

**Анализ ответа клеток с сенсором РКА SPARK при активации цАМФ-сигналинга: алгоритмический и нейросетевой подходы**

**Научный руководитель – Путляева Лидия Викторовна**

***Шевякова Полина Алексеевна***

*Студент (бакалавр)*

Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва,  
Россия

*E-mail: nerinaperevinkl@gmail.com*

**Введение.** РКА-SPARK — флуоресцентный репортер активности протеинкиназы А (РКА). Он содержит eGFP и сайт фосфорилирования РКА; после фосфорилирования формирует цитоплазматические агрегаты, видимые как капли. Это позволяет регистрировать активацию РКА без сложной коррекции сигнала. Репортеры SPARK применимы и к другим сигнальным белкам, включая ERK. Необходимы методы автоматизированного анализа их ответа, поскольку существующие подходы (подсчёт капель, измерение их интенсивности или площади) дают плохо воспроизводимые результаты.

**Методы.** Клетки HEK293T трансфицировали сенсором РКА-SPARK с использованием GenJect-39 (Молекта) и Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific). Активность регистрировали методом широкопольной флуоресцентной микроскопии на Nikon Eclipse Ti2 при фиксированных настройках. Макрос разработан в Fiji, нейросеть — на основе предобученной модели Ultralytics YOLOv11.

**Результаты.** Разработаны два метода анализа: макрос для количественной оценки числа агрегатов на площадь клетки и нейросеть для автоматической классификации клеток на отвечающие и не отвечающие. Суммарно было проанализировано около 14 700 клеток. С помощью нейросети было выявлено, что через 45 минут на серотонин ответили 90,966% клеток, на паратгормон — 45,608%. На смесь форсколина, IBMX и паратгормона ответили 50,000% клеток через 1 минуту и 90,323% через 10 минут. Ответ на норадреналин оставался в пределах погрешности: прирост не более чем на 10% за 45 минут.

**Выводы.** Качественный анализ нейросетью и количественный анализ макросом дали совпадающие результаты: одинаковую форму кривой, совпадающие моменты начала ответа и выхода на плато. Макрос позволяет оценивать динамику сигнала, но требует ручной настройки порогов. Нейросеть работает автоматически и устойчива к шуму, перекрытию клеток и изменению яркости. Оба подхода можно адаптировать к другим типам клеток и SPARK-репортерам после донастройки и дообучения, например для анализа съёмки мозга дрозофилы, экспрессирующей сенсор.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 25-75-30005.

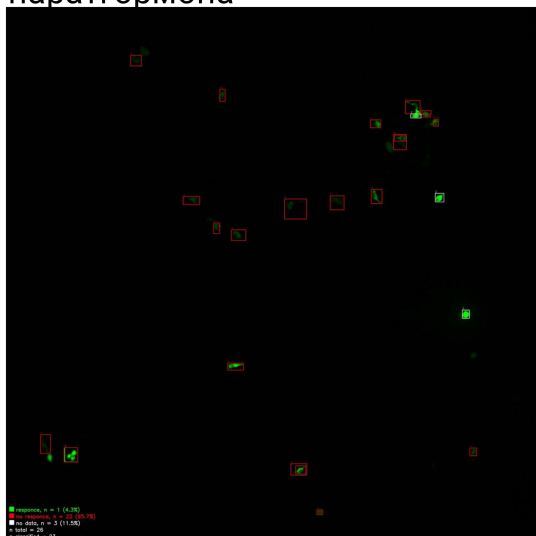
**Источники и литература**

- 1) Zhang Q, Huang H, Zhang L, et al. Visualizing Dynamics of Cell Signaling In Vivo with a Phase Separation-Based Kinase Reporter. *Mol Cell*. 2018;69(2):334- 346.e4
- 2) Sears JC, Brodie K. FMRP-PKA Activity Negative Feedback Regulates RNA Binding-Dependent Fibrillation in Brain Learning and Memory Circuitry. *Cell Rep*. 2020;33(2):108266.
- 3) Tyurin-Kuzmin PA, Karagyaur MN, Kulebyakin KY, et al. Functional Heterogeneity of Protein Kinase A Activation in Multipotent Stromal Cells. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4442. Published 2020 Jun 1 22

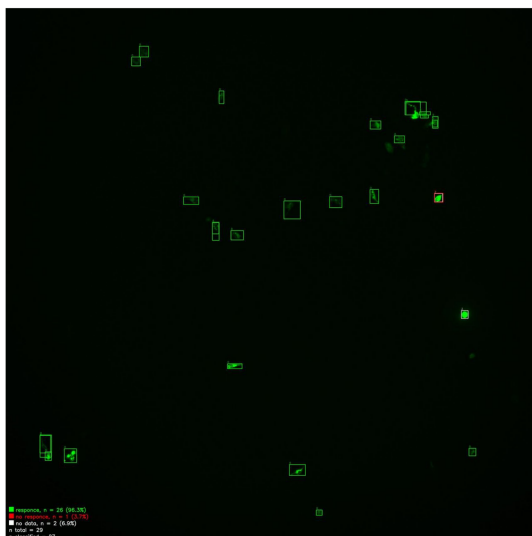
- 4) Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682
- 5) Jocher, G., Qiu, J., & Chaurasia, A. (2023). Ultralytics YOLO (Version 8.0.0) [Computer software].

## **Иллюстрации**

а) клетки (n=26) до стимуляции смесью форсколина, IBMX и паратгормона



б) клетки спустя 15 минут стимуляции



с) динамика активации сенсора PKA SPARK: сравнение двух алгоритмов классификации клеток

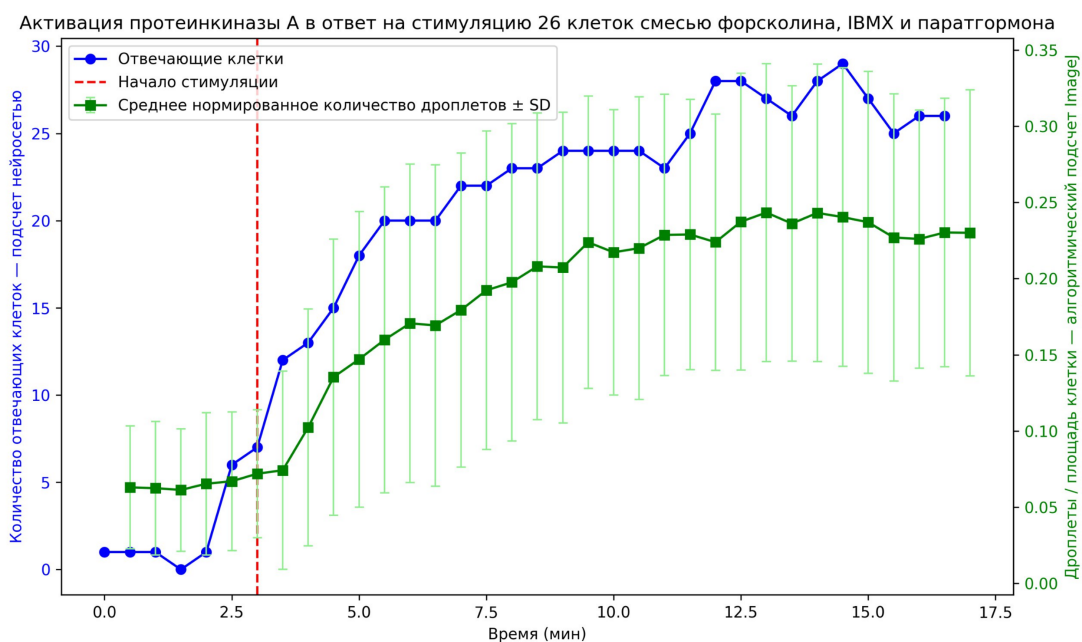
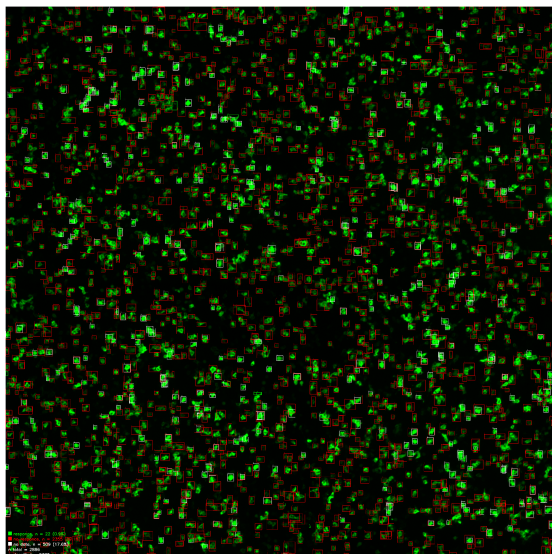
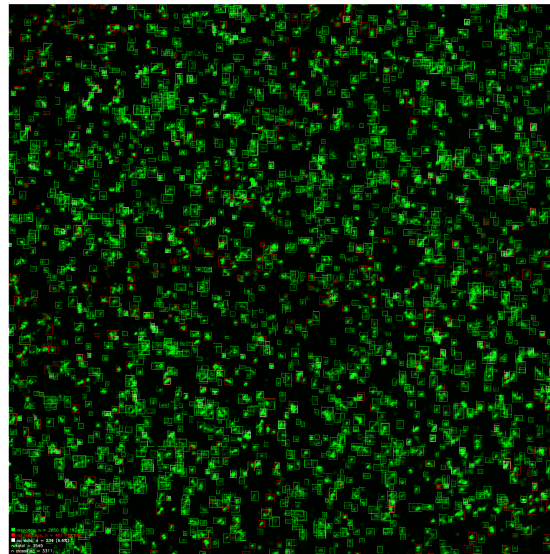


Рис. : Активация сенсора PKA SPARK в клетках НЕК при повышении уровня цАМФ. Сравнение алгоритмического и нейросетевого подходов. а) Фотография клеток до стимуляции (n = 26). б) Те же клетки через 15 минут после добавления смеси форсколина, IBMX и паратгормона. Наблюдается увеличение числа дроплетов, отражающее активацию PKA SPARK. в) Динамика активации PKA SPARK. Синим показано число отвечающих клеток, рассчитанное нейросетью. Зелёной линией показано среднее число дроплетов в клетке, нормированное на ее площадь, рассчитанное алгоритмически в ImageJ; вертикальные зеленые линии соответствуют стандартному отклонению от среднего. Красная пунктирная линия обозначает момент начала стимуляции. Обе метрики демонстрируют согласованную кинетику активации PKA после повышения уровня цАМФ.

а) клетки ( $n = 3454$ ) до стимуляции норадреналином



б) клетки спустя 60 минут после начала стимуляции



с) динамика активации сенсора PKA SPARK: обработка 3454 клеток алгоритмом YOLO



Рис. : Активация сенсора PKA SPARK в 3454 клетках НЕК при повышении уровня цАМФ. Демонстрация возможностей нейросетевого подхода. а) Фотография клеток до стимуляции ( $n = 3454$ ). б) Те же клетки через 60 минут после добавления норадреналина. в) Динамика активации сенсора PKA SPARK. Синей линией показано число отвечающих клеток, определённое нейросетевым алгоритмом классификации. Красная пунктирная линия обозначает момент начала стимуляции. Аккуратно применить алгоритмический подход в ImageJ на таком количестве клеток было бы намного более вычислительно тяжелой задачей.