostra a presença de estruturas reticulares dentro do núcleo (setas). (b) Diferentes planos focais da mesma célula mostram que uma destas estruturas reticulares atravessa o núcleo (setas). (c) Imagens de imunofluorescência de três diferentes células SkHep1 marcadas com anticorpo anti-calreticulina também mostra a presença de estruturas reticulares no núcleo (setas). (d) Diferentes células SkHep1 marcadas com a sonda de baixa afinidade ao Ca^{2+} , Mag-fluo-4/AM, e visualizadas por microscopia confocal demonstram que o retículo endoplasmático estoca Ca^{2+} (setas). Barra = 5 μm

se que o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e integrinas, que ativaram proteínas tirosina cinase, causaram a hidrólise de PIP_2 no núcleo (Divecha et al. 1991; Plevin et al. 1990). Martelli et al. (1992) também observaram que a sinalização de Ca^{2+} nuclear pode ser disparada por ativação de receptores de tirosina cinase através de peptídeos sintéticos. Em conjunto estes trabalhos mostram que receptores de tirosina cinase estão envolvidos na geração de Ca^{2+} nuclear.

1.4 Ca^{2+} regula processos específicos dentro do núcleo

A sinalização de Ca^{2+} nuclear regula diretamente importantes funções celulares tais como translocação de proteínas cinases (Echevarria et al. 2003) e transcrição gênica (Hardingham et al. 1997; Hardingham et al. 1998; Chawla et al. 1998; Pusch et al. 2002; Thompson et al. 2003) (Figura 4). Os efeitos do Ca^{2+} nuclear na translocação de proteínas cinases são distintas dos efeitos do Ca^{2+} citosólico. Isso foi demonstrado através de monitoramento da translocação de proteína cinase C gama fundida com a proteína fluorescente verde (GFP) em células na qual o “caged Ca^{2+} ” foi fotoliberado somente no núcleo ou citosol. O aumento localizado de Ca^{2+} no núcleo causou redistribuição de proteína cinase C no envelope nuclear sem afetar a distribuição da proteína cinase no citosol (Echevarria et al. 2003).

Os sinais de Ca^{2+} podem regular a expressão gênica e evidências recentes sugerem que os sinais de Ca^{2+} nuclear e citosólico afetam a expressão de genes de maneira distinta. Por exemplo, vias de sinalização ativadas por Ca^{2+} citoplasmático ativam o “serum response element” (SRE), enquanto o Ca^{2+} nuclear controla a expressão de genes através do “cAMP response element” (CRE) (Hardingham et al. 1997). Além disso, a contribuição dos sinais de Ca^{2+} nuclear e citosólico foram estudados durante estimulação de Elk1 mediada por EGF (Pusch et al. 2002). Neste

trabalho, os sinais de Ca^{2+} em ambos os compartimentos foram seletivamente bloqueados através da expressão de uma proteína quelante de Ca^{2+} , parvalbumina, no citosol ou no núcleo. Foi encontrado que a supressão do Ca^{2+} nuclear, mas não do Ca^{2+} citosólico inibiu a ativação de Elk 1 por EGF. Entretanto, supressão de sinais de Ca^{2+} nuclear não afetaram a habilidade de ERK ser fosforilada ou de translocar-se para o núcleo em resposta ao EGF (Pusl et al. 2002). Assim, propriedades espaciais dos sinais de Ca^{2+} são importantes determinantes para o tipo de resposta transcricional, fornecendo um mecanismo para a regulação diferenciada por um único segundo mensageiro (revisado por Hardingham et al. 1998).

Como exemplificado, o Ca^{2+} nuclear possui funções distintas do Ca^{2+} citosólico. Assim serão explorados neste trabalho as funções do Ca^{2+} citosólico e nuclear bem como vias intracelulares que podem contribuir para a geração do Ca^{2+} nuclear. Para responder essas questões utilizamos construções moleculares que tamponam o Ca^{2+} ou o InsP_3 seletivamente no núcleo ou no citosol. Para estes estudos utilizamos células SkHep1, que quando estimuladas com HGF ativam a sinalização de Ca^{2+} que é associada com a maquinaria nuclear (Echevarria et al. 2003).

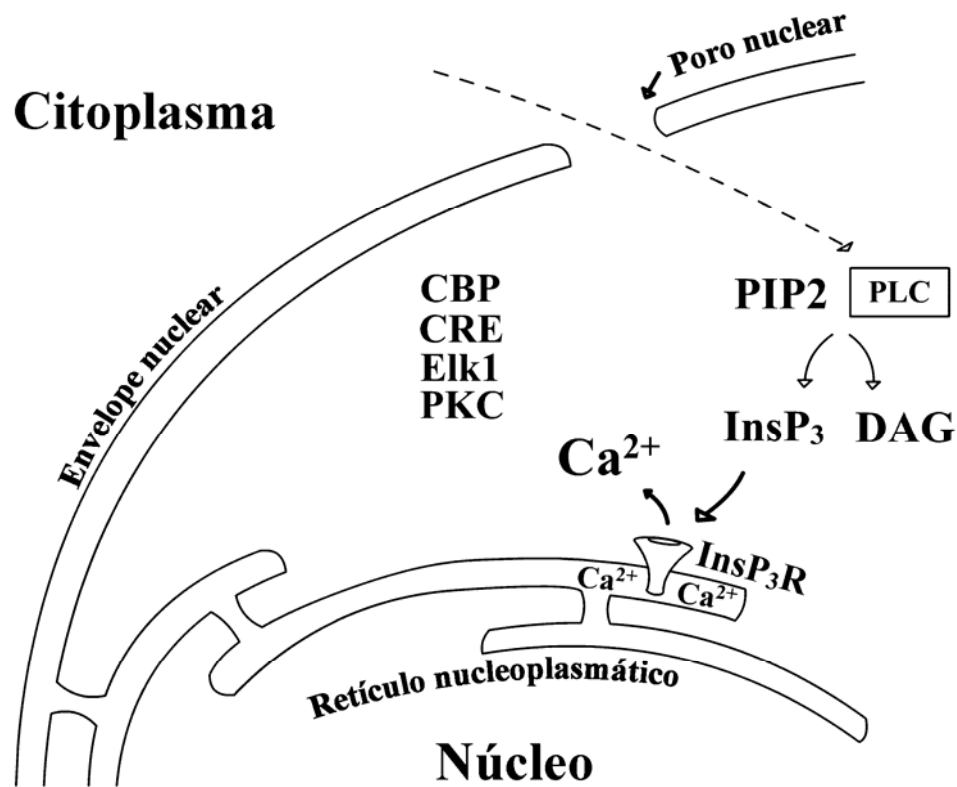


Figura 4. Ações múltiplas do Ca^{2+} nuclear. Aumento do Ca^{2+} dentro do núcleoplasma regula a atividade de vários fatores de transcrição e cinases, como na figura e descrito no texto.

2. Objetivos

Objetivo Geral

Investigar vias intracelulares que podem ser controladas especificamente por sinais de Ca^{2+} citosólico ou nuclear e identificar as vias que podem contribuir para a geração de Ca^{2+} nuclear.

Objetivos Específicos

1) Caracterizar as propriedades das construções de parvalbumina e calretinina na sinalização do Ca^{2+} citosólico e nuclear.

Para esta finalidade, as construções de parvalbumina e calretinina foram fundidas às sequências de localização nuclear (NLS) ou a sequências de exclusão nuclear (NES) e suas propriedades foram estudadas em células SkHep1.

2) Investigar funções do Ca^{2+} nuclear e citosólico.

As construções de parvalbumina entregues por adenovírus foram utilizadas para explorar a ativação de MAPKs e fatores de transcrição em células SkHep1 estimuladas com o fator de crescimento hepático (HGF).

3) Investigar a geração de InsP_3 nuclear.

Utilizamos construções que podem quelar InsP_3 tanto no núcleo quanto no citosol para investigar a geração de InsP_3 no núcleo de células SkHep1 estimuladas com HGF.

4. Materiais e Métodos

3.1 Cultura celular e transfecção

Células SkHep1 foram obtidas da American Type Culture Collection (Rockville, MD) e cultivadas em Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen), suplementado com 100 unit/ml penicilina, 0,1 mg/ml streptomicina (Invitrogen), 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), a 37°C em 5% CO₂. As células SkHep1 foram transfectadas usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

3.2 Geração das construções de parvalbumina e calretinina em vetores de expressão

As construções de PV direcionadas para o núcleo (PV-NLS-GFP) ou citosol (PV-NES-GFP) foram previamente descritas (Pusl et al. 2002). Para gerar as construções em fusão com proteína fluorescente derivada do coral *Discosoma sp* (DSR), a GFP das construções previamente publicadas foram substituídas por DSR como descrito a seguir: A sequência de DSR foi amplificada por PCR do plasmídeo pDSR2-N1 (Clontech) usando primers ao qual foram introduzidos os sites da enzima de restrição NotI na região 5' e 3'. O produto de PCR foi digerido com NotI e subclonado nos plasmídios de expressão PV-NLS-GFP e PV-NES-GFP, previamente digeridos com NotI para liberar o inserto da GFP. As construções resultantes foram nomeadas de PV-NLS-DSR e PV-NES-DSR. Construiu-se o plasmídeo controle por subclonagem do gene do DSR no plasmídeo pCMV-Myc-Cyto (Invitrogen). Cada vetor de expressão foi confirmado por análise de enzima de restrição e também por sequenciamento automático.

Os vetores de expressão de CR direcionados tanto para o núcleo quanto para o citosol foram construídos através do cDNA completo da CR de rato, o qual foi generosamente fornecido pelo Dr. Jacek Kuznicki (International Institute of Molecular and Cell Biology, Warsaw, Poland) no plasmídeo pCMV-Myc-Nuc (Invitrogen).

Subsequentemente, a região codificante do DSR derivado do plasmídio pDSR2-N1 (Clontech) foi amplificada por PCR e sub-clonada através dos sítios de NotI para produzir o plasmídio pCMV-CR-DSR-Myc-Nuc, designado como CR-NLS-DSR. O vetor de expressão da CR direcionada para o citoplasma foi gerado por amplificação do cDNA através da PCR usando os primers 5'-GGG GTC GAC GCA TTA CAA AAA AAA TTA GAA GAA TTA GAA TTA GAT GAA ATG GCT GGC CCG CAG-3' (contendo a sequência de exclusão nuclear amino terminal derivada da MEK1) e 5'-ATA AGA ATG CGG CCG CCA GGA ACA GGT GGT GGC GGC CC-3'. O produto da PCR foi sub-clonado no vetor pCMV-Myc-Cyto vector (Invitrogen). A DSR foi sub-clonada usando os sites da NotI para criar o vetor pCMV-CR-NES-DSR-Myc-Cyto, designado como CR-NES-DSR.

3.3 Geração dos Adenovírus de Parvalbumina

As construções de PV em fusão com DSR foram amplificadas por PCR e subclonados em pShuttle-CMV (Bert Vogelstein, John Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD) por análise de restrição enzimática com XhoI e XbaI para gerar o pShuttle-CMV-PV-NLS-DSR. Adenovírus recombinantes foram gerados por transformação de pShuttle-CMV-PV-NLS-DSR em células AdEaseier-1 (Vogelstein), derivada da bactéria BJ5183 contendo o plasmídio “backbone” pAdEasy-1. Os adenovírus positivos foram selecionados por resistência a kanamicina e análise por restrição enzimática usando a enzima PacI. Os adenovírus de PV foram amplificados usando células HEK-293 como descrito por He *et al*, 1998.

3.4 Geração das construções de InsP₃ Sponge

As construções InsP₃ Sponge e InsP₃ Sponge NLS em fusão com mRFP foram gentilmente doadas pelo Dr. Tamas Balla (Endocrinology and Reproduction Research Branch, NICHD, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) e foram geradas como descrito anteriormente (Varnai et al. 2002; Lin et al. 2005). Em resumo, o domínio de ligação ao InsP₃ do InsP₃R humano do tipo I (número de acesso no GenBank D26070) foi amplificado de cDNA de cérebro humano (Quickclone, CLONTECH) com os seguintes pares de primers 5' GCA ACA GAG TGC CTG ACC CAG GTC AG-3 e 5'- CTT TCG CAC CAG GCT GAC AAA TGT GTC 3'. O produto de PCR foi subclonado no plasmídeo de clonagem pGEM-Easy T/A (Promega, Madison, WI). Após sequenciamento, dois clones foram identificados, um contendo (SHII+) e o outro faltando (SHII-) a região de ligação localizada entre os dois domínios envolvidos na ligação ao InsP₃. O “splice variant” SHII+ foi usado como “template”, o domínio de ligação ao InsP₃ (resíduos 224–605) foi amplificado com “nested primers” contendo os sítios de restrição para as enzimas *XhoI* e *EcoRI*, e o produto de PCR foi subclonado no vetor pEGFP-C1. Subsequentemente a EGFP foi substituída por proteína fluorescente monomérica vermelha (mRFP) para que os experimentos de Ca²⁺ pudessem ser realizados com as sondas para Ca²⁺ com excitação no comprimento de onda de 488 nm, como o fluo-4/AM. O vetor mRFP-C1-InsP₃⁽²²⁴⁻⁶⁰⁵⁾ foi designado de InsP₃ Sponge. Para geração da construção InsP₃ Sponge NES oligonúcleotídeos sintéticos contendo a sequência de exclusão nuclear amino terminal derivada da MEK1 (5' CCG GTA TGG CTC TGC AGA AAA AGT TGG AAG AGC TTG AGC TGG ATG AGG CA 3' e 5' CCG GTG CCT CAT CCA GCT CAA GCT CTT CCA ACT TTT TCT GCA GAG CCA TA 3') e os sítios de restrição para a enzima AgeI foram hibridizados *in vitro* e ligados ao plasmídeo InsP₃ Sponge previamente digeridos com a

enzima AgeI. A orientação foi confirmada por sequenciamento e a correta localização subcelular por expressão em células SkHep1.

3.5 Western Blot

Os western blots das células SkHep1 foram feitos de acordo com métodos descritos (Leite et al. 2003; Echevarria et al. 2003). As células cultivadas em placas de cultura de 35mm foram lavadas três vezes com PBS e a estas foram adicionados 1% de um coquetel contendo inibidores de proteases (Sigma, St. Louis, USA) e 1% de um coquetel de inibidores de fosfatases (Sigma, St. Louis, USA) dissolvido em M-PER (Pierce, Rockford, USA), para obtenção de lisados totais. As frações citosólicas e nucleares foram obtidas utilizando o kit NE-PER (Pierce, Rockford, USA), ao qual foram adicionados em todas as soluções 1% de um coquetel contendo inibidores de proteases (Sigma, St. Louis, USA) e 1% de um coquetel de inibidores de fosfatases (Sigma, St. Louis, USA), o protocolo foi realizado de acordo com o manual do fabricante. A concentração de proteínas foi determinada por espectrofotômetro e 15-40 µg de proteínas foi separada por eletroforese usando um gel de poliacrilamida de gradiente 5-20%. Em seguida, foi feita transferência durante 90 min em sistema semi seco (BioRad, Hercules, CA) das proteínas para uma membrana de PDVF (BioRad, Hercules, CA). Então, a membrana foi bloqueada usando-se PBS 0.1% tween-20 (PBST), mais 5% de leite desnatado por 60 min. Os anticorpos usados foram: anti c-met monoclonal (1:500) (Upstate, Charlottesville, USA), anti fosfo c-met policlonal (1:1000) (Biosource, California, USA), anti Na⁺/K⁺ ATPase monoclonal (1:250) (Santa Cruz), anti lamin B policlonal (1:1000) (Santa Cruz), anti Erk1 monoclonal (1:1000) (Cell Signaling), anti fosfo Erk 1/2 monoclonal (1:1000) (Cell Signaling), anti p38 monoclonal (1:1000) (Cell Signaling), anti fosfo p38 monoclonal (1:1000) (Cell

Signaling), anti PLC γ monoclonal (1:500) (BD Pharmingen, CA, USA) e anti-actina monoclonal (1:4000) (Sigma, St. Louis, USA). A incubação com anticorpo primário foi feita overnight a 4°C. Após três lavagens com PBST, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Amersham Biosciences) (1:5000) por 1 h a temperatura ambiente. As bandas foram reveladas por reação de quimioluminescência (ECL plus, from Amersham Biosciences). O filme foi escaneado com um densitômetro GS-700 (Bio-Rad, Hercules, CA) e a análise quantitativa foi realizada usando o Multi-Analyst software (Bio-Rad).

3.6 Imunofluorescência

A imunofluorescência foi realizada como descrito (Leite et al. 2003; Echevarria et al. 2003). As células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 10 min, e lavadas três vezes com PBS. As células foram incubadas em uma solução de bloqueio (PBS contendo 1% BSA, 0.5% triton, 5% soro de cabra) por 1 h. Após o bloqueio, as células foram incubadas por 12 horas em PBS 1% BSA contendo um dos seguintes anticorpos primários: c-met monoclonal (1:50) (Upstate, Charlottesville, USA) e anti PLC γ monoclonal (BD Pharmingen, CA, USA) (1:100) à 4°C. As células foram lavadas três vezes em PBS e incubadas por 1 h em PBS 1% BSA contendo anticorpo secundário conjugado Alexa 488 (1:500). Controles negativos foram incubados apenas com anticorpo secundário. As células foram lavadas três vezes, e as lamínulas foram montadas usando solução de montagem antifade. Imagens de imunofluorescência foram obtidas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 meta usando a objetiva de imersão a óleo com aumento de 63X (1,4 AN). Foi usando o laser argon 488 nm para excitar, e a emissão foi coletada entre 505 and 530 nm. As imagens de imunofluorescência foram adquiridas mantendo-se a íris sempre inferior a um micromêtro.

3.7 Detecção do aumento de Ca^{2+} citosólico

Na detecção do aumento de Ca^{2+} citosólico usou-se o fluo-4 aceto-metil-éster (Fluo/4 AM). Quarenta e oito horas após as células terem sido plaqueadas ou transfectadas, as mesmas foram incubadas com a solução salina de HEPES tamponada (SSHT) 6 μM de fluo-4/AM durante 30 min (37°C). Em seguida as células foram transferidas para uma câmara de perfusão acoplada a um microscópio Zeiss (Axiovert 200). As imagens e as medidas da fluorescência das células foram obtidas com o sistema a laser confocal (Zeiss LSM 510 META) utilizando-se uma objetiva de imersão em água (63X, 1,2 AN) acoplada ao microscópio Zeiss. As células foram excitadas com 488 nm e a intensidade de emissão da fluorescência acima de 515 nm foi coletada utilizando-se a modalidade de decurso temporal. Em todos os experimentos, cada célula foi analisada individualmente e utilizada como seu próprio controle (Kushmerick et al, 1999).

As células marcadas com fluo-4/AM foram inicialmente perfundidas com SSHT até o estabelecimento de uma linha de base. Em seguida as células foram perfundidas por 1 min com SSHT contendo 100 ng/mL de HGF por 7 minutos ou 5 nM de AVP por 2 minutos. As imagens foram analisadas e processadas utilizando os seguintes softwares: LSM 510, Windows Excel, Prism 4.0, Image J 3.2, Sigma Plot 9.1 e Adobe Photoshop CS2.

3.8 Análise Estatística

Todos os dados apresentados representam pelo menos três experimentos independentes e foram expressos pela média \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com o Programa PRISM statistical software (GraphPad, San Diego, CA). Os grupos de dados foram comparados usando one-way ANOVA. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. Resultados

1. Expressão e localização das construções de parvalbumina e calretinina.

Demonstrou-se anteriormente que a expressão da PV no núcleo ou citosol foi capaz de atenuar tanto o aumento de Ca^{2+} induzido por ATP quanto aquele induzido por EGF nestes compartimentos subcelulares (Pusl et al. 2002). Anteriormente, foram descritas construções de PV fundidas a GFP. Embora a GFP seja compatível com alguns indicadores de Ca^{2+} , ela pode interferir com o espectro dos indicadores de Ca^{2+} (Bolsover et al. 2001). Desse modo as construções com PV foram otimizadas, substituindo a GFP por DSR. Similarmente, CR foi fundida com a DSR e a sequências de exclusão nuclear (NES) ou sequências de localização nuclear (NLS) com o objetivo de direcioná-las tanto para o citosol quanto para o núcleo (Figura 5). A expressão da PV e CR fusionadas com DSR foram confirmadas por expressão transiente em células SkHep1. Devido ao fato das construções de PV e CR terem sido fundidas ao epítipo Myc, os níveis relativos de expressão puderam ser comparados. As construções CR-NLS-DSR, CR-NES-DSR, PV-NLS-DSR ou PV-NES-DSR quando transientemente expressas, em células SkHep1, apresentaram seus corretos pesos moleculares (Figura 5B). CR-NLS-DSR e PV-NLS-DSR foram expressos na mesma extensão (Figura 5B). CR-NES-DSR e PV-NES-DSR foram semelhantemente expressos quando comparados com as construções de PV e CR, fundidas às sequências de localização nuclear (Figura 5B).

Para confirmar a localização subcelular das construções de PV e CR fundidas ao DSR, células SkHep1 foram transientemente transfectadas com as construções CR-NES-DSR e CR-NLS-DSR. Como esperado, o vetor controle que expressa somente DSR foi expresso tanto no núcleo quanto no citosol (Figura 6A). Marcação nuclear com

TO-PRO-3 confirmou que a construção CR-NES-DSR foi excluída do núcleo, quando expressado em células SkHep1 (Figura 6B). Em contraste, CR-NLS-DSR foi direcionada somente para o núcleo (Figura 6C). Similarmente, PV-NES-DSR também se localizou no citosol, mas não no núcleo. Enquanto, a construção PV-NLS-DSR se localizou no núcleo, mas não no citosol (Figuras 7A e 7B).

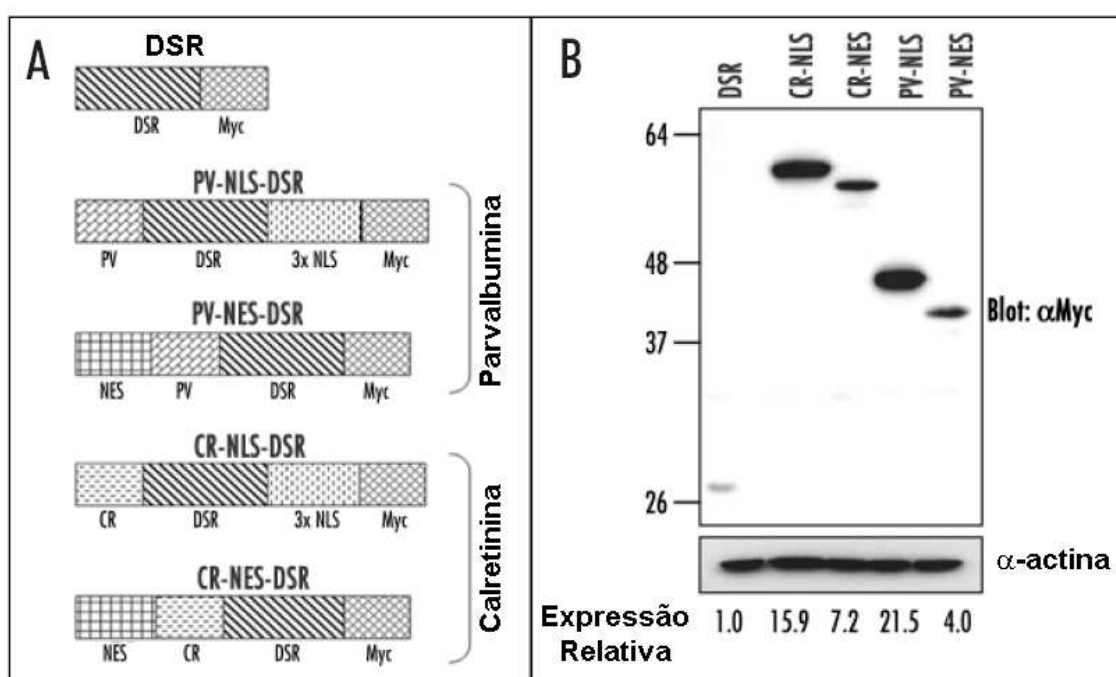


Figura 5: Representação esquemática e expressão da parvalbumina e calretinina fusionadas com DSR. (A) Representação esquemática da PV e CR ligadas ao epítipo myc e DSR. NLS representa a sequência de localização nuclear e NES representa a sequência de exclusão nuclear. (B) Expressão das construções de PV e CR em células SkHep1 foram detectadas usando anticorpos anti-myc. O painel inferior representa o imunoblot anti-actina, usado como controle para normalizar a relativa expressão dos níveis de PV e CR. Dados representativos de três experimentos.

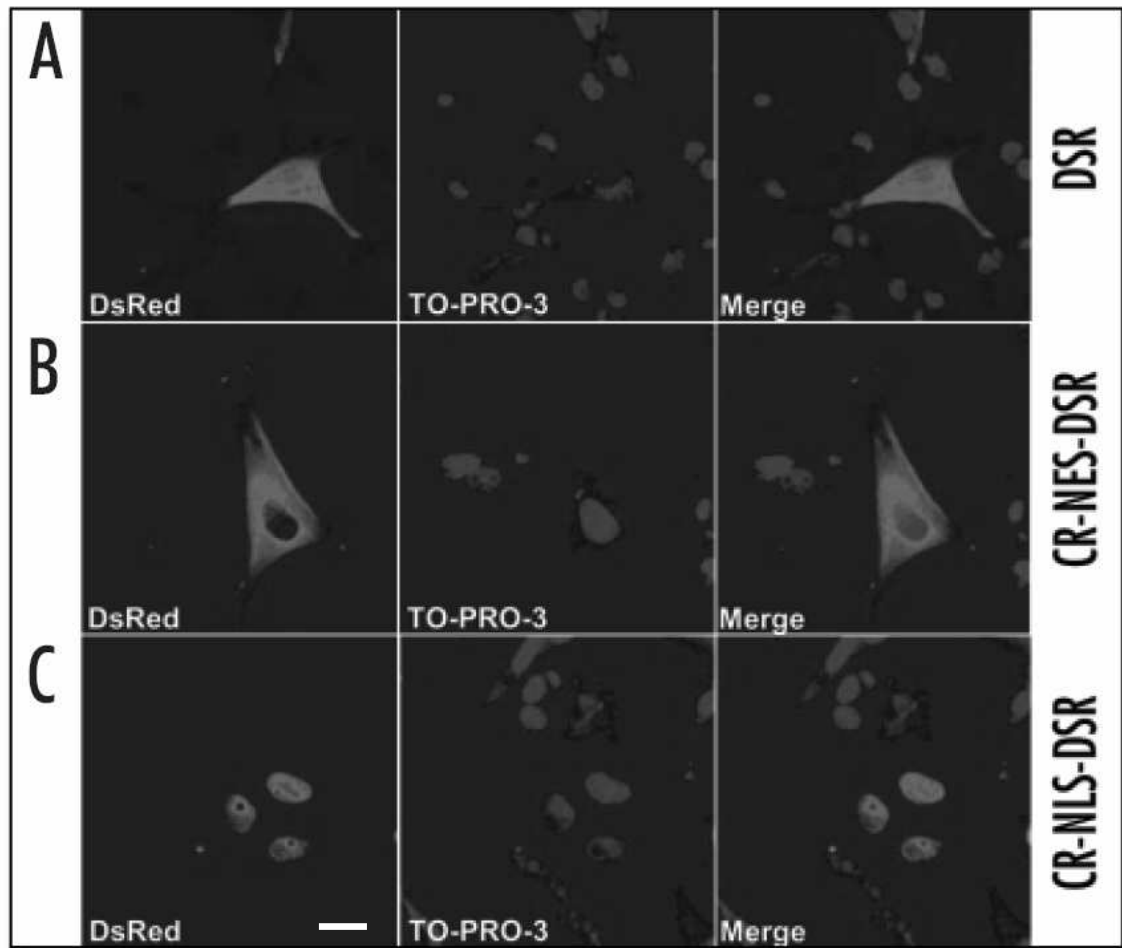


Figura 6. Localização subcelular das construções de calretinina. Células SkHep1 foram transientemente transfectadas tanto com os vetores de expressão (A) controle DSR, (B) CR-NES-DSR ou (C) CR-NLS-DSR. As células foram então examinadas por microscopia confocal. As proteínas calretina fundidas a DSR ligadas tanto a NLS quanto a NES localizam-se no núcleo ou citosol, respectivamente (vermelho). Localização nuclear foi confirmada com o marcador nuclear específico TO-PRO-3 (Azul). Imagem representativa de quatro experimentos. Barra = 10 μ m

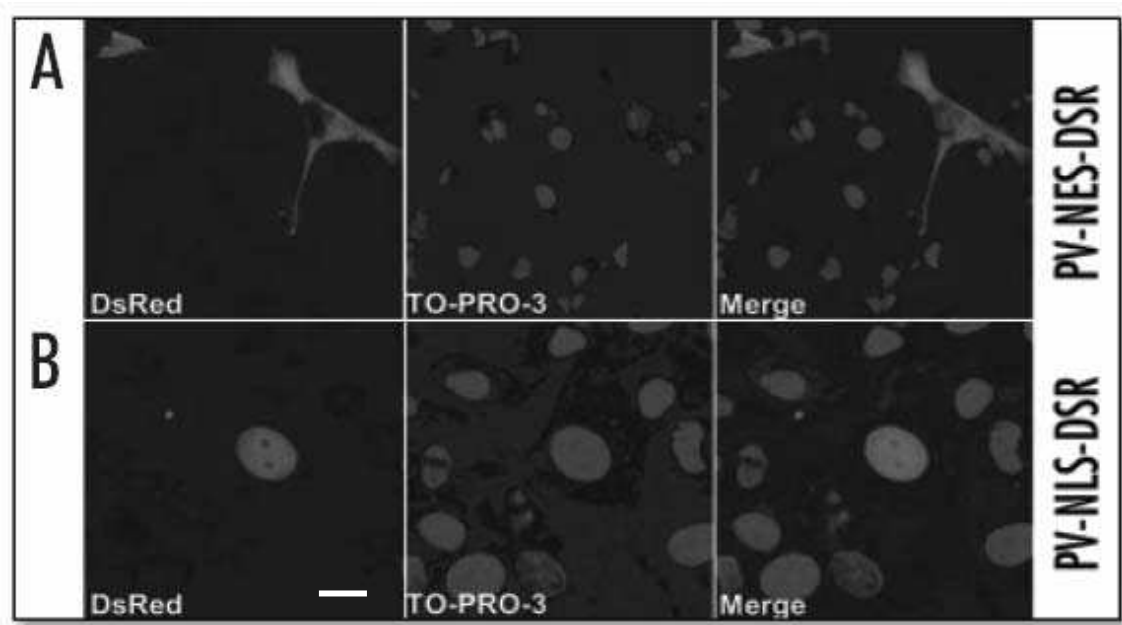


Figura 7. Localização subcelular das construções de parvalbumina. Células SkHep1 foram transientemente transfectadas tanto com os vetores de expressão (A) PV-NES-DSR ou (B) PV-NLS-DSR como indicadas e então examinadas por microscopia confocal. As proteínas PV fundidas ao DSR ligadas a NLS ou NES localizam-se no núcleo ou citosol, respectivamente (vermelho). Localização nuclear foi confirmada com o marcador nuclear específico TO-PRO-3 (Azul). Imagem representativa de quatro experimentos. Barra = 10 μ m

2. Atenuação dos transientes de Ca^{2+} pela expressão das construções de calretinina e parvalbumina.

Foi determinado se o rápido aumento de Ca^{2+} induzido por adenosina trifosfato (ATP) pode ser atenuado pela expressão de CR. Expressão transiente da CR-NLS-DSR em células SkHep1 não afetou o aumento de Ca^{2+} induzido no citosol (Figura 8A e B). Por outro lado, a construção CR-NLS-DSR atenuou o aumento de Ca^{2+} no núcleo após estimulação por ATP, quando comparado com células não transfectadas (Figura 8A e B). O aumento de Ca^{2+} induzido por ATP foi reduzido pela expressão de CR-NLS-DSR de 426% para 253% no núcleo, quando comparado com o controle (Figura 8E). A expressão de CR-NLS-DSR não mostrou diferença significativa na fluorescência do fluo-4/AM no citosol (Figura 8E), demonstrando que o Ca^{2+} citosólico não é afetado pela expressão de CR no núcleo. Em contraste, a construção CR-NES-DSR não alterou o aumento de Ca^{2+} no núcleo após estimulação por ATP (Figura 8C e D), quando comparado com células SkHep1 não transfectadas (Figuras 8C e D). Por outro lado, CR-NES-DSR suprimiu o aumento de Ca^{2+} induzido por ATP somente no citosol de 273% para 182% comparado com os níveis do controle (Figura 8C, D e F). Estes resultados mostram que o aumento de Ca^{2+} induzido por ATP é proveniente principalmente do citosol.

Como a CR, a expressão da PV tampona Ca^{2+} dependendo da localização subcelular. Quando comparado com aumentos de Ca^{2+} induzidos por ATP no citosol de células SkHep1 não transfectadas (Figura 9A), a expressão de PV-NLS-DSR não afetou o aumento de Ca^{2+} no citosol (Figura 9B). Entretanto, PV-NLS-DSR (Figura 9B) suprimiu o aumento de fluorescência no núcleo de células SkHep1 estimuladas com ATP, quando comparadas com o controle (Figura 9A). A construção PV-NLS-DSR

inibiu significativamente o aumento do Ca^{2+} núcleoplasmático induzido por ATP de 625% para 422% (Figura 9E). Como observado previamente, PV-NES-DSR não afetou o aumento de Ca^{2+} nuclear induzido por ATP quando comparado com células não transfectadas (Figura 9C e D). Por outro lado, o aumento de Ca^{2+} induzido por ATP foi diminuído significativamente pela expressão da construção PV-NES-DSR de 366% para 193% (Figura 9F).

Estudos anteriores usando a sonda fura-2 indicaram que a expressão da PV não altera a concentração basal de Ca^{2+} no citosol e no núcleo (Pusl et al. 2002). Neste estudo foi também demonstrado que a fluorescência do fluo-4/AM não é alterada pela expressão da PV ou CR (Tabela 1). Para examinar os efeitos da CR e PV na cinética dos sinais de Ca^{2+} , examinamos a taxa de aumento dos sinais de Ca^{2+} em células estimuladas com ATP. Em células controle, não transfectadas, o Ca^{2+} aumentou de 20% para 80% e atingiu o pico máximo de resposta em 5.1 ± 0.4 segundos no citosol ($n=30$), semelhante ao que foi observado previamente em células epiteliais e neurônios (Leite et al. 2002; Jacob et al. 2005). Desse modo o pico máximo de resposta foi semelhante ao do núcleo, 5.2 ± 0.3 segundos. No citosol a taxa de aumento da fluorescência foi de 26.7 ± 3.1 unidades de fluorescência/segundos e de 60.6 ± 7.7 unidades/segundo no núcleo, provavelmente refletindo as maiores mudanças de fluorescência observadas no núcleo (Thomas et al. 2000). Para explorar esta diferença, normalizamos a taxa de aumento do Ca^{2+} no núcleo ou citosol das células transfectadas e das células não transfectadas (Tabela 2). A taxa de aumento do Ca^{2+} foi significativamente diminuída no núcleo, mas não no citosol de células transfectadas com as construções PV-NLS e CR-NLS. Estes achados demonstram que a PV e CR tamponam a resposta de Ca^{2+} no citosol e no núcleo. Esta observação reflete o fato de que os sinais de Ca^{2+} núcleoplasmáticos induzidos pela estimulação por ATP são resultantes em parte, da difusão do Ca^{2+}

citoplasmático através dos poros nucleares para o nucleoplasma (Fox et al. 1997). É importante ressaltar que as construções com NES foram mais eficazes em atenuar o Ca^{2+} citoplasmático do que o nucleoplasmático. Estes dados demonstram que a PV e a CR direcionadas tanto para o núcleo quanto para o citosol são efetivas no tamponamento do aumento de Ca^{2+} desses compartimentos subcelulares.

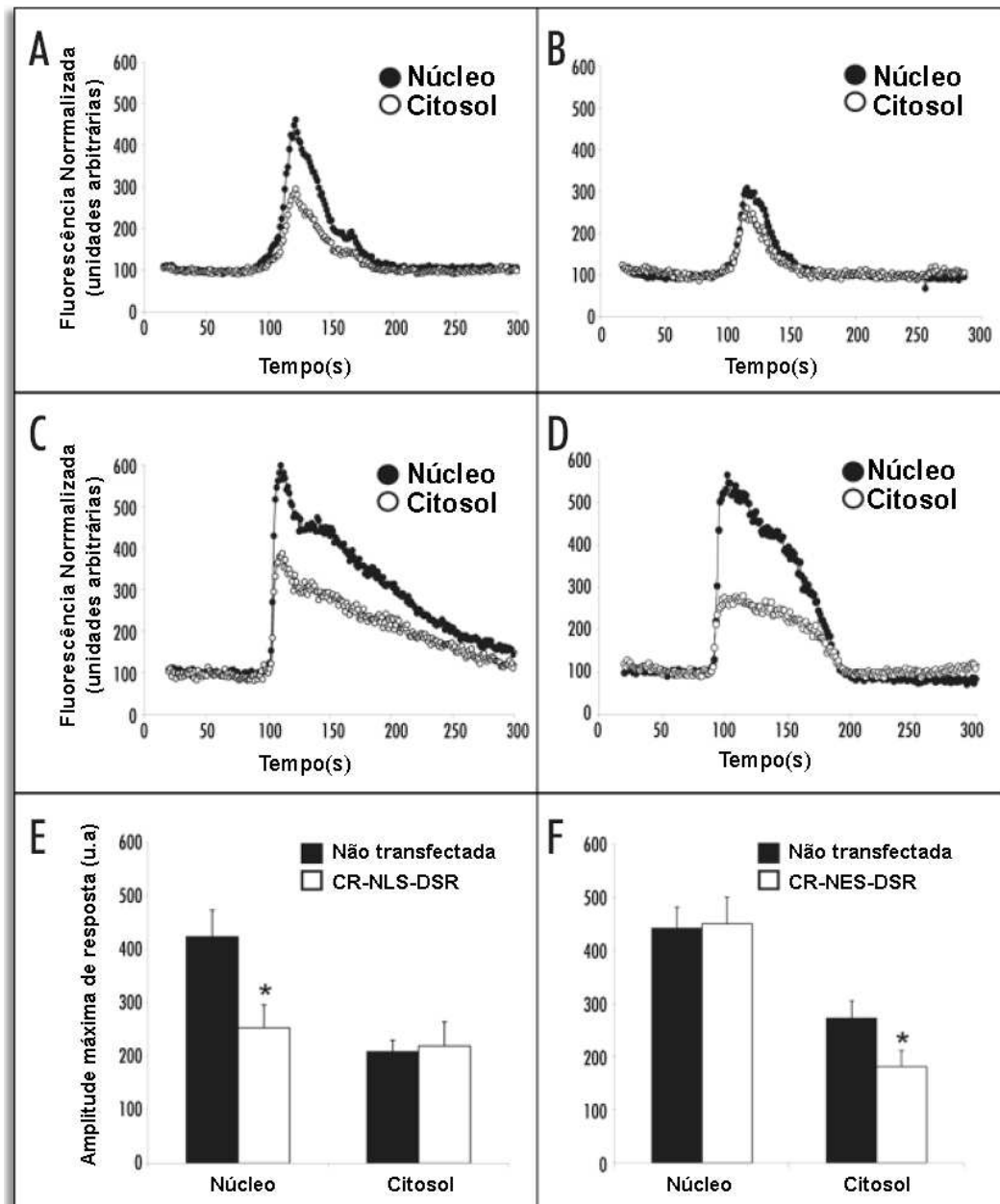


Figura 8. Supressão dos sinais de Ca^{2+} em células SkHep1 por expressão de CR. Células SkHep1 expressando CR foram marcadas com a sonda fluorescente para Ca^{2+} , fluo-4/AM, e subsequentemente estimuladas com 10 μ M de ATP. As células foram monitoradas em experimentos de decurso temporal através de microscopia confocal. (A) Células não transfectadas e (B) transfectadas com CR-NLS-DSR. (C) Células não transfectadas e (D) transfectadas com CR-NES-DSR. (E) Resumo dos dados obtidos em células isoladas mostrados em (A) e (B). Os resultados mostram a percentagem de aumento da fluorescência do fluo-4/AM induzido por ATP, em relação à linha de base, e são representativos de no mínimo seis células não transfectadas e transfectadas com a construção CR-NLS-DSR. (F) Resumo dos dados obtidos em células isoladas mostrados em (C) e (D). Os resultados mostram a percentagem de aumento da fluorescência do fluo-4/AM induzido por ATP, em relação à linha de base, e são representativos da percentagem de no mínimo nove células não transfectadas e transfectadas com as construção CR-NES-DSR. O asterisco representa $p < 0.05$.

Tabela 1. Fluorescência da linha de base não é alterada em células expressando as proteínas quelantes de Ca^{2+} .

	Transfectada		Não transfectada	
	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma
PV-NLS-DSR	17±7	22±6	14±2	24±3
PV-NES-DSR	12±2	21±5	19±5	21±4
CR-NLS-DSR	20±6	19±7	17±3	21±4
CR-NES-DSR	14±3	19±4	20±3	25±3

Os valores são representativos da média \pm EPM de no mínimo seis células de cada grupo. Nenhum dos valores do núcleo ou citoplasma de células transfectadas difere significativamente daqueles obtidos em células não transfectadas.

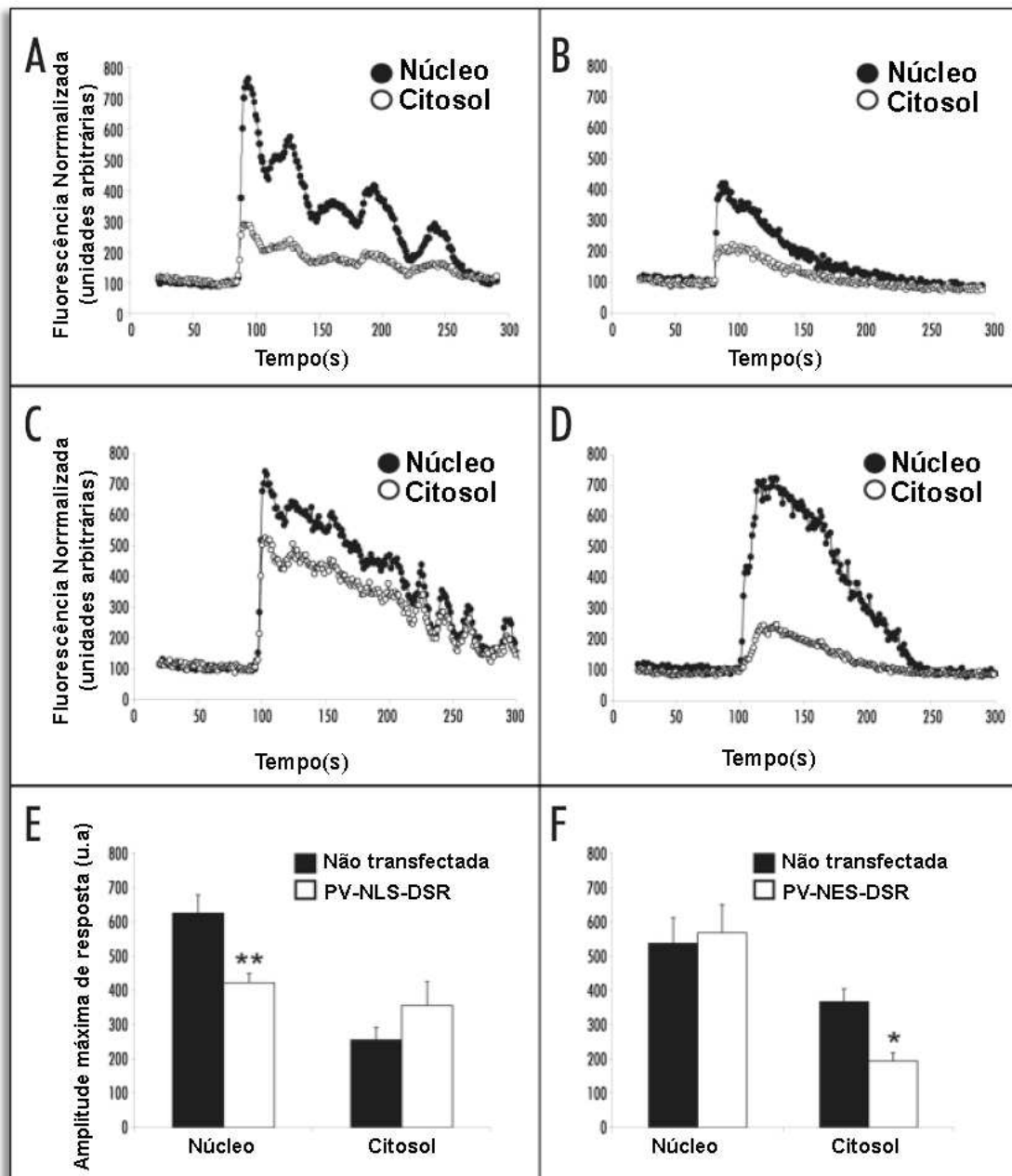


Figura 9. Supressão dos sinais de Ca^{2+} em células SkHep1 por expressão de parvalbumina. Células SkHep1 expressando PV foram marcadas com a sonda fluorescente para Ca^{2+} , fluo-4/AM, e subsequentemente estimuladas com 10 μM de ATP. As células foram monitoradas em experimentos de decurso temporal através de microscopia confocal. (A) Células não transfectadas e (B) transfectadas com PV-NLS-DSR. (C) Células não transfectadas e (D) transfectadas com PV-NES-DSR. (E) Resumo dos dados obtidos em células isoladas mostrados em (A) e (B). Os resultados mostram a percentagem de aumento da fluorescência do fluo-4/AM induzido por ATP, em relação à linha de base, e são representativos de no mínimo quatro células não transfectadas e transfectadas com a construção PV-NLS-DSR. (F) Resumo dos dados obtidos em células isoladas mostrados em (C) e (D). Os resultados mostram a percentagem de aumento da fluorescência do fluo-4/AM induzido por ATP, em relação à linha de base, e são representativos de no mínimo sete células não transfectadas e transfectadas com a construção PV-NES-DSR. O asterisco representa $p < 0.05$.

Tabela 2. Efeito da parvalbumina e calretinina na sinalização do Ca^{2+}

Construções	Transfectada/não transfectada	
	Núcleo	Citoplasma
PV-NLS-DSR	$0.60 \pm 0.11^*$	1.14 ± 0.29
PV-NES-DSR	$0.65 \pm 0.14^*$	$0.48 \pm 0.11^*$
CR-NLS-DSR	$0.40 \pm 0.13^*$	0.66 ± 0.20
CR-NES-DSR	$0.48 \pm 0.10^*$	$0.33 \pm 0.07^*$

A taxa de aumento (unidades de fluorescência/segundo) dos sinais de Ca^{2+} foi normalizada pelas taxas observadas em células controles, não transfectadas, presentes no mesmo campo de visão das células transfectadas. Os valores são representativos da média \pm EPM de no mínimo seis células de cada grupo. O asterisco representa $p < 0.05$.

3. Localização subcelular das construções de adenovírus de parvalbumina-DSR.

Para maximizar a taxa de expressão transferimos as construções de PV para um sistema de expressão adenoviral. Inicialmente testamos diferentes títulos virais para determinar a concentração que induz a maior taxa de infecção com a menor toxicidade. Desse modo na concentração de 200 MOI, 90% das células foram infectadas e nenhum efeito tóxico foi observado. Assim, este título viral foi utilizado em todos os experimentos subsequentes. Como podemos observar na figura 10, as construções apresentam a distribuição celular esperada. A construção ad-PV-NLS-DSR é expressa unicamente no núcleo e a construção ad-PV-NES-DSR é expressa somente no citosol das células SkHep1. Usamos a construção ad-DSR como controle e como esperado o ad-DSR foi expresso tanto no núcleo quanto no citosol.

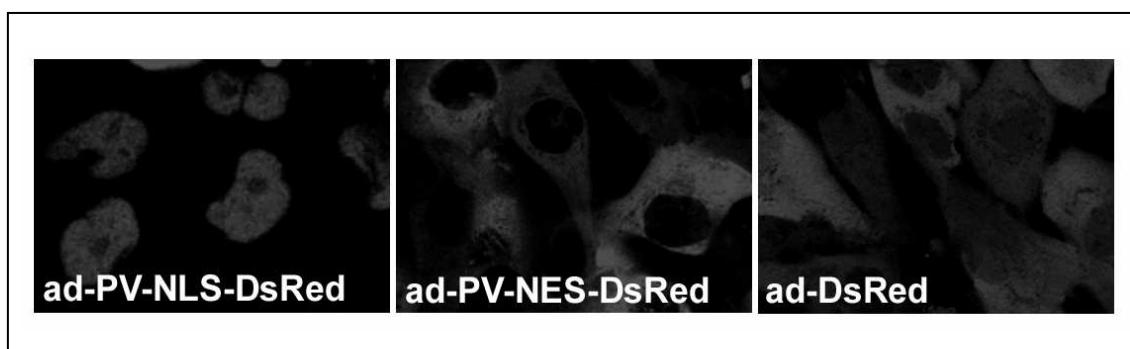


Figura 10 Localização subcelular das construções de adenovírus de parvalbumina-DSR. Células SkHep1 foram infectadas com 200 MOI por 48 horas com vetores adenovirais para ad-PV-NLS-DSR, ad-PV NES-DSR ou com o vetor controle ad-DSR. As construções apresentam a distribuição celular esperada. Ad-PV-NLS-DSR é expresso unicamente no núcleo, ad-PV-NES-DSR somente no citosol e o ad-DSR é expresso tanto no núcleo como no citosol. Imagem representativa de seis experimentos.

4. HGF fosforila endógeno c-met em células SkHep1.

Como discutido anteriormente, escolhemos o HGF para estimulação de SkHep1, pois ele ativa a maquinaria responsável em gerar Ca^{2+} nuclear. Inicialmente, testamos a capacidade de HGF fosforilar o c-met endógeno em células SkHep1. A figura 11 mostra que a fosforilação do c-met pelo HGF é dependente da concentração. A concentração de 100 ng/mL de HGF induziu a fosforilação máxima do c-met e esta concentração foi escolhida para realizar todos os demais experimentos.

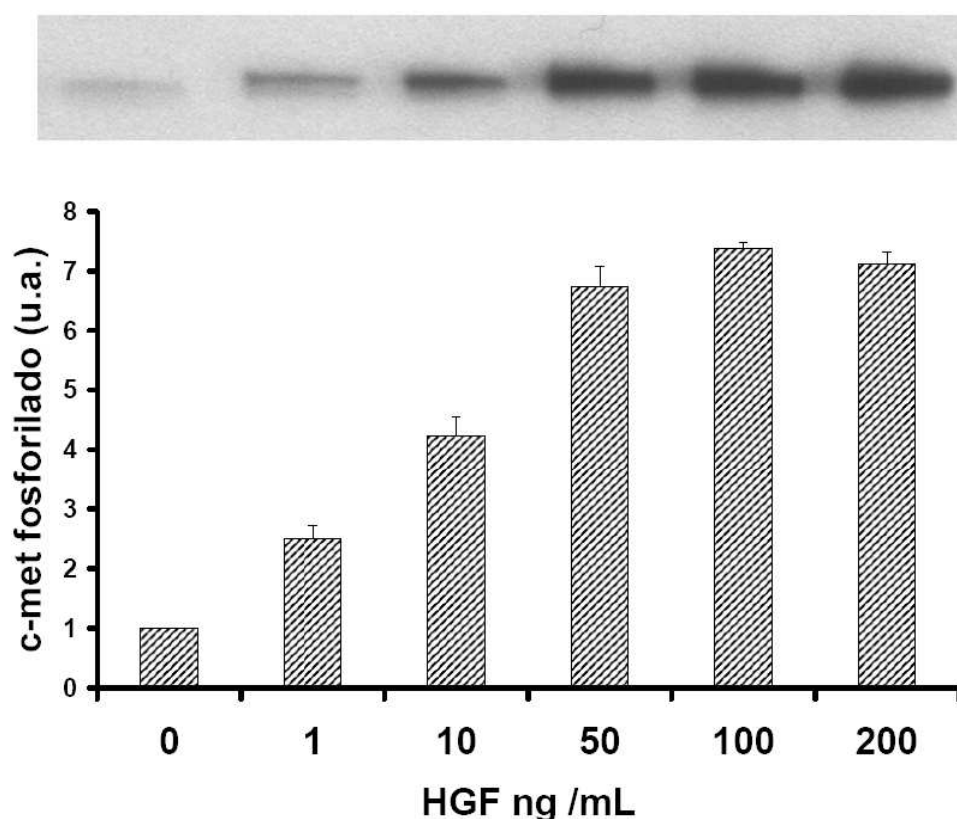


Figura 11. HGF fosforila c-met em células SkHep1. Células SkHep1 foram estimuladas com 1, 10, 50, 100 e 200 ng/mL de HGF por 2 minutos. O painel superior representa western blot usando anticorpo anti c-met fosforilado e o painel inferior representa a quantificação de quatro experimentos. Os dados foram normalizados em relação ao controle, células não estimuladas com HGF. Os valores são representativos da média \pm EPM.

5. Ad-PV-NES bloqueia a fosforilação de Erk 1.

Foi observado que fatores de crescimento induzem aumentos de Ca^{2+} que contribuem para a ativação de MAPKs (Pusl et al. 2002). Para estudarmos a função do Ca^{2+} citosólico e nuclear na ativação de MAPKs utilizamos as construções de PV entregues por adenovirus. Testamos inicialmente a fosforilação da MAPK Erk 1 e 2 induzida por HGF. Lisados de células SkHep1 estimuladas com 100 ng/mL de HGF por 2, 4, 8, 16, 32 e 64 minutos foram submetidos a westerns utilizando anticorpos anti Erk 1 e 2 fosforilado e anti Erk 1, como controle. Como observado na Figura 12A, HGF induz uma rápida fosforilação da Erk 1 e não foi observado fosforilação significativa de Erk 2. Após 16 min ocorreu a fosforilação máxima induzida pelo HGF (Figura 12B). Para investigar o efeito do Ca^{2+} nuclear e citosólico na fosforilação de Erk 1, estimulou-se as células SkHep1 durante 8 minutos com 100 ng/ml de HGF (após as células serem infectadas com as construções ad-DSR, ad-PV-NES, ad-PV-NLS, ad-PV-NLS-CD por 48 horas). As amostras não infectadas e não estimuladas com HGF foram chamadas de C- (controle negativo) e as amostras não infectadas e estimuladas com 100 ng/mL de HGF foram nomeadas de C+ (controle positivo). A construção ad-PV-NES reduziu a fosforilação de Erk 1 em $90.1 \pm 11\%$ ($P < 0.05$) (Figura 13A e B). As construções ad-PV-NLS e ad-PV-NLS-CD reduziram a fosforilação de Erk 1 de $33.7 \pm 8.3\%$ para $18.5 \pm 8.4\%$ ($p > 0.05$), respectivamente (Figura 13A e B). Os resultados obtidos mostram que a diminuição dos níveis de Ca^{2+} citosólico pela construção ad-PV-NES causou bloqueio quase que total da fosforilação de Erk 1. Por outro lado, a redução dos níveis de Ca^{2+} do núcleo levou à redução parcial da fosforilação de Erk 1.

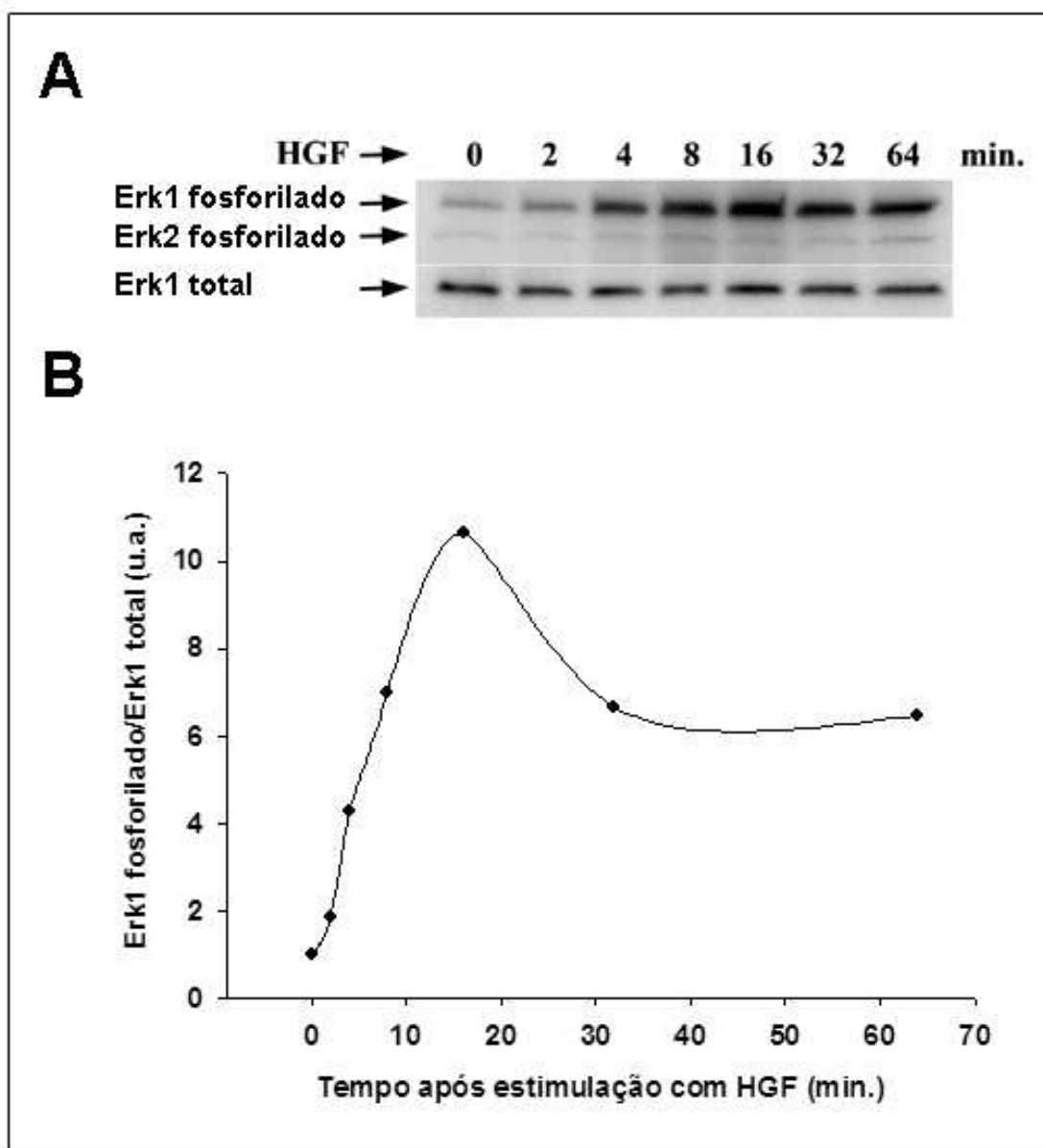


Figura 12. HGF fosforila Erk 1. (A) Western blots foram realizados utilizando anticorpos anti Erk 1/2 fosforilado (painel superior) e anti Erk 1 (painel inferior) em células SkHep1 estimuladas com 100 ng/ml de HGF por 2, 4, 8, 16, 32 e 64 minutos. A membrana do painel superior foi reincubada com o anticorpo anti Erk 1, após ser tratada para a remoção do anticorpo anti Erk 1/2 fosforilado (B) Os resultados mostrados no painel A foram quantificados por densitometria e os valores obtidos normalizados em relação ao controle, células não estimuladas com HGF, e dividido por Erk 1 total. Dados representativos de quatro experimentos.

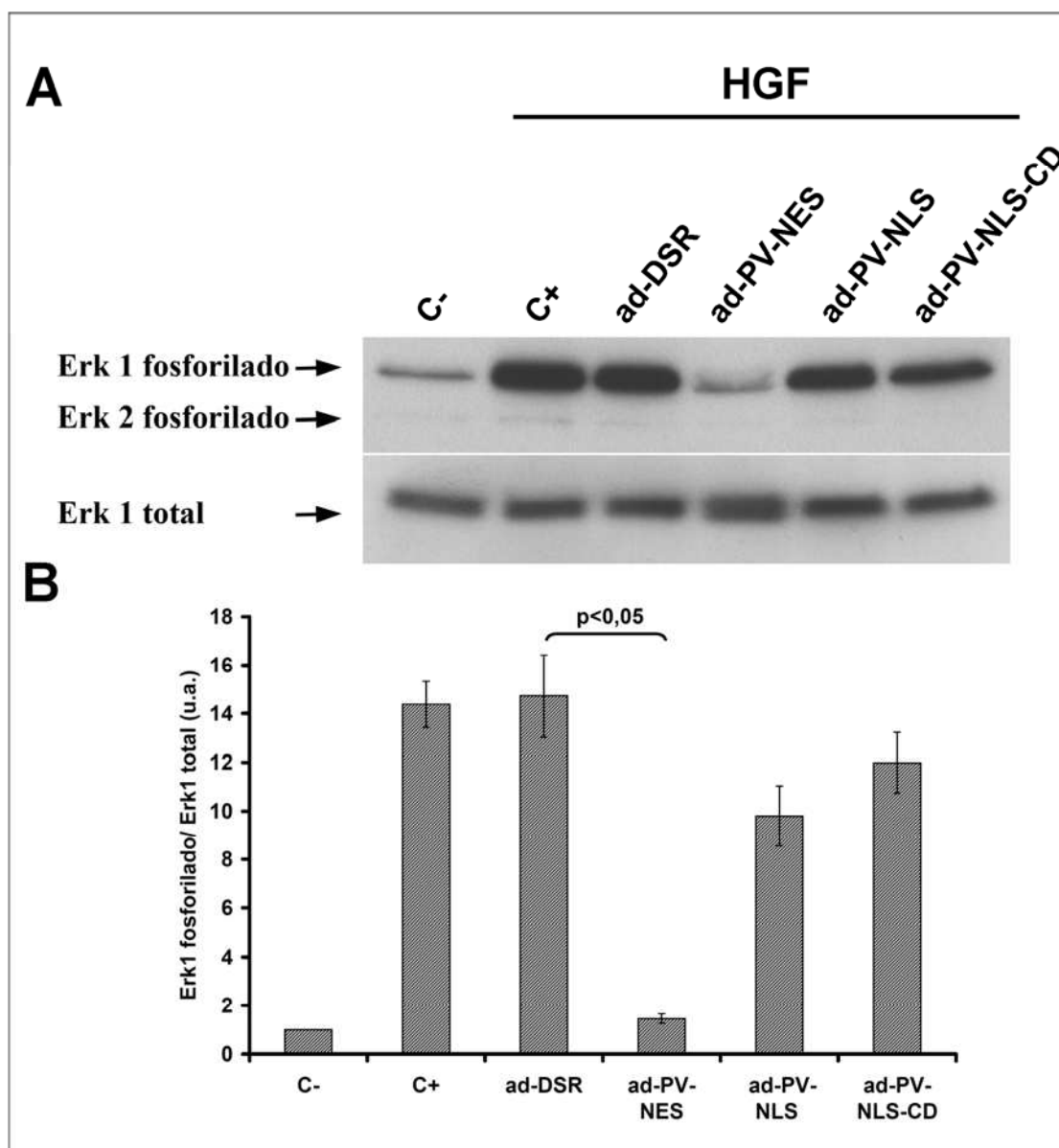


Figura 13. Ad-PV-NES bloqueia a fosforilação de Erk 1 induzida por HGF. (A) Western blots foram realizados utilizando anticorpos anti Erk 1/2 fosforilado (painel superior) e anti Erk 1 (painel inferior). Células SkHep1, infectadas com as construções ad-DSR, ad-PV-NES, ad-PV-NLS e PV-NLS-CD foram estimuladas com 100 ng/ml de HGF por 8 minutos. As amostras não infectadas e não estimuladas com HGF foram chamadas de C- e as amostras não infectadas e estimuladas com 100 ng/mL de HGF foram nomeadas de C+. (B) Os resultados mostrados no painel A foram quantificados por densitometria e os valores obtidos foram normalizados em relação ao controle, células não estimuladas com HGF, e divididos por Erk 1 total. Os valores são representativos da média \pm EPM de três experimentos independentes.

6. PV-NES bloqueia a expressão de p38

Após investigar a função do Ca^{2+} citosólico e nuclear na fosforilação de Erk 1 investigamos a MAPK p38. Para este experimento, as células SkHep1 foram infectadas com as construções ad-DSR, ad-PV-NES, ad-PV-NLS, ad-PV-NLS-CD por 48 horas e estimuladas com HGF por 8 minutos. Os lisados foram submetidos à westerns utilizando anticorpos anti p38 e anti actina, como controle. As amostras não infectadas e não estimuladas com HGF foram chamadas de C- (controle negativo) e as amostras não infectadas e estimuladas com 100 ng/mL de HGF foram nomeadas de C+ (controle positivo). Com o procedimento acima a construção ad-PV-NES bloqueou por completo a expressão de p38 (Figura 14A e B). Observamos também que as construções ad-PV-NLS e ad-PV-NLS-CD reduziram a expressão de p38 em $30.1 \pm 6.4\%$ e $19.3 \pm 3.1\%$, respectivamente (Figura 14A e B). Estes resultados mostram que diminuição dos níveis de Ca^{2+} citosólico pela construção ad-PV-NES bloqueia a expressão de p38.

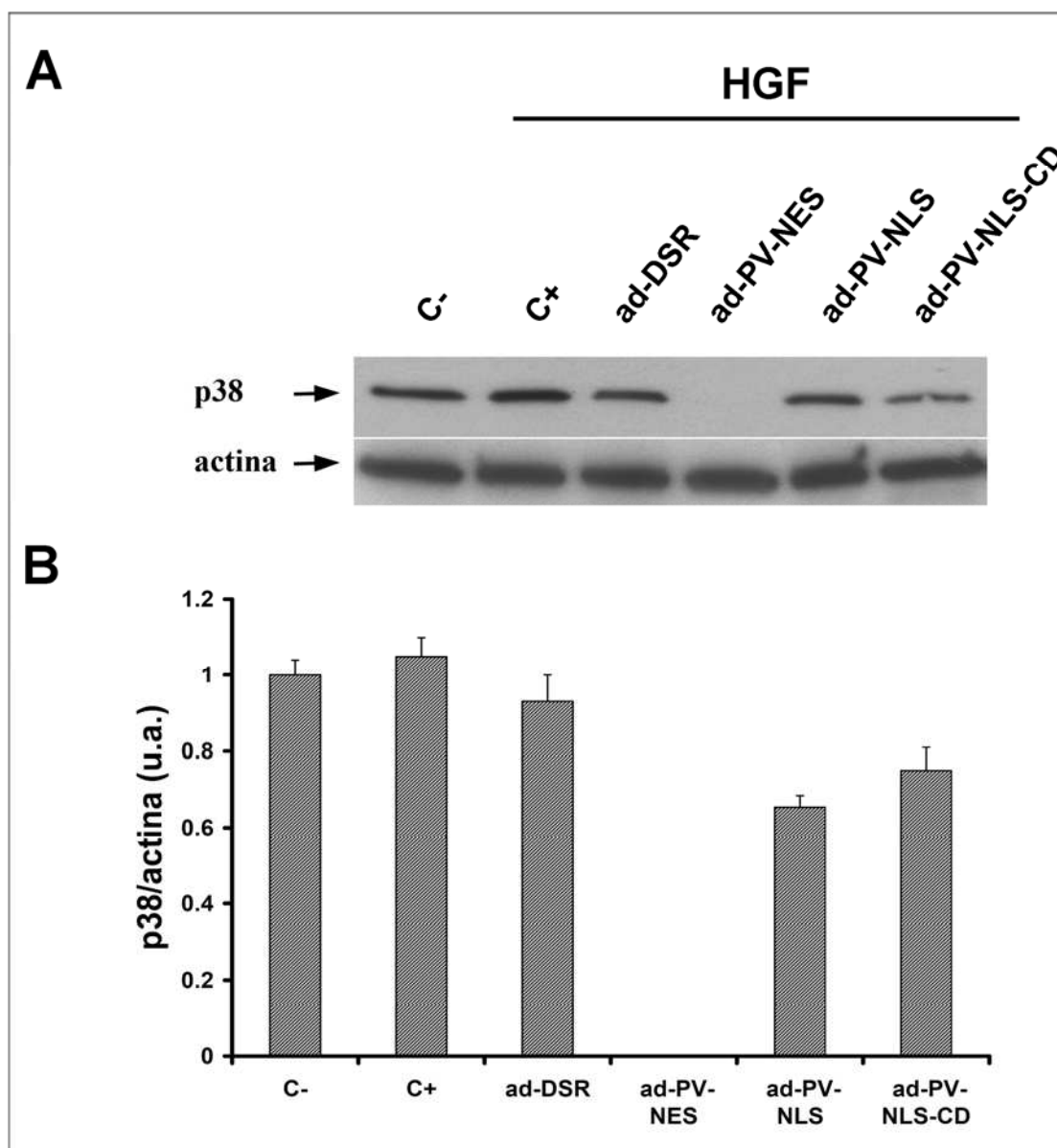


Figura 14. Ad-PV-NES bloqueia a expressão de p38. (A) Western blots foram realizados utilizando anticorpos anti p38 (painel superior) e anti actina (painel inferior). Células SkHep1, infectadas com as construções ad-DSR, ad-PV-NES, ad-PV-NLS e PV-NLS-CD foram estimuladas com 100 ng/ml de HGF por 8 minutos. As amostras não infectadas e não estimuladas com HGF foram chamadas de C-. A amostra não infectada e estimulada com 100 ng/mL de HGF foram nomeadas de C+. (B) Os resultados mostrados no painel A foram quantificados por densitometria e os valores obtidos foram normalizados em relação ao controle, células não estimuladas com HGF, e divididas pela actina. Os valores são representativos da média \pm EPM de quatro experimentos.

7. PV-NLS diminui a fosforilação de CDK1

A ativação da CDK1 é importante para a transição da fase G2 do ciclo celular para a mitose (Kramer et al. 2004; Nagy et al. 2000). Assim, estudamos o efeito do Ca^{2+} citosólico e nuclear na fosforilação da CDK1. Para isto, células SkHep1 foram infectadas com as construções ad-DSR, ad-PV-NES, ad-PV-NLS, ad-PV-NLS-CD durante 48 horas. Os lisados foram submetidos à westerns utilizando anticorpos anti CDK1 fosforilado e anti CDK1 total, como controle. O grupo controle representa as amostras não infectadas. Verificamos que a construção ad-PV-NES bloqueou a fosforilação de CDK1 em $15 \pm 5\%$ (Figura 15A e B). As construções ad-PV-NLS e ad-PV-NLS-CD reduziram a fosforilação de CDK1 em $92 \pm 4\%$ e $68 \pm 6\%$ ($p < 0.05$), respectivamente (Figura 15A e B). Estes resultados mostram que a diminuição dos níveis de Ca^{2+} nuclear pela construção ad-PV-NLS reduz a fosforilação da CDK1, sugerindo que o Ca^{2+} nuclear pode ter uma função importante na regulação do ciclo celular. Experimentos em colaboração com a estudante Michele Angela Rodrigues (Yale University) mostram como o Ca^{2+} nuclear está envolvido na regulação do ciclo celular (dados ainda não publicados).

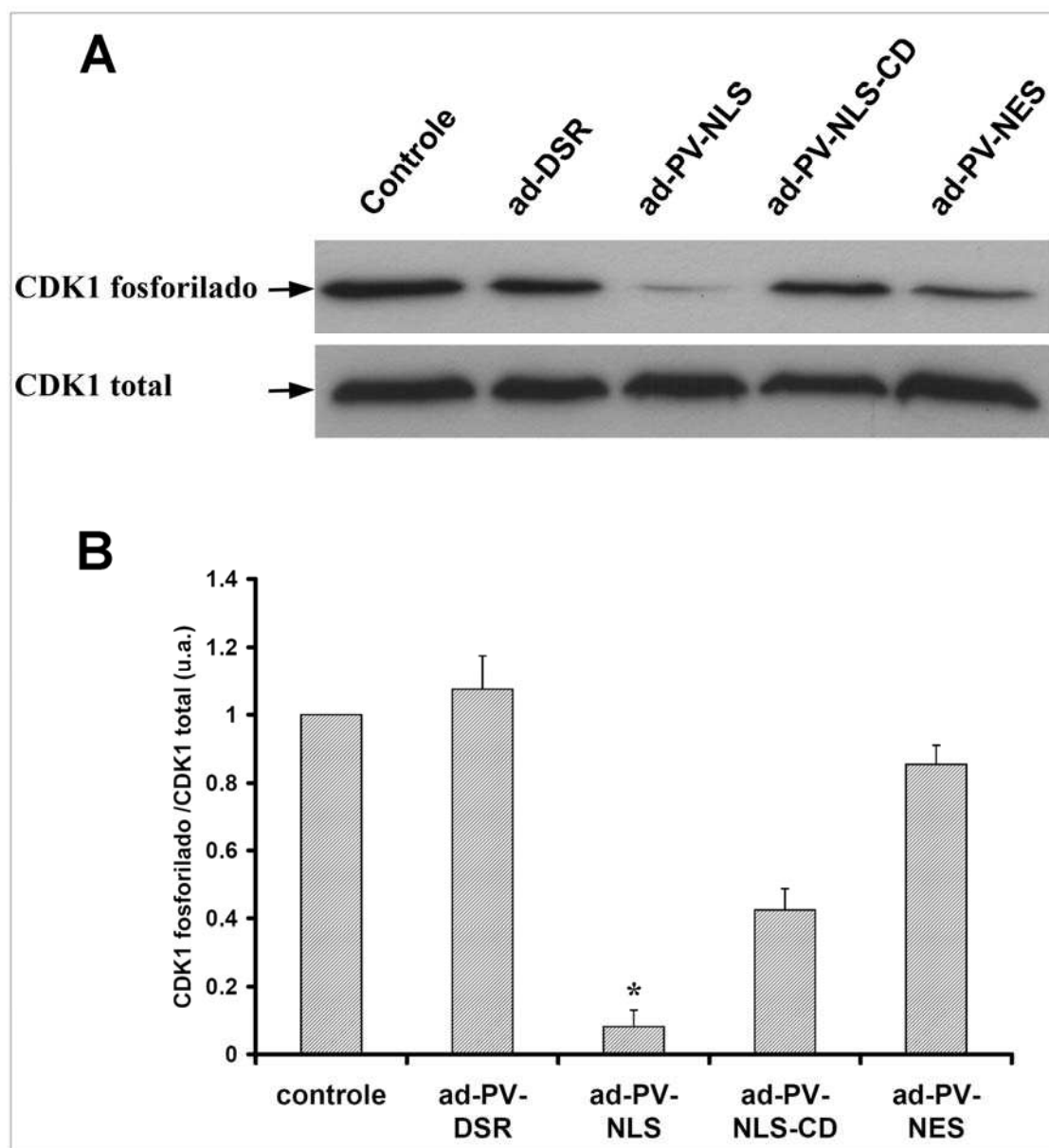
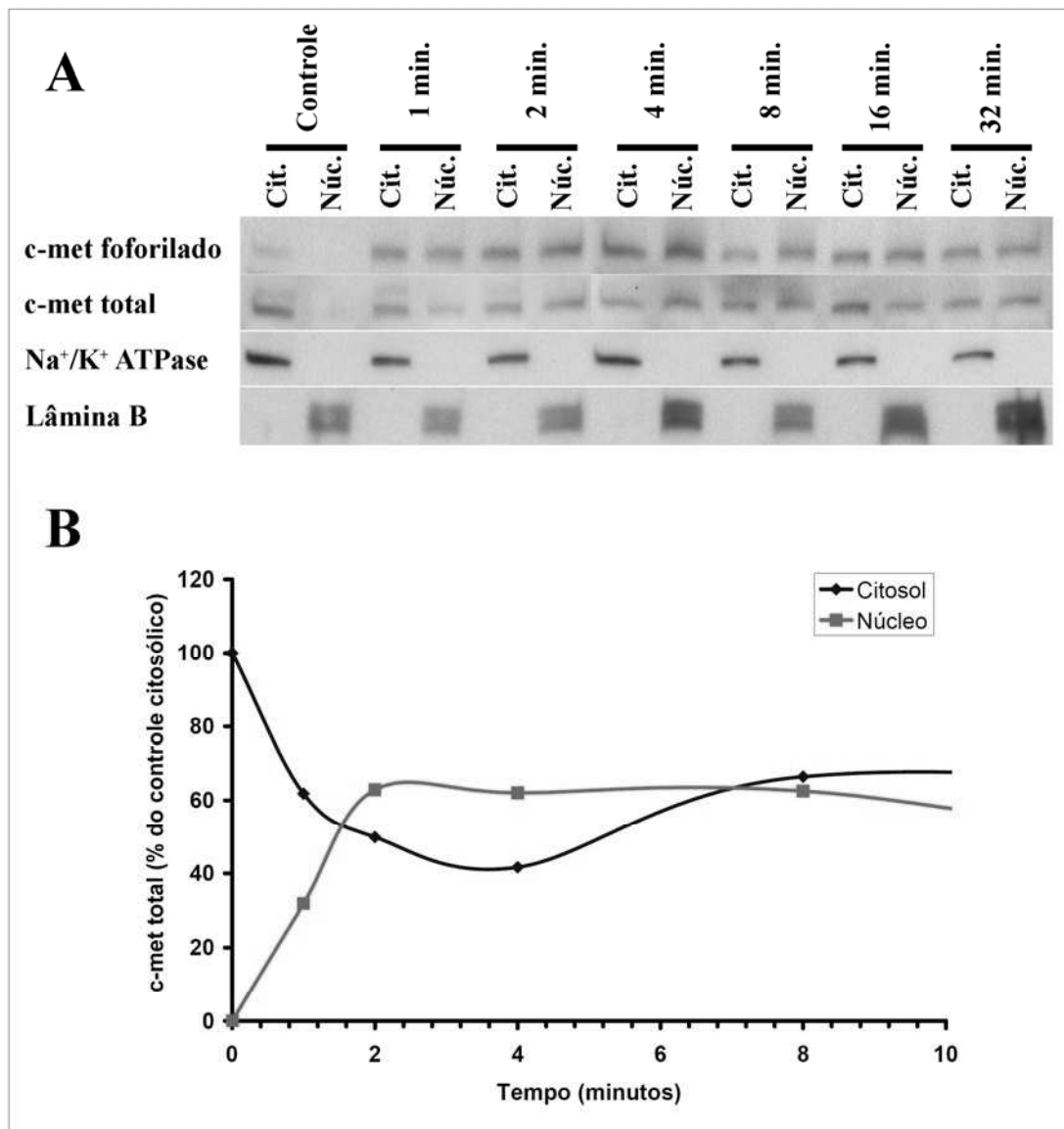


Figura 15. Ad-PV-NLS bloqueia a fosforilação de CDK1. (A) Western blots foram realizados utilizando anticorpos anti CDK1 fosforilado (painel superior) e anti CDK1 total (painel inferior). Células SkHep1 foram infectadas com as construções ad-DSR, ad-PV-NES, ad-PV-NLS e PV-NLS-CD. As amostras não infectadas foram chamadas de Controle. (B) Os resultados mostrados no painel A foram quantificados por densitometria e os valores obtidos foram normalizados em relação ao controle, células não infectadas, e divididos pelos níveis de CDK1 total. Os valores são representativos da média \pm EPM de três experimentos independentes. O asterisco representa $p < 0.05$.

8. O receptor de HGF (c-met) transloca-se para o núcleo de células SkHep1.

Após investigarmos algumas proteínas que podem ser reguladas pelo Ca^{2+} nuclear e citosólico, estudamos as vias intracelulares que levam à geração de Ca^{2+} nuclear. Inicialmente, investigamos se c-met é capaz de translocar para o núcleo. Nossa hipótese é que c-met possa ativar $\text{PLC}\gamma$ nuclear. Para testar esta hipótese primeiramente realizamos westerns das frações citosólicas e nucleares de células SkHep1 estimuladas por tempos crescentes com 100 ng/mL de HGF. Na figura 16A, c-met somente foi observado no citosol de células SkHep1 não estimuladas. Em contraste, após estimulação com 100 ng/mL de HGF c-met pode ser encontrado em frações nucleares mesmo após 1 minuto de estimulação (Figura 16A, B e C). O pico máximo de translocação e fosforilação acontece após 4 minutos de estimulação com HGF (Figura 16B e C). Anticorpos anti Na^+/K^+ ATPase e Lamina B foram usados como controles das frações citosólicas e nucleares, respectivamente (Figura 16A). Para comprovar a translocação de c-met para o núcleo também realizamos imunofluorescência de células SkHep1 antes e após 4 minutos de estimulação com 100 ng/mL de HGF (Figura 17A e B). Após 4 minutos de estimulação observamos c-met no núcleo de células SkHep1 (Figura 17B). Em conjunto estes resultados mostram que c-met transloca-se para o núcleo de células SkHep1.



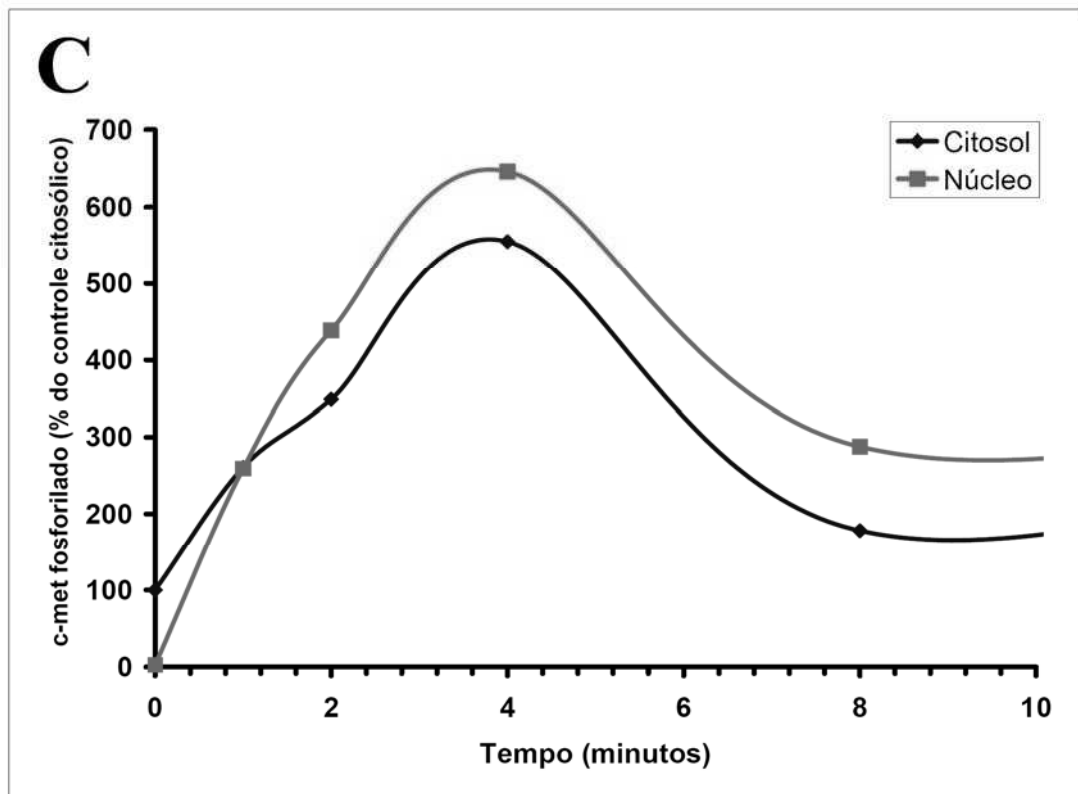


Figura 16. Tratamento com HGF induz translocação de c-met para o núcleo de células SkHep1. (A) Análises de western blot para c-met, c-met fosforilado, Na^+/K^+ ATPase (controle citosólico) e anti-lamina B (controle nuclear) de frações citosólicas (Cit.) e de núcleos isolados (Núc.) de células SkHep1 estimuladas por períodos crescentes de tempo com 100 ng/mL de HGF. (B) Os dados obtidos para c-met foram analisados por densitometria e normalizados em relação às frações citosólicas de células não estimuladas. (C) Os dados obtidos utilizando anticorpo anti c-met fosforilado foram analisados por densitometria e normalizados em relação às frações citosólicas de células não estimuladas. Os blots são representativos de quatro experimentos independentes.

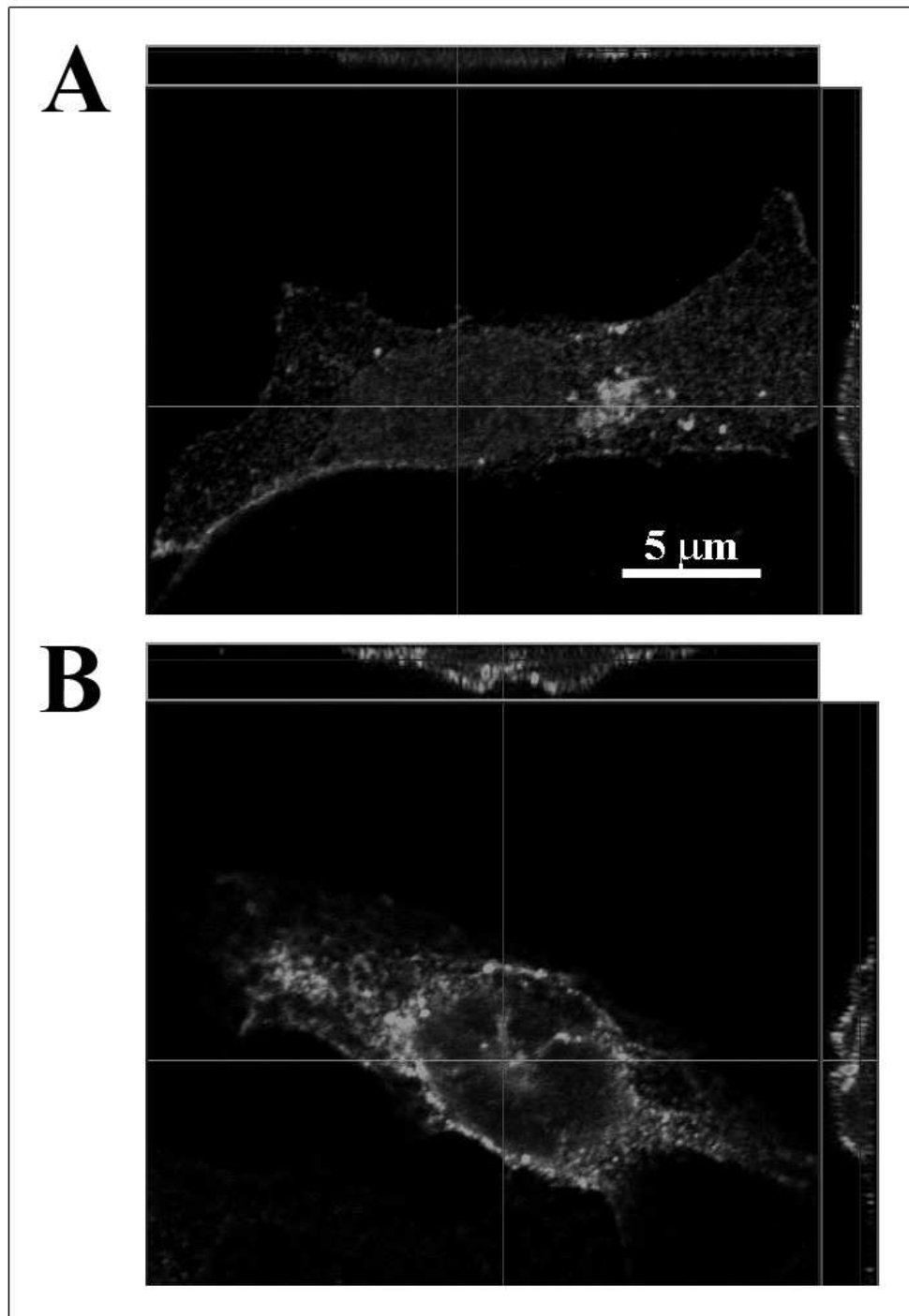


Figura 17. Receptor c-met transloca para o núcleo de células SkHep1. Reconstruções tridimensionais de imunofluorescências realizadas em células SkHep1 utilizando anticorpo anti c-met conjugado com alexa 488 (em verde) e Hoechst (em azul), indicando o núcleo. As reconstruções tridimensionais foram realizadas no software LSM 510 (Zeiss) e microscopia de dois fótons foi utilizada para excitar Hoechst a 380 nm. O painel A representa células SkHep1 não estimuladas e o painel B células estimuladas com 100 ng/mL de HGF por 4 minutos. As interseções entre as linhas verdes e vermelhas representam o interior dos núcleos de células SkHep1. Imagens representativas de três experimentos independentes.

9. PLC γ localiza-se no núcleo de células SkHep1.

Em seguida exploramos a possibilidade de que PLC γ possa estar no núcleo de células SkHep1. O domínio C terminal da subunidade β do c-met contém dois sítios de ligação à tirosina que sob autofosforilação liga-se a múltiplas proteínas que contêm domínios SH2 (Gual et al. 2000). A PLC γ é uma das proteínas que contém o domínio SH2 e tanto a interação entre PLC γ quanto sua fosforilação por c-met já foram relatados (Gual et al. 2000; Ponzetto et al. 1994; Okano et al. 1993). Como demonstrado, c-met transloca-se para o núcleo de células SkHep1 e a ativação de PLC γ presente no núcleo por c-met pode ser uma nova via de geração de InsP₃ nuclear. Para testarmos esta hipótese realizamos análises de western blots para PLC γ , Na⁺/K⁺ ATPase (controle citosólico), anti-lamina B (controle nuclear) de frações citosólicas (Cit.) e de núcleos isolados (Núc.) de células SkHep1. A figura 18A mostra que PLC γ está presente no citosol e no núcleo de células SkHep1. Para comprovar a presença de PLC γ no núcleo destas células realizamos imunofluorescências utilizando anticorpo anti PLC γ conjugado com alexa 488 (em verde) e Topro-3 (em azul) indicando o núcleo (Figura 18B). A imunofluorescência comprova que PLC γ está no núcleo de células SkHep1, como indicado pelas setas. Desse modo c-met transloca-se para o núcleo sugerindo, portanto uma nova via de ativação de Ca²⁺ nuclear. Em seguida exploramos a possibilidade de HGF gerar InsP₃ nuclear. Para estudarmos esta via intracelular, construções que podem quelar InsP₃ tanto no citosol quanto no núcleo foram utilizadas.

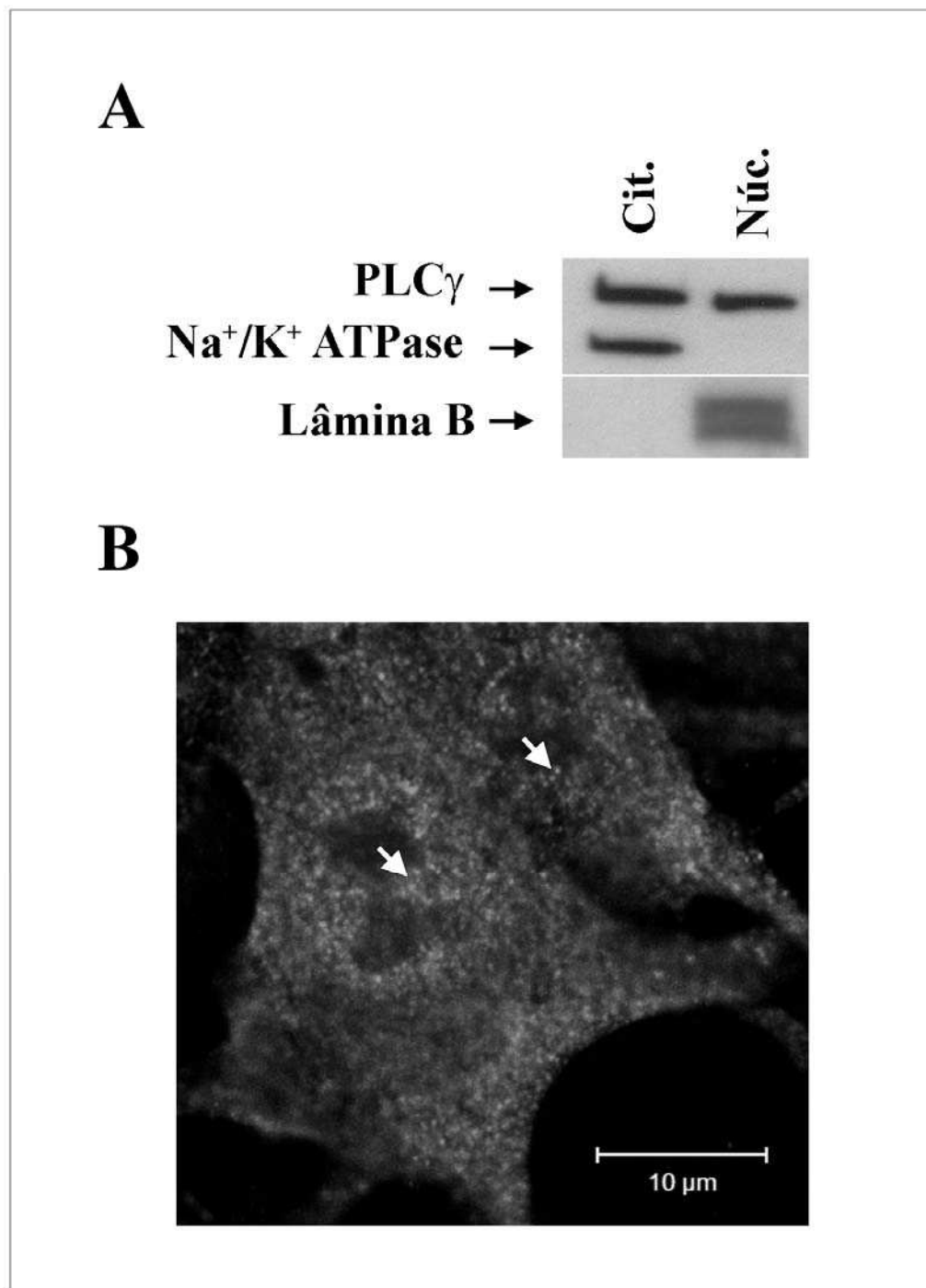


Figura 18. PLCγ localiza-se no núcleo de células SkHep1. (A) Análises de western blot para PLCγ, Na⁺/K⁺ ATPase (controle citosólico), anti-lamina B (controle nuclear) de frações citosólicas (Cit.) e de núcleos isolados (Núc.) de células SkHep1 não estimuladas. (B) Imunofluorescência realizada em células SkHep1 utilizando anticorpo anti PLCγ conjugado com alexa 488 (em verde) e Topro-3 (em azul) indicando o núcleo. Setas indicam a presença de PLCγ no núcleo. Fatias ópticas de 0.5 micrômetros foram realizadas tanto para PLCγ quanto para o Topro-3. Imagem representativa de quatro experimentos.

10. Localização das construções de InsP₃ Sponge.

Foi demonstrado que HGF aumenta Ca^{2+} primeiro no núcleo de células SkHep1 e que caged InsP₃ quando liberado dentro do núcleo de células induz a liberação de Ca^{2+} pelo retículo nucleoplasmático (Echevarria et al. 2003). Porém, as vias que levam à geração de InsP₃ dentro do núcleo ainda são matéria de especulação. Para estudarmos esta questão foram geradas construções que podem quelar InsP₃ tanto no núcleo quanto no citosol. Foi demonstrado que o sítio de ligação ao InsP₃ do receptor de InsP₃R (resíduos 224-605) foi efetivo em atenuar os sinais de Ca^{2+} citosólicos induzidos por ATP em células HEK 293 e COS-7 (Varnai et al. 2002; Uchiyama et al. 2002). A construção InsP₃R₂₂₄₋₆₀₅ fundida a proteína fluorescentes vermelha monomérica (mRFP) foi gentilmente fornecida pelo Dr. Tamas Balla (Varnai et al. 2002; Lin et al. 2005). Similarmente ao que foi feito com as construções de PV e CR, mRFP-InsP₃R₂₂₄₋₆₀₅ foi fundida a sequências de exclusão nuclear (NES) ou sequências de localização nuclear (NLS) no contexto de direcioná-las tanto para o citosol quanto para o núcleo, respectivamente. A construção mRFP-InsP₃R₂₂₄₋₆₀₅ fusionadas a NES ou NLS foram denominadas InsP₃ Sponge NES e InsP₃ Sponge NLS, consecutivamente (Figura 19).

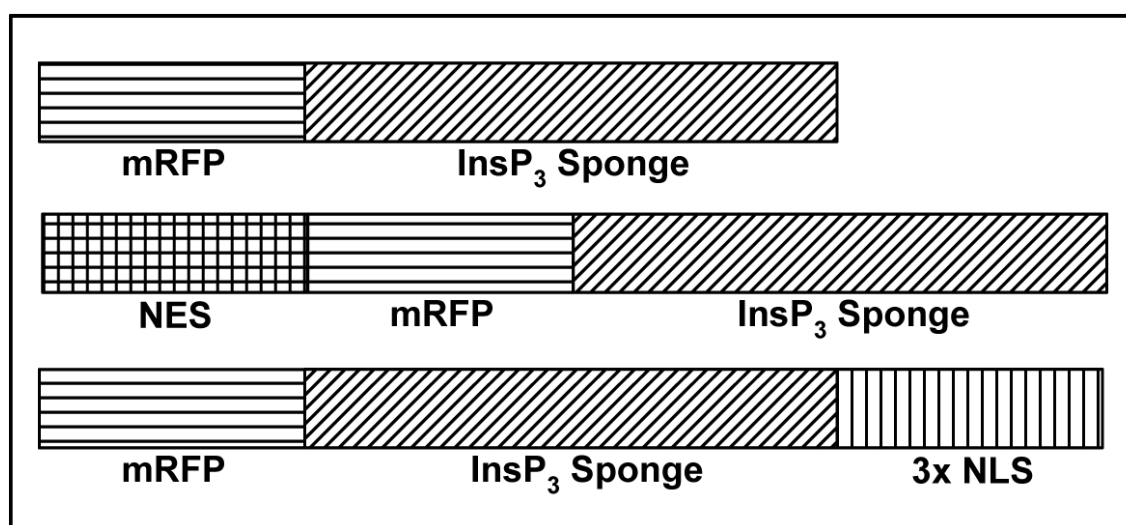


Figura 19: Representação esquemática das construções de InsP₃ Sponge fusionadas a mRFP. NLS representa a sequência de localização nuclear e NES representa a sequência de exclusão nuclear.

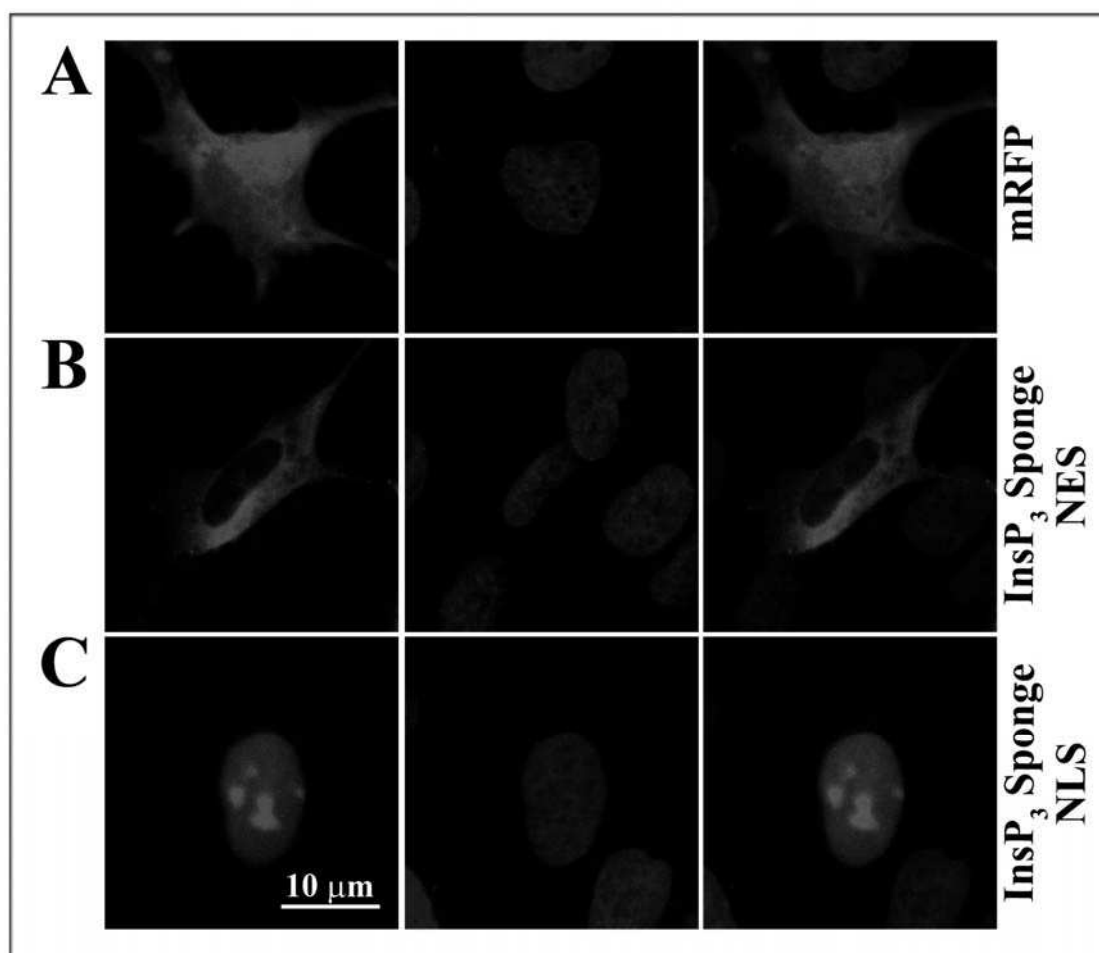


Figura 20. Localização subcelular das construções de InsP₃ Sponge. Células SkHep1 foram transientemente transfectadas tanto com os vetores de expressão (A) controle mRFP, (B) InsP₃ Sponge-NES ou (C) InsP₃ Sponge-NLS conforme indicado e então examinadas por microscopia confocal. Os InsP₃ Sponges fundidos a mRFP e ligados a NLS ou NES localizam-se no núcleo ou citosol, respectivamente (vermelho). A localização nuclear foi confirmada com o marcador nuclear específico Hoescht (Azul). Imagem representativa de 4 experimentos.

11. InsP₃ Sponge NLS suprime aumentos de Ca²⁺ induzidos por HGF

Estudamos se aumento de Ca²⁺ induzido por arginina vasopressina (AVP) ou HGF pode ser suprimido pela expressão de InsP₃ Sponge. Estes experimentos foram realizados para demonstrar se o aumento de Ca²⁺ induzido por HGF se deve à formação de InsP₃ nuclear. Observamos que a expressão transiente da InsP₃ Sponge NLS em células SkHep1 não afetou significativamente o aumento de Ca²⁺ induzido no citosol ou núcleo após estimulação com 5 nM de AVP (Figura 21A, B). Comparando com o controle, InsP₃ Sponge NLS reduziu o aumento de Ca²⁺ induzido por AVP de 402 ±33% para 373 ±31% (p>0.05) no citosol (Figura 21E) e de 525 ±26% para 426 ±44% (p>0.05) no núcleo (Figura 21F). Em contraste, InsP₃ Sponge NES suprimiu o aumento de Ca²⁺ induzido por AVP no citosol e núcleo (Figura 21C e D). As quantificações destes dados demonstraram que InsP₃ Sponge NES reduz significantivamente o aumento da fluorescência do fluo-4/AM no citosol de 386 ±52% para 134 ±16% (p<0.05) e no núcleo de 453 ±77% para 125 ±20% (p<0.05) comparado aos níveis do controle (Figura 21F). Estes resultados demonstram que o aumento de Ca²⁺ induzido por AVP é primariamente gerado no citosol, pois a expressão de InsP₃ Sponge NES bloqueia a resposta induzida por AVP tanto no citosol quanto no núcleo. A resposta de Ca²⁺ induzida por AVP observada por expressão de InsP₃ Sponge NLS é um indicativo de que o Ca²⁺ observado no núcleo é devido à difusão do Ca²⁺ citosólico.

Por outro lado, estimulando as células SkHep1 com 100 ng/mL de HGF, a expressão de InsP₃ Sponge NES não afetou o aumento de Ca²⁺ no citosol e no núcleo (Figura 22C e D). Quantificações destes resultados demonstraram que InsP₃ Sponge NES reduziu o aumento da fluorescência do fluo-4/AM induzido por HGF de 252 ±22% para 248 ±3% (p>0.05) no núcleo (Figura 22E), porém aumentou de 227 ±11% para 253

$\pm 33\%$ ($p > 0.05$) no núcleo (Figura 22F), quando comparado ao controle. Em contraste, a expressão de InsP_3 Sponge NLS suprimiu o aumento de Ca^{2+} induzido por HGF no núcleo e citosol (Figura 22B), quando comparado com células SkHep1 não transfectadas (Figura 22A). O aumento em Ca^{2+} núcleoplasmático induzido por HGF foi significativamente reduzido de $230 \pm 18\%$ para $115 \pm 15\%$ ($p < 0.05$) em células SkHep1 expressando InsP_3 Sponge NLS (Figura 22E). A construção InsP_3 Sponge NLS reduziu o aumento de Ca^{2+} induzido por HGF no citosol de $248 \pm 26\%$ para $108 \pm 8\%$, comparado com células não transfectadas. Estes resultados demonstram que o aumento de Ca^{2+} induzido por HGF em contraste com os resultados obtidos pelo AVP são principalmente gerados no núcleo, pois a expressão de InsP_3 Sponge NLS bloqueou a resposta induzida por HGF tanto no núcleo quanto no citosol. A resposta de Ca^{2+} induzida por HGF observada por expressão de InsP_3 Sponge NES é um indicativo de que o Ca^{2+} observado no citosol é devido à difusão do Ca^{2+} nuclear. Em conjunto, estes resultados sugerem que alguns agonistas como AVP podem gerar Ca^{2+} no citosol, enquanto outros como HGF podem gerar Ca^{2+} principalmente no núcleo.

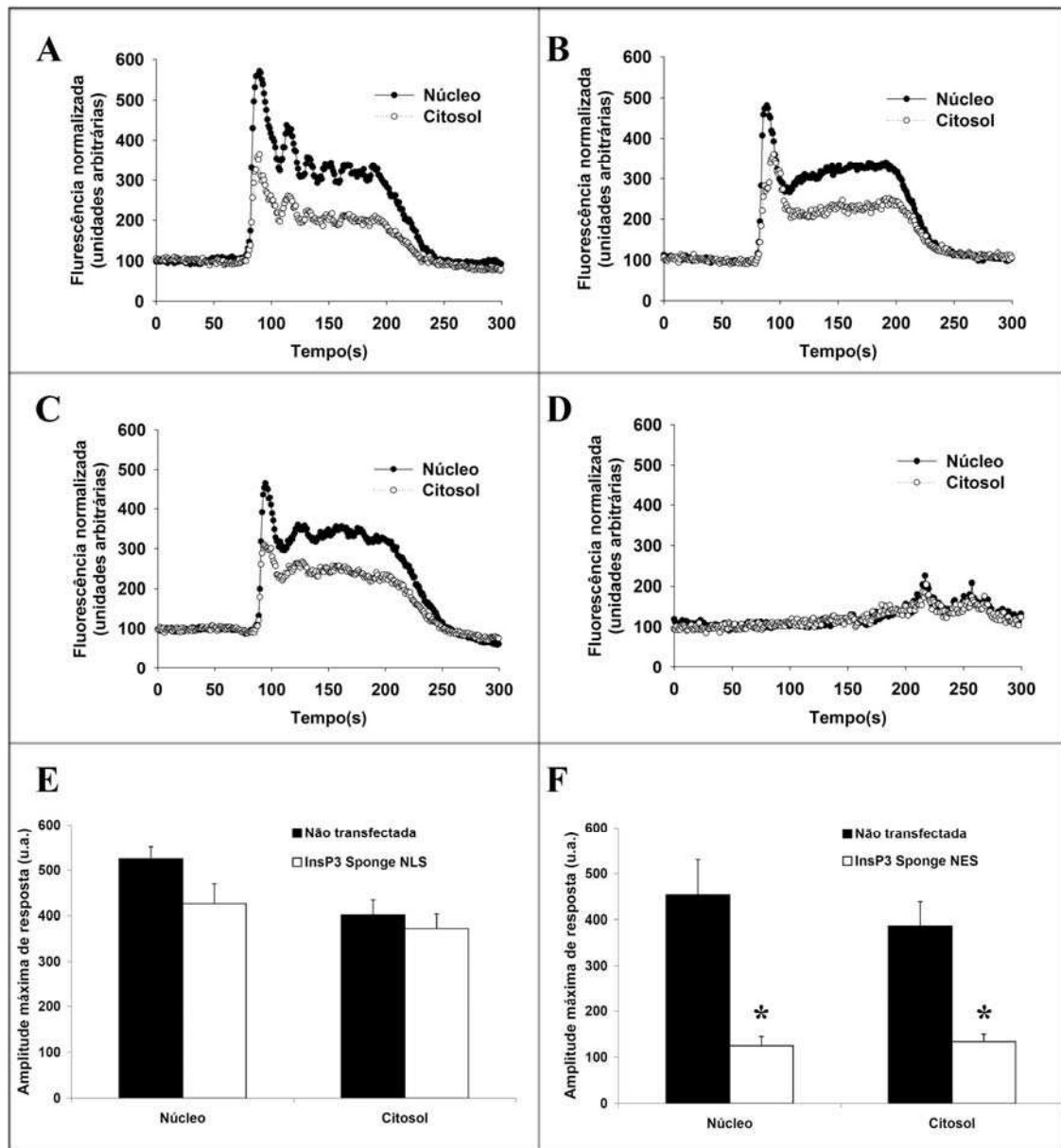


Figura 21. InsP₃ Sponge NES suprime aumento de Ca²⁺ induzido por AVP. Células SkHep1 expressando InsP₃ Sponge foram marcadas com a sonda fluorescente para Ca²⁺, fluo-4/AM, e subsequentemente estimuladas com 5 nM de AVP. As células foram monitoradas através de experimentos de decurso temporal por microscopia confocal. (A) Células não transfectadas e (B) transfectadas com InsP₃ Sponge NLS. (C) Células não transfectadas e (D) transfectadas com InsP₃ Sponge NES. (E) Resumo dos dados de células isoladas representadas em (A) e (B). Os resultados mostram a percentagem de aumento da fluorescência do fluo-4/AM induzido por AVP, em relação à linha de base, e são representativos de no mínimo 6 células não transfectadas e transfectadas com InsP₃ Sponge NLS. (F) Resumo dos dados obtidos em células isoladas representadas em (C) e (D). Os resultados mostram a percentagem de aumento da fluorescência do fluo-4/AM induzido por AVP, em relação à linha de base, e são representativos de no mínimo 6 células não transfectadas e transfectadas com InsP₃ Sponge NES. O asterisco representa $p < 0.05$.

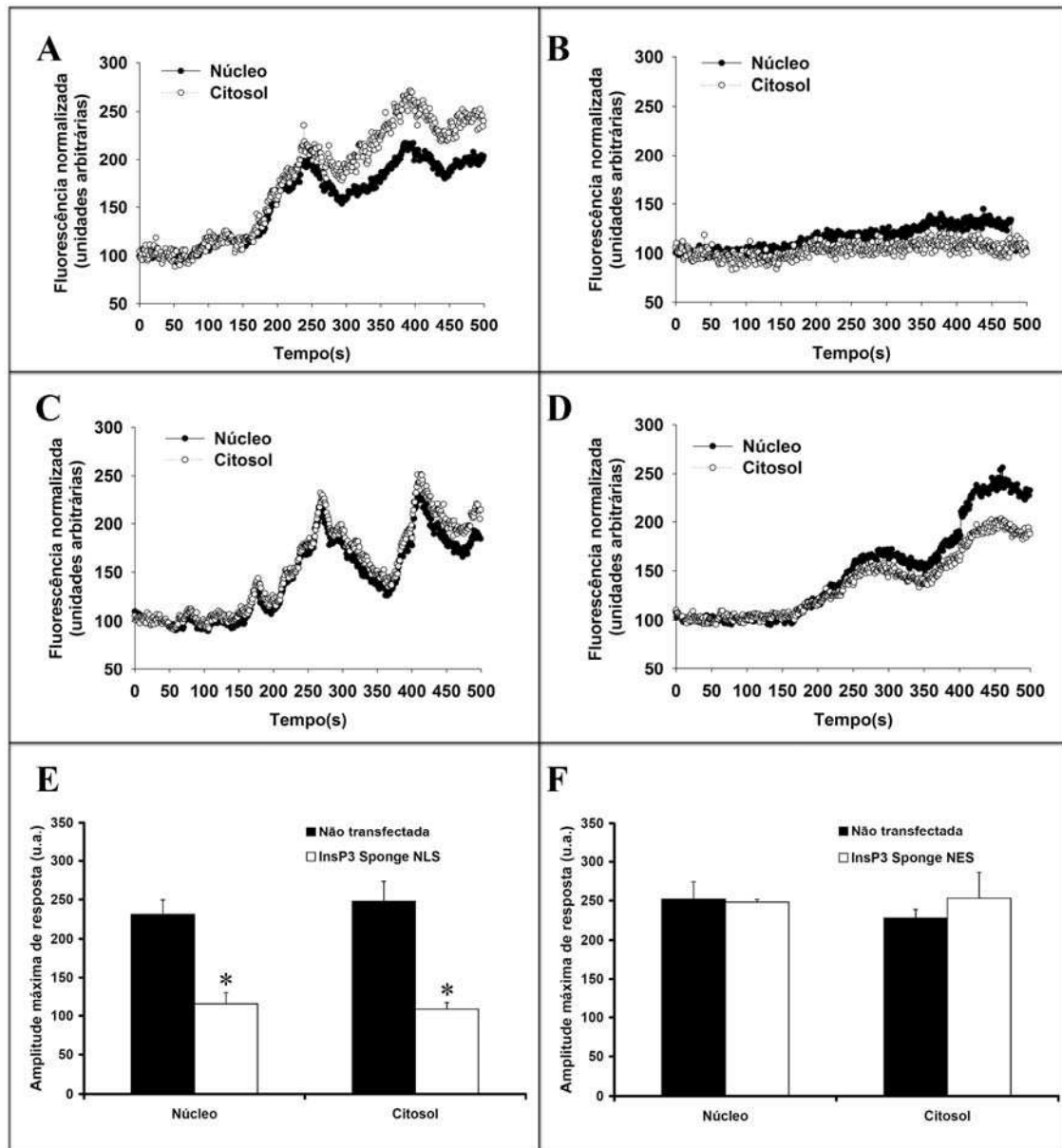


Figura 22. InsP₃ Sponge NLS suprime aumento de Ca²⁺ induzido por HGF. Células SkHep1 expressando InsP₃ Sponge foram marcadas com a sonda fluorescente para Ca²⁺, fluo-4/AM, e subsequentemente estimuladas com 100 ng/mL de HGF. As células foram monitoradas através de experimentos de decurso temporal por microscopia confocal. (A) Células não transfectadas e (B) transfectadas com InsP₃ Sponge NLS. (C) Células não transfectadas e (D) transfectadas com InsP₃ Sponge NES. (E) Resumo dos dados de células isoladas mostradas em (A) e (B). Os resultados mostram a percentagem de aumento da fluorescência do fluo-4/AM induzido por HGF, em relação à linha de base, e são representativos de no mínimo 7 células não transfectadas e transfectadas com InsP₃ Sponge NLS. (F) Resumo dos dados de células isoladas mostradas em (C) e (D). Os resultados mostram a percentagem de aumento da fluorescência do fluo-4/AM induzido por HGF, em relação à linha de base, e são representativos de no mínimo 8 células não transfectadas e transfectadas com InsP₃ Sponge NES. O asterisco representa $p < 0.05$.

5. Discussão e Conclusões

O Ca^{2+} citosólico é um sinal altamente versátil e que pode regular muitos processos celulares (Berridge et al. 2003). Os sinais de Ca^{2+} também podem ser gerados em diversos compartimentos celulares incluindo o nucleoplasma (Gerasimenko et al. 1995; Echevarria et al. 2003; Leite et al. 2003). Resultados experimentais fornecem evidências funcionais de que InsP_3 pode liberar Ca^{2+} através de InsP_3Rs presente no retículo endoplasmático. Apesar das inúmeras publicações nesta área os mecanismos que levam a sinalização de Ca^{2+} nuclear ainda continuam controversos.

A maioria dos experimentos descritos para explorar a sinalização de Ca^{2+} nuclear foram realizados com indicadores fluorescentes adicionados em células permeabilizadas ou injetados diretamente em núcleos isolados (Carafoli et al. 1997). Como alternativa para estas metodologias, demonstramos inicialmente que a expressão de PV no núcleo ou citosol reduzia nestes compartimentos subcelulares, o aumento de Ca^{2+} induzido por agonistas (Pusl et al. 2002; Thompson et al. 2003). Os resultados apresentados aqui, estendem estas nossas observações anteriores mostrando que a CR, proteína que se liga ao Ca^{2+} , pode também ser direcionada seletivamente para o núcleo ou citosol e subsequentemente atenuar a sinalização de Ca^{2+} especificamente nestes compartimentos subcelulares. Estes achados demonstram a generalidade da expressão das proteínas que se ligam ao Ca^{2+} como ferramentas para seletivamente tamponar a sinalização de Ca^{2+} em compartimentos subcelulares.

A CR apresenta propriedades de ligação ao Ca^{2+} que são distintas daquelas da PV. Desse modo, a CR apresenta cinco domínios de ligação ao Ca^{2+} funcionais enquanto a PV contém dois (Schwaller et al. 2002). Além disso, CR não se liga a Mg^{2+} (Schwaller et al. 2002). Estas propriedades únicas de ligação ao Ca^{2+} provavelmente tornam a CR um supressor mais potente da sinalização de Ca^{2+} quando comparada a PV. Porém, quando PV e CR foram expressas em níveis comparáveis em células

SkHep1 observamos que, quando expressas no núcleo, a PV e a CR foram similarmente efetivas na supressão dos aumentos de Ca^{2+} induzidos por ATP. Resultados semelhantess foram obtidos quando a PV e CR foram direcionadas para o citoplasma. Nossos resultados foram similares aos obtidos em oócitos de *Xenopus*, onde foi demonstrado que a PV comporta-se de maneira semelhante a CR (Dargan et al. 2004).

O aprimoramento das construções testadas neste trabalho, em relação aquelas previamente publicadas pelo nosso grupo, reflete-se no fato de que as proteínas foram fusionadas ao DSR ao invés de GFP. A utilização dessa estratégia tem a vantagem de evitar possíveis incompatibilidades com o espectro de emissão e excitação da GFP com indicadores de Ca^{2+} , tais como fura-2 e fluo-4/AM (Bolsover et al. 2001). Desse modo as construções utilizadas são mais compatíveis com uma ampla gama de indicadores de Ca^{2+} . Além disso, aprimoramos as construções de PV através da utilização de infecção viral (adenovírus) ao invés de transfecções transientes. Adenovírus são largamente usados e sendo vírus de dupla fita de DNA podem aceitar fragmentos de até 7Kb. Desse modo permite a produção de altos títulos virais atingindo altas taxas de infecção mesmo em células que não estão em divisão. A expressão é transiente como uma consequência de raras integrações no genoma do hospedeiro e integrações extracromossomais. Uma das grandes vantagens dos sistemas adenovirais é a possibilidade de infecção de tecidos em cultura ou de animais vivos. As desvantagens incluem respostas inflamatórias e imunes do hospedeiro (revisado em Partridge and Oreffo 2004).

Após a caracterização das construções de PV e CR na cinética da sinalização de Ca^{2+} em células SkHep1 estudamos vias intracelulares que poderiam ser afetadas pelas construções de PV direcionadas para o núcleo ou citosol. Como demonstramos a construção PV-NES bloqueou a fosforilação de Erk 1 e a tradução de p38. Alguns artigos descrevem que a via Ras-Erk pode ser modulada por proteínas que se ligam à

calmodulina. Em células PC12 ou neurônios ativação prolongada da via Ras-Erk induz parada do crescimento celular ligada à sobrevivência e diferenciação. Em contraste, em outros tipos celulares tais como fibroblastos ou queratinócitos, uma ativação prolongada da via Ras-Erk leva a uma parada do ciclo celular ligado a senescência ou apoptose. Nestas células, Ca^{2+} e calmodulina tem nítido efeito inibitório na ativação da via de Erk (revisado em Agell et al. 2002). Por outro lado, como o Ca^{2+} pode modular a transcrição ou tradução da p38 ainda é matéria de especulação.

Resultados do laboratório de Lucio Cocco sugerem que Erk fosforila PLC β nuclear (Cocco et al. 2002; Martelli et al. 2000; Martelli et al. 1999). Os nossos resultados mostram que o Ca^{2+} citosólico é importante modulador da fosforilação destas MAPKs. Em conjunto estes resultados sugerem que as ErKs podem contribuir para a modulação ou geração do Ca^{2+} nuclear, mas como estas MAPKs parecem ser dependentes do Ca^{2+} citosólico, elas não podem ser responsáveis pela geração de Ca^{2+} nuclear independente do Ca^{2+} citosólico.

É sabido que células eurarióticas requerem Ca^{2+} extracelular para crescer e proliferar em cultura. Balk, em 1971, reportou que a proliferação de fibroblatos é estritamente dependente da concentração extracelular de Ca^{2+} . Estas células tornaram-se quiescentes se mantidas em meio deficiente de Ca^{2+} por três dias, mesmo na presença de fatores de crescimento. Quando adicionou-se quantidades fisiológicas de Ca^{2+} nas culturas celulares, a síntese de DNA retornou dentro de algumas horas, seguida por divisão celular (Balk et al. 1973). Observações semelhantes foram descritas também em fibroblastos humanos (Boynton et al. 1977; Hazelton et al. 1979; Tupper et al. 1980; Takuwa et al. 1993), de camundongo (MacManus et al. 1975; Nicholson et al. 1984; Takuwa et al. 1991) e em outros tipos de células (Whitfield et al. 1980; Veigl et al. 1984; Boynton 1988; Gardner 1989), excetuando células da paratireóide (Sakaguchi

1992) e quaternários (Hennings and Holbrook 1982). Dulbecco e Elkington (1975) demonstraram que entre os componentes dos meios de cultura celular, somente o CaCl_2 induz replicação de DNA em células 3T3 de camundongos Balb/c inibidas por contato. Esses autores também encontraram que cultivos prolongados destas células na presença suprafisiológica de CaCl_2 (5.4 mM) por 6 dias resultam em alterações na morfologia e densidade celulares saturantes (Dulbecco and Elkington 1975).

Mais de 50 anos se passaram desde que Howard e Pele descreveram o ciclo celular e suas fases. Todavia, somente estudos recentes revelaram que o ciclo celular é um evento altamente conservado e ordenado (Golias et al. 2004). O ciclo celular em células eucarióticas consiste em quatro fases: G1, S, G2 and M. O DNA é replicado durante a fase S, onde as histonas necessárias para a nova cromatina são sintetizadas durante a fase G1. Outras proteínas são também sintetizadas na fase G1, e sua síntese continua aumentando durante a fase G2, aumentando significativamente a massa celular. No final da fase G2 as células progridem para a fase M. Os atores principais na inicialização e progressão do ciclo celular são as cinases do ciclo celular (CDK's) as quais se tornam ativadas por associação com as ciclinas. Várias ciclinas são sintetizadas e degradadas em fases específicas do ciclo celular. Ciclinas C, D, e E, são essenciais para a progressão do ciclo celular na fase S, e são sintetizadas durante a fase G1. As ciclinas A e B essenciais para a entrada na mitose são sintetizadas durante a fase G2. Os mecanismos que levam a ativação das CDK's não são completamente entendidos. Sugeriu-se que segundos mensageiros regulam as cascatas de proteínas cinases que podem eventualmente resultar em sua ativação. Entre os segundos mensageiros o Ca^{2+} parece ter importância especial (revisado por Santella 1998).

Estudos realizados em nosso laboratório pela estudante Michele Rodrigues demonstram que células SkHep1 infectadas com PV-NLS perdem a capacidade de

multiplicar. Não se observou este efeito em células infectadas com PV-NES. Células SkHep1 param de multiplicar-se exatamente no início da prófase, pois as células perdem a capacidade de dividir os centríolos (dados ainda não publicados). Em conjunto estes resultados mostram que realmente o Ca^{2+} nuclear é um importante regulador do ciclo celular.

Após explorar algumas vias intracelulares que podem ser moduladas pelo Ca^{2+} nuclear e citosólico também estudamos vias que podem ser responsáveis pela a geração do Ca^{2+} nuclear. O domínio C terminal da subunidade β do c-met contém dois sítios de ligação à tirosina o qual sob autofosforilação liga-se a múltiplas proteínas que contém domínios SH2 (Gual et al. 2000). A PLC γ é uma das proteínas que contém o domínio SH2 e tanto a interação entre PLC γ quanto sua fosforilação por c-met foi relatado (Gual et al. 2000; Ponzetto et al. 1994; Okano et al. 1993). A nossa hipótese é que c-met ativa diretamente PLC γ presente no núcleo levando à hidrólise de PIP $_2$, formação InsP $_3$ e consequentemente liberação de Ca^{2+} do retículo nucleoplasmático para o interior do nucleoplasma através dos InsP $_3$ Rs. Corroborando nossa hipótese, observamos que c-met pode translocar-se para o núcleo de maneira rápida e capaz de gerar Ca^{2+} no núcleo. O pico de translocação de c-met para o núcleo ocorre em torno de 4 minutos e o pico da resposta de Ca^{2+} induzida por HGF é observado após 5 minutos. Análises de western blots e imunofluorescência também identificaram a presença de PLC γ no núcleo de células SkHep1. Em conjunto, estes resultados suportam a idéia que c-met possa vir a ativar PLC γ presente no envelope nuclear, e assim gerar InsP $_3$ no nucleoplasma, com conseqüente aumento de Ca^{2+} nuclear.

Exploramos também a hipótese de HGF gerar InsP $_3$ no nucleoplasma de células SkHep1. Para isso, produzimos construções que quelam InsP $_3$ no citosol ou núcleo. Assim, células SkHep1 foram transfectadas transientemente por 48h com as construções

de InsP_3 Sponge e a resposta de Ca^{2+} induzida por AVP ou HGF foram comparadas e analisadas. A construção InsP_3 Sponge NES praticamente aboliu a resposta de Ca^{2+} induzida por AVP tanto no núcleo quanto no citosol de células SkHep1. Por outro lado, nenhuma redução do Ca^{2+} citosólico ou nuclear foi observado em células estimuladas com HGF. Estes resultados mostram que AVP gera InsP_3 principalmente no citosol. Em contranste, a construção InsP_3 Sponge NLS reduz drasticamente a resposta de Ca^{2+} induzida por HGF, tanto no núcleo quanto no citosol. No entanto, a resposta de Ca^{2+} induzida por AVP, tanto no citosol quanto no núcleo, não foi alterada pela construção InsP_3 Sponge NLS. Nossos resultados são pioneiros, ao demonstrarmos que HGF gera InsP_3 principalmente no núcleo de celular, com conseqüente aumento de Ca^{2+} nuclear. Este aumento de Ca^{2+} no nucleoplasma difere do aumento de Ca^{2+} nuclear observado após estimulação com AVP, cujo Ca^{2+} é proveniente da difusão do Ca^{2+} citoplasmático. Em conjunto, nossos dados mostram que o HGF pode produzir InsP_3 e consequentemente Ca^{2+} no núcleo de células SkHep1.

Com estas evidências experimentais iremos agora explorar com mais detalhes como c-met está envolvido na geração de InsP_3 e Ca^{2+} no núcleo de células SkHep1. Posteriormente, estudaremos se estes mecanismos existem em outros modelos celulares. Atualmente estamos desenvolvendo c-met em fusão com GFP. Esperamos com esta construção observar a translocação de c-met em tempo real após estimulação com HGF.

Apesar da interação entre $\text{PLC}\gamma$ e c-met ter sido observado anteriormente, planejamos realizar algumas coimunoprecipitações para demonstrarmos esta interação nas frações nucleares (Gual et al. 2000; Ponzetto et al. 1994; Okano et al. 1993). Planejando também produzir siRNAs para a proteína Gab1 que pode ser a responsável por levar c-met para o núcleo. Se a translocação de c-met for bloqueada pelo knockdown de Gab1 demonstraremos experimentalmente que a geração de Ca^{2+} no

núcleo realmente dependente da translocação de c-met. Iremos também realizar coimunoprecipitações de c-met e PLC γ , após tratamento com siRNA para Gab1, caso não seja observado interação entre estas proteínas nas frações nucleares. Esperamos assim ter evidências experimentais demonstrando que a interação c-met/PLC γ é necessária para a geração de Ca²⁺ nuclear.

Conclusões

Várias evidências demonstraram que a introdução de segundos mensageiros dentro do núcleo induz sinais de Ca²⁺ independentes das mudanças do Ca²⁺ citosólico (Gerasimenko et al. 1995; Hennager et al. 1995; Santella and Kyozuka 1997). O aumento de Ca²⁺ nuclear e citoplasmático tem efeitos diferentes nas atividades nucleares, e assim, é importante saber a origem precisa destes sinais de Ca²⁺ (Lipp et al. 1997). Neste trabalho, obtivemos evidências experimentais que c-met gera sinais de Ca²⁺ especificamente dentro do núcleo. Entretanto, continuam em aberto às questões sobre os mecanismos pelos quais a sinalização de Ca²⁺ nuclear torna-se ativada. Avanços neste campo irão resultar no entendimento das fontes e da natureza dos sinais que modulam o Ca²⁺ nuclear. Outra questão importante refere-se à relevância das funções distintas do retículo núcleoplasmático. Muitos tipos celulares regulam processos dependentes de Ca²⁺ citosólico por regulação de regiões nas quais o Ca²⁺ citosólico possa ser liberado. Neste trabalho, demonstramos que as MAPKs são dependentes do Ca²⁺ citosólico e por outro lado que a fosforilação de CDK1 é dependente dos níveis de Ca²⁺ nuclear. Continua para ser estudado se o retículo núcleoplasmático exerce níveis de controle espaciais sobre os processos dependentes de Ca²⁺ em regiões distintas do núcleo. As respostas destas questões irão ajudar nosso

entendimento dos modos pelos quais os sinais de Ca^{2+} estão integrados para regular funções celulares em condições de saúde e doença.

6. Referências bibliográficas

- Agell,N., Bachs,O., Rocamora,N., and Villalonga,P. 2002. Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca(2+), and calmodulin. *Cell Signal.* **14**: 649-654.
- Allbritton,N.L., Oancea,E., Kuhn,M.A., and Meyer,T. 1994. Source of nuclear calcium signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**: 12458-12462.
- Bachs,O., Agell,N., and Carafoli,E. 1992. Calcium and calmodulin function in the cell nucleus. *Biochim. Biophys. Acta* **1113**: 259-270.
- Balk,S.D., Whitfield,J.F., Youdale,T., and Braun,A.C. 1973. Roles of calcium, serum, plasma, and folic acid in the control of proliferation of normal and Rous sarcoma virus-infected chicken fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **70**: 675-679.
- Berridge,M.J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**: 315-325.
- Berridge,M.J. 2002. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* **32**: 235-249.
- Berridge,M.J., Bootman,M.D., and Roderick,H.L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 517-529.
- Bolsover,S., Ibrahim,O., O'lunaigh,N., Williams,H., and Cockcroft,S. 2001. Use of fluorescent Ca²⁺ dyes with green fluorescent protein and its variants: problems and solutions. *Biochem. J.* **356**: 345-352.
- Boronenkov,I.V., Loijens,J.C., Umeda,M., and Anderson,R.A. 1998. Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors. *Mol. Biol. Cell* **9**: 3547-3560.
- Boynton,A.L. 1988. Calcium and epithelial cell proliferation. *Miner. Electrolyte Metab* **14**: 86-94.
- Boynton,A.L., Whitfield,J.F., Isaacs,R.J., and Tremblay,R.G. 1977. Different extracellular calcium requirements for proliferation of nonneoplastic, preneoplastic, and neoplastic mouse cells. *Cancer Res.* **37**: 2657-2661.
- Brini,M., Murgia,M., Pasti,L., Picard,D., Pozzan,T., and Rizzuto,R. 1993. Nuclear Ca²⁺ concentration measured with specifically targeted recombinant aequorin. *EMBO J.* **12**: 4813-4819.
- Bustamante,J.O. 1994. Nuclear electrophysiology. *J. Membr. Biol.* **138**: 105-112.
- Carafoli,E., Nicotera,P., and Santella,L. 1997. Calcium signalling in the cell nucleus. *Cell Calcium* **22**: 313-319.
- Carrion,A.M., Link,W.A., Ledo,F., Mellstrom,B., and Naranjo,J.R. 1999. DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature* **398**: 80-84.
- Chawla,S., Hardingham,G.E., Quinn,D.R., and Bading,H. 1998. CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* **281**: 1505-1509.

- Clapham,D.E. 1995. Calcium signaling. *Cell* **80**: 259-268.
- Clark,E.A. and Brugge,J.S. 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**: 233-239.
- Cocco,L., Martelli,A.M., Vitale,M., Falconi,M., Barnabei,O., Stewart,G.R., and Manzoli,F.A. 2002. Inositides in the nucleus: regulation of nuclear PI-PLC β 1. *Adv. Enzyme Regul.* **42**: 181-193.
- Collings,D.A., Carter,C.N., Rink,J.C., Scott,A.C., Wyatt,S.E., and Allen,N.S. 2000. Plant nuclei can contain extensive grooves and invaginations. *Plant Cell* **12**: 2425-2440.
- Dargan,S.L., Schwaller,B., and Parker,I. 2004. Spatiotemporal patterning of IP₃-mediated Ca²⁺ signals in *Xenopus* oocytes by Ca²⁺-binding proteins. *J. Physiol* **556**: 447-461.
- Divecha,N., Banfic,H., and Irvine,R.F. 1991. The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus. *EMBO J.* **10**: 3207-3214.
- Dulbecco,R. and Elkington,J. 1975. Induction of growth in resting fibroblastic cell cultures by Ca⁺⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **72**: 1584-1588.
- Echevarria,W., Leite,M.F., Guerra,M.T., Zipfel,W.R., and Nathanson,M.H. 2003. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* **5**: 440-446.
- Fox,J.L., Burgstahler,A.D., and Nathanson,M.H. 1997. Mechanism of long-range Ca²⁺ signalling in the nucleus of isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* **326 (Pt 2)**: 491-495.
- Fricker,M., Hollinshead,M., White,N., and Vaux,D. 1997. Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* **136**: 531-544.
- Gardner,P. 1989. Calcium and T lymphocyte activation. *Cell* **59**: 15-20.
- Gensburger,C., Freyermuth,S., Klein,C., and Malviya,A.N. 2003. In vivo nuclear Ca²⁺-ATPase phosphorylation triggers intermediate size molecular transport to the nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**: 1225-1228.
- Gerasimenko,O.V., Gerasimenko,J.V., Tepikin,A.V., and Petersen,O.H. 1995. ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from the nuclear envelope. *Cell* **80**: 439-444.
- Golias,C.H., Charalabopoulos,A., and Charalabopoulos,K. 2004. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int. J. Clin. Pract.* **58**: 1134-1141.
- Gual,P., Giordano,S., Williams,T.A., Rocchi,S., Van Obberghen,E., and Comoglio,P.M. 2000. Sustained recruitment of phospholipase C- γ to Gab1 is required for HGF-induced branching tubulogenesis. *Oncogene* **19**: 1509-1518.

- Hardingham, G.E., Chawla, S., Johnson, C.M., and Bading, H. 1997. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* **385**: 260-265.
- Hardingham, G.E., Cruzalegui, F.H., Chawla, S., and Bading, H. 1998. Mechanisms controlling gene expression by nuclear calcium signals. *Cell Calcium* **23**: 131-134.
- Hazelton, B., Mitchell, B., and Tupper, J. 1979. Calcium, magnesium, and growth control in the WI-38 human fibroblast cell. *J. Cell Biol.* **83**: 487-498.
- Hennager, D.J., Welsh, M.J., and DeLisle, S. 1995. Changes in either cytosolic or nucleoplasmic inositol 1,4,5-trisphosphate levels can control nuclear Ca^{2+} concentration. *J. Biol. Chem.* **270**: 4959-4962.
- Jacob, S.N., Choe, C.U., Uhlen, P., DeGray, B., Yeckel, M.F., and Ehrlich, B.E. 2005. Signaling microdomains regulate inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated intracellular calcium transients in cultured neurons. *J. Neurosci.* **25**: 2853-2864.
- Koppler, P., Matter, N., and Malviya, A.N. 1993. Evidence for stereospecific inositol 1,3,4,5-[^3H]tetrakisphosphate binding sites on rat liver nuclei. Delineating inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate interaction in nuclear calcium signaling process. *J. Biol. Chem.* **268**: 26248-26252.
- Kramer, A., Lukas, J., and Bartek, J. 2004. Checking out the centrosome. *Cell Cycle* **3**: 1390-1393.
- Lee, M.A., Dunn, R.C., Clapham, D.E., and Stehno-Bittel, L. 1998. Calcium regulation of nuclear pore permeability. *Cell Calcium* **23**: 91-101.
- Leite, M.F., Hirata, K., Pusch, T., Burgstahler, A.D., Okazaki, K., Ortega, J.M., Goes, A.M., Prado, M.A., Spray, D.C., and Nathanson, M.H. 2002. Molecular basis for pacemaker cells in epithelia. *J. Biol. Chem.* **277**: 16313-16323.
- Leite, M.F. and Nathanson, M.H. 2001. Ca^{2+} Signaling in the liver. *In* The liver: Biology and Pathobiology. Edited by I.M.Arias, J.L.Boyer, F.V.Chisari, N.Fausto, D.Schachter, and D.A.Shafritz. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp. 537-554.
- Leite, M.F., Thrower, E.C., Echevarria, W., Koulen, P., Hirata, K., Bennett, A.M., Ehrlich, B.E., and Nathanson, M.H. 2003. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**: 2975-2980.
- Lin, S.Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K.Y., Bourguignon, L., and Hung, M.C. 2001. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat. Cell Biol.* **3**: 802-808.
- Lin, X., Varnai, P., Csordas, G., Balla, A., Nagai, T., Miyawaki, A., Balla, T., and Hajnoczky, G. 2005. Control of calcium signal propagation to the mitochondria by inositol 1,4,5-trisphosphate-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **280**: 12820-12832.
- Lipp, P., Thomas, D., Berridge, M.J., and Bootman, M.D. 1997. Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *EMBO J.* **16**: 7166-7173.

- Lui,P.P., Kong,S.K., Kwok,T.T., and Lee,C.Y. 1998. The nucleus of HeLa cell contains tubular structures for Ca²⁺ signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**: 88-93.
- MacManus,J.P., Whitfield,J.F., Boynton,A.L., and Rixon,R.H. 1975. Role of cyclic nucleotides and calcium in the positive control of cell proliferation. *Adv. Cyclic. Nucleotide. Res.* **5**: 719-734.
- Mak,D.O. and Foskett,J.K. 1994. Single-channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor currents revealed by patch clamp of isolated *Xenopus* oocyte nuclei. *J. Biol. Chem.* **269**: 29375-29378.
- Malviya,A.N. 1994. The nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors. *Cell Calcium* **16**: 301-313.
- Malviya,A.N., Rogue,P., and Vincendon,G. 1990. Stereospecific inositol 1,4,5-[³²P]trisphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**: 9270-9274.
- Martelli,A.M., Billi,A.M., Manzoli,L., Faenza,I., Aluigi,M., Falconi,M., De,P.A., Gilmour,R.S., and Cocco,L. 2000. Insulin selectively stimulates nuclear phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) beta1 activity through a mitogen-activated protein (MAP) kinase-dependent serine phosphorylation. *FEBS Lett.* **486**: 230-236.
- Martelli,A.M., Cocco,L., Bareggi,R., Tabellini,G., Rizzoli,R., Ghibellini,M.D., and Narducci,P. 1999. Insulin-like growth factor-I-dependent stimulation of nuclear phospholipase C-beta1 activity in Swiss 3T3 cells requires an intact cytoskeleton and is paralleled by increased phosphorylation of the phospholipase. *J. Cell Biochem.* **72**: 339-348.
- Mignery,G.A., Sudhof,T.C., Takei,K., and De Camilli,P. 1989. Putative receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate similar to ryanodine receptor. *Nature* **342**: 192-195.
- Nagy,P., Bisgaard,H.C., Schnur,J., and Thorgeirsson,S.S. 2000. Studies on hepatic gene expression in different liver regenerative models. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**: 591-595.
- Nicholson,N.B., Chen,S., Blanck,G., and Pollack,R. 1984. SV40 transformation of Swiss 3T3 cells can cause a stable reduction in the calcium requirement for growth. *J. Cell Biol.* **99**: 2314-2321.
- Nowycky,M.C. and Thomas,A.P. 2002. Intracellular calcium signaling. *J. Cell Sci.* **115**: 3715-3716.
- Okano,Y., Mizuno,K., Osada,S., Nakamura,T., and Nozawa,Y. 1993. Tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma in c-met/HGF receptor-stimulated hepatocytes: comparison with HepG2 hepatocarcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**: 842-848.

- Osborne,S.L., Thomas,C.L., Gschmeissner,S., and Schiavo,G. 2001. Nuclear PtdIns(4,5)P₂ assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing. *J. Cell Sci.* **114**: 2501-2511.
- Partridge,K.A. and Oreffo,R.O. 2004. Gene delivery in bone tissue engineering: progress and prospects using viral and nonviral strategies. *Tissue Eng* **10**: 295-307.
- Perez-Terzic,C., Pyle,J., Jaconi,M., Stehno-Bittel,L., and Clapham,D.E. 1996. Conformational states of the nuclear pore complex induced by depletion of nuclear Ca²⁺ stores. *Science* **273**: 1875-1877.
- Plevin,R., Palmer,S., Gardner,S.D., and Wakelam,M.J. 1990. Regulation of bombesin-stimulated inositol 1,4,5-trisphosphate generation in Swiss 3T3 fibroblasts by a guanine-nucleotide-binding protein. *Biochem. J.* **268**: 605-610.
- Ponzetto,C., Bardelli,A., Zhen,Z., Maina,F., dalla,Z.P., Giordano,S., Graziani,A., Panayotou,G., and Comoglio,P.M. 1994. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* **77**: 261-271.
- Pusl,T., Wu,J.J., Zimmerman,T.L., Zhang,L., Ehrlich,B.E., Berchtold,M.W., Hoek,J.B., Karpen,S.J., Nathanson,M.H., and Bennett,A.M. 2002. Epidermal growth factor-mediated activation of the ETS domain transcription factor Elk-1 requires nuclear calcium. *J. Biol. Chem.* **277**: 27517-27527.
- Reilly,J.F. and Maher,P.A. 2001. Importin beta-mediated nuclear import of fibroblast growth factor receptor: role in cell proliferation. *J. Cell Biol.* **152**: 1307-1312.
- Rizzuto,R. and Pozzan,T. 2006. Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev.* **86**: 369-408.
- Rogue,P.J., Humbert,J.P., Meyer,A., Freyermuth,S., Krady,M.M., and Malviya,A.N. 1998. cAMP-dependent protein kinase phosphorylates and activates nuclear Ca²⁺-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**: 9178-9183.
- Sakaguchi,K. 1992. Acidic fibroblast growth factor autocrine system as a mediator of calcium-regulated parathyroid cell growth. *J. Biol. Chem.* **267**: 24554-24562.
- Santella,L. 1998. The role of calcium in the cell cycle: facts and hypotheses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**: 317-324.
- Santella,L. and Kyojuka,K. 1997. Effects of 1-methyladenine on nuclear Ca²⁺ transients and meiosis resumption in starfish oocytes are mimicked by the nuclear injection of inositol 1,4,5-trisphosphate and cADP-ribose. *Cell Calcium* **22**: 11-20.
- Schwaller,B., Meyer,M., and Schiffmann,S. 2002. 'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *Cerebellum*. **1**: 241-258.
- Shah,P.K. and Sowdhamini,R. 2001. Structural understanding of the transmembrane domains of inositol triphosphate receptors and ryanodine receptors towards calcium channeling. *Protein Eng* **14**: 867-874.

- Stehno-Bittel,L., Luckhoff,A., and Clapham,D.E. 1995a. Calcium release from the nucleus by InsP3 receptor channels. *Neuron* **14**: 163-167.
- Stehno-Bittel,L., Perez-Terzic,C., and Clapham,D.E. 1995b. Diffusion across the nuclear envelope inhibited by depletion of the nuclear Ca²⁺ store. *Science* **270**: 1835-1838.
- Tabellini,G., Billi,A.M., Fala,F., Cappellini,A., Evagelisti,C., Manzoli,L., Cocco,L., and Martelli,A.M. 2004. Nuclear diacylglycerol kinase-theta is activated in response to nerve growth factor stimulation of PC12 cells. *Cell Signal*. **16**: 1263-1271.
- Takeshima,H. 1993. Primary structure and expression from cDNAs of the ryanodine receptor. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **707**: 165-177.
- Takuwa,N., Iwamoto,A., Kumada,M., Yamashita,K., and Takuwa,Y. 1991. Role of Ca²⁺ influx in bombesin-induced mitogenesis in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **266**: 1403-1409.
- Takuwa,N., Zhou,W., Kumada,M., and Takuwa,Y. 1993. Ca(2+)-dependent stimulation of retinoblastoma gene product phosphorylation and p34cdc2 kinase activation in serum-stimulated human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **268**: 138-145.
- Thomas,D., Tovey,S.C., Collins,T.J., Bootman,M.D., Berridge,M.J., and Lipp,P. 2000. A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell Calcium* **28**: 213-223.
- Thompson,M., Andrade,V.A., Andrade,S.J., Pusch,T., Ortega,J.M., Goes,A.M., and Leite,M.F. 2003. Inhibition of the TEF/TEAD transcription factor activity by nuclear calcium and distinct kinase pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**: 267-274.
- Tupper,J.T., Kaufman,L., and Bodine,P.V. 1980. Related effects of calcium and serum on the G1 phase of the human W138 fibroblast. *J. Cell Physiol* **104**: 97-103.
- Uchiyama,T., Yoshikawa,F., Hishida,A., Furuichi,T., and Mikoshiba,K. 2002. A novel recombinant hyperaffinity inositol 1,4,5-trisphosphate (IP(3)) absorbent traps IP(3), resulting in specific inhibition of IP(3)-mediated calcium signaling. *J. Biol. Chem.* **277**: 8106-8113.
- Varnai,P., Lin,X., Lee,S.B., Tuymetova,G., Bondeva,T., Spat,A., Rhee,S.G., Hajnoczky,G., and Balla,T. 2002. Inositol lipid binding and membrane localization of isolated pleckstrin homology (PH) domains. Studies on the PH domains of phospholipase C delta 1 and p130. *J. Biol. Chem.* **277**: 27412-27422.
- Veigl,M.L., Vanaman,T.C., and Sedwick,W.D. 1984. Calcium and calmodulin in cell growth and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* **738**: 21-48.
- Whitfield,J.F., Boynton,A.L., MacManus,J.P., Rixon,R.H., Sikorska,M., Tsang,B., Walker,P.R., and Swierenga,S.H. 1980. The roles of calcium and cyclic AMP in cell proliferation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **339**: 216-240.

7.1 Participação em eventos.

1. The Liver Meeting. Realizado em San Francisco, USA, 2005
2. Digestive Disease Week (DDW). Realizado em Chicago, USA, 2005.
3. Yale Digestive Diseases Reunion Weekend & Scientific Symposium. Realizado em New Haven, USA, 2005.
4. The Liver Meeting. Realizado em Boston, USA, 2004.
5. Electrophysiological concepts and techniques for studying cells. Realizado em Ribeirão Preto, Brasil, 2004.

7.2 Trabalhos apresentados em eventos.

1. MINAGAWA, N. ; SHIBAO, K. ; GOMES, D. A. ; MASYUK, A. ; LARUSSO, N. F. ; NATHANSON, M. H. . Cyclic AMP regulates bicarbonate secretion in cholangiocytes through release of ATP into bile. In: The Liver Meeting, 2005, San Francisco. Hepatology, 2005. v. 42.
2. O'BRIEN, E. M. ; GOMES, D. A. ; SEGHAL, S. ; NATHANSON, M. H. Vasopressin increases the permeability of the nuclear membrane. In: The Liver Meeting, 2005, San Francisco. Hepatology, 2005. v. 42. p. 752A.
3. RODRIGUES, M. A. ; GOMES, D. A. ; GRANT, W. ; BENNETT, A. M. ; NATHANSON, M. H. . Calcium signals in the nucleus regulate activation of cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1). In: The Liver Meeting, 2005, San Francisco. Hepatology, 2005. v. 42. p. 753A.
4. LEITE, M. F. ; RODRIGUES, M. A. ; GOMES, D. A. ; NATHANSON, M. H. . Regulation of calcium signals in the nucleus. In: 3rd Meeting of the European Club for Liver Cell Biology, 2005, Thurgovie. 3rd Meeting of the European Club for Liver Cell Biology, 2005.
5. GOMES, D. A. ; PINHEIRO, C. C. ; SOUTO, N. C. ; GOES, Tércio ; GOES, Alfredo M ; NATHANSON, M. H. ; LEITE, M. F. . The type 3 isoform of the inositol-1,4,5-triphosphate receptor (InsP₃R) selectively mediates apoptosis. In: Digestive Disease Week (DDW), 2005, Chicago. Gastroenterology, 2005. v. 128. p. A707-A707.
6. GOMES, D. A. ; VORONOV, S. ; De CAMILLI, P. ; NATHANSON, M. H. . The gamma isoform of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) Kinase regulates Ca²⁺ signaling. In: Digestive Disease Week, 2005, Chicago. Gastroenterology, 2005. v. 128. p. A693-A693.
7. PIMENTA, F. J. G. S. ; GOMES, D. A. ; PERDIGAO, P. F. . Análise da Expressão do gene WWOX no Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Bucal. In: VII Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia UFMG/ VI Encontro Científico das Faculdades de Odontologia de MG, 2004, Belo Horizonte. Arquivos em Odontologia, 2004. v. 40.
8. GOMES, D. A. ; RODRIGUES, M. A. ; SOUTO, N. C. ; THOMPSON, M. ; GOES, Tércio de Souza ; LEITE, M. F. . Modulation of Calcium Signaling by Inositol trisphosphate receptors in Hek-293 cells. In: FESBE XIX, 2004, Águas de Lindoia. FESBE XIX, 2004.

7.3 Prêmios e títulos.

- 2005 Apresentação oral na Digestive Disease Week (DDW), Chicago, USA, sobre o trabalho: The gamma isoform of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) Kinase regulates Ca^{2+} signaling
- 2004 Prêmio Hyclone, FeSBE.
- 2004 Prêmio Roberto Alcântara Gomes-SBBf, FeSBE.
- 2004 Menção Honrosa, Centro de Extensão da Faculdade de Odontologia da UFMG.
- 2003 Prêmio Iniciação Científica, 49º Congresso Nacional de Genética.

7.4 Artigos publicados em periódicos.

1. GOMES, D. A. ; LEITE, M. F. ; BENNETT, A. M. ; NATHANSON, M. H. . Calcium Signaling in the Nucleus. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, In Press, 2006.
2. GRANT, W. ; ROTH, R. ; GOMES, D. A. ; EHRLICH, B. E. ; NATHANSON, M. H. ; BENNETT, A. M. . Suppression of Nuclear and Cytosolic Calcium Signaling By Targeted Expression of Calretinin. Calcium Binding Proteins, v. 1, n. 1, p. 1, 2006.
3. PIMENTA, F. J. G. S. ; GOMES, D. A. ; PERDIGAO, P. F. ; ROMANO-SILVA, M. A. ; GOMEZ, M. V. ; de MARCO, L. A. ; GOMEZ, R. S. . Characterization of the tumor suppressor gene WWOX in primary human oral squamous cell carcinomas. International journal of cancer. Journal international du cancer, v. 118, n. 5, p. 1154-1158, 2006.
4. MENDES, C. C. P. ; GOMES, D. A. ; THOMPSON, M. ; SOUTO, N. C. ; GOES, T. S. ; RODRIGUES, M. A. ; GOES, A. M. ; GOMEZ, M. V. ; NATHANSON, M. H. ; LEITE, M. F. . THE TYPE III INOSITOL 1,4,5-TRISPHOSPHATE RECEPTOR PREFERENTIALLY TRANSMITS APOPTOTIC Ca^{2+} SIGNALS INTO MITOCHONDRIA. Journal of Biological Chemistry, v. 280, n. 49, p. 40892-40900, 2005.
5. GOMES, D. A. ; GUATIMOSIM, C. ; GOMEZ, R. S. ; LEITE, M. F. ; VIEIRA, L. B. ; ROMANO-SILVA, M. A. ; PRADO, M. A. M. ; GOMEZ, Marcus Vinícius . Effect of halothane on the release of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in dorsal root ganglions neurons.. Neuroreport, v. 15, n. 7, p. 1187-90, 2004.
6. FERNANDES, V. M. V. ; ROMANO-SILVA, M. A. ; GOMES, D. A. ; PRADO, M. A. M. ; SANTOS, T. M. ; GOMEZ, M. V. . Dopamine Release Evoked by Beta Scorpion Toxin, Tityus Gamma, in Prefrontal Cortical Slices is Mediated by Intracellular Calcium Stores. Cellular and Molecular Neurobiology, v. 24, n. 6, p. 757-767, 2004.

Ultra-sensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity

Tsai-Wen Chen¹, Trevor J. Wardill^{1,†}, Yi Sun¹, Stefan R. Pulver¹, Sabine L. Renninger², Amy Baohan^{1,3}, Eric R. Schreiter¹, Rex A. Kerr¹, Michael B. Orger², Vivek Jayaraman¹, Loren L. Looger¹, Karel Svoboda¹, and Douglas S. Kim¹

¹Janelia Farm Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, 19700 Helix Drive, Ashburn, Virginia 20147, USA

²Champalimaud Neuroscience Programme, Champalimaud Centre for the Unknown, Avenida Brasília, Doca de Pedrouços, 1400-038, Lisbon, Portugal

³Department of Neurobiology, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, USA

Summary

Fluorescent calcium sensors are widely used to image neural activity. Using structure-based mutagenesis and neuron-based screening, we developed a family of ultra-sensitive protein calcium sensors (GCaMP6) that outperformed other sensors in cultured neurons and in zebrafish, flies, and mice *in vivo*. In layer 2/3 pyramidal neurons of the mouse visual cortex, GCaMP6 reliably detected single action potentials in neuronal somata and orientation-tuned synaptic calcium transients in individual dendritic spines. The orientation tuning of structurally persistent spines was largely stable over timescales of weeks. Orientation tuning averaged across spine populations predicted the tuning of their parent cell. Although the somata of GABAergic neurons showed little orientation tuning, their dendrites included highly tuned dendritic segments (5 - 40 micrometers long). GCaMP6 sensors thus provide new windows into the organization and dynamics of neural circuits over multiple spatial and temporal scales.

Users may view, print, copy, download and text and data- mine the content in such documents, for the purposes of academic research, subject always to the full Conditions of use: http://www.nature.com/authors/editorial_policies/license.html#terms

Correspondence should be addressed to M.B.O. (michael.orger@neuro.fchampalimaud.org) for zebrafish, V.J. (jayaramanv@janelia.hhmi.org) for flies, L.L.L. (loogerl@janelia.hhmi.org) for GCaMP protein structure information, K.S. (svobodak@janelia.hhmi.org) for mice, and D.S.K. (kimd@janelia.hhmi.org) for neuronal culture screen information and constructs.

[†]Present address: Marine Biological Laboratory, Program in Sensory Physiology and Behavior, 7 MBL Street, Woods Hole, Massachusetts 02543, USA

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Author Contributions: V.J., R.A.K., L.L.L., and K.S. initiated the project. T.W.C., T.J.W., and D.S.K. conducted neuronal culture screening. T.W.C. performed mouse visual cortical experiments on pyramidal neurons. T.W.C. and A.B. performed experiments on inhibitory neurons. Y.S., T.J.W., and S.R.P. carried out fly larval NMJ studies. Y.S. and V.J. carried out adult fly antennal lobe imaging. S.L.R. and M.B.O. conducted zebrafish tectal imaging. E.R.S. performed protein assays. All authors analyzed data. T.W.C., R.A.K., M.B.O., V.J., L.L.L., K.S., and D.S.K. wrote the paper with comments from all authors.

Author Information: The authors have applied for a patent on materials and methods related to the GCaMP6 variants. S.L.R. is supported by a Fellowship from the Swiss National Science Foundation. M.B.O. is supported by a Marie Curie Career Integration Grant PCIG09-GA-2011-294049.

Introduction

Neural activity causes rapid changes in intracellular free calcium¹⁻⁴. Calcium imaging experiments have relied on this principle to track the activity of neuronal populations^{5,6} and to probe excitation of small neurons and neuronal microcompartments^{2,7-10}. Genetically-encoded protein sensors can be targeted to specific cell types^{2,9,11,12} for non-invasive imaging of identified neurons and neuronal compartments^{8,13-15} over chronic timescales⁶.

Calcium indicator proteins include the single fluorophore sensor GCaMP^{11,16,17} and several families of Förster resonance energy transfer based sensors¹⁸⁻²². However, none of these protein-based indicators have yet surpassed the sensitivity and speed of commonly used synthetic calcium indicators (*e.g.*, Oregon Green Bapta-1-AM, OGB1-AM). Therefore, depending on the experimental goals, investigators choose between sensitive synthetic indicators delivered by invasive chemical or physical methods, or less sensitive protein sensors delivered with genetic methods.

Multiple rounds of structure-guided design have made GCaMPs the most widely used protein calcium sensors^{11,16,17}. But past efforts in optimizing GCaMPs and other indicators of neuronal function were limited by the throughput of quantitative and physiologically relevant assays. Because neurons have unusually fast calcium dynamics and low peak calcium accumulations⁴, sensors designed to probe neuronal function are best tested in neurons^{11,13,23,24}, rather than in non-neuronal systems, most of which show much slower and larger calcium changes¹⁹. We thus screened GCaMP variants produced by mutagenesis in neurons, and subsequently validated lead sensors in several *in vivo* systems.

GCaMP protein engineering

GCaMP¹⁷ and its progeny^{11,16} consist of circularly permuted green fluorescent protein (cpGFP)²⁵, the calcium-binding protein calmodulin (CaM), and CaM-interacting M13 peptide²⁶ (Fig. 1a). The CaM/M13 complex is in proximity to the chromophore inside the cpGFP β barrel²⁷. Calcium-dependent conformational changes in CaM/M13, including modulation of solvent access and the pK_a of the chromophore, cause increased brightness with calcium binding. Despite extensive structure-guided optimization^{11,16}, GCaMP and other protein sensors still suffer from low sensitivity and slow kinetics.

We produced numerous additional GCaMP variants and tested them in automated neuronal assays (Fig. 1). With the aim of improving sensitivity, we focused mutagenesis on the interface between cpGFP and CaM at 16 amino acid positions, some mutagenized to near completion (Fig. 1a, Supplementary Table 5)¹⁶. Mutations were made at 18 additional sites, notably at the M13/CaM interface which can affect calcium affinity²⁸ (A317) and in CaM (R392)¹⁶ (Fig. 1a).

Dissociated rat hippocampal neurons in 24-well plates were transduced with GCaMP variants (one per well), together with nuclear mCherry²⁹, using lentivirus-mediated gene transfer. Electrodes triggered trains of action potentials in all neurons within each well (Methods). Time-lapse images (35 Hz) of $\sim 800 \mu\text{m}$ fields of view containing 10-100 neurons were acquired, while delivering a series of action potential trains (Fig. 1c).

Fluorescence changes extracted from single neurons were used to compare the sensitivity, dynamic range, and kinetics of individual GCaMP variants and OGB1-AM (Fig. 1d). We monitored the resting brightness of the sensor by measuring green fluorescence relative to red mCherry fluorescence.

The assay revealed 43/348 point mutants with improved sensitivity compared to GCaMP3 (F/F_0 in response to one action potential; $p < 0.01$; Wilcoxon rank sum test) (Fig. 1c; Supplementary Fig. 1). In addition, one mutation at the M13/CaM interface (A317E) accelerated kinetics (4-fold), but also reduced response amplitude (2-fold), compared to parent GCaMP variants (Supplementary Fig. 2). In a second round of mutagenesis we combined beneficial mutations, selected based on improved response amplitudes (1-3 action potentials) and/or kinetics, without compromising baseline fluorescence or maximal response (160 action potentials) (94 variants, up to 8 beneficial point mutations; Fig. 1a, c, Supplementary Table 5). In some cases the beneficial effects were additive (Supplementary Fig. 2). A317E consistently accelerated the kinetics compared to the parent sensors. In total, we screened 447 GCaMP variants (Supplementary Table 5).

Based on screening in cultured neurons (Fig. 1), we chose three ultrasensitive GCaMP6 sensors (GCaMP6s, 6m, 6f; for slow, medium and fast kinetics, respectively) for characterization *in vivo*. These sensors vary in kinetics, with the more sensitive sensors having slower kinetics. Compared to GCaMP5G, the GCaMP6 sensors have similar baseline brightness and a 1.1-1.6 fold increase in dynamic range (F/F_0 at 160 action potentials). For small numbers of action potentials the most sensitive sensor, GCaMP6s, produced 7-fold larger signals (>10-fold larger than GCaMP3, Fig. 1b-e; Supplementary Table 1). Underlying this sensitivity gain are multiple factors (Supplementary Table 2). Compared to GCaMP5G, GCaMP6s exhibited 3-fold higher apparent affinity for calcium and 1.3-fold higher saturated fluorescence, with similar baseline fluorescence. Calcium-saturated GCaMP6s is 27% brighter than enhanced GFP (EGFP), its parent fluorescent protein. The fastest sensor, GCaMP6f, had 2-fold faster rise time and 1.7-fold faster decay time than GCaMP5G (Fig. 1f, g) (Supplementary Table 1). GCaMP6f is the fastest genetically-encoded calcium indicator for cytoplasmic free calcium in neurons, with sensitivity comparable to OGB1-AM (Fig. 1d-g). GCaMP6 indicators were more sensitive and/or faster than other GCaMP variants in presynaptic boutons of the *Drosophila* larval neuromuscular junction²⁴ (Supplementary Fig. 3; Supplementary Table 4), in projection neurons of the *Drosophila* adult antennal lobe during odor presentation¹⁶ (Supplementary Fig. 4), and in neuropil and somata of the zebrafish tectum *in vivo*¹⁶ (Supplementary Fig. 5).

Imaging neuronal populations in the mouse visual cortex

We next tested GCaMP6 in layer (L)2/3 pyramidal neurons in the mouse visual cortex V1 *in vivo* (Fig. 2a). The majority of V1 neurons can be driven to fire action potentials in response to drifting gratings³⁰. V1 was infected with adeno-associated virus (AAV) expressing GCaMP variants (AAV-*hSyn1*-GCaMP variant)¹¹. Three weeks after AAV infection, the vast majority of L2/3 neurons showed fluorescence mainly in the neuronal cytoplasm (Supplementary Fig. 6). Sensory stimuli consisted of moving gratings presented in eight directions to the contralateral eye^{12,16}. Two-photon imaging revealed visual stimulus-

evoked fluorescence transients in subsets of neurons (Fig. 2a-c). These responses were stable across trials (Supplementary Fig. 8) and tuned to stimulus orientation (Fig. 2a, b and Supplementary Fig. 9). Orientation tuning was similar for GCaMP5G, GCaMP6f, GCaMP6m, and bulk-loaded OGB1-AM⁵ (Supplementary Fig. 9). Fluorescence transients were faster with GCaMP6f compared to other sensors and faithfully tracked dynamic sensory stimuli (Fig. 2d).

GCaMP6 performance was compared to other sensors in several ways. The fraction of responding neurons detected with GCaMP6s was 3-fold higher than for GCaMP5G (5-fold higher than GCaMP3) (Fig. 2e). Notably, the fractions of active neurons detected with GCaMP6s and GCaMP6m were also significantly higher than for OGB1-AM (Fig. 2e, f, $p < 0.01$, Wilcoxon rank sum test). GCaMP6 sensors thus reveal neuronal dynamics that were previously undetectable with protein sensors.

We imaged GCaMP6s-expressing neurons through a chronic imaging window^{6,31} over several weeks in V1 (Supplementary Fig. 6c)¹⁸. Sensory responses and orientation tuning of neurons were largely stable (Supplementary Fig. 6c, e). Responses of a small fraction of neurons were lost over time, which was balanced by other neurons that started responding. The orientation preference of the neurons responding in all imaging sessions (~56% of cells that responded in the first session) was remarkably stable (Supplementary Fig. 6d). Over months of expression a small fraction of highly expressing neurons acquired nuclear fluorescence; these neurons eventually also developed aberrant responses¹¹ (Supplementary Fig. 7). These experiments indicate that expression of GCaMP6s over 1-2 months does not obviously perturb the function of cortical circuits.

We directly compared cellular fluorescence changes and spiking using loose-seal, cell-attached recordings. The contrast of the visual stimulus was adjusted online to maintain a moderate spike rate. GCaMP6s produced large fluorescence transients even in response to single action potentials (> 6 times larger than for GCaMP5K, Fig. 3 and Supplementary Video 1), yielding high detection rates for single spikes ($99 \pm 0.2\%$; at 1% false-positive rate, $n=9$ cells, 250 spikes). GCaMP6f and GCaMP6m showed slightly lower spike detection efficiencies, but with faster kinetics (Fig. 3, Supplementary Table 3). Individual spikes within a burst resulted in step-wise fluorescence increases (Fig. 3b), which were resolvable if they were separated by an interval on the order of the rise time of the sensor or more (100-150 ms, GCaMP6s; 75-100 ms, GCaMP6m; 50-75 ms, GCaMP6f; Fig. 3f, Supplementary Fig. 10, Supplementary Table 3). These data show that GCaMP6s can detect activity with near 100% action potential detection in pyramidal cells.

Calcium transients in dendritic spines

Pyramidal neuron output is shaped by thousands of excitatory synapses distributed across the dendritic arbor. Activation of single excitatory synapses causes calcium accumulations in individual dendritic spines, mediated by NMDA-Rs^{32,33}, which can be imaged to measure the tuning of single synapses *in vivo*^{10,33}. We used GCaMP6s to image synaptic calcium signals within dendritic spines over chronic timescales. In V1 with sparsely labeled L2/3 pyramidal neurons (Methods) small dendritic branches were imaged at high magnification during visual stimulation (Fig. 4a). We first focused on neurons that did not fire visually

evoked action potentials (~40% of neurons) to avoid calcium changes caused by action potentials back-propagating into dendrites⁷. Individual spines showed large fluorescence transients, often independent of their parent dendrites (Fig. 4b,d and Supplementary Video 2). Spine responses were orientation-tuned (Fig. 4b-e), as expected from the fact that most input to V1 neurons originates from (presumably orientation-tuned) V1 neurons³⁴. Neighboring spines were often tuned with different preferred orientations. The correlation between orientation tuning and distance between spines was weak ($R=0.08$; $p>0.05$). Overall, 27% of spines (62/228, 15 dendrites, 4 mice) were visually responsive, and most were orientation-tuned (Fig. 4f, g). Furthermore, close to 40% of spines were active at some time during the imaging session (Fig. 4f). Bleaching of GCaMP6 was negligible over 40 imaging trials (320 s of continuous imaging, Fig. 4h).

We imaged the same dendritic segments over imaging sessions separated by weeks. Most spines persisted over this timescale, although other spines appeared and disappeared³¹. We analyzed the visual responses of persistent spines. The percentage of spines that responded to visual stimulation was stable over a week (37/139 on day 1; 34/139 on day 8). Spines that responded during one imaging session were also likely to respond a week later (65%). Furthermore, visually responsive spines mostly retained their orientation tuning (Fig. 4i-k).

How orientation-tuned neurons connect to other orientation-tuned neurons remains controversial^{10,35}. Some measurements suggest that individual neurons sample heterogeneous input, from neurons with diverse orientation-tuning¹⁰. Models indicate that specific connectivity is not required for orientation tuning³⁶. However, other measurements emphasize that neurons prefer to make synapses with neurons sharing similar orientation tuning³⁵, but orientation tuning at the level of subthreshold membrane potential is weak^{37,38}. We thus compared the orientation tuning of populations of individual spines and the output of their parent neuron. We identified neurons with tuned output ($OSI, 0.91 \pm 0.04$, $n=5$) (Fig. 5a) and measured the orientation tuning of large numbers of dendritic spines per neuron (average, 201 spines; range, 120-298 spines) (Fig. 5b-d). Contributions to the signal from back-propagating action potentials were removed using a computational subtraction procedure (Methods; Supplementary Fig. 11). For individual neurons, the orientation tuning averaged across all spines was biased towards the orientation tuning of the parent neurons (Fig. 5e, f) ($p < 0.01$, Wilcoxon rank sum test), although the modulation depth for spines was smaller ($p < 0.01$, Wilcoxon rank sum test). A similar trend was also apparent in the distributions of preferred orientations across spines (Fig. 5g, h). Our results show that spine fluorescence transients, which are not necessarily good predictors of the strength of excitatory synaptic input³⁹, averaged across a neuron predict the orientation tuning of the cell's output.

Calcium transients in GABAergic dendrites

Consistent with previous results^{40,41}, somatic fluorescence changes in GABAergic neurons were broadly tuned with respect to stimulus orientation (Fig. 6a, b; Supplementary Fig. 12). However, their dendrites showed pronounced orientation-tuned domains (Fig. 6c, d). Individual dendritic branches often had multiple domains with distinct preferred orientations, consistent with the diverse preferences of inputs to GABAergic neurons^{42,43}.

The underlying fluorescence responses were modulated at the temporal frequency of the drifting grating (1 Hz) (Fig. 6e), a characteristic feature of V1 excitatory neurons in the superficial layers of V1³⁰, suggesting that the responses reflect local excitatory synaptic input. Tuned dendritic domains were seen in parvalbumin-positive (Fig. 6) and somatostatin-positive (data not shown) interneurons.

We mapped the visual response along 104 interneuron dendrites (total imaged length 6.3 mm) with regions of interest placed every micrometer along the dendrite (Fig. 6d). Visually-evoked GCaMP6s responses were detected in 5.7 mm (90 %) of dendritic length, with 1.79 mm (28%) showing significant orientation-tuning ($p < 0.01$, ANOVA across 8 conditions). The majority of imaged dendrites (33/54; longer than 50 μm) had multiple domains preferring different orientations. The OSI (0.44 ± 0.15 ; mean \pm s.d.) of tuned dendritic segments was higher than for interneuron somata ($p < 0.005$, Supplementary Fig. 12), but lower than for typical pyramidal neurons ($p < 0.001$, Supplementary Fig. 9). Back-propagation⁴⁴ of broadly tuned somatic action potentials probably lowers the OSI of the dendritic calcium signals. Consistent with this, both the dendritic OSI and the percentage of orientation selective sites increased with distance from the soma (Supplementary Fig. 13a).

The sizes of individual domains ($12 \pm 7 \mu\text{m}$, mean \pm s.d. FWHM, $n=107$ domains) were considerably larger than the spacing between excitatory synapses on interneuron dendrites ($<1 \mu\text{m}$)⁴⁵ (Supplementary Fig. 13b, c). Nearby domains with distinct preferred orientations often overlapped (Supplementary Fig. 13b). The large size of these domains might reflect spatially clustered input with shared orientation preference. Alternatively, individual domains might be dominated by a few sparse, randomly distributed strong inputs⁴⁶, amplified by local postsynaptic mechanisms⁴⁷.

Conclusions

We developed a new class of genetically-encoded indicators of neuronal function with greatly improved properties. GCaMP6 indicators cross important performance thresholds. They have higher sensitivity than commonly used synthetic calcium dyes (*e.g.*, OGB1) and detect individual action potentials with high reliability at reasonable microscope magnifications. These indicators can be used to image large groups of neurons as well as tiny synaptic compartments over multiple imaging sessions separated by months. It is likely that these sensors will find widespread applications for diverse problems in brain research and calcium signaling. Future engineering efforts could focus on red fluorescent calcium indicator proteins^{48,49}, which promise imaging considerably deeper in scattering tissue⁵⁰.

Methods

All experiments were conducted according to National Institutes of Health guidelines for animal research and were approved by the Janelia Farm Research Campus Institutional Animal Care and Use Committee and Institutional Biosafety Committee.

Neuronal culture screen

GCaMP variants were made in a modified SIV-based lentiviral construct, pGP-*syn*-GCaMP-nls-mCherry-WPRE, derived from pCL20cSLFR MSCV-GFP⁵¹. The pro lentiviral vector included a 476-bp human synapsin promoter, GCaMP, a nuclear localization sequence fused to mCherry, and the woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element. Site-directed mutagenesis was conducted by PCR and mutated regions were incorporated into the lentiviral constructs by gene assembly⁵².

Hippocampi were dissected and dissociated in papain. Cells were plated at a density of 225,000 viable cells/well in 24-well glass-bottom plates (Mattek, #1.5 glass coverslips), pre-coated with Matrigel (BD Biosciences). Cells were cultured in growth medium (28 mM glucose, 2.4 mM sodium bicarbonate, 100 µg/mL transferrin, B-27 supplement (1X, Invitrogen), 500 µM L-glutamine, 50 units/mL penicillin, 50 mg/mL streptomycin, 5% fetal bovine serum in MEM).

Lentiviral particles were made in a biosafety level 2 laboratory by transfecting a pro lentiviral construct and packaging and coat pseudotyping DNA constructs (pCAG-SIVgprre, pCAG4-RTR-SIV, pCMV-VSV-G)^{51,53} into HEK293T/17 cells (ATCC) in 10-cm plates. After 72 h, supernatant was collected (6 mL) and filtered. Neuronal cultures were infected at 3 days *in vitro*. Each well of a 24-well plate was incubated overnight with 0.5 mL of lentivirus in conditioned growth medium. The growth medium was supplemented with 4 µM AraC to inhibit glial proliferation. In some experiments, OGB1-AM was loaded into cells by incubating neurons in 1 mL of 2 µM OGB1-AM (Invitrogen) for 30 min and rinsing 3 times with imaging buffer (145 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM glucose, 10 mM HEPES pH 7.4, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂).

Neurons were stimulated in imaging buffer containing a drug cocktail to inhibit synaptic receptors (10 µM CNQX, 10 µM (R)-CPP, 10 µM gabazine, 1 mM (S)-MCPG, Tocris). Under these conditions, intracellular calcium increases are presumably caused by the opening of voltage sensitive calcium channels.

Action potentials (APs) (83 Hz) were evoked by field stimulation with a Grass Technologies S48 stimulation unit and a custom-built 24-well cap stimulator with pairs of parallel platinum wires. The microscope was an Olympus IX81 with a 10× (0.4 NA) air objective lens and EMCCD camera (Andor 897, 512 × 512 pixels, 35 frames/s), Cairn OptoLED illumination system, and GFP (Excitation: 450-490 nm; Dichroic: 495 nm long-pass; Emission: 500-550 nm) and TxRed (Excitation: 540-580 nm; Dichroic: 585 nm long-pass; Emission: 593-668 nm) filter sets. The field of view was 800 µm × 800 µm. Images were background subtracted (mean of 5% lowest pixel values). Responses were quantified for each cell as change in fluorescence divided by baseline fluorescence measured one second prior to stimulation. Signal-to-noise ratio (SNR) was quantified as peak F/F_0 response over the standard deviation of the signal during a one second period prior to stimulation.

Control experiments varying stimulation voltage, frequency, and pulse width insured suprathreshold stimulation of neurons. Voltage imaging using the ArchWT-GFP archaerhodopsin-based voltage sensor⁵⁴ confirmed that individual pulses (1 ms, 40 V, 83

Hz) reliably triggered single APs. The imaging and stimulation system was controlled by custom scripts written in MetaMorph software (version 7.7.5, Molecular Devices) and Ephus software⁵⁵ (ephus.org). Detailed neuronal culture screening methods will be described elsewhere (T.J.W., T.W.C., E.R.S., R.A.K., V.J., L.L.L., K.S., and D.S.K., manuscript in preparation).

Labeling V1 neurons

Constructs used to produce AAV included pGP-AAV-*syn*-GCaMP-WPRE and the Cre recombinase-activated construct pGP-AAV-*syn*-flex-GCaMP-WPRE. Virus was injected slowly (30 nL in 5 minutes) at a depth of 250 μ m into the primary visual cortex (two sites, 2.5 and 2.9 mm lateral from the lambda suture). For population imaging and electrophysiology (Fig 2-3), AAV2/1-*syn*-GCaMP-WPRE virus (titer: $\sim 10^{11}$ – 10^{12} genomes/mL) was injected into the visual cortex of C57BL/6J mice (1.5–2 months old)⁶. For dendritic imaging (Fig 4, 5 and 6a–f), sparse labeling was achieved by injecting a mixture of diluted AAV2/1-*syn*-Cre particles (titer: $\sim 10^{12}$ genomes/mL, diluted 8000–20,000 fold in PBS) and high titer, Cre-dependent GCaMP6s virus ($\sim 8 \times 10^{11}$ genomes/mL). This produces strong GCaMP6 expression in a small subset of neurons (~ 3 – 5 cells in a $250 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$ volume), defined by Cre expression⁵⁶. Both pyramidal (Fig. 4–5) and GABAergic (Fig. 6) neurons were labeled using this approach, but they could be distinguished based on the presence or absence of dendritic spines. *Post hoc* immunolabeling further identified the imaged cells. For specific labeling of parvalbumin interneurons (Fig. 6g and Supplementary Fig. 12), Cre-dependent GCaMP6s AAV was injected into the visual cortex of PV-IRES-Cre mice⁵⁷. Individual somata (Supplementary Fig. 12) and dendritic segments could be recognized (Fig. 6 g, h, total length of imaged dendrite: 2.86 mm), but the high labeling density made it difficult to track individual dendrites over long distances.

Window surgery

After 2–4 weeks of expression, mice were anesthetized using isoflurane (3% for induction, 1.5–2% during surgery) and a circular craniotomy (2–3 mm diameter) was made above V1 (centered 2.7 mm lateral from the lambda suture). For acute experiments, the craniotomy was covered with agarose (1–1.3 %), and a round glass coverslip (Warner Instruments; 5mm diameter; #1 thickness) was cemented to the skull to reduce motion of the exposed brain. A custom titanium head post was fixed to the skull using black dental cement (Contemporary Ortho-Jet). For simultaneous imaging and cell-attached recording, the exposed brain was covered with ~ 1 mm thick agarose (1.3%) without a coverslip. For chronic imaging experiments, the imaging window was constructed from two layers of microscope coverglass⁶. A larger piece (Fisher, #1 thickness) was attached to the bone and a smaller insert (#2 thickness) was fitted snugly into the craniotomy. Imaging experiments were started ~ 1 – 2 weeks after chronic window implantation.

Visual stimuli

Moving grating stimuli were generated using the Psychophysics Toolbox^{58,59} in MATLAB. Each stimulus trial consisted of a 4 s blank period (uniform gray at mean luminance) followed by a 4 s drifting sinusoidal grating (0.05 cycles per degree, 1 Hz temporal

frequency). Typically, 8 drifting directions were used (separated by 45 degrees) and 5 trials were recorded for each direction, giving a total of 40 stimulus trials per recording session (320 s recording time). The gratings were presented with an LCD monitor (30 × 40 cm), placed 25 cm in front of the center of the right eye of the mouse. The monitor subtended an angle of $\pm 38^\circ$ horizontally and -20° to $+38^\circ$ vertically around the eye of the mouse. For experiments with cell-attached recording (Fig. 3), pipette access required the use of a smaller LCD monitor (12 × 16 cm) placed ~ 10 cm in front of the right eye. During simultaneous imaging and electrophysiology, the optimal grating stimulus was repeatedly played (duration 2 s, separated by a 4 s blank period), but the contrast of the stimulus grating was adjusted online to maintain moderate spike rates.

For analysis of dendritic spine populations (Fig. 5), the stimulus contrast was lowered to reduce action potential-related dendritic signals (average F/F_0 in dendritic shafts at the preferred orientations was 32%, 80%, 16%, 15%, 12% for cells 1 through 5, corresponding to stimulus contrast 10-40%, 5-20%, 10-40%, 20-40%, 20-40%). The orientation preference of dendritic shafts was identical to the soma, consistent with back-propagating action potentials (data not shown). Orientation tuning of GABAergic dendrites (Fig. 6) was mapped using the standard stimulus set at full contrast. The stimulus duration was 2 s; because of the slower decay of calcium transients⁴¹ we used a 6 s inter trial interval.

Imaging mouse V1 neurons and dendrites

Mice were placed on a warm blanket (37°C) and kept anesthetized with 0.5% isoflurane and sedated with chlorprothixene (20-40 μ L at 0.33 mg/ml, i.m.)³⁰. Imaging was performed using a custom-built two-photon microscope (designs available at research.janelia.org/Svoboda) equipped with a resonant galvo scanning module (Thorlabs), controlled by ScanImage (scanimage.org)⁶⁰. The light source was a Mai Tai femtosecond pulsed laser (Spectra-Physics) running at 940 nm. The objective was a 16× water immersion lens (Nikon, 0.8 NA, 3 mm working distance). The power used was 35-50 mW for full field imaging (Fig. 2) and 20-40 mW for higher zoom imaging (Fig. 3-6).

Images were collected at 15 Hz (512 × 512 pixels, 250 μ m × 250 μ m; Fig. 2) or 60 Hz (256 × 256 pixels, 30 μ m × 30 μ m; Fig. 3), or 15 Hz (512 × 512 pixels, 30 μ m × 30 μ m; Fig. 4-5), or 15 Hz (512 × 512 pixels, 30 μ m × 30 μ m - 100 μ m × 100 μ m; Fig. 6). For dendritic imaging experiments (Fig. 4-6), fields of view were chosen so that extended dendritic segments were in one focal plane. At the end of each imaging session, z-stacks (1 μ m step size) of the recorded cells were acquired. The coordinates of the imaged dendrites relative to the parent somata were recorded. The orientation, curvature, and the branching pattern of the dendrites together with the constellation of spines, helped to precisely identify the same field of view in long-term imaging experiments.

Electrophysiology

In vivo cell-attached recordings were performed using glass pipettes (~ 5 -7 M Ω) filled with solution containing the following (in mM): 125 NaCl, 5 KCl, 10 glucose, 10 HEPES, 2 CaCl₂, 2 MgSO₄, and 0.1 Alexa Fluor 594; pH 7.4). Signals were amplified using an AxoPatch 200B amplifier (Molecular Devices), filtered at 5 kHz, and digitized at 10 kHz.

Spikes were recorded using current clamp mode. The frame trigger pulses of ScanImage 4.0 were also recorded and used offline to synchronize individual frames to electrophysiological recordings. After establishment of a low-resistance seal (15-50 MΩ), the orientation, spatial and temporal frequency of the stimuli was quickly optimized for individual neurons using recorded spikes. The optimal grating stimulus was repeated at a reduced contrast to maintain a moderate spiking rate.

Image analysis

Mechanical drift in the imaging plane was corrected using the TurboReg plug-in in ImageJ⁶¹. All remaining analyses were performed in MATLAB. Regions-of-interest (ROIs) corresponding to visually identifiable cell bodies were selected using a semi-automated algorithm (Supplementary Fig. 14). For GCaMP, ring-shaped ROIs were placed at the cytosolic regions of the cells (excluding the nucleus; GCaMP expression is typically restricted to the cytoplasm¹¹). For OGB1-AM, circular ROIs covering the whole soma were used. For long-term GCaMP imaging, baseline fluorescence images of multiple sessions were inspected manually, and only the cells that could be clearly identified in all imaged sessions were included in the analysis. The fluorescence time course of each cell was measured by averaging all pixels within the ROI, with a correction for neuropil contamination⁴¹. The fluorescence signal of a cell body was estimated as $F_{cell_true}(t) = F_{cell_measured}(t) - r * F_{neuropil}(t)$, with $r = 0.7$. The neuropil signal $F_{neuropil}(t)$ surrounding each cell was measured by averaging the signal of all pixels within a 20 μm region from the cell center (excluding all selected cells). Cell-attached recordings confirmed that neuropil-compensated fluorescence changes reflect action potentials in single neurons (Supplementary Fig. 15). To ensure robust neuropil subtraction, only cells that were at least 3% brighter than the surrounding neuropil were included. The neuropil correction was not applied for dendritic imaging experiments because sparse labeling provided negligibly low background. F/F_0 was calculated as $(F - F_0)/F_0$, where F_0 is the baseline fluorescence signal averaged over a 2 second period immediately before the start of visual stimulation. Visual responses were measured for each trial as F/F_0 , averaged over the stimulus period. Visually responsive neurons were defined as cells with significant stimulus-related fluorescence changes (ANOVA across blank and eight direction periods, $p < 0.01$)⁵ with an average F/F_0 at preferred orientations greater than 6%.

The orientation selectivity index (OSI) was calculated for visually responsive cells^{16,30}. First, the preferred orientation (θ_{pref}) of the cell was determined as the stimulus that produced the strongest response. The orientation tuning curve was constructed by measuring the mean F/F_0 , averaged over the stimulus period, for each orientation. We then fitted the tuning curve with the sum of two Gaussians centered on θ_{pref} and $\theta_{pref} + \pi$, both with width σ (constrained to $> 15^\circ$), amplitudes A_1 and A_2 , and a constant baseline B . The OSI was defined as $OSI = (R_{pref} - R_{ortho}) / (R_{pref} + R_{ortho})$, where R_{pref} and R_{ortho} are the response amplitudes at the preferred (θ_{pref}) and the orthogonal orientation ($\theta_{pref} + \pi/2$) respectively.

For simultaneous imaging and cell-attached recording, ring-shaped ROIs were placed over the cytosolic regions of the cells. Fluorescence transients at the soma were caused by action potentials, with little contribution from subthreshold activity⁶² (Supplementary Fig. 15). To

quantify the efficiency for detecting single APs (Fig. 3), we identified single AP events with nearby APs at least 1 s away. Fluorescence traces consisting of 10 frames (0.17 s) before and 60 frames (1 s) after the i^{th} 1 AP event were assembled in 70-dimensional vectors, f_i . Segments of noisy traces, n_i were taken from periods without APs. The average of all 1 AP traces was used as a template vector, $f_{\text{template}} = \sum f_i / N$. The vector was normalized after subtraction of the mean to create a unit vector $\hat{f}_{\text{template}}$. The projection of f_i or n_i along the direction of $\hat{f}_{\text{template}}$ was calculated to obtain a scalar f_i or n_i , respectively. The AP detection threshold was defined as the 99th percentile of all n_i values (*i.e.*, 1% false positive), and the percentage of the f_i values above the detection threshold was the AP detection efficiency.

For spine images (Fig. 4-5), circular ROIs were placed over individual dendritic spines to measure spine fluorescence and compute F/F_{0_spine} . To minimize contamination from back-propagating action potentials (BAPs), we either recorded from ‘silent cells’ (~40 % of cells) showing few or no APs in response to a standard set of grating stimuli (Fig. 4), or used stimuli with reduced stimulus contrast (Fig. 5).

Occasional BAP related calcium signals that invaded the imaged spines were removed using a subtraction method, implemented in three steps (Supplementary Fig. 11). First, a region covering the entire parent dendritic shaft (~30 micrometers of dendritic length; excluding all spines) was drawn for each recorded dendritic segment to estimate BAP related global dendritic signal, $F/F_{0_dendrite}$. Because of the much larger volume of the dendritic shaft compared to tuned dendritic spines (100-fold), spines above and below the focal plane were expected to contribute negligible signal to $F/F_{0_dendrite}$. This was verified using principle component analysis (data not shown). Plotting F/F_{0_spine} against $F/F_{0_dendrite}$ reveals two components of spine signals, a BAP-related component and a spine-specific component. Second, the BAP-related component was removed from the spine signals by subtracting a scaled version of the dendritic shaft signal, $F/F_{0_spine_specific} = F/F_{0_spine} - \alpha \cdot F/F_{0_dendrite}$. α was determined using robust regression (MATLAB function ‘robustfit.m’) of F/F_{0_spine} vs. $F/F_{0_dendrite}$ (the slope of the fitted line in Supplementary Fig. 11b). Third, the visual responsiveness ($F/F_0 > 10\%$) and the OSI of individual spines were calculated with the BAP signal removed. Active spines (Fig. 4f) were defined as spines showing at least three spine-specific (*i.e.*, BAP independent) calcium events during the 5 minute imaging session, with an event defined as an episode of the calcium signal that crosses 3 s.d. of the baseline noise for at least three consecutive frames (~50 ms).

We next confirmed the effectiveness of the BAP removal algorithm. First, BAP removed spine signals showed sharp orientation tuning ($OSI = 0.84 \pm 0.14$, mean \pm s.d., $n=190$ spines) comparable to V1 excitatory neurons (Supplementary Fig. 9, $p > 0.05$, Wilcoxon rank sum). This holds even for spines preferring the orthogonal orientation compared to the soma ($OSI = 0.82 \pm 0.16$, $n=24$ spines), indicating that the BAP contamination was cleanly removed. Second, the majority (79.7%) of visually responsive spines showed little trial-to-trial correlation with the dendritic shaft signal after BAP subtraction. 20.3% spines still displayed significant correlation with shaft responses compared to trial shuffled controls ($p < 0.01$). This could reflect synchronously active pre-synaptic cells, or imperfect BAP action potential signal subtraction. Because we were unable to distinguish between these possibilities, these spines were excluded from further analysis. In two cells (cell 4 and cell 5;

Fig. 5), we collected larger numbers of trials (15 trials per orientation), which made it possible to further exclude trials with detectable dendritic responses ($F/F_0 > 6\%$). The result (*i.e.*, the preferred orientation of the summed spine responses) was identical as with using the subtraction procedure alone.

For the analysis of GABAergic cells (Fig. 6), dendrites were traced using ‘Simple neurite tracer’ in ImageJ⁶³. The program outputs a 1D sequence of coordinates traversing a dendrite and a 2D mask covering the traced dendrite, which were used to define ROIs along the dendrite (size, 1.5 μm of dendritic length; spacing, 1 μm). Visual responsiveness and orientation selectivity index were computed for individual ROIs. A region of dendrite is considered orientation selective if its response to least one stimulus orientation is significantly different from other orientations ($p < 0.01$, ANOVA across 8 conditions). Because synaptic and BAP signals were intermixed in the same dendritic compartment, no attempt was made to isolate synaptic signals from BAP-related components. We did not analyze the relationship between integrated synaptic signals and the output tuning in GABAergic cells.

Reagent distribution

DNA constructs and AAV particles with GCaMP6 variants were deposited for distribution at Addgene (www.addgene.org) and the University of Pennsylvania Vector Core (www.med.upenn.edu/gtp/vectorcore) and the Bloomington Drosophila Stock Center (flystocks.bio.indiana.edu), respectively.

Supplementary Material

Refer to Web version on PubMed Central for supplementary material.

Acknowledgments

We thank J. Akerboom and L. Tian for constructs and advice; J. Hasseman, M. Ramirez, G. Tsegaye for molecular cloning; B. Shields for neuronal culture; A. Hu for histology; B. Fosque, R. Behnam, K. Ritola for virus production; J. Macklin and R. Patel for spectroscopy; B. Coop and L. Ramasamy for multiwell electrode manufacturing; K. Smith for mouse viral transduction; K. Hibbard for fly husbandry; J. Yu, C. Niell, M. Stryker, J. Trachtenberg and A. Kerlin for advice on visual cortex experiments.

References

1. Baker PF, Hodgkin AL, Ridgway EB. Depolarization and calcium entry in squid giant axons. *J Physiol.* 1971; 218:709–755. [PubMed: 5133953]
2. Kerr R, et al. Optical imaging of calcium transients in neurons and pharyngeal muscle of *C. elegans*. *Neuron.* 2000; 26:583–594. [PubMed: 10896155]
3. Tank DW, Sugimori M, Connor JA, Llinas RR. Spatially resolved calcium dynamics of mammalian Purkinje cells in cerebellar slice. *Science.* 1988; 242:773–777. [PubMed: 2847315]
4. Sabatini BL, Oertner TG, Svoboda K. The life cycle of Ca^{2+} ions in dendritic spines. *Neuron.* 2002; 33:439–452. [PubMed: 11832230]
5. Ohki K, Chung S, Ch'ng YH, Kara P, Reid RC. Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex. *Nature.* 2005; 433:597–603. [PubMed: 15660108]
6. Huber D, et al. Multiple dynamic representations in the motor cortex during sensorimotor learning. *Nature.* 2012; 484:473–478. [PubMed: 22538608]

7. Svoboda K, Denk W, Kleinfeld D, Tank DW. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature*. 1997; 385:161–165. [PubMed: 8990119]
8. Petreanu L, et al. Activity in motor-sensory projections reveals distributed coding in somatosensation. *Nature*. 2012; 489:299–303. [PubMed: 22922646]
9. Wang Y, et al. Stereotyped odor-evoked activity in the mushroom body of *Drosophila* revealed by green fluorescent protein-based Ca²⁺ imaging. *J Neurosci*. 2004; 24:6507–6514. [PubMed: 15269261]
10. Jia H, Rochefort NL, Chen X, Konnerth A. Dendritic organization of sensory input to cortical neurons in vivo. *Nature*. 2010; 464:1307–1312. [PubMed: 20428163]
11. Tian L, et al. Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Methods*. 2009; 6:875–881. [PubMed: 19898485]
12. Zariwala HA, et al. A Cre-Dependent GCaMP3 Reporter Mouse for Neuronal Imaging In Vivo. *J Neurosci*. 2012; 32:3131–3141. [PubMed: 22378886]
13. Mao T, O'Connor DH, Scheuss V, Nakai J, Svoboda K. Characterization and subcellular targeting of GCaMP-type genetically-encoded calcium indicators. *PloS One*. 2008; 3:e1796. [PubMed: 18350138]
14. Dreosti E, Odermatt B, Dorostkar MM, Lagnado L. A genetically encoded reporter of synaptic activity in vivo. *Nat Methods*. 2009; 6:883–889. [PubMed: 19898484]
15. Guerrero G, et al. Heterogeneity in synaptic transmission along a *Drosophila* larval motor axon. *Nat Neurosci*. 2005; 8:1188–1196. [PubMed: 16116446]
16. Akerboom J, et al. Optimization of a GCaMP Calcium Indicator for Neural Activity Imaging. *J Neurosci*. 2012; 32:13819–13840. [PubMed: 23035093]
17. Nakai J, Ohkura M, Imoto K. A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 2001; 19:137–141. [PubMed: 11175727]
18. Mank M, et al. A genetically encoded calcium indicator for chronic in vivo two-photon imaging. *Nat Methods*. 2008
19. Miyawaki A, et al. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*. 1997; 388:882–887. [PubMed: 9278050]
20. Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A. Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca²⁺ by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:10554–10559. [PubMed: 15247428]
21. Palmer AE, et al. Ca²⁺ Indicators Based on Computationally Redesigned Calmodulin-Peptide Pairs. *Chem Biol*. 2006; 13:521–530. [PubMed: 16720273]
22. Horikawa K, et al. Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca(2+) indicators, yellow Cameleon-Nano. *Nat Methods*. 2010; 7:729–732. [PubMed: 20693999]
23. Pologruto TA, Yasuda R, Svoboda K. Monitoring neural activity and [Ca²⁺] with genetically encoded Ca²⁺ indicators. *J Neurosci*. 2004; 24:9572–9579. [PubMed: 15509744]
24. Reiff DF, et al. In vivo performance of genetically encoded indicators of neural activity in flies. *J Neurosci*. 2005; 25:4766–4778. [PubMed: 15888652]
25. Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:11241–11246. [PubMed: 10500161]
26. Crivici A, Ikura M. Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1995; 24:85–116. [PubMed: 7663132]
27. Akerboom J, et al. Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design. *J Biol Chem*. 2009; 284:6455–6464. [PubMed: 19098007]
28. Bayley PM, Findlay WA, Martin SR. Target recognition by calmodulin: dissecting the kinetics and affinity of interaction using short peptide sequences. *Protein Sci*. 1996; 5:1215–1228. [PubMed: 8819155]
29. Shaner NC, et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 2004
30. Niell CM, Stryker MP. Highly selective receptive fields in mouse visual cortex. *J Neurosci*. 2008; 28:7520–7536. [PubMed: 18650330]

31. Trachtenberg JT, et al. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*. 2002; 420:788–794. [PubMed: 12490942]
32. Mainen ZF, Malinow R, Svoboda K. Synaptic calcium transients in single spines indicate that NMDA receptors are not saturated. *Nature*. 1999; 399:151–155. [PubMed: 10335844]
33. Chen X, Leischner U, Rochefort NL, Nelken I, Konnerth A. Functional mapping of single spines in cortical neurons in vivo. *Nature*. 2011; 475:501–505. [PubMed: 21706031]
34. Binzegger T, Douglas RJ, Martin KA. A quantitative map of the circuit of cat primary visual cortex. *J Neurosci*. 2004; 24:8441–8453. [PubMed: 15456817]
35. Ko H, et al. Functional specificity of local synaptic connections in neocortical networks. *Nature*. 2011; 473:87–91. [PubMed: 21478872]
36. Hansel D, van Vreeswijk C. The mechanism of orientation selectivity in primary visual cortex without a functional map. *J Neurosci*. 2012; 32:4049–4064. [PubMed: 22442071]
37. Liu BH, et al. Broad inhibition sharpens orientation selectivity by expanding input dynamic range in mouse simple cells. *Neuron*. 2011; 71:542–554. [PubMed: 21835349]
38. Tan AY, Brown BD, Scholl B, Mohanty D, Priebe NJ. Orientation selectivity of synaptic input to neurons in mouse and cat primary visual cortex. *J Neurosci*. 2011; 31:12339–12350. [PubMed: 21865476]
39. Sobczyk A, Scheuss V, Svoboda K. NMDA receptor subunit-dependent [Ca²⁺] signaling in individual hippocampal dendritic spines. *J Neurosci*. 2005; 25:6037–6046. [PubMed: 15987933]
40. Sohya K, Kameyama K, Yanagawa Y, Obata K, Tsumoto T. GABAergic neurons are less selective to stimulus orientation than excitatory neurons in layer II/III of visual cortex, as revealed by in vivo functional Ca²⁺ imaging in transgenic mice. *J Neurosci*. 2007; 27:2145–2149. [PubMed: 17314309]
41. Kerlin AM, Andermann ML, Berezovskii VK, Reid RC. Broadly tuned response properties of diverse inhibitory neuron subtypes in mouse visual cortex. *Neuron*. 2010; 67:858–871. [PubMed: 20826316]
42. Bock DD, et al. Network anatomy and in vivo physiology of visual cortical neurons. *Nature*. 2011; 471:177–182. [PubMed: 21390124]
43. Hofer SB, et al. Differential connectivity and response dynamics of excitatory and inhibitory neurons in visual cortex. *Nat Neurosci*. 2011; 14:1045–1052. [PubMed: 21765421]
44. Goldberg JH, Tamas G, Yuste R. Ca²⁺ imaging of mouse neocortical interneurone dendrites: I_A-type K⁺ channels control action potential backpropagation. *J Physiol*. 2003; 551:49–65. [PubMed: 12844506]
45. Gulyas AI, Megias M, Emri Z, Freund TF. Total number and ratio of excitatory and inhibitory synapses converging onto single interneurons of different types in the CA1 area of the rat hippocampus. *J Neurosci*. 1999; 19:10082–10097. [PubMed: 10559416]
46. Goldberg JH, Tamas G, Aronov D, Yuste R. Calcium microdomains in aspiny dendrites. *Neuron*. 2003; 40:807–821. [PubMed: 14622584]
47. Katona G, et al. Roller Coaster Scanning reveals spontaneous triggering of dendritic spikes in CA1 interneurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108:2148–2153. [PubMed: 21224413]
48. Zhao Y, et al. An expanded palette of genetically encoded Ca(2) indicators. *Science*. 2011; 333:1888–1891. [PubMed: 21903779]
49. Akerboom J, et al. Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics. *Front Mol Neurosci*. 2013; 6:2. [PubMed: 23459413]
50. Kobat D, et al. Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation. *Opt Express*. 2009; 17:13354–13364. [PubMed: 19654740]
51. Hanawa H, et al. Efficient gene transfer into rhesus repopulating hematopoietic stem cells using a simian immunodeficiency virus-based lentiviral vector system. *Blood*. 2004; 103:4062–4069. [PubMed: 14976042]
52. Gibson DG, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*. 2009; 6:343–345. [PubMed: 19363495]
53. Stewart SA, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA*. 2003; 9:493–501. [PubMed: 12649500]

54. Kralj JM, Douglass AD, Hochbaum DR, Maclaurin D, Cohen AE. Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin. *Nat Methods*. 2012; 9:90–95. [PubMed: 22120467]
55. Suter BA, et al. Ephus: multipurpose data acquisition software for neuroscience experiments. *Front Neural Circuits*. 2010; 4:100. [PubMed: 21960959]
56. Xu NL, et al. Nonlinear dendritic integration of sensory and motor input during an active sensing task. *Nature*. 2012; 492:247–251. [PubMed: 23143335]
57. Hippenmeyer S, et al. A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol*. 2005; 3:e159. [PubMed: 15836427]
58. Brainard DH. The Psychophysics Toolbox. *Spatial vision*. 1997; 10:433–436. [PubMed: 9176952]
59. Pelli DG. The VideoToolbox software for visual psychophysics: transforming numbers into movies. *Spat Vis*. 1997; 10:437–442. [PubMed: 9176953]
60. Pologruto TA, Sabatini BL, Svoboda K. ScanImage: Flexible software for operating laser-scanning microscopes. *Biomed Eng Online*. 2003; 2:13. [PubMed: 12801419]
61. Thevenaz P, Ruttimann UE, Unser M. *IEEE Trans Image Process*. 1998; 7:27–41. [PubMed: 18267377]
62. Bandyopadhyay S, Shamma SA, Kanold PO. Dichotomy of functional organization in the mouse auditory cortex. *Nat Neurosci*. 2010; 13:361–368. [PubMed: 20118924]
63. Longair MH, Baker DA, Armstrong JD. Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics*. 2011; 27:2453–2454. [PubMed: 21727141]
64. Wang Q, Shui B, Kotlikoff MI, Sondermann H. Structural basis for calcium sensing by GCaMP2. *Structure*. 2008; 16:1817–1827. [PubMed: 19081058]

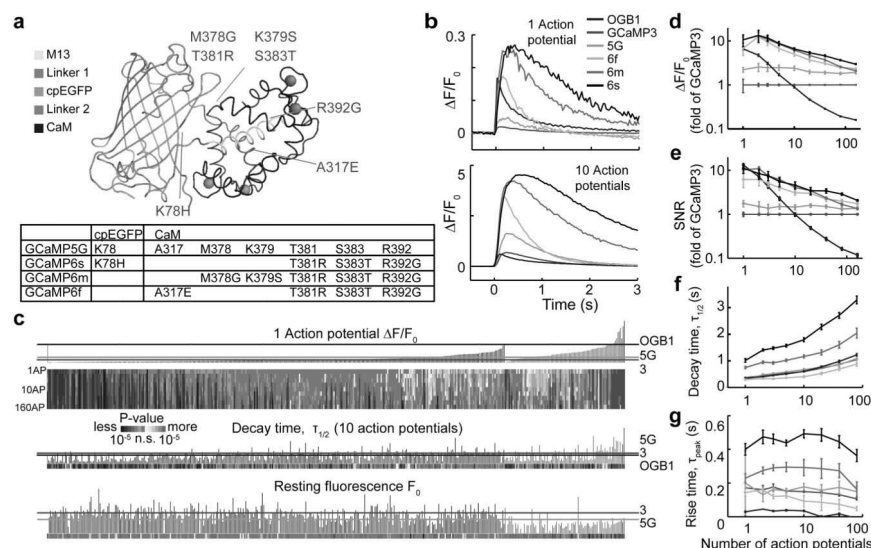


Figure 1. GCaMP mutagenesis and screening in dissociated neurons

a, GCaMP structure^{27,64} and mutations in different GCaMP variants relative to GCaMP5G.

b, Responses averaged across multiple neurons and wells for GCaMP3, 5G, 6f, 6m, 6s, and OGB1-AM. Top, fluorescence changes in response to 1 action potential. Bottom, 10 action potentials.

c, Screening results, 447 GCaMPs. Top, fluorescence change in response to 1 action potential (vertical bars, F/F_0 ; green bar, OGB1-AM, left; black bars, single GCaMP mutations; red bars, combinatorial mutations; blue, GCaMP6 indicators) and significance values for different action potential stimuli (color plot). Middle, half decay time after 10 action potentials. Bottom, resting fluorescence, F_0 normalized to nuclear mCherry fluorescence. Red line, GCaMP3 level; green line, GCaMP5G level; blue line, OGB1-AM level.

d-g, Comparison of GCaMP sensors and OGB1-AM (blue) as a function of stimulus strength (colors as in b). **d**, response amplitude; **e**, SNR; **f**, half decay time; **g**, time to peak (after stimulus offset). Error bars correspond to s.e.m (n=300, 16, 8, 11, 13, 11 wells for GCaMP3, GCaMP5G, OGB1-AM, 6f, 6m, 6s, respectively).

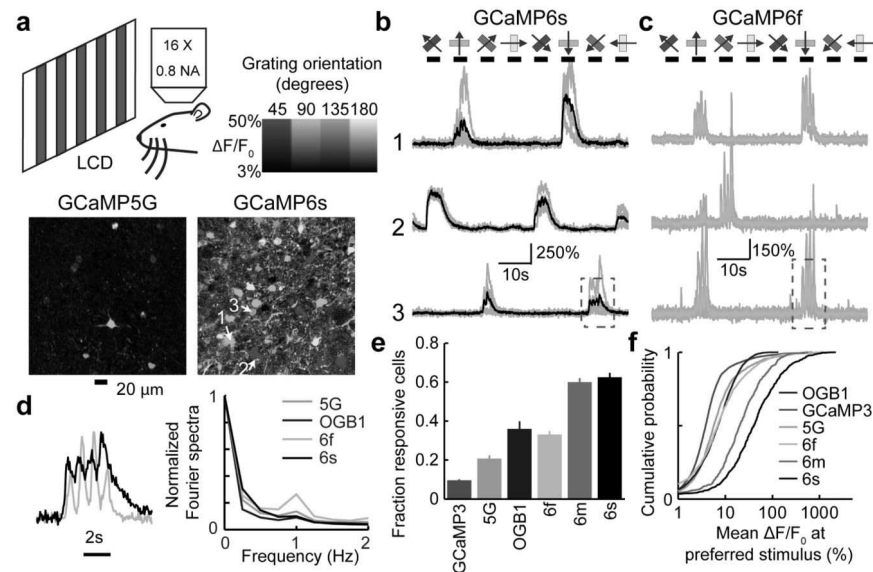


Figure 2. GCaMP6 performance in the mouse visual cortex

- a**, Top, schematic of the experiment. Bottom, field of view showing neurons color-coded according to their preferred orientation (hue) and response amplitude (brightness) for GCaMP5G (left) and GCaMP6s (right).
- b**, Example traces from three neurons expressing GCaMP6s. Single sweeps (grey) and averages of 5 sweeps (black) are overlaid. Directions of grating motion (8 directions) are shown above traces (arrows).
- c**, Example traces from three neurons expressing GCaMP6f. Single sweeps (grey) and averages of 5 sweeps (cyan) are overlaid.
- d**, Top, high magnification view of fluorescence changes corresponding to the red boxes in b (black) and c (cyan), normalized to the peak of the response. Bottom, Fourier spectra normalized to the response amplitude at 0 Hz for neurons driven with 1 Hz drifting gratings, transduced with GCaMP5G, OGB1-AM, 6f, 6s.
- e**, The fraction of cells scored as responding to visual stimulation when loaded with different calcium indicators. Error bars correspond to s.e.m. ($n=70, 39, 23, 38, 21, 34$ FOVs for GCaMP3, 5G, OGB1-AM, 6f, 6m, 6s, respectively). GCaMP3, 5G, and OGB1-AM data are from ref ¹⁶.
- f**, The distribution of fluorescence changes across cells at the preferred orientation.

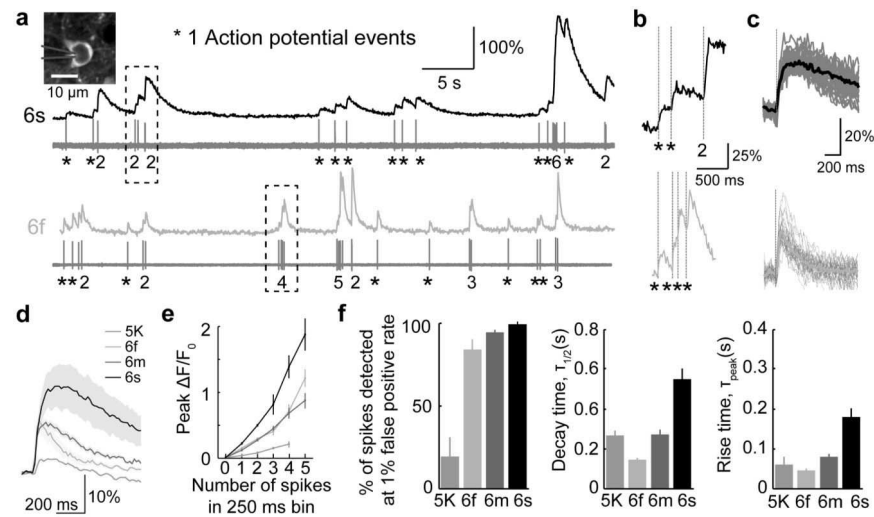


Figure 3. Combined imaging and electrophysiology in the visual cortex

a, Simultaneous fluorescence dynamics and spikes in a GCaMP6s (top) and a GCaMP6f (bottom) expressing neuron. The number of spikes for each burst is indicated below the trace (single spikes are indicated by asterisks). Left inset, a GCaMP6s expressing neuron with the recording pipette indicated schematically.

b, Zoomed-in view of bursts of action potentials. Top, GCaMP6s; bottom, GCaMP6f.

c, Fluorescence change in response to one action potential. Top, GCaMP6s; bottom, GCaMP6f.

d, Median fluorescence change in response to one action potential for different calcium indicators. Shading corresponds to s.e.m., $n = 9$ (GCaMP5K, data from ref ¹⁶), 11 (GCaMP6f), 10 (GCaMP6m), 9 (GCaMP6s) cells. GCaMP5K and GCaMP5G have similar properties¹⁶.

e, Peak fluorescence change as a function of number of action potentials in a 250 ms bin (5K: $n = 161$, 65, 22, 4 events for 1, 2, 3, 4 action potentials; 6f: $n = 366$, 120, 50, 15, 7 events for 1, 2, 3, 4, 5 action potentials; 6m: $n = 354$, 105, 31, 11, 7 events for 1, 2, 3, 4, 5 action potential; 6s: $n = 250$, 60, 20, 5, 4 events for 1, 2, 3, 4, 5 action potentials). Error bars correspond to s.e.m.

f, Comparison of GCaMP indicators. Left, fraction of isolated spikes detected at 1% false positive rate. Middle, half decay time. Right, rise time to peak. Error bars correspond to s.e.m.

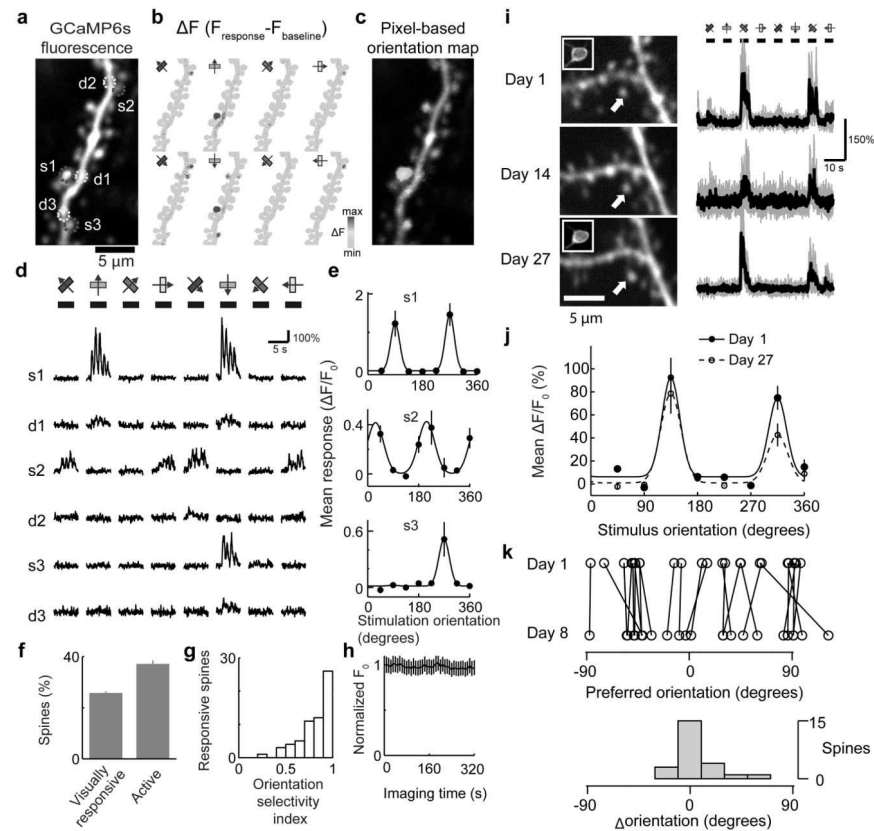


Figure 4. Imaging activity in dendritic spines in the visual cortex

a, Image of an L2/3 dendritic branch expressing GCaMP6s. Regions of interest (ROIs) are indicated as dashed circles (red, spines; yellow, dendrites).

b, Map of fluorescence change ($F = F_{\text{response}} - F_{\text{baseline}}$) in response to drifting gratings of 8 different orientations.

c, Pixel-based map of orientation preference.

d, Responses of dendritic spines (s1-s3) and neighboring dendritic shafts (d1-d3) to drifting gratings with different orientations (corresponding to ROIs indicated in **a**).

e, Orientation tuning of individual spines (s1, s2, s3). Error bars correspond to s.e.m. (n=5 trials).

f, Fraction of spines that show detectable calcium transients (active) and respond to visual stimulation (responsive) (see Methods for definitions) (228 spines; 15 dendrites; 4 mice).

g, Distribution of the orientation selectivity index across visually responsive spines (62 spines).

h, Baseline fluorescence across individual dendritic spines over 320 seconds of continuous imaging (228 spines; 15 dendrites; 4 mice; error bars reflect s.e.m. across spines).

i, Left, the same GCaMP6s labeled spine imaged over weeks. Right, fluorescence responses to oriented drifting gratings. Insets, parent soma of imaged spines.

j, Orientation selectivity of single spines measured over time (same as **i**).

k, Top, preferred orientation for spines that responded in two imaging sessions separated by one week. Opposing stimulus directions are considered as equivalent in this analysis.

Bottom, the distribution of ΔOri (difference in preferred orientation between two sessions).

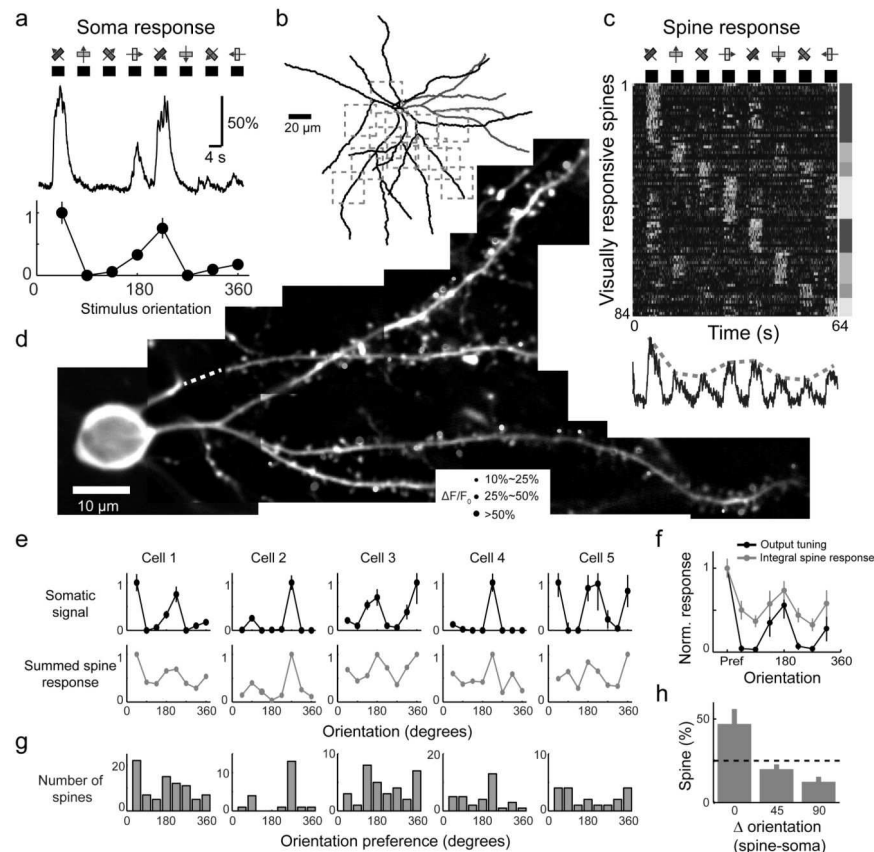


Figure 5. The orientation preference of populations of dendritic spines predicts the orientation preference of their parent neuron

a, Somatic fluorescence responses of a GCaMP6s-expressing layer 2/3 pyramidal neuron (depth, 120 μm) to oriented drifting gratings (Top) and the corresponding tuning curve (Bottom, normalized).

b, Reconstruction of the dendritic arbor (red dendrites, dendrites shown in d; dashed squares, additional imaged regions).

c, Top, fluorescence responses of visually responsive spines (84/298) sorted by their preferred orientation (averaged over 5 trials). Each row shows one spine normalized to its peak. Bottom, summed F/F_0 across all spines (without normalization).

d, Locations of orientation selective spines on a subset of imaged dendrites (corresponding to red dendrites in b). The size of the circle corresponds to the averaged F/F_0 at the preferred stimulus, the color indicates the preferred orientation, and the saturation of the color encodes the orientation selectivity index (OSI=1, saturated color; OSI=0, white).

e, Top, tuning curve of somatic F/F_0 . Bottom, summed spine F/F_0 . Cell 1 corresponds to panels a-d.

f, Averaged output tuning (black) and integral spine response (gray) across the 5 neurons (same cells as in e). The tuning curves were aligned to the preferred orientation of the output response (0 degree). The average was normalized.

g, The distribution of preferred orientation of dendritic spines (5 cells; number of spines sampled: 298,166,137,278,116).

h, Fraction of visually responsive spines preferring orientations 0, 45 or 90 degree away from the postsynaptic cell's preferred orientation. Opposing stimulus directions are considered as equivalent in this analysis. Error bars correspond to s.e.m.

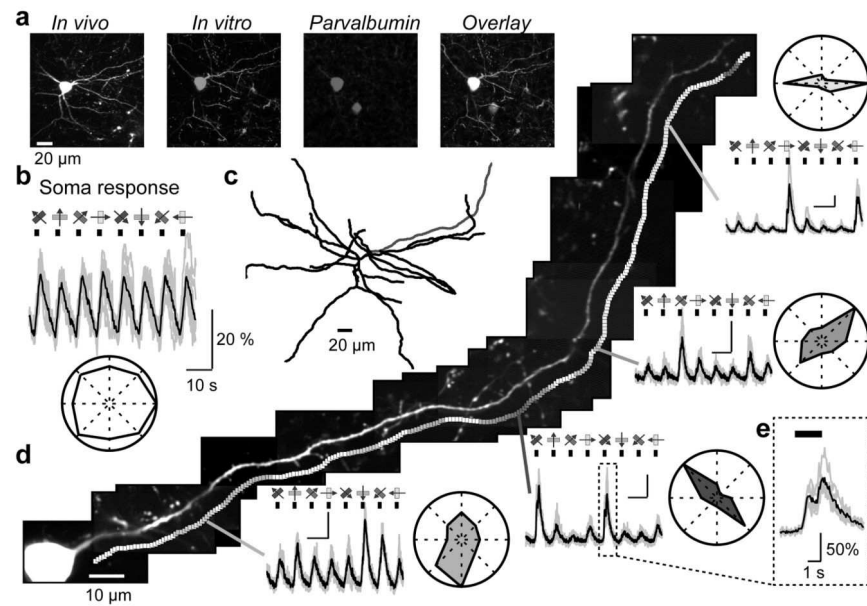


Figure 6. Orientation-tuned domains in dendrites of GABAergic interneurons

- a**, A GCaMP6s-expressing interneuron (soma depth, 250 μm), identified *post hoc* as a parvalbumin-positive interneuron.
- b**, Somatic fluorescence changes to oriented drifting grating (same cell as in **a**). Bottom, polar plot.
- c**, Reconstruction of the dendritic arbor based on GCaMP6s fluorescence.
- d**, Left, a dendrite of the cell (red in **c**) was imaged along its entire length. Colored squares indicate dendritic sites showing significant orientation tuning ($p < 0.01$, ANOVA across 8 stimulus directions). The color of each square indicates the local preferred orientation, and the saturation of the color encodes the orientation selectivity index (OSI=1, saturated color; OSI=0, white). Right, example dendritic fluorescence changes and the corresponding polar plots for four locations with distinct orientation preferences. Scale bars: 10s; 50% F/F.
- e**, Zoomed-in view of the dendritic calcium signal corresponding to the box in **d**. The signal shows modulation at the frequency of the drifting grating (1 Hz).