

УДК 577.352.465

ДВА ТИПА КЛЕТОЧНЫХ БИОСЕНСОРОВ СЕРОТОНИНА

© 2023 г. О. А. Рогачевская^{а, *}, А. П. Черкашин^а, Е. Е. Копылова^а, М. Ф. Быстрова^а

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com

Поступила в редакцию 31.08.2022 г.

После доработки 28.09.2022 г.

Принята к публикации 30.09.2022 г.

Метод клеточных биосенсоров, позволяющий локально детектировать вещества, секретируемые одиночными клетками, традиционно используется в изучении периферической вкусовой системы. В основе этого метода лежит клетка, экспрессирующая рецептор секретируемой молекулы, который обычно сопряжен с мобилизацией Ca^{2+} . Таким образом, высвобождение нейротрансмиттера исследуемыми клетками можно отслеживать в реальном времени по Ca^{2+} -сигналам в клетках-биосенсорах. Определенной особенностью таких сенсоров является то, что Ca^{2+} -сигналы, инициируемые лигандами GPCR-рецепторов, могут генерироваться по принципу “все или ничего” за счет участия Ca^{2+} -индуцированного выброса Ca^{2+} (CICR), являющегося триггер-подобным механизмом. По ответам такого биосенсора можно констатировать сам факт секреции нейромедиатора, но для изучения регуляций, влияющих на количество высвобождаемого нейромедиатора, такие биосенсоры малоприспособлены. С этой точки зрения градуальные биосенсоры, которые используют иные сигнальные системы, например cAMP-систему, могут оказаться более информативными. Нами были получены биосенсоры серотонина двух типов. Один биосенсор был получен на основе клеток СНО, экспрессирующих рекомбинантный рецептор 5-HT_{2C}, сопряженный фосфолипазным путем с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} . Другой биосенсор представлял собой клетки НЕК-293, экспрессирующие как рецептор 5-HT₄, сопряженный с активацией аденилатциклазы, так и флуоресцентный белок Pink Flamingo (НЕК/5-HT₄/PF), являющийся генетически кодируемым молекулярным сенсором cAMP. Хотя оба клеточных биосенсора позволяли детектировать серотонин в наномолярных концентрациях, 5-HT_{2C}-положительные клетки генерировали Ca^{2+} -ответы в соответствии с принципом “все или ничего”. Между тем в клетках, экспрессирующих рецептор 5-HT₄ и Pink Flamingo, серотонин-индуцируемые cAMP-сигналы градуально возрастали с концентрацией агониста в области 0.3–30 нМ. Представляется, что НЕК/5-HT₄/PF биосенсор вполне пригоден для исследований механизмов регуляции секреции серотонина.

Ключевые слова: клеточный биосенсор, серотонин, Ca^{2+} -сигнализация, cAMP-сигнализация, генетически кодируемые сенсоры

DOI: 10.31857/S0233475523010085, **EDN:** NTZCSG

ВВЕДЕНИЕ

Изучение секреции сигнальных молекул на уровне одиночной клетки сопряжено с необходимостью мониторинга секретируемого соединения в локальной области пространства и в режиме реального времени. Эффективным подходом для решения этой задачи является метод клеточного биосенсора. В основе этого метода лежит клетка, экспрессирующая рецептор секретируемой молекулы, который сопряжен с сигнальной системой, активность которой можно тем или иным образом детектировать. Обычно используются гептаспиральные рецепторы (G-protein-coupled receptor, GPCR), рекомбинантные или эндогенные, которые сопряжены с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} . Методы мониторинга последнего в

реальном времени хорошо отработаны [1]. С использованием метода клеточного биосенсора была проанализирована секреция различных нейротрансмиттеров, идентифицированных во вкусовой почке, таких как серотонин [2], АТР [3, 4], норадреналин [5], ГАМК [6] и ацетилхолин [7]. Серотонин — первый нейромедиатор, идентифицированный во вкусовой системе вначале иммуногистохимически, а затем физиологически и методом клеточного биосенсора [2, 8]. Считается, что экзоцитозный механизм обеспечивает секрецию серотонина в ответ на вкусовую стимуляцию вкусовых клеток III типа. В режиме on-line это впервые было показано с использованием клеток СНО, стабильно экспрессирующих рекомбинантный рецептор 5-HT_{2C} [2], и в этой работе ре-

шалась задача демонстрации стимул-зависимого выброса серотонина. Между тем количественные характеристики секреции, например анализ зависимости количества секретируемого серотонина от интенсивности вкусового стимула, требуют градуального сенсора, т.е. сенсора, ответы которого пропорциональны локальной концентрации соединения, высвобожденного клеткой за определенное время. В предыдущих работах было показано, что многие клетки в ответ на агонисты GPCR-рецепторов генерируют Ca^{2+} -сигналы по принципу “все или ничего” [9, 10]. Иными словами, при разных дозах выше пороговой, агонисты инициировали Ca^{2+} -сигналы, практически идентичные по амплитуде и близкие по форме. Возникает вопрос, можно ли получить градуальный клеточный сенсор серотонина путем гетерологичной экспрессии серотониновых GPCR-рецепторов, сопряженных фосфоинозитидным каскадом с мобилизацией Ca^{2+} , к которым относятся серотониновые рецепторы 5-HT2 типа [11]. На базе клеток СНО, трансфицированных плазмидой для гетерологичной экспрессии рецептора 5-HT2C, нами был получен сенсор, способный детектировать серотонин в наномолярной области концентраций. Оказалось, однако, что 5-HT2C-положительные клетки СНО генерировали Ca^{2+} -ответы на серотонин по принципу “все или ничего” и, следовательно, были непригодны для количественного анализа секреции. Следует отметить, что семейство GPCR-рецепторов серотонина включает рецепторы, сопряженные с аденилатциклазой [12], например 5-HT4, который стимулирует продукцию сАМР. Учитывая разницу в работе аденилатциклазной системы и системы Ca^{2+} -сигналикации, можно было ожидать, что клеточный сенсор серотонина на основе 5-HT4-рецептора окажется градуальным. Развитие генетически кодируемых флуоресцентных зондов предоставляет в настоящий момент возможность on-line мониторинга внутриклеточного сАМР. В частности, таким сенсором является Pink Flamingo (PF) [13], интенсивность флуоресценции которого растет с сАМР в физиологической области концентраций. В данной работе мы провели сравнительный анализ двух различных клеточных биосенсоров серотонина – СНО/5-HT2C и НЕК/5-HT4/PF.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молекулярная биология. Для клонирования рецепторов серотонина (5-HT2C, 5-HT4) из мозга мыши с использованием набора GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma) была выделена тотальная РНК. Методом реакции обратной транскрипции с применением набора SuperScript

IV VILO Master Mix (Invitrogene) в присутствии олиго(dT)-праймеров была получена кДНК, которая служила матрицей для дальнейших ПЦР. Для амплификации полноразмерного рецептора 5-HT2C выбрана последовательность, кодирующая 5-HT2C (Htr2c, NM_008312.4), которая включает нуклеотиды 689–2065. ПЦР проводили с ген-специфичными праймерами TAAGAAT-TCTGGCCACCATGGTGAACCTGGGGCACT и TATGTCGACTGCACACTACTAATCCTCTCGCTG, включающие сайты рестрикции EcoRI и SalI, по которым полученный транскрипт клонировали в плазмидный вектор pDsRed-Monomer-N1 (Clontech). Эта плазида обеспечивала экспрессию химерного белка, состоящего из рецептора серотонина 5-HT2C, на N-конце которого находится красный флуоресцентный белок DsRed. Последовательность рецептора 5-HT4 (Htr4, NM_008313.4), включающую нуклеотиды 207–1376, амплифицировали с помощью праймеров TATAAGCTTCCTGTAATGGACAACTTGATG и TATAAGCTTAGTATCACTGGGGCTGAGC. ПЦР-продукт был клонирован по сайту HindIII в вектор pAcGFP1-Hyg-N1 (Takara Bio). Сконструированная плазида обеспечивала экспрессию 5-HT4 рецептора серотонина, слитого с зеленым флуоресцентным белком. Клонирование и наработка плазмид в препаративных количествах осуществлялась в соответствии с протоколами, подробно описанными нами ранее [9, 14].

Трансфекция клеток и получение моноклональных линий клеток-сенсоров. Клетки трансфицировали плазмидными векторами набором для трансфекции FuGENE 6 (Promega) по оптимизированному согласно рекомендациям производителя протоколу, используя 1 мкг конструкта pDsRed-Monomer-N1/5-HT2C или смесь двух плазмид в равном соотношении: 0.5 мкг pAcGFP1-Hyg-N1/5-HT4 + + 0.5 мкг Pink Flamingo (#102356, Addgene) для трансфекции $(2-4) \times 10^5$ клеток в 1 лунке 12-лучного планшета. Из популяции трансфицированных клеток с помощью многоступенчатого последовательного отбора, включающего применение селективных антибиотиков, клеточного сортера, визуального контроля и физиологического тестирования (подобно полученным ранее клеткам [9, 14]), были получены две моноклональные линии клеток-сенсоров, СНО/5-HT2C и НЕК/5-HT4/PF.

Культура клеток. Клетки линий СНО-K1 и НЕК-293 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных) и модифицированные моноклональные линии СНО/5-HT2C и НЕК/5-HT4/PF культивировали в среде F12 (Invitrogen) и DMEM (Invitrogen) с высоким содержанием глюкозы соответственно, с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл

гентамицина (Sigma), 2 мМ глутамин (Sigma) (ростовая среда) во влажной атмосфере с 5% содержанием CO_2 в воздухе при 37 °C. Для культивирования полученных моноклональных линий дополнительно добавляли к 1 мл ростовой среды 300 мкг антибиотика G418 (Invivogen) для клеток СНО/5-НТ2С и 300 мкг G418 + 200 мкг гигромицина (Hygromycin B, Invivogen) для клеток НЕК/5-НТ4/PF.

Мониторинг внутриклеточных сигналов клеток-сенсоров. Перед экспериментом клетки снимали с культурального пластика 0.25% раствором трипсина (Sigma-Aldrich), а затем прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak (Corning). При дальнейших манипуляциях клетки находились во внеклеточном растворе, содержащем (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 HEPES, pH 7.4, 10 глюкозы (все соли и буферы произведены Sigma-Aldrich). Для загрузки флуоресцентным Ca^{2+} -зондом клетки СНО/5-НТ2С инкубировали 30 мин в присутствии 4 мкМ Fluo-8 AM (ATTOBioquest) и 0.02% детергента Pluronic (Molecular Probes). Затем клетки отмывали внеклеточным раствором и выдерживали в нем в течение 1 ч. Клетки НЕК/5-НТ4/PF перед экспериментом инкубировали 1.5 ч в фотометрической камере в физиологическом растворе. Описанные манипуляции и дальнейшие эксперименты проводили при комнатной температуре (22–24 °C). Фотометрические эксперименты осуществляли с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20×/0.75 и цифровой EMCCD камерой LucaR (Andor Technology). Флуоресценцию клеток СНО/5-НТ2С возбуждали на длине волны 480 ± 10 нм, эмиссию регистрировали в области 520 ± 20 нм, что соответствует спектральным характеристикам Fluo-8. Изменение уровня Ca^{2+} в цитоплазме оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции Fluo-8 $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F и F_0 – интенсивность эмиссии Ca^{2+} -зонда в текущий момент времени и в начале регистрации, соответственно. Флуоресценцию клеток НЕК/5-НТ4/PF возбуждали при 572 ± 17.5 нм, эмиссию регистрировали в области 634 ± 34 нм, что соответствует характеристикам флуоресцентного белка Pink Flamingo. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS-Elements AR 5.3 (Nikon). Полученные экспериментальные данные обрабатывали с помощью программы Sigma Plot 14.5 (Systat Software Inc). В работе использовали серотонин (Tocris Bioscience), апплицируя его путем полной замены раствора в фотометрической камере с помощью системы перфузии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основываясь на предыдущем опыте получения клеточных моноклонов [9, 14], мы получили собственную линию клеток СНО, стабильно экспрессирующую рекомбинантный рецептор 5-НТ2С мыши. Далее были получены несколько моноклональных линий СНО/5-НТ2С, большая часть клеток которых генерировала Ca^{2+} -сигналы в ответ на серотонин с порогом 1–3 нМ (рис. 1а) и обладала высокой степенью селективности. Нам удалось многократно наблюдать выброс серотонина из отдельных вкусовых клеток III типа, однако полученные нами клетки СНО/5-НТ2С реагировали на появление нейромедиатора по принципу “все или ничего”, т.е. не реагировали на подпороговые концентрации серотонина, но генерировали одинаково максимальный Ca^{2+} -сигнал при пороговых и значительно превосходящих порог концентрациях серотонина. (рис. 1б). Такое поведение биосенсора не позволяет проводить исследования количественной регуляции секреции серотонина.

Ранее было показано, что механизм “все или ничего” характерен для агонист-индуцированных Ca^{2+} -ответов мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека [15]. Ряд фактов свидетельствовал о том, что в основе этого явления лежит механизм CICR, который обеспечивает генерацию относительно универсальных ответов при разных дозах агонистов [15, 16]. Вероятно, механизм CICR присущ всем клеткам, экспрессирующим IP_3 - и риадиновые рецепторы [17, 18]. Таким образом, для получения градуального клеточного биосенсора серотонина следовало использовать другой рецептор-сигнальный каскад.

Семейство рецепторов серотонина включает семь типов рецепторов (5-НТ1–7), шесть из которых являются GPCR (G-protein coupled receptors) рецепторами, а 5-НТ3 представляет собой лиганд-управляемый катионный канал [12]. Поскольку нами исследовалась зависимость секреции серотонина не только от величины прикладываемого стимула, но и от внеклеточного Ca^{2+} , рецепторы семейства 5-НТ3, как и рецепторы, связанные с мобилизацией Ca^{2+} , не соответствовали нашим требованиям. Известно, что серотониновый рецептор 5-НТ4 в основном сопряжен со стимуляцией аденилатциклазы, а не с мобилизацией Ca^{2+} [19]. Учитывая, что сАМР-сигнализация не включает в себя какой-либо триггероподобный механизм, такой как CICR [20], мы ожидали, что в 5-НТ4-положительных клетках серотонин будет вызывать сАМР-сигналы, которые градуально увеличиваются с ростом дозы агониста. On-line мониторинг внутриклеточного

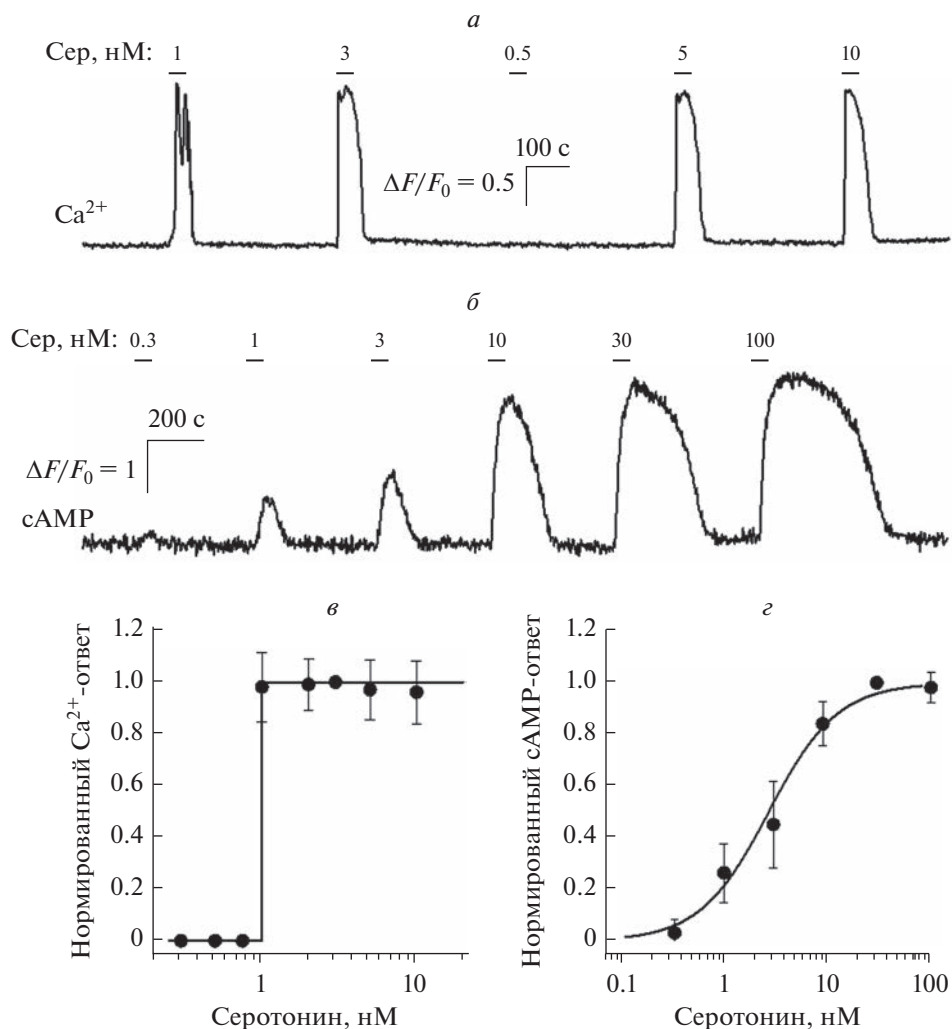


Рис. 1. Биосенсоры серотонина.

a – Мониторинг внутриклеточного Ca^{2+} в 5-HT2C-положительной CHO-клетке по флуоресценции Fluo-8 при последовательной стимуляции серотонином в указанных концентрациях.

б – Мониторинг внутриклеточного cAMP с помощью сенсора Pink Flamindo в клетке HEK-293, экспрессирующей рецептор 5-HT4 при последовательной стимуляции серотонином в указанных концентрациях.

в – Кривая доза–ответ для биосенсора CHO/5-HT2C. В каждом конкретном эксперименте изменения концентрации Ca^{2+} ($\Delta F/F_0$), вызванные серотонином в данной концентрации, нормировались на серотониновый ответ при 3 нМ. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 46$). Сплошная линия представляет собой функцию Хевисайда $H(S-1)$ от концентрации серотонина S .

г – Кривая доза–ответ для биосенсора HEK/5-HT4/PF. В каждом конкретном эксперименте cAMP-ответы на серотонин в различных концентрациях нормировались на cAMP-ответ, вызванный 30 нМ серотонина. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 31$). Сплошная прямая представляет уравнение Хилла $R = S^n / (S_{0.5}^n + S^n)$ для нормированного cAMP-ответа R при коэффициенте Хилла $n = 1.3$ и концентрации полуэффекта $S_{0.5} = 27$ нМ.

cAMP стал возможен относительно недавно с появлением генетически кодируемых сенсоров, включая белок Pink Flamindo, флуоресценция которого зависит от концентрации cAMP в клетке [13].

Для получения клеточного биосенсора мы клонировали рецептор 5-HT4 из мозга мыши и экспрессировали его в клетках HEK-293 одновременно с генетически кодируемым cAMP-сенсором Pink Flamindo [13]. Было показано, что лишь небольшая часть 5-HT4-положительных клеток

генерирует хорошо детектируемые cAMP-сигналы, проявлявшиеся в форме повышения флуоресценции Pink Flamindo, в ответ на серотонин в области наномолярных концентраций (рис. 1б). Используя методы клеточной селекции для отбора максимально чувствительных клеток, нам удалось получить несколько моноклональных линий клеток HEK/5-HT4/PF, большинство из которых демонстрировали достаточную чувствительность к серотонину и показывали градуальную зависи-

мость внутриклеточных сАМР-сигналов от концентрации наружного серотонина. Полученные клетки НЕК/5-НТ4/РФ обычно отвечали на 1 нМ серотонина, хотя отдельные клетки могли детектировать появление агониста и при существенно меньших концентрациях. Насыщение сАМР-ответов достигалось при 20 нМ агониста. Таким образом, второй полученный нами клеточный биосенсор серотонина НЕК/5-НТ4/РФ характеризуется градуальной зависимостью доза — ответ в диапазоне 1–20 нМ (рис. 1з). Это позволило нам более детально исследовать секрецию серотонина вкусовыми клетками в разных физиологических условиях и при различных условиях стимуляции [9].

Авторы благодарят Д.М. Поташикову за помощь в проведении работ по сортировке клеток на клеточном сортере FACS Aria SORP в рамках Программы развития МГУ.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-75-10068.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neher E. 1995. The use of Fura-2 for estimating Ca buffers and Ca fluxes. *Neuropharm.* **11**, 1423–1442.
2. Huang Y.J., Maruyama Y., Lu K.S., Pereira, E., Plonsky, I., Baur, J.E., Wu, D., Roper, S.D. 2005. Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter. *J. Neurosci.* **25**, 843–847.
3. Huang, Y.J., Maruyama Y., Dvoryanchikov G., Pereira E., Chaudhari N., Roper S.D. 2007. The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 6436–6441.
4. Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Jiang P., Margolskee R.F., Kolesnikov S.S. 2007. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO J.* **26**, 657–667.
5. Huang Y.A., Maruyama Y., Roper S.D. 2008. Norepinephrine is coreleased with serotonin in mouse taste buds. *J. Neurosci.* **28**, 13088–13093.
6. Huang Y.A., Pereira E., Roper S.D. 2011. Acid stimulation (sour taste) elicits GABA and serotonin release from mouse taste cells. *PLoS ONE.* **6**, e25471.
7. Dando, R., Roper, S.D. 2012. Acetylcholine is released from taste cells, enhancing taste signalling. *J. Physiol.* **590**, 3009–3017.
8. Yee C.L., Yang R., Bottger B., Finger T.E., Kinnamon J.C. 2001. “Type III” cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific
9. enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J. Comp. Neurol.* **440** (1), 97–108.
10. Cherkashin A.P., Rogachevskaja O.A., Kabanova N.V., Kotova P.D., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. 2022. Taste cells of the type III employ CASR to maintain steady serotonin exocytosis at variable Ca^{2+} in the extracellular medium. *Cells.* **11**(8), 1369.
11. Kotova P.D., Bystrova M.F., Rogachevskaja O.A., Khokhlov A.A., Sysoeva V.Y., Tkachuk V.A., Kolesnikov S.S. 2018. Coupling of P2Y receptors to Ca^{2+} mobilization in mesenchymal stromal cells from the human adipose tissue. *Cell Calcium.* **71**, 1–14.
12. Berg K.A., Clarke W.P., Sailstad C., Saltzman A., Maayani S. 1994 Signal transduction differences between 5-hydroxytryptamine type 2A and type 2C receptor systems. *Mol. Pharmacol.* **46**, 477–484.
13. Barnes N.M., Ahern G.P., Becamel C., Bockaert J., Camilleri M., Chaumont-Dubel S., Claeyens S., Cunningham K.A., Fone K. C., Gershon M., Di Giovanni G., Goodfellow N.M., Halberstadt A.L., Hartley R.M., Hassaine G., Herrick-Davis K., Hovius R., Lacivita E., Lambe E.K., Leopoldo M., Levy F.O., Lumis S.C.R., Marin P., Maroteaux L., McCreary A.C., Nelson D.L., Neumaier J.F., Newman-Tancredi A., Nury H., Roberts A., Roth B. L., Roumier A., Sanger G.J., Teitler M., Sharp T., Villalón C.M., Vogel H., Watts S.W., Hoyer D. 2021. Classification of receptors for 5-hydroxytryptamine. *Pharmacology and Function. Pharmacol. Rev.* **73** (1), 310–520.
14. Harada K., Ito M., Wang X., Tanaka M., Wongso D., Konno A., Hirai H., Hirase H., Tsuboi T., Kitaguchi T. 2017. Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging. *Sci. Rep.* **7**, 735.
15. Котова П.Д., Рогачевская О.А. 2020. Клеточная тест-система с генетически кодируемыми сенсорами цитоплазматического и ретикулярного кальция. *Биол. мембраны.* **37** (5), 373–380.
16. Kotova P.D., Sysoeva V.Y., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Kolesnikova A.S., Tyurin-Kuzmin P.A., Fadeeva J.I., Tkachuk V.A., Kolesnikov S.S. 2014. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta.* **1843**, 1899–1908.
17. Kaimachnikov N.P., Kotova P.D., Kochkina E.N., Rogachevskaja, O.A., Khokhlov A.A., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. 2021. Modeling of Ca^{2+} transients initiated by GPCR agonists in mesenchymal stromal cells. *BBA Adv.* **1**, 100012.
18. Park J.B., Lee C.S., Jang J.H., Ghim J., Kim Y.J., You S., Hwang D., Suh P. G., Ryu S.H. 2012. Phospholipase signalling networks in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **12**, 782–792.
19. Atakpa-Adaji P., Thillaiappan N.B., Taylor C.W. 2020. IP3 receptors and their intimate liaisons. *Curr. Opin. Physiol.* **17**, 9–16.
20. Masson J., Emerit M.B., Hamon M., Darmon M. 2012. Serotonergic signaling: Multiple effectors and pleiotropic effects. *WIREs Membr. Transp. Signal* **1**, 685–713.
21. Sassone-Corsi P. 2012. The cyclic AMP pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a011148.

Two Types of Cellular Serotonin Biosensors

O. A. Rogachevskaja^{1, *}, A. P. Cherkashin¹, E. E. Kopylova¹, M. F. Bystrova¹

¹*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

**e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com*

The method of cellular biosensors, which allows local detection of substances secreted by single cells, is traditionally used for studying the peripheral taste system. This method is based on cells that can detect secreted molecules with surface receptors coupled to the mobilization of intracellular Ca^{2+} . Thus, the neurotransmitter release can be tracked on-line by Ca^{2+} signals generated by a cell-biosensor. A specific feature of such cellular biosensors is that Ca^{2+} signals induced by GPCR ligands may be generated in the “all-or-nothing” manner due to the involvement of trigger-like mechanism, that is Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR). Although such a sensor validates the fact of neurotransmitter secretion, it does not allow studying regulatory circuits controlling the quantity of the released substance. This implies that biosensors, which are based on distinct intracellular signaling pathways, such as for cAMP signaling, could be more informative. Here we generated two types of serotonin biosensors. One was based on CHO cells expressing the recombinant 5-HT_{2C} receptor coupled by the phospholipase pathway to Ca^{2+} mobilization. Another involved HEK-293 cells that expressed both 5-HT_{2C} receptor coupled to adenylyl cyclase and the fluorescent protein Pink Flamindo serving as genetically encoded cAMP sensor. Although both cellular biosensors allow detection of nanomolar serotonin, 5-HT_{2C} cells generated Ca^{2+} responses in the “all-or-nothing” manner. In contrast, in 5-HT₄ and Pink Flamindo expressing cells, serotonin-triggered cAMP responses gradually rose with agonist concentration in the range of 0.3–30 nM. It thus appears that the 5-HT₄/Pink Flamindo biosensor is suitable for studying regulatory mechanism of serotonin secretion.

Keywords: cellular biosensor, serotonin, Ca^{2+} signaling, cAMP signaling, genetically encoded sensors