

Національна академія наук України
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Оліфіров Борис Олексійович

УДК 573, 576, 577, 612.8

ДИСЕРТАЦІЯ

Участь гіпокальцину в NMDA-рецептор залежній
довготривалій синаптичній депресії

09 Біологія

091 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідні джерела.

Оліфіров Б.О. _____

Науковий керівник: Білан Павло Володимирович, доктор біологічних наук,
професор, завідувач відділу біофізики сенсорної сигналізації

Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Київ-2025

SUMMARY

B. Olifirov. Hippocalcin involvement in NMDA receptor-dependent long-term synaptic depression – Qualification scientific work as a manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 09 – Biology, speciality 091 – Biology. Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv, 2025.

Long-term synaptic plasticity is the physiological basis for memory, skill acquisition, and experience formation. One of the main types of long-term plasticity in glutamatergic synapses is NMDA receptor-dependent long-term depression (LTD). The induction of LTD is based on a prolonged decrease in the number of AMPA receptors on the postsynaptic membrane, which leads to a decrease in the possibility of individual synapses transmitting excitatory signals. LTD is well characterised as developing in response to prolonged low-frequency synaptic stimulation, during which an influx of Ca^{2+} through activated NMDA receptors in the early induction phase serves as a key secondary messenger in the signalling cascade. Further signalling pathways trigger the dissociation of AMPA receptors from the postsynaptic density and their removal from the dendrite plasma membrane by clathrin-mediated endocytosis (CME). However, the exact mechanisms that ensure Ca^{2+} dependence and CME localisation in the process of LTD induction remain poorly described. Recent studies have suggested that the neuronal Ca^{2+} -sensor protein hippocalcin (HPCA) plays a role as a potential signalling link in LTD induction. The distinctive feature of HPCA is the presence of a myristoyl switch: the fatty acid residue at the N-terminus of the protein that protrudes from the molecule's hydrophobic pocket after Ca^{2+} binding. This defines HPCA's capacity for reversible, calcium-dependent insertion into lipid membranes. According to the previous studies, HPCA acts as a Ca^{2+} -dependent shuttle to the plasma membrane surface for the adapter protein complex 2, which interacts with AMPA receptors and initiates CME. However, these studies were based exclu-

sively on biochemical, immunological, and indirect electrophysiological methods, without directly observing HPCA signalling during LTD induction. Therefore, the dissertation research aimed to investigate the involvement of HPCA in the induction of NMDA receptor-dependent LTD using live-cell fluorescence imaging approaches to capture dynamic molecular interactions.

A new method of prolonged local iontophoretic application of NMDA was developed and validated for the pharmacological induction of NMDA receptor-dependent long-term depression (LTD) in cultured hippocampal neurons. This new approach enables flexible and effective modelling of LTD in individual neurons. The protocol developed for prolonged iontophoretic applications can be used with any water-soluble ionic compound and is an effective alternative to the bath-application technique in a wide range of experimental designs.

Experiments involving a fluorescent marker of postsynaptic density (PSD95) were conducted to evaluate the spatial characteristics of Ca^{2+} -dependent HPCA redistribution in the dendritic tree in response to NMDA receptor activation. The results indicated that sites of HPCA insertion in the plasma membrane are heterogeneous along the dendritic tree, with a significant accumulation of HPCA observed in dendritic spines. Notably, HPCA insertions within dendritic spines were exclusively observed in the direct vicinity of the postsynaptic density. These regions cytomorphologically correspond to endocytosis zones, regions of active synaptic receptors' endocytosis. Further direct observations were conducted using Förster resonance energy transfer (FRET) approaches to investigate the mutual localisation and potential interaction between HPCA and the β -subunit of the adapter protein complex 2 (AP2B1) in both control and during induction of the LTD. Significant levels of FRET were detected in the dendritic spines in the control before the LTD induction. Concurrently, LTD induction protocol triggered an elevation in FRET signals observed both within dendritic spines and across prominent regions along the dendritic shaft. Upon completion of the protocol, the FRET values did not return to their initial value, indicating the prolonged HPCA and AP2B1 interaction. Overall our results demonstrate an inter-

action between HPCA and AP2B1, which may underlie HPCA involvement in both the constitutive AMPA receptor trafficking in the endocytic zones of dendritic spines and Ca^{2+} -dependent AMPA receptor endocytosis in different dendritic tree regions during the induction and maintenance of LTD.

Keywords: Brain, hippocampus, memory, long-term plasticity, excitability, synaptic transmission, glutamate receptors, receptor trafficking, calcium signalling, hippocalcin, cell culture, live-cell imaging, iontophoresis, FRET.

АНОТАЦІЯ

Оліфіров Б.О. Участь гіпокальцину в NMDA-рецептор залежній довготривалій синаптичній депресії – кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 – Біологія за спеціальністю 091 – Біологія. Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2025.

Довготривала синаптична пластичність є фізіологічним підґрунтям процесів запам'ятовування, набуття навичок і формування досвіду. Одним з основних різновидів довготривалої пластичності в глутаматергічних синапсах є NMDA-рецептор залежна довготривала синаптична депресія (long-term depression/LTD). В основі розвитку LTD є тривале зменшення кількості глутаматних AMPA-рецепторів на мембрані постсинаптичного нейрона, що призводить до зниження здатності окремих синапсів передавати збудливі сигнали. Широко відомо, що розвиток LTD відбувається у відповідь на тривалу, але низькочастотну, активацію синапсів і вторинним посередником в цьому процесі виступають іони Ca^{2+} які на початкових етапах індукції LTD надходять через активовані глутаматні NMDA-рецептори. Подальші сигнальні каскади провокують дисоціацію AMPA-рецепторів з ділянки постсинаптичної щільності та їх вилучення з плазматичної мембрани дендрита шляхом клатрин-опосередкованого ендоцитозу (clathrin-mediated endocytosis/CME). Однак точні механізми що забезпечують Ca^{2+} -залежність і локалізацію CME в процесі індукції LTD залишались маловивченими. Наявні дослідження висували нейронний Ca^{2+} -сенсорний білок гіпокальцин (hippocalcin/HPCA) на роль потенційної сигнальної ланки в індукції LTD. Особливість HPCA полягає в наявності міристильного перемикача, залишку жирної кислоти на N-кінці білка, що вивільняється з гідрофобної кишеньки молекули після зв'язування з Ca^{2+} . Це обумовлює здатність HPCA до Ca^{2+} -залежного

та оборотного вбудовування до ліпідних мембран. Згідно з попередніми дослідженнями, НРСА забезпечує Ca^{2+} -залежне доставлення до поверхні мембран комплексу адаптерних білків 2, що взаємодіє з AMPA-рецепторами та ініціює СМЕ. Однак ці дослідження ґрунтувались виключно на біохімічних, імунологічних на непрямих електрофізіологічних методах, без прямого спостереження за досліджуваними білками в процесі індукції LTD. Тому метою дисертаційного дослідження було визначити участь НРСА в процесі індукції NMDA-рецептор залежної LTD з використанням методів флуоресцентного мічення білків і флуоресцентної візуалізації їх переміщень і взаємодій у живих клітинах.

Для фармакологічної індукції NMDA-рецептор залежної LTD в первинній культурі нейронів гіпокампа було розроблено та валідовано нову методику тривалих локальних іонофоретичних прикладань NMDA. Новий підхід дозволив гнучко та ефективно моделювати LTD у поодиноких нейронах. Можливість застосовувати іонофорез для тривалих прикладань будь-яких полярних водорозчинних речовин в широкому спектрі експериментальних підходів робить створений метод перспективною альтернативою обробки всіх клітин в зразку розчином із фармакологічними препаратами (bath-application).

У дослідях із використанням флуоресцентної мітки постсинаптичної щільності (PSD95) було оцінено просторові характеристики Ca^{2+} -залежного перерозподілу НРСА в дендритному дереві у відповідь на активацію NMDA-рецепторів. Виявлено, що регіони вбудовування НРСА є гетерогенними вздовж всього дендритного дерева та спостерігається значне накопичення НРСА в дендритних шипиках. Важливо зауважити, що вбудовування НРСА в межах дендритних шипиків спостерігались виключно в регіонах, що оточували постсинаптичну щільність. Виявлені регіони цитоморфологічно відповідають зонам ендоцитозу, регіонам що забезпечують активне вилучення синаптичних рецепторів. Подальші прямі спостереження за взаємною локалізацією та потенційною взаємодією між НРСА та β -субодиницею комплексу адаптерних білків 2 (AP2B1) як у контрольних умовах, так і процесі індукції LTD були проведені з використанням

підходів для детектування Фьорстеровського резонансного перенесення енергії (FRET). В структурі дендритних шипиків було виявлено значущі рівні FRET до початку індукції LTD. Натомість у відповідь на протокол індукції LTD збільшення рівнів FRET спостерігалось як в дендритних шипиках, так і значних ділянках вздовж стовбуру дендрита, а по завершенню протоколу величина FRET не демонструвала повернення до початкових значень. Це є вагомими свідченнями щодо взаємодії між NRCA та AP2B1, яка може обумовлювати як конститутивний трафік рецепторів в зонах ендоцитозу дендритних шипиків, так і необоротне збільшення рівня ендоцитозу AMPA-рецепторів на стадіях індукції та підтримання LTD.

Ключові слова: Мозок, гіпокамп, пам'ять, довготривала пластичність, збудливість, синаптична передача, глутаматні рецептори, трафік рецепторів, кальцієва сигналізація, гіпокальцин, культури клітин, візуалізація живих клітин, іонофорез, FRET.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЙНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

В яких опубліковано основні результати дисертаційного дослідження:

- 1) Ye. Sheremet, **B. Olifirov**, A. Okhrimenko, V. Cherkas, O. Bagatskaya, P. Belan (2020) Hippocalcin Distribution Between the Cytosol and Plasma Membrane of Living Cells. Neurophysiology 52(1). **Q4**
[DOI 10.1007/s11062-020-09845-6](https://doi.org/10.1007/s11062-020-09845-6).

(Особистий внесок здобувача - розробка підходів до аналізу даних конфокальної мікроскопії, розробка програмних рішень для напівавтоматичного аналізу зображень, аналіз зображень та статистична обробка результатів).

- 2) **B. Olifirov**, O. Fedchenko, A. Dovgan, D. Babets, V. Krotov, V. Cherkas, P. Belan (2025). Local Iontophoretic Application for Pharmacological Induction of Long-Term Synaptic Depression. Bio-protocol 15(11): e5338. **Q2**
[DOI: 10.21769/BioProtoc.5338](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.5338).

(Особистий внесок здобувача - дизайн дослідів, розробка програмного забезпечення для аналізу мікроскопічних зображень, проведення серій дослідів із валідації техніки іонофорезу та детекції FRET, статистична обробка результатів, написання тексту публікації та оформлення ілюстративного матеріалу).

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертаційного дослідження:

- 1) **Б. Оліфіров**, Є. Шеремет, П. Білан.

Просторова локалізація білку гіпокальцину в живих клітинах за низької внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} .

XVIII Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Теоретичні і прикладні проблеми фізики, математики та інформатики». 12-13 травня 2020 року, Київ, Україна.

- 2) O. Fedchenko, S. Nevelchuk, **B. Olifirov**, P. Belan.

Biophysical properties of Ca^{2+} -dependent hippocalcin translocation in HEK 293 cells.

Virtual FENS Regional Meeting 2021, 25-27 серпня 2021 року, Краків, Польща.

- 3) S. Nevelchuk, **B. Olifirov**, O. Fedchenko, P. Koval, V. Zhytniuk, P. Belan.
Interplay between local cell morphology and kinetics of hippocalcin calcium-dependent insertion.

*All-Ukrainian conference on molecular and cell biology
with international participation. 15-17 червня 2022 року, Київ, Україна.*

- 4) O. Fedchenko, **B. Olifirov**, S. Nevelchuk, P. Koval, V. Zhytniuk, P. Belan.
Calcium-dependent hippocalcin distribution between different subcellular compartments.

*All-Ukrainian conference on molecular and cell biology
with international participation. 15-17 червня 2022 року, Київ, Україна.*

- 5) **B. Olifirov**, S. Nevelchuk, P. Koval, P. Belan.
Biophysical properties of hippocalcin signaling
in different sub-cellular compartments.

FENS Forum 2022, 9-13 липня 2022 року, Париж, Франція.

- 6) **Б. Оліфіров**, П. Білан.

Спостереження за розподілом Ca^{2+} -залежного вбудовування гіпокальцина в плазматичну мембрану та впливом на цей процес морфології клітин.

XX Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Теоретичні і прикладні проблеми фізики, математики та інформатики». 15 червня 2022 року, Київ, Україна.

- 7) О. Федченко, **Б. Оліфіров**, П. Белан.

Дослідження розподілу Ca^{2+} -залежного вбудовування гіпокальцина в нейронах гіпокампу.

Сьома міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології». 3-4 жовтня 2024 року, Дніпро, Україна.

їна.

8) **Б. Оліфіров.**

Гіпокальцин як потенційна сигнальна ланка в регуляції ендоцитозу синаптичних AMPAR та індукції довготривалої синаптичної депресії.

Сьома міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології». 3-4 жовтня 2024 року, Дніпро, Україна.

9) **B. Olifirov**, O. Fedchenko, N. Voitenko, V. Cherkas, P. Belan.

Hippocalcin interaction with adaptor protein complex 2 underlies localization and duration of hippocampal LTD induction.

Society for Neuroscience Annual Meeting 2024, 5-9 жовтня 2024 року, Чикаго, США.

10) D. Biruk, O. Fedchenko, Ye. Sheremet, **B. Olifirov**.

Comparison of hippocalcin translocation and minor phospholipid distribution.

Наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «KyivAcademUs 2025», 7-9 травня 2025 року, Київ, Україна.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	4
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1 Огляд літератури	19
1.1 Довготривала NMDA-рецептор залежна синаптична депресія ..	19
1.1.1 Регуляція та механізми індукції довготривалої синаптичної депресії	19
1.1.2 Регуляція клатрин-опосередкованого ендоцитозу	21
1.1.3 Ендоцитоз синаптичних рецепторів	23
1.1.4 Експериментальні методи індукції довготривалої NMDA-рецептор залежної синаптичної депресії	28
1.2 Нейронні кальцієві сенсори	29
1.2.1 Особливості будови та функціонування нейронних кальцієвих сенсорів	29
1.2.2 Гіпокальцин в регуляції збудливості нейронних мереж та синаптичної пластичності	32
1.3 Оптичні методи в біофізичних дослідженнях	35
1.3.1 Епіфлуоресцентна та конфокальна мікроскопія	35
1.3.2 Флуоресцентні індикатори Ca^{2+}	37
1.3.3 Фотолабільні кальцієві буфери	39
1.3.4 Фьорстеровське резонансне перенесення енергій в дослідженнях біомолекул	40
1.3.5 Флуоресцентні білки та зонди на їх основі в біофізичних дослідженнях	43
1.4 Іонофорез	45
1.4.1 Іонофорез в дослідженнях синаптичної передачі та синаптичної пластичності	45
1.4.2 Фізичні основи іонофоретичного прикладання	46
РОЗДІЛ 2 Матеріали та методи	50

2.1	Культури клітин	50
2.1.1	Первинна культура нейронів гіпокампа щура.....	50
2.1.2	Лінійна культура клітин НЕК 293	51
2.1.3	Генетичні конструкції для трансфекції клітин	52
2.1.4	Транз'єнтна трансфекція первинних культур клітин	52
2.1.5	Транз'єнтна трансфекція лінійних культур клітин	53
2.1.6	Підготовка культур клітин до експерименту	53
2.2	Мікроскопічні та флуоресцентні методи	55
2.2.1	Завантаження культур клітин проникними АМ-похідними індикатора Fluo-4 та фотолабільного хелатора NP-EGTA ..	55
2.2.2	Епіфлуоресцентна та конфокальна мікроскопія	55
2.2.3	Оцінка ефективності Фьорстеровського резонансного перенесення енергії.....	56
2.3	Флуоресцентні та електрофізіологічні реєстрації в комбінації з іонофоретичними прикладаннями	59
2.3.1	Підготовка до виконання іонофоретичних прикладань ..	59
2.3.2	Підготовка та виконання флуоресцентних реєстрацій ...	61
2.3.3	Підготовка до виконання patch-clamp реєстрацій mEPSCs	64
2.3.4	Виконання patch-clamp реєстрацій mEPSCs	67
2.4	Аналіз зображень	69
2.5	Детекція подій mEPSCs.....	73
2.6	Статистичний аналіз	74
РОЗДІЛ 3 Результати та обговорення		75
3.1	Розробка методики тривалих іонофоретичних прикладань для фармакологічної індукції довготривалої синаптичної депресії	75
3.1.1	Просторово-часові характеристики іонофоретичних прикладань	75
3.1.2	Зміни внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} у відповідь на тривале іонофоретичне прикладання NMDA	79
3.1.3	Довготривалі зміни характеристик mEPSCs у відповідь на тривалі іонофоретичні прикладання NMDA	82

3.1.4	Транслокація гіпокальцина у відповідь на протокол індукції довготривалої NMDA-рецептор залежної синаптичної депресії	85
3.1.5	Транслокація гіпокальцина у відповідь на короткі іонофоретичні прикладання NMDA	87
3.2	Транслокація гіпокальцина в різних структурах дендритного дерева у відповідь на активацію NMDA-рецепторів	89
3.2.1	Характер перерозподілу гіпокальцина між різними структурами дендритного дерева у відповідь на активацію NMDA-рецепторів	89
3.2.2	Взаємодія гіпокальцина та β -субодиниці комплексу адаптерних білків 2 в різних структурах дендритного дерева.....	95
3.3	Порівняння транслокації гіпокальцину та розподілу мінорних фосфоліпідів	106
3.3.1	Дослідження Ca^{2+} -залежного перерозподілу гіпокальцину між різними типами клітинних мембран	106
3.3.2	Дослідження вмісту PIP_2 в різних типах клітинних мембран	109
РОЗДІЛ 4 Узагальнення результатів		113
ВИСНОВКИ		117
ДОДАТКИ		119
ДОДАТОК А. НЕЙРОН ГІПОКАМПА		119
ДОДАТОК В. СИСТЕМА ПРОТОЧНОЇ ПЕРФУЗІЇ.....		120
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ		123

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AM – acetoxymethyl, ацетоксиметил

AMPA – α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, α -аміно-3-гідроксі-5-метил-4-ізоксалепропіонова кислота

AMPA – AMPA receptor, AMPA-рецептор

AP2B1 – adaptor related protein complex 2 subunit beta 1, *beta1*-субодиниця адаптерного комплексу білків 2

$[Ca^{2+}]_i$ – концентрація Ca^{2+} в цитозолі

CaM – calmodulin, кальмодулін

CDF – cumulative distribution function, кумулятивна функція розподілу ймовірностей

CME – clathrin-mediated endocytosis, клатрин-опосередкований ендоцитоз

CPP – clathrin-coated pit, вкриті клатрином западини плазматичної мембрани

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium, модифікація середосища Ігла Дульбеко

DYT2 – Torsion dystonia-2, первинна ізольована дистонія 2 типу

E_{app} – FRET efficiency, ефективність Фьорстеровського резонансного перенесення енергії

ECFP – enhanced cyan fluorescent protein, підсилений ціановий флуоресцентний білок

EF-hand – консервативний Ca^{2+} -зв'язуючий домен

EPSC – excitatory postsynaptic potential, збуджуючий постсинаптичний струм

EYFP – enhanced yellow fluorescent protein, підсилений жовтий флуоресцентний білок

EYFP-Memb – membrane EYFP, мембранний підсилений жовтий флуоресцентний білок

F_c – sensitised emission, сенсibilізована емісія

FBS – fetal bovine serum, фетальна сироватка бика

Fluo-4 – флуоресцентний індикатор Ca^{2+}

FRET – Förster resonance energy transfer, Фьорстеровське резонансне перенесення енергії

GMM – Gaussian mixture model, модель гауссової суміші

HEK – human embryonic kidney, клітини людської ембріональної нирки

HPCA – hippocalcin, гіпокальцин

HS – horse serum, сироватка коня

I_{AA} – інтенсивність флуоресценції за довжини хвилі збудження акцептора в спектральному каналі раєстрації акцептора

I_{AD} – інтенсивність флуоресценції за довжини хвилі збудження акцептора в спектральному каналі раєстрації донора

I_{DA} – інтенсивність флуоресценції за довжини хвилі збудження донора в спектральному каналі раєстрації акцептора

I_{DD} – інтенсивність флуоресценції за довжини хвилі збудження донора в спектральному каналі раєстрації донора

K_d – константа дисоціації

LTD – long-term depression, довготривала депресія

LTP – long-term potentiation, довготривала потенціація

mBaoJin – новітній зелений флуоресцентний білок із підвищеною яскравістю та фотостабільністю

MEM – Minimum Essential Medium, мінімальне середовище

mEPSC – miniature excitatory postsynaptic potential, мініатюрний збуджуючий постсинаптичний струм

mGluR – метаботропні рецептори глутамату

nCaBP – neuronal calcium-binding protein, нейронні кальцій-зв'язуючі білки

NCALD – нейрокальцин δ

NCS – neuronal Ca^{2+} -sensors, нейронні кальцієві сенсори

NMDA – N-methyl-D-aspartate, N-метил-D-аспартат

NMDAR – NMDA receptor, NMDA-рецептор

NP-EGTA – nitrophenyl-EGTA, нітрофеніл-EGTA

PDF – probability density function, функція щільності ймовірності

PH – pleckstrin homology domain, гомологічний домен плекстрину

PIP_2 – phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, фосфатиділінозітол-4,5-біфосфат

PLC – phospholipase C, фосфоліпаза C

PLL – poly-L-lysine, полі-L-лізин

PSF – point spread function, функція розсіювання точки

R^2 – коефіцієнт детермінації лінійної регресії

ROI – region of interest, регіон інтересу

sAHP – slow afterhyperpolarisation, повільна постгіперполяризація

sd – standard deviation, середнє квадратичне відхилення

se – standard error of mean, стандартна похибка середнього

TagBFP – blue fluorescent protein, блакитний флуоресцентний білок

TagRFP – red fluorescent protein, червоний флуоресцентний білок

ВСТУП

*Присвячую моїй родині,
без цієї підтримки нічого б не сталося.
Для них ці перші науково-популярні абзаци.*

Актуальність дисертаційного дослідження.

У пам'яті, набутті навичок й формуванні досвіду, всьому тому, що обумовлює як реакції тварин, так і саму людську свідомість, є біологічна основа. Мережа з мільярдів нервових клітин, **нейронів**, в складі головного мозку і в тисячі разів більша кількість контактів між нейронами, де електричні імпульси переходять від однієї клітини до іншої. Проте завмерлі й усталенні зв'язки навіть в надзвичайно великій мережі не були б здатні забезпечити ту гнучкість і здатність до адаптації, що спостерігається в живих організмах. Тому відбувається безперервна зміна, руйнація й утворення окремих контактів між нейронами, відомих як **синапси**. Кожен окремий синапс може регулювати свою здатність передавати сигнал від одного нейрона до іншого, на чому й ґрунтується пластичність всієї нейронної мережі. Пластичність полягає в зменшенні чи збільшенні величини сигналу при його передачі крізь окремі синапси, але напрямок цих змін у випадку кожного окремого синапса визначається складною взаємодією між попередньою історією активності як поодинокого синапса, так і пов'язаних між собою нейронів, що утворюють цей синапс. Й "прийняття" рішення щодо напрямку пластичних змін кожним окремим синапсом відбувається на суто хімічному рівні, шляхом взаємодій між йонами, малими молекулами та білками в складі окремих нейронів [1].

Електричні явища передбачають наявність вільних носіїв зарядів і їх вільного руху. Носіями електричних зарядів в живих організмах слугують іони що існують у водному розчині, насамперед іони Na^+ , K^+ , Cl^- та Ca^{2+} . Вміст різних йонів назовні та всередині клітин відрізняється, а мембрана, що скла-

дається з гідрофобних (жирних) сполук переважно не здатна пропускати воду та йони крізь себе. Але проходження будь-якого електричного сигналу безпосередньо пов'язане із рухом певних видів йонів назовні чи всередину клітин, відповідно до різниці концентрацій і електричного потенціалу на мембрані. На рівні кожного окремого синапса нейрон, що передає сигнал, вивільняє певну речовину-медіатор зі свого *пре*-синаптичного закінчення, а нейрон, що приймає сигнал, містить відповідні чутливі білки-рецептори на своїй *пост*-синаптичній поверхні. Існує багато синапсів, що можуть відрізнятись медіаторами, які їм притаманні, але в межах цієї роботи увага буде сконцентрована на найбільш розповсюдженому різновиді збудливих синапсів – в них медіатором є амінокислота глутамат. Відповідно, постсинаптичний нейрон містить рецептори до глутамату, основними серед яких є AMPA-рецептори та NMDA-рецептори. Обидва типи рецепторів після зв'язування із медіатором переходять у відкритий стан та починають пропускати крізь себе йони, обумовлюючи проходження електричного струму [2]. Так і відбувається синаптична передача сигналу між нейронами – синаптична передача.

Серед перелічених вище йонів, що відіграють роль у синаптичній передачі, особливо варто виокремити Ca^{2+} . Всередині клітини концентрація цих йонів є надзвичайно низькою (порядку десятків nM), натомість позаклітинне середовище багате на них (концентрація вища на чотири порядки, одиниці mM). Це робить Ca^{2+} не тільки носієм заряду, але й зручним показником активності: чим більше опинилось цих йонів всередині, тим більше нейрон отримує сигналів. Більшість типів AMPA-рецепторів не здатні пропускати крізь себе Ca^{2+} , тому головним чином його надходження всередину нейрона відбувається через NMDA-рецептори [3].

Дві основні форми довготривалої синаптичної пластичності, наслідки яких можуть тривати впродовж годин, днів, чи навіть довше, є протилежними за своїми наслідками: “підсилення” окремих синапсів відбувається шляхом *довготривалої потенціації* (long-term potentiation/LTP), а “пригнічення” шляхом

довготривалої депресії (long-term depression/LTD). Механізми, що відповідають за розвиток LTP і LTD в загальних рисах є доволі простими: оскільки рецепторів на поверхні клітини в окремому синапсі доволі мало, буквально тисячі окремих білкових комплексів, то навіть незначна зміна їх кількості здатна сильно вплинути на синапс. Якщо AMPA-рецепторів стає більше (розвивається потенціація), значить одна й та сама порція медіатора здатна викликати відкриття більшої кількості каналів, надходження всередину клітини більшої кількості йонів Na^+ , що викличе більший струм – синапс стає “сильнішим”. І у випадку зменшення кількості AMPA-рецепторів (розвивається депресія) менше йонів здатні одночасно потрапити всередину клітини – синапс стає “слабшим” [4]. Способи, якими AMPA-рецептори доставляються до мембрани клітини, або видаляються з поверхні нейронів також добре відомі, оскільки притаманні не тільки нейронам. Доставка назовні забезпечується процесом **екзо**-цитозу, а видалення – процесом **ендо**-цитозу, коли рецептори разом зі шматочком мембрани клітини, де вони знаходяться, відриваються і у вигляді маленького пухирця [5].

Дивовижно, але обидва найбільш досліджених механізми розвитку як LTP, так і LTD, розвиваються у відповідь на надходження Ca^{2+} через NMDA-рецептори, тому їх і називають **NMDA-рецептор залежними** формами синаптичної пластичності [4]. Окрім простої наявності чи відсутності йонів біля окремого синапса, запуск різних форм синаптичної пластичності визначається саме особливостями зміни концентрації Ca^{2+} в результаті активності нейрона. У дуже загальних рисах вибір того, які пластичні зміни стануться, відбувається так: сильна та короткотривала активність синапса призводить до швидкого та значного збільшення Ca^{2+} , що може сприйматись нейроном як “важливий” сигнал, тому такий синапс варто зробити сильнішим і запустити в ньому потенціацію. Натомість помірна та довготривала активність синапса, коли Ca^{2+} надходить потрохи, але довго, частіше може бути проявом шуму в нейронній мережі, тому такий синапс варто зробити слабшим та пригнітити такий “беззмистовний”

сигнал – запустити депресію [6].

Розпізнавання характеру змін внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} відбувається різними білками, що здатні зв'язувати ці йони. Таких білків всередині нейрона існує безліч та всі вони одночасно конкурують за Ca^{2+} , що надходять крізь NMDA-рецептори активного синапса. Суто фізичні та хімічні властивості, як то спорідненість, кооперативність і швидкість дифузії визначають, які саме з сотень різних Ca^{2+} -зв'язуючих білків встигнуть зв'язати йони та запустити ту реакцію клітини, за яку вони відповідають [7]. І серед них доволі цікавими є білки, що називаються нейронними кальцієвими сенсорами. Зазвичай білки існують в сталій формі: або більш-менш вільно плавають всередині клітини, або постійно прикріплені, чи навіть глибоко вбудовані в клітинні мембрани. Однак нейронні кальцієві сенсори здатні існувати в обох станах, і це залежить від зв'язування з Ca^{2+} . Після зв'язування вони змінюють свою форму і вивільнюють “хвостик” з жирної міристинової кислоти, який дозволяє їм приєднуватись до клітинних мембран, а коли концентрація Ca^{2+} знов зменшується, то повертатись назад. **Гіпокальцин** (hippocalcin/HRCA) належить до нейронних кальцієвих сенсорів та найчастіше зустрічається якраз у гіпокампі, відділі мозку, що відповідає за формування довготривалої та просторової пам'яті [8]. Окрім здатності вбудовуватись у мембрани, цей білок також вирізняється дуже високою афінністю до Ca^{2+} , тобто дуже малої концентрації йонів достатньо, щоб гіпокальцин вже почав їх зв'язувати [7]. Це одразу робить гіпокальцин привабливим кандидатом на роль Ca^{2+} -зв'язуючого білку, що може відігравати роль у регуляції довготривалої депресії – саме тоді, коли треба реагувати на тривалі, але невисокі збільшення концентрації Ca^{2+} .

Palmer із колегами ще у 2005 році запропонували механізм, за яким гіпокальцин може бути залучений в те, як запускається довготривала депресія. Для того, щоб видалити AMPA-рецептори спершу з рецепторами має зв'язатись спеціальний комплекс білків-адаптерів, такий адаптер відмічає те, що варто видалити з мембрани за допомогою ендоцитозу. І гіпокальцин було запропонова-

но як човниковий транспорт, який захоплює білки-адаптери зсередини клітини та доставляє їх до мембрани, де утримує і сприяє взаємодії з рецепторами та запускає довготривалу депресію [9]. Однак ця гіпотеза ґрунтується на обмежених та опосередкованих свідченнях, оскільки використані методи не дозволяли прямо спостерігати за реакцією білків в живих клітинах. На два десятиліття дослідження в цій галузі майже зупинились, однак наші уявлення про роботу синапсів розвивались, розвивались і експериментальні підходи та інструменти. Тому дана робота покликана використати сучасні методи мікроскопії, щоб глибше розібратись в ролі гіпокальцина у процесі розвитку NMDA-рецептор залежної довготривалої депресії. Ми спробували “роздивитись” у живих клітинах, що ж саме робить цей білок в окремих нейронах та чи дійсно він переміщує до мембран білки, що здатні запускати ендоцитоз. Заповнити суттєвий пробіл у наших знаннях у тому, як на рівні окремих молекул формуються складні мережі, які й обумовлюють те, ким ми є. А побачити нейрони так, як бачимо їх ми, можна у *додатку А*.

• • •

Як вже було зазначено в загальних рисах вище, до особливостей будови та функціонування НРСА належить наявність активного міристильного перемикача. Цей механізм дозволяє білку Ca^{2+} -залежним чином вбудовуватись до ліпідних мембран, оскільки залишок міристинової кислоти на N-кінці білка вивільняється з гідрофобної кишеньки лише у Ca^{2+} -зв'язаному стані. Попри те, що НРСА є одним з найбільш високо експресованих буферів Ca^{2+} в нейронах і у гіпокампі поступається концентрацією лише кальмодуліну, він все ще залишається надзвичайно малодослідженим [10, 11, 7, 12].

Наявні дослідження розглядають НРСА як важливу ланку сигналізації в численних формах нейронної пластичності. Так відомо, що НРСА безпосередньо залучений до регуляції повільної постгіперполяризації (slow afterhyperpolarisation/sAHP), різновиду короткотривалої нейронної пластичності що регулює частоту

та тривалість пачкової активності нейронів. Згідно зі ранніми уявленнями, це могло відбуватися шляхом модуляції K^+ -провідностей (каналів SK та KCNQ типів) після вбудовування кальцієвого сенсора у мембрану [13, 14, 15]. Подальші дослідження гіпокампальних та кортикальних нейронів розширили набір потенційних молекулярних детермінантів: канали KCa3.1, Kv7, Kir6, KCNQ2/3, KATP, KNa, KCNT1-2 та Na^+ - K^+ -обмінника [16, 17]. Але попри широкий відомий набір потенційних молекулярних механізмів розвитку sANP та відому Ca^{2+} -залежність sANP через сигналізацію HPCA, все ще лишається невідомим яким Ca^{2+} сенсорний білок впливає на такий широкий спектр мішеней.

Уже описана вище потенційна роль HPCA в регуляції NMDA-рецептор залежної LTD полягає у взаємодії із β -субодиницею комплексу адаптерних білків 2 (adapter protein complex 2/ AP2). Стабілізація AP2 на мембрані через взаємодію із HPCA може сприяти ініціації клатрин-опосередкованого ендоцитозу (clathrin-mediated endocytosis/ CME) AMPA-рецепторів впродовж індукції LTD [9]. Додатковим свідченням, що дозволяє припустити участь HPCA у регуляції CME, є підтверджена висока спорідненість до мінорного фосфоліпіда плазматичної мембрани – фосфатидилінозитол-4,5-біфосфата (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate/ PIP_2) [18], що також є критичним у регуляції CME [5].

Також відомо, що точкові мутації в гені *Hrsa* асоційовані із розвитком важкого неврологічного розладу, первинної ізольованої дистонії 2 типу (Torsion dystonia-2/ DYT2) [19, 20]. Подальші детальні дослідження впливу DYT2- асоційованих мутацій на біофізичні властивості HPCA показали, що мутантні форми білка мають погіршену здатність до олігомеризації [21]. Також показано, що мутації в сайтах зв'язування призводять до суттєвого зменшення афінності до Ca^{2+} . Зважаючи на дуже високі рівні експресії HPCA в структурах гіпокампа розглядається, що можливою ланкою молекулярного патогенезу DYT2 може виступати не тільки порушення в конкретних сигнальних каскадах, але й загальна пертурбація буферної системи Ca^{2+} в нейронах [22].

На жаль, не зважаючи на беззаперечну роль Ca^{2+} як вторинного посере-

дника в нейронах, нейронні кальцієві сенсори, і зокрема НРСА, лишаються мало вивченими. Однак наявні поодинокі роботи вказують на великий потенціал НРСА як сигнальної молекули у найрізноманітнішому наборі Ca^{2+} -залежних процесів і потенційної ланки молекулярного патогенезу неврологічних розладів. Це спонукає продовжувати фундаментальні пошуки в цій галузі із залученням нових експериментальних та методичних підходів, які в першу чергу ґрунтуються на сучасних підходах флуоресцентної мікроскопії у візуалізації білків і їх взаємодій в живих клітинах.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Робота виконана в рамках наукової тематики відділу біофізики сенсорної сигналізації Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (0124U001556). Дисертант входить до колективів виконавців двох грантів тематики яких безпосередньо дотичні до теми дисертаційного дослідження: «Гіпокальцин-залежна регуляція довготривалої депресії в нормі та при первинній дистонії» (Конкурс наукових, науково-технічних робіт та проєктів, які фінансуються за рахунок зовнішнього інструменту допомоги Європейського Союзу для виконання зобов'язань України у Рамковій програмі Європейського Союзу з наукових досліджень та інновацій «Горизонт 2020», проєкт 0123U102767) та «Nanoscale Hippocalcin Signaling in Long-Term Depression in Norm and Primary Dystonia» (Long-Term Funding by the Polish Academy of Sciences and U.S. National Academy of Sciences, проєкт PAN.BFB.S.BWZ.405.022.2023).

Мета та задачі дослідження.

Метою дисертаційного дослідження було встановити участь гіпокальцина в процесі розвитку довготривалої NMDA-рецептор залежної синаптичної депресії в нейронах гіпокампа щурів.

Відповідно до мети були сформульовані наступні завдання дисертаційного дослідження:

- 1) Адаптувати методику іонофоретичного прикладання фармакологічних препаратів для тривалих локальних прикладань NMDA до окремих нейронів у первинній культурі клітин гіпокампа;
- 2) Валідувати методику тривалих іонофоретичних прикладань для фармакологічного моделювання довготривалої NMDAR-залежної синаптичної депресії в первинній культурі нейронів гіпокампа щура;
- 3) Визначити вплив мінорного фосфоліпіду PIP_2 у складі мембран на Ca^{2+} -залежне вбудовування гіпокальцина у мембрани клітин HEK 293;
- 4) Ідентифікувати потенційні сайти гіпокальцин-індукованого ендоцитозу, опосередкованого довготривалою активацією NMDA рецепторів в дендритному дереві та шипиках нейронів гіпокампа;
- 5) Визначити наявність взаємодії між гіпокальцином та β -субодиницею адаптерного комплексу білків 2 (AP2B1) в процесі розвитку довготривалої NMDAR-залежної синаптичної депресії.

Об'єкти дослідження.

Клітини лінії HEK 293 та культивовані нейрони гіпокампа щура; NMDAR-залежні транзйєнти $[Ca^{2+}]_i$ в культивованих нейронах гіпокампа щура; експресовані в культурах клітин флуоресцентно мічені рекомбінантні білки:

- Нейронний кальцієвий сенсор гіпокальцин мічений флуоресцентними білками ECFP, EYFP, TagRFP, або mBaoJin.
- Компонент системи клатрин-опосередкованого ендоцитозу, β -субодиниця адаптерного комплексу 2 мічена флуоресцентним білком EYFP.
- Структурний білок постсинаптичної щільності PSD-95 мічений флуоресцентним білком TagRFP.
- Неспецифічна мембранна мітка із С-термінального домену нейромодуліну міченого флуоресцентним білком EYFP.
- Специфічна мембранна мітка до PIP_2 із плекстринового домену фосфоліпази $C\delta$ міченого флуоресцентним білком ECFP.

Предмет дослідження.

Перерозподіл кальцієвого сенсора НРСА між мембранами різних клітинних компартментів за умов фотоіндукованого вивільнення іонів Ca^{2+} в клітинах простої морфології; просторово-часова динаміка перерозподілу НРСА між компартментами дендритного дерева нейронів гіпокампа у відповідь на активацію NMDAR; потенційна взаємодія між НРСА та β -субодиницею адаптерного комплексу 2 у фармакологічній моделі довготривалої NMDAR-залежної синаптичної депресії.

Методи дослідження.

В експериментальній роботі використано декілька сучасних методів біологічних досліджень: методи молекулярної біології для підтримання культивованих клітин та транзійтної експресії рекомбінантних флуоресцентно мічених цільових білків в живих клітинах; електрофізіологічні методи петч-клемпу для запису електричної активності поодиноких нейронів; біофізичні методи для локальних контрольованих прикладань фармакологічних препаратів із використанням іонофорезу; фізико-хімічні методи для завантаження клітин етерифікованими проникними в клітину реагентами та для фотоіндукованого вивільнення іонів кальцію в живих клітинах; методи епіфлуоресцентної та флуоресцентної мікроскопії для спостереження за перерозподілом гіпокальцина в живих клітинах, моніторингу внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію з використанням флуоресцентних кальцієвих індикаторів, детектування білок-білкових взаємодій та локалізації гіпокальцина в живих клітинах з використанням Фьорстеровського резонансного перенесення енергії.

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше проведено порівняння між характеристиками Ca^{2+} -залежного перерозподілу НРСА між різними типами клітинних мембран та вмістом у мембранах мінорного фосфоліпіда PIP_2 в живих клітинах із простою морфологією.

В межах розробки експериментальної моделі фармакологічно індукованої довготривалої NMDAR-залежної синаптичної депресії вперше використано метод іонофорезу для тривалих локальних прикладань фармакологічних агентів до окремих нейронів в культурі. Проведено валідацію застосованості цього експериментального підходу як ефективною альтернативи прикладанням розчинів фармакологічних агентів шляхом заміни всього об'єму розчину в експериментальній камері.

Вперше показано, що нейронний кальцієвий сенсор HPCA транслокується в живих нейронах гіпокампа в окремі регіони дендритного дерева та в потенційні зони ендоцитозу, локалізовані в околицях постсинаптичних щільностей у відповідь на різні патерни активації NMDA-рецепторів та впродовж індукції довготривалої NMDAR-залежної синаптичної депресії. З використанням Фьорстеровського резонансного перенесення енергії вперше виявлено потенційну білок-білкову взаємодію HPCA із компонентом комплексу адаптерних білків 2 під час індукції LTD.

Практичне значення одержаних результатів.

Зважаючи на вже відомий прямий вплив точкових мутацій в гені *Hrsa* на розвиток орфанного неврологічного захворювання первинної ізольованої дистонії типу DYT2, отримані результати щодо залученості кальцієвого сенсора в розвитку довготривалої синаптичної пластичності можуть лягти в основу кращого розуміння механізмів молекулярного патогенезу означеного неврологічного захворювання. Розуміння ролі гіпокальцина як мішені для генної терапії із застосуванням новітніх генно-інженерних підходів на основі векторів вірусної та іншої природи із подальшим провадженням доклінічних досліджень є прямим шляхом практичного застосування результатів дисертаційного дослідження.

Особистий внесок здобувача.

Дисертантом самостійно проведено аналіз наукової літератури за тематикою дослідження, виконано основний об'єм експериментальних досліджень, розроблено програмні рішення для аналізу експериментальних даних та проведено статистичну обробку результатів. Дисертант спільно з науковим керівником розробив дизайн експериментальних досліджень, сформулював мету та завдання дисертаційного дослідження.

Особливі подяки:

- Співробітниці відділу біофізики сенсорної сигналізації Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України Олександрі Федченко, в тісній співпраці з якою було виконано більшість експериментальних досліджень, за проведення окремих серій дослідів й виконання роботи з культурами клітин;
- Студентці магістратури кафедри біомедицини та нейронаук Київського академічного університету Дані Бірук за проведення серій дослідів із використанням культури клітин НЕК 293 та аналізу отриманих результатів;
- Колективу дослідників YPBitech, R&D підрозділу групи фармацевтичних компаній ЮРІЯ-Фарм. Голові YPBitech Олександру Губару, біотехнологу Назарію Грубіяну та молодшій біотехнологині Анастасії Романенко за розробки дизайну і збірку рекомбінантних генетичних конструкцій для експресії NPCA-mBaoJin.

Апробація результатів дисертаційного дослідження.

Результати дисертаційного дослідження були представлені на наступних конференціях всеукраїнського та міжнародного рівнів:

- 1) XVIII Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених “Теоретичні і прикладні проблеми фізики, математики та інформатики” - Київ (Україна), 2020;
- 2) FENS Regional Meeting 2021 - Краків (Польща), 2021;
- 3) XX Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та

молодих вчених “Теоретичні і прикладні проблеми фізики, математики та інформатики” - Київ (Україна), 2022;

- 4) All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation - Київ (Україна), 2022;
- 5) FENS Forum 2022 - Париж (Франція), 2022;
- 6) 7th International Scientific Conference ”Current Problems of Biochemistry, Cell Biology, and Physiology Дніпро (Україна), 2024;
- 7) SfN Meeting 2024 - Чикаго (США), 2024;
- 8) KyivAcademUs 2025 - Київ (Україна), 2025.

Наукові публікації.

За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 12 наукових праць, з яких 2 статті в наукових журналах категорії А індексованих в базах Scopus/WoS та 10 тез представлених на конференціях всеукраїнського та міжнародного рівнів.

Структура та обсяг дисертації.

Обсяг дисертації 157 сторінок; робота складається з анотації; змісту; переліку умовних позначень та скорочень; вступу; огляду літератури; матеріалів і методів; розділів результатів та узагальнення результатів і висновків. Робота містить 31 рисунок, 5 таблиць, 2 додатки та список використаних джерел на 143 найменування.

РОЗДІЛ 1

Огляд літератури

1.1 Довготривала NMDA-рецептор залежна синаптична депресія

1.1.1 Регуляція та механізми індукції довготривалої синаптичної депресії

Довготривала синаптична депресія (long-term depression/LTD) є фундаментальним проявом синаптичної пластичності, що забезпечує динамічний діапазон адаптації нервових мереж та доповнює процеси довготривалої потенціації (long-term potentiation/LTP). Історично перші експериментальні свідчення існування LTD були отримані на початку 1990-х років, тоді спостерігали стійке зменшення амплітуди збудливих постсинаптичних струмів (excitatory postsynaptic current/ EPSP) після низькочастотної стимуляції синапсів гіпокампа. У цих же дослідках було показано, що частотні параметри стимулу можуть «перемика-ти» синапси між режимами депресії та потенціації [23, 6]. Баланс між процесами LTP і LTD розглядається як центральний механізм формування навичок, пам'яті, навчання та консолідації спогадів у гіпокампі й корі [24, 1]. Дані електрофізіологічних та поведінкових досліджень підтверджують, що порушення LTD асоціюється з дефектами робочої й епізодичної пам'яті, а також із підвищеною ймовірністю патологічної пластичності при нейродегенеративних захворюваннях [25].

Центральним тригером більшості форм LTD є постсинаптичне підвищення концентрації іонів кальцію до незначного рівня, який відрізняється від пікових концентрацій, необхідних для індукції LTP. Показано, що тривале, але помірне збільшення цитозольної концентрації Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) переважно активують фосфатазно-орієнтовані сигнальні каскади, тоді як короткотривале, але значне підвищення $[Ca^{2+}]_i$ активує кінази [26]. Класична і найбільш розповсюджена в

глютаматергічних синапсах NMDA-рецептор залежна LTD індукується за участю рецепторів NR2B-типу, крізь які в постсинаптичне закінчення надходять Ca^{2+} , необхідні для активації кальциневрину та подальшого дефосфорилювання синаптичних рецепторів та інших ферментів [6]. Подальші дослідження уточнили цю модель, продемонструвавши, що активація NMDA-рецепторів запускає фосфатазний каскад PP2B-PP1, який веде до дисоціації AMPA-рецепторів з постсинаптичної щільності та їх видалення з дендритних шипиків. Додатково було показано, що інгібітори кальциневрину блокують LTD та не впливаючи на LTP. Це підкреслює специфічність фосфатазної активності для індукції синаптичної депресії [27]. Ключовим механізмом індукції LTD є зміни в трафіку AMPA-рецепторів (AMPA), збільшення ендоцитозу рецепторів, переважно підтипів GluA2/3. LTD може реалізовуватися через посилення екзоцитозу «нестабільних» Ca^{2+} -проникних AMPA-рецепторів, позбавлених субодиниці GluA2, що створює умови для тимчасового збільшення кальцієвої проникності. Це створює позитивний зворотний зв'язок, який посилює кальцієві сигнали та провокує подальшого вилучення цих рецепторів із синаптичної щілини [28, 25] (рис. 1.1).

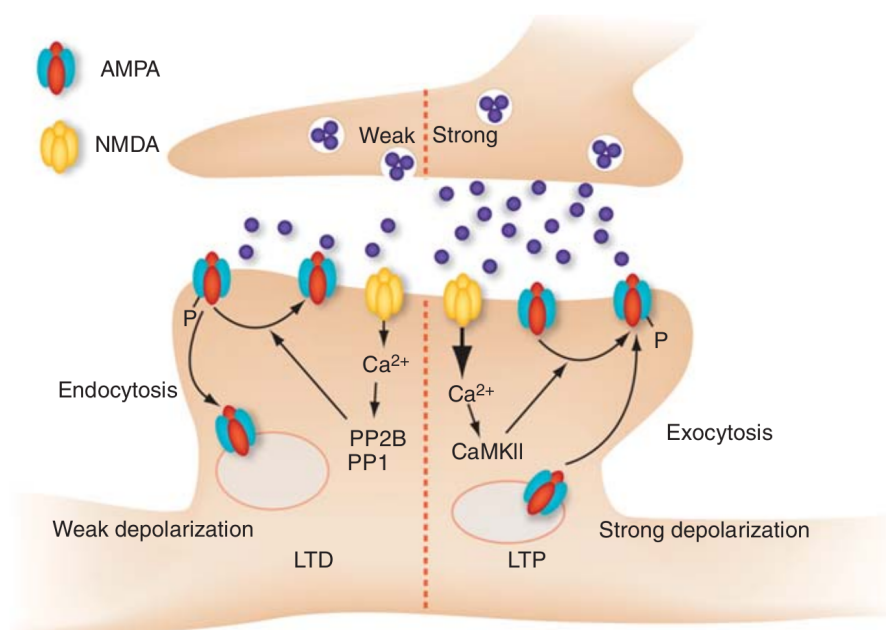


Рис. 1.1. Загальна схема розвитку довготривалої синаптичної депре-

сії та довготривалої синаптичної потенціації. Відтворено з [27].

Хоча історично основну увагу в контексті механізмів індукції LTD приділяли саме ендоцитозу AMPA-рецепторів, сучасні дослідження доводять, що насправді баланс співвідношення екзо- та ендоцитозу визначає амплітуду LTD. Зокрема було показано, що при LTD в синапсах активується Rab-залежний екзоцитоз AMPA-рецепторів з подальшим швидким ендоцитозом, і саме темп чергування цих подій корелює з рівнем LTD [29]. А білок Arf6 координує як доставлення нових AMPAR на мембрану, ендоцитоз рецепторів, діючи як «перемикач» між різними типами пластичності [30]. Також показано, що локальна конденсація F-актина у перисинаптичних ділянках стовбура дендрита здатна формувати фізичний бар'єр, що обмежує мобільність везикул, які містять AMPA-рецептори, пригнічуючи їхній вихід до активних зон синапсів. Конденсація актину залежить від кооперативного зв'язування кальмодулін (calmodulin/CaM) залежного білка кортактина з F-актином, що вказує на додаткові механізми Ca^{2+} -залежної регуляції LTD [31].

Отже, на молекулярному рівні LTD є результатом координованих змін фосфорилування субодиниць синаптичних рецепторів, процесів їх трафіку та реорганізації цитоскелета. Таким чином, LTD не можна розглядати виключно як ендоцитоз; це радше динамічна рівновага двох протилежних процесів.

1.1.2 Регуляція клатрин-опосередкованого ендоцитозу

Клатрин-опосередкований ендоцитоз (clathrin-mediated endocytosis/ CME) відіграє ключову роль у зменшенні кількості AMPA-рецепторів на мембрані дендритного дерева в процесі індукції LTD. У процесі CME ділянка плазматичної мембрани зазнає низки висококоординованих подій, що вилучають ділянку ліпідного бішару із білками у своєму складі у вигляді везикули діаметром $\sim 100\text{ nm}$, здатну до подальшого транспортування всередині клітини та утиліза-

ції в ендосомальній системі клітини [5].

Ініціація СМЕ відбувається в обмежених ділянках плазматичної мембрани зі збільшеним локальним вмістом міnorного фосфоліпіда фосфоінозитол-4,5-біфосфата (PIP_2). На перших етапах комплекс адаптерних протеїнів 2 (adaptor protein complex 2/ AP2) взаємодії із мішенями на мембрані та створює умови для подальшої полімеризації клатрина та формування вкритих клатрином заглиблень плазматичної мембрани (clathrin coated pits/ CCP) [32, 33, 34] (*initiation* на рис. 1.2). За останні роки показано, що етап ініціації СМЕ є оборотним – близько 30 % новоутворених CCP дисоціюють ще до стадії зрілої CPP [5] (*stabilization* на рис. 1.2). На етапі зростання CPP відбувається послідовне залучення понад 50 допоміжних факторів, серед яких BAR-домен вмістні білки та актиновий цитоскелет, що призводить до збільшення локальної кривизни мембрани в процесі дозрівання CPP [35] (*maturation* на рис. 1.2). Приблизно за 30–60 s після ініціації СМЕ до шийки везикули приєднується динамін; його GTP-азна активність приводить до механохімічного звуження шийки та фінального відщеплення везикули від поверхні плазматичної мембрани [32, 5] (*fission* на рис. 1.2). Одразу після відщеплення везикули відбувається дисоціація клатринового каркасу за участю Hsc70 та ауксіліна, що повертає клатрин у цитозольний пул і робить його доступним для нового циклу СМЕ та дозволяє везикулі злитись із ранніми ендосомами в цитоплазмі [33].

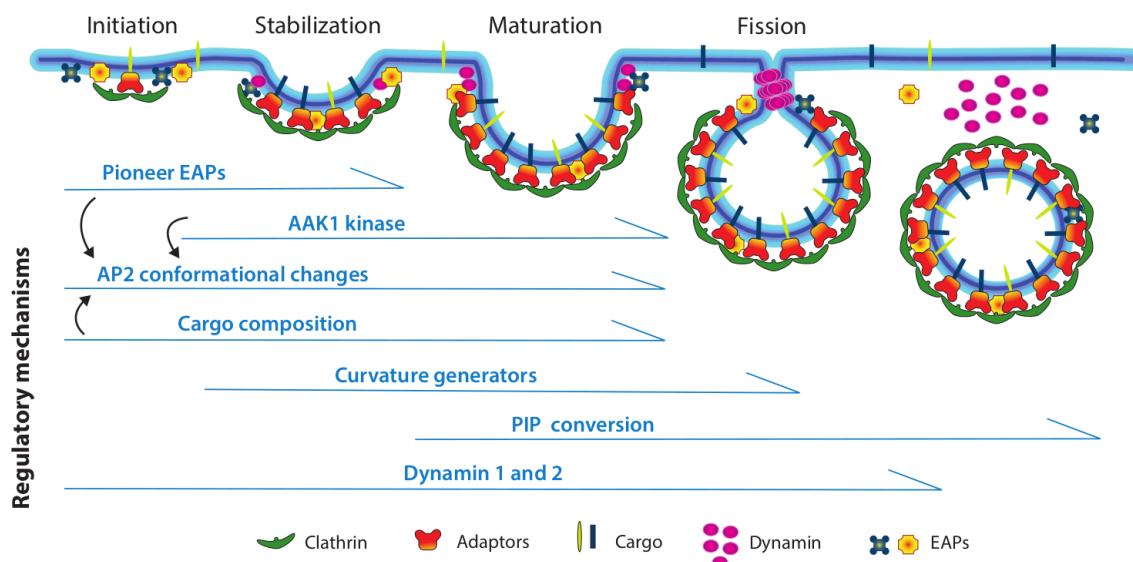


Рис. 1.2. Загальна схема клатрин-опосередкованого ендоцитозу (clathrin-mediated endocytosis/CME). Відтворено з [5].

Регуляція CME здійснюється на всіх етапах: ініціація контролюється вмістом PIP_2 в плазматичній мембрані, подальша взаємодія із білками-мішенями контролюється поліморфізмом субодиниць AP2, посттрансляційними модифікаціями клатрину і динаміну та полімеризація F-актину, що може чинити механічні перешкоди формуванню везикул [32, 5]. Наприклад, фосфорилювання $\mu 2$ -субодиниці AP2 підвищує її афінність до консервативних доменів білків-мішеней, тоді як убіквітінація клатрину може виступати сигналом до дисоціації дефектних CCP [35]. Сучасні методи мікроскопії надвисокої роздільної здатності (STORM, L-PALM) дозволили виявити кластеризацію AP2 на ранніх етапах та неоднорідність наборів допоміжних білків у різних CCP, що свідчить про існування функціонально спеціалізованих субпопуляцій регіонів ендоцитозу [33].

1.1.3 Ендоцитоз синаптичних рецепторів

Ендоцитоз AMPA-рецепторів (AMPA-рецепторів) є ключовим механізмом, який визначає індукцію LTD та зменшення інтенсивності збуджувальної синаптичної

передачі [36]. У класичному шляху СМЕ початково AMPA-рецептори безпосередньо взаємодіють з AP2 через мотив у С-кінцевого неструктурованого хвоста субодиниць GluA1-3. С-кінцевий мотив AMPA-рецепторів структурно нагадує сайт зв'язування синаптотагміну-1, що свідчить про спільні принципи взаємодії пре- і постсинаптичних білків з AP2 [37]. Функціональне порушення взаємодії GluA2 з AP2, зокрема введення пептидів-конкурентів, блокує NMDA-індукований ендоцитоз і перешкоджає індукції LTD [37]. Дослідження у культурі гіпокампальних нейронів також показали, що мутації С-кінцевого мотиву субодиниці GluA2 блокує LTD-асоційовану втрату AMPA-рецепторів на поверхні клітини, але не впливає на LTP [38]. Додатково до AP2, у перебіг СМЕ залучені актин-асоційований білок кортактин і СаМ-залежні сигнальні каскади, що активують активуючи серин/треонінкінази, які можуть додатково модулювати процес ендоцитозу синаптичних рецепторів [39]. При індукції LTD шляхом активації NMDA-рецепторів спостерігається швидке фосфорилування субодиниці GluA1 в позиціях S845 та S831 і субодиниці GluA2 в позиції S880. Ці посттрансляційні модифікації призводять до зменшення спорідненості рецепторів до компонентів постсинаптичної щільності й пришвидшує інтерналізацію AMPA-рецепторів [39, 40, 34]

Оскільки в межах синапсів рецептори асоційовані із компонентами постсинаптичної щільності, СМЕ можуть підлягати виключно рецептори поза цим регіоном і латеральна рухливість у площині плазматичної мембрани визначає, у яких ділянках дендритного древа буде відбуватися ендоцитоз. Ранні дослідження показали, що частина поверхневих субодиниць GluA2 дифундує поза межами постсинаптичної щільності та може інтерналізуватись в перисинаптичних зонах. Активність NMDA-рецепторів також підвищує мобільність AMPA-рецепторів, полегшуючи їхній захват AP2 у віддалених від синапсів ділянках мембрани [41, 42]. Також в експериментах з фотознебарвленням було показано, що LTD-індукуюча стимуляція нейронів призводить до вивільнення субодиниць GluA1 з постсинаптичних щільностей і збільшення їх латеральної мо-

більності, що може сприяти подальшому ендоцитозу [34]. Також відомо про вплив динамічної зміни пальмітування субодиниць AMPA-рецепторів на їх мобільність [43]. Наприклад, оборотне С-термінальне пальмітування субодиниць GluA1 здатне зменшувати їх спорідненість до каркасних білків постсинаптичної щільності [44].

Відомо, що поза межами постсинаптичної щільності спостерігається активна дисоціація тетрамерів AMPA-рецепторів на окремі димерні та мономерні компоненти, що володіють значно більшою латеральною дифузією. Це може обумовлювати трафік не цілих рецепторних комплексів, а окремих субодиниць в процесі розвитку синаптичної пластичності [45]. Таким чином, динаміка дифузії як компонентів, так і цілих AMPA-рецепторів на поверхні нейрона тісно інтегрована з процесом ендоцитозом, а перехід між маломобільним синаптичним станом і рухливим станом визначає просторовий розподіл потенційних регіонів інтерналізації рецепторів.

Наразі одними з ключових структур, де відбувається ендоцитоз синаптичних рецепторів, вважаються так звані зони ендоцитозу (endocytic zones/ EZ), що являють собою стабільні утворення багаті клатрином які розташовуються безпосередньо біля постсинаптичної щільності. У ранніх роботах за допомогою електронної мікроскопії було показано, що близько 70% ССР в структурі дендритних шипиків розташовані на відстані $<100\text{ nm}$ від постсинаптичної щільності, утворюючи морфологічний «пояс» в якому відбувається активний трафік рецепторів [46] (рис. 1.3).

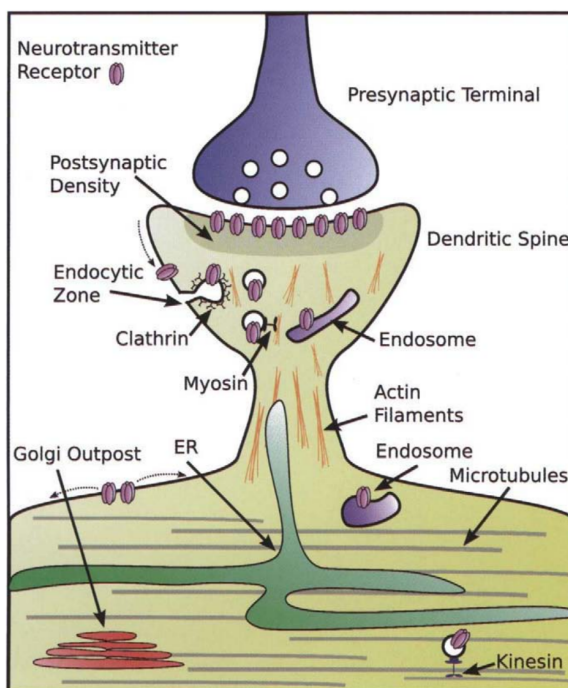


Рис. 1.3. Машинерія трафіку синаптичних рецепторів. Відтворено з [46].

Стабілізація зв'язку між постсинаптичною щільністю та EZ відбувається шляхом взаємодії між динаміном-3 та структурним білком Homer. Динамін-3 безпосередньо зв'язується з Homer, що фізично фіксує CCR в околицях постсинаптичної щільності. Порушення зв'язку динамін-3–Homer призводить до втрати EZ синапсами, зменшення кількості субодиниць GluA1/2 на поверхні мембрани й зменшення амплітуд мініатюрних EPSC (miniature EPSC/ mEPSC) [47].

Сучасні дослідження з використанням методів візуалізації окремих подій ендоцитозу свідчать, що у відповідь на активацію NMDA-рецепторів відбувається стрімке збільшення частоти утворення везикул із субодиницями GluA1 та GluA2 та збільшені темпи ендоцитозу спостерігаються навіть по завершенню протоколу індукції LTD. Переважна кількість подій ендоцитозу спостерігається в безпосередній близькості до постсинаптичних щільностей, натомість CCR в пересинаптичних ділянках дендритного стовбура не демонстрували зміни активності. Це все чітко вказує, що за фізіологічних умов, коли активуються виключно синаптичний пул NMDA-рецепторів, активний трафік AMPA-

рецепторів відбуватиметься переважно в близьких до синапса структурах багатих на клатрин, тобто в межах EZ [48].

Мікроскопія надвисокої роздільної здатності дозволила детально дослідити тонку організацію EZ. Так, переважна кількість структурних на адаптерних білків, що беруть участь в ініціації СМЕ, розташовуються на периферії багатих клатрином регіонів і безпосередньо не впливають на взаємну локалізацію EZ та постсинаптичної щільності. Також наразі не виявлено свідчень щодо асоціації EZ з актином в складі цитоскелета. Вважається, що активне формування везикул відбувається на периферії EZ, коли білки-мішені досягають меж цих областей в процесі дифузії. Також відомо, що активація NMDA-рецепторів в процесі індукції LTD не впливає на кількість багатих клатрином структур в межах дендритних шипиків, натомість активація метаботропних mGluR-рецепторів призводить до збільшення кількості клатрина [49]. Це вказує на наявність окремих, і поки невідомих, механізмів, що регулюють трафік синаптичних рецепторів у відповідь на активацію різних типів рецепторів, спрямовану на індукцію LTD в експериментальних умовах. Для окремого типу метаботропних рецепторів mGluR5 навіть описана окрема популяція багатих клатрином структур з дещо відмінним набором білків. Це дозволяє незалежно регулювати склад рецепторів в межах окремого дендритного шипика [50].

Разом всі ці свідчення вказують на те, що EZ морфологічно та динамічно відмінні від решти багатих клатрином зон в межах дендритного стовбура. Ці регіони є високоспеціалізованими структурами, що відповідають за скоординований незалежний і локальний трафік різних типів синаптичних рецепторів шляхом СМЕ. А порушення структури EZ і подальша інтерналізація рецепторів в пересинаптичних ділянках може призводити до виснаження локального пулу рецепторів і впливати на процеси синаптичної передачі в межах поодиноких дендритних шипиків.

1.1.4 Експериментальні методи індукції довготривалої NMDA-рецептор залежної синаптичної депресії

Наразі основними експериментальними підходами для індукції LTD є тривала електрична стимуляція та фармакологічна обробка дослідного препарату. Обидва підходи спрямовані на тривалу, але помірну активацію NMDA-рецепторів (тривалістю до декількох сотень секунд) що призводить до збільшення $[Ca^{2+}]_i$ та запускає процеси інтерналізації синаптичних AMPA-рецепторів.

Електрофізіологічна індукція LTD відбувається шляхом тривалої низькочастотної стимуляції (1 Hz впродовж 200–300 s) аферентних волокон у випадку органотипових зрізів або пресинаптичних нейронів у випадку первинної культури клітин. Для ефективного усунення Mg^{2+} -блоку NMDA рецепторів використовують або позаклітинні розчини із зменшеною концентрацією Mg^{2+} , або, у випадку комбінації із patch-clamp записами, встановлення потенціалу утримання постсинаптичного нейрона на рівні -40 mV [6, 51, 52, 53]. Електрична стимуляція дозволяє отримувати патерн змін $[Ca^{2+}]_i$ максимально наближений до фізіологічної, адже відбувається безпосередня активація синапсів. Однак цей підхід дуже вибагливий до конфігурації нейронної мережі в зразку, адже вимагає наявності прямих моносинаптичних контактів досліджуваної клітини із популяцією клітин, що піддаються електричній стимуляції, що особливо критично у випадку використання первинних культур клітин.

Фармакологічний підхід до індукції LTD є простішим і передбачає обробку зразка (bath-application) розчином із помірною концентрацією NMDA (20–50 μM) за присутності в розчині гліцина (10–20 μM), коактиватора NMDA-рецепторів. Прикладання розчину впродовж 1–5 хвилин розглядається як ефективний протокол індукції LTD як в органотипових зрізах, так і в первинній культурі клітин [51, 53, 48, 29, 54, 49]. До ключових недоліків цього підходу варто віднести невибірковість активації NMDA-рецепторів, адже впливу аго-

ніста піддаються як синаптичні, так і екстрасинаптичні рецептори. Це значно впливає на загальний просторовий патерн надходження Ca^{2+} в клітину та дуже умовно може відповідати змінам $[Ca^{2+}]_i$ у відповідь на синаптичну активність. Також через те, що впливу агоніста одночасно піддається весь зразок, це унеможливорює реєстрацію більше як однієї клітини, що значно знижує продуктивність експериментальної роботи та підвищує її вартість.

1.2 Нейронні кальцієві сенсори

1.2.1 Особливості будови та функціонування нейронних кальцієвих сенсорів

Кальцієві буфери відіграють ключову роль у перетворенні змін $[Ca^{2+}]_i$ на специфічні молекулярні відповіді. У межах навіть поодинокого дендритного шипика за Ca^{2+} конкурують численні білки, причому характер цієї конкуренції за обмежену кількість ліганду визначається одночасно і локальною морфологією дендритного дерева, і швидкістю надходження Ca^{2+} в клітину, і буферною ємністю цитоплазми. Варто зауважити, що навіть найбільш високо експресований в нейронах CaM мусить активно конкурувати із представниками нейронних кальцій-зв'язуючих білків (neuronal calcium-binding protein/ nCaBP) та нейронних кальцієвих сенсорів (neuronal calcium sensor/ NCS), що мають зіставні та, подекуди, навіть вищі показники афінності до Ca^{2+} та можуть легко витіснити CaM за певних просторово-часових умов; доменна структура найбільш поширених буферів що наявні в нейронах наведена на рис. 1.4. Таким чином, уже на рівні первинного зв'язування йонів формується селективність подальших сигнальних шляхів [7].

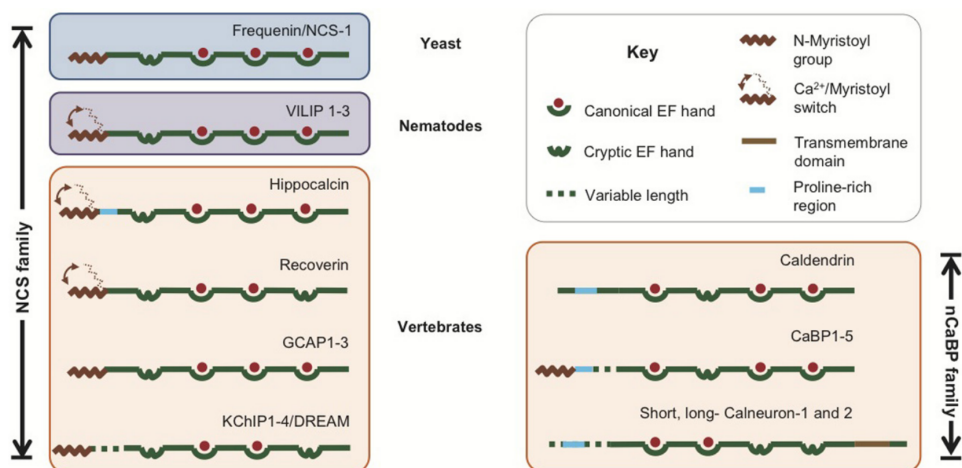


Рис. 1.4. Схема сімейств кальцієвих буферів що експресуються в нейронах. Відтворено з [7].

Родина NCS налічує понад 20 білків, усі вони містять чотири консервативних Ca^{2+} -зв'язуючих домени, так звані EF-hand-домени. Та, на відміну від CaM, у NCS наявна посттрансляційна модифікація, до N-кінця білкової молекули ковалентно приєднується залишок міристинової кислоти, що обумовлює мембранну локалізацію NCS. В окремих представників цих білків також є активний механізм міристинового перемикача, коли залишок жирної кислоти експонується з гідрофобної кишеньки молекули виключно у Ca^{2+} -зв'язаному стані, що обумовлює оборотне і Ca^{2+} -залежне вбудовування до ліпідних мембран (рис. 1.5). Оновлений аналіз послідовностей та структур показав, що ця родина розділяється на чотири підгрупи, що відрізняються як набором ефекторних білків, так і кінетикою взаємодії з кальцієм. Структурні дані свідчать, що лише EF-hand-домени 2-4 є функціонально активними, тоді як домен 1 зазвичай є нефункціональним, виконуючи скоріше роль у стабілізації конформації молекули [10, 11, 7, 12].

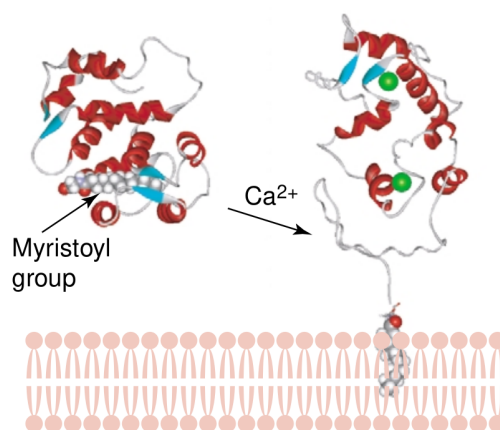


Рис. 1.5. Схема роботи міристильного перемикача. Відтворено з [10].

Одним з перших відкритих представників NCS, був рековерин, виявлений у фоторецепторах сітківки. Було виявлено, що сенсор може регулювати світлочутливі протеїнкінази через Ca^{2+} -залежну асоціацію з ліпідними мембранами [55, 56]. Пізніше для білків підродини VILIP (visinin-like proteins) також показали виражену Ca^{2+} -залежну транслокацію з цитозолу до плазматичної мембрани у нейронах гіпокампа. Цей процес виявився чутливим до просторового профілю змін $[Ca^{2+}]_i$, що дозволило припустити роль VILIP в розпізнаванні просторово-часової динаміки надходження Ca^{2+} [57]. Для білка NCS-1 відома сигнальна функція у метаботропній LTD. Експерименти показали, що активація mGluR призводить до активації NCS-1, який ініціює сигнальний каскад, необхідний для стійкого зниження амплітуд синаптичних струмів [58]. Не менш значущим є взаємодії нейрокальцину δ (NCALD) із компонентами цитоскелета, що забезпечує участь сенсора у регуляції ендоцитозу й реструктуризація актинового цитоскелета та структурній пластичності. Також виявлена Ca^{2+} -залежна асоціація NCALD з клатрином, що вказує на потенційну роль у сортуванні та трафіку везикул в синаптичних закінченнях [59].

Особливу увагу серед численної родини NCS привертає гіпокальцин (hippocalcin/HPCA), що демонструє найвищу афінність до Ca^{2+} з усіх відомих представників NCS [60, 21] і дуже високі рівні експресії в пірамідних клітинах гіпокампа та специфічні біохімічні властивості [61, 62, 60]. Було показано, що у

відповідь на зміни $[Ca^{2+}]_i$ НРСА демонструє швидку транслокацію до плазматичної мембрани. Використання флуоресцентних міток дозволило в реальному часі візуалізувати цикли асоціації та дисоціації НРСА клітинними мембранами [63, 64, 65]. Подальша робота з гіпокампальними нейронами показала, що транслокація може відбуватись навіть на рівні окремих дендритних шипиків, що свідчить про здатність НРСА реагувати та інтерпретувати зміни у $[Ca^{2+}]_i$ на мікро- та нанодоменному рівні [66].

Ще однією характерною особливістю НРСА є його висока афінність до PIP_2 , міnorного фосфоліпіда в складі плазматичної мембрани що також відіграє важливу функцію в регуляції СМЕ. Було встановлено, що N-термінальний пептид НРСА здатен зв'язуватися з ліпосомами, збагаченими PIP_2 , із K_d близько 50 нМ, що значно перевищує навіть афінність РН-домена фосфоліпази $C\delta$, активно витісняючи флуоресцентний маркер на основі РН-домена з мембран у живих клітинах [18].

1.2.2 Гіпокальцин в регуляції збудливості нейронних мереж та синаптичної пластичності

Попередні імуногістохімічні дослідження показали, що НРСА виявляє високу експресію в пірамідних клітинах гіпокампа, особливо в ділянках СА1 і СА3, а також у корі й стріатумі, що вказує на його потенційну участь у когнітивних процесах [55]. Функціональна значущість такої експресії підтверджується на моделях нокаутних мишей: нокаут гена *Hrsa* не змінює морфології відповідних відділів мозку, проте суттєво знижує активність транскрипційного фактора CREB після деполяризації нейронів або активації NMDA-рецепторів. У тварин із нокаутом гена *Hrsa* спостерігається погіршення просторового орієнтування та порушення асоціативного навчання, що свідчить про критичну роль НРСА для формування просторової та довготривалої пам'яті [67].

Клінічні генетичні дослідження розширили уявлення про значення НРСА,

показавши, що мутації у цьому білку зумовлюють розвиток первинної ізольованої дистонії (Torsion dystonia-2/ DYT2). Перші повідомлення, що пов'язували точкові мутації у HPCA з етіологією DYT2, описували клінічну картину в пацієнтів з ураженням м'язів шиї та тулуба, порушення координації та довільні рухи кінцівок [19, 20]. Біофізичний аналіз показав, що точкові мутації T71N та A190T, описані при DYT2, не змінюють афінність HPCA до Ca^{2+} та не порушують функціонування міристильного перемикача, проте суттєво порушують олігомеризацію білка і зміни кальцієвого гомеостазу, що узгоджуються з гіперзбудливістю, яка лежить в основі розвитку клінічної картини захворювання [21]. Водночас інші дослідження вказують, що точкова мутація N75K значущо впливає на афінність HPCA до Ca^{2+} , що порушує як процеси транслокації кальцієвого сенсора, так і призводить до загального дисбалансу в буферній системі нейронів [22]. Сукупність генетичних даних дозволяє розглядати HPCA як нову мішень терапевтичного втручання при DYT2 та, ймовірно, інших розладів руху [20, 21, 22].

Регуляція нейронної збудливості за участі HPCA чітко проявляється в залученості білка до такої форми короткочасної нейронної пластичності як повільна постгіперполяризація (slow afterhyperpolarisation/ sAHP). В експериментах на зрізах гіпокампа показано, що вхідний струм, який обумовлює розвиток sAHP, відсутній у тварин із нокаутом гена *Hpsa*. Внутрішньоклітинне введення HPCA до досліджуваних клітин призводило до відновлення sAHP, водночас введення варіанта HPCA з порушеним міристилюванням N-кінці — ні. Це свідчить про необхідність Ca^{2+} -залежної транслокації HPCA до мембран для активації K^{+} -проникних каналів та розвитку sAHP, що запобігає надлишковій збудливості нейронів. Таким чином, через sAHP HPCA накладає обмеження на максимальну можливу частоту активності окремих нейронів і опосередковано регулює ритми на рівні цілих нейронних мереж [13, 14, 15].

Іншою важливою функцією HPCA є потенційна сигналізація в процесі розвитку різних форм LTD. Непрямими біохімічними методами була показана зда-

тність HPCSA до Ca^{2+} -залежної взаємодії з одним із ключових сигнальних компонентів СМЕ, β -субодиницею в складі AP2 (AP2B1). Також було визначено, що фрагмент HPCSA що складався із 2-72 амінокислотних залишків нативного білку здатен конкурентно пригнічувати розвиток синаптичної депресії в моделі NMDA-рецептор залежної LTD. Разом ці опосередковані свідчення сформували сучасні уявлення про роль HPCSA як Ca^{2+} -залежної човникової системи доставки AP2 до поверхні мембрани, де вже відбувається взаємодія адаптерного комплексу з AMPA-рецепторами та запускається ендоцитоз, що і обумовлює розвиток LTD (загальна схема сигналізації наведена на рис. 1.6) [9]. Також є окремі свідчення про сигнальну роль HPCSA в процесах зменшення кількості NMDA-рецепторів в активних синапсах. У цьому випадку у відповідь на активацію мускаринових ацетилхолінових рецепторів і вивільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо шляхом активації IP_3 -рецепторів HPCSA, що потенційно може бути попередньо асоційований із компонентами постсинаптичної щільності, вивільняється та сприяє СМЕ NMDA-рецепторів [68].

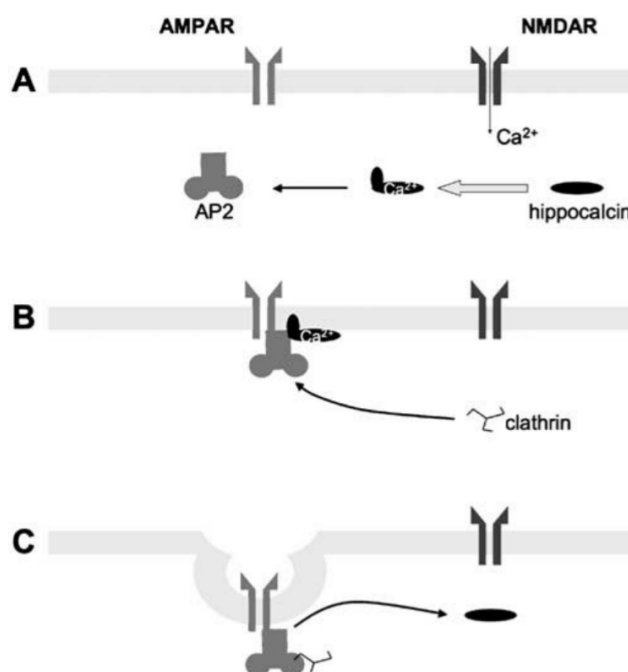


Рис. 1.6. Схема сигналізації гіпокальцину в процесі індукції довготривалої депресії. Відтворено з [9].

Все наведене вище демонструє, що НРСА є надзвичайно важливим і дуже малодослідженим компонентом кальцієвої сигналізації в нейронах, адже його унікальні біофізичні властивості дозволяють цьому кальцієвому сенсору активно і локально реагувати на найменші та найшвидші зміни $[Ca^{2+}]_i$ в межах мікро- і нанодоменів дендритного дерева та спонукає до подальших активних досліджень цього білка як з біофізичної, так і фізіологічної точок зору.

1.3 Оптичні методи в біофізичних дослідженнях

1.3.1 Епіфлуоресцентна та конфокальна мікроскопія

Класична флуоресцентна мікроскопія реєструє світло з всієї товщі зразка. Кожне точкове джерело розсіюється у форму, що нагадує подвійний перевернутий конус, відомий як функція розсіювання точки (point spread function/ PSF). Тільки центральна частина цієї області знаходиться у фокальній площині об'єктива, а решта флуоресцентного сигналу сприяє розмиванню зображення через надходження світла з областей простору поза фокусом (центральна область на рис. 1.7).

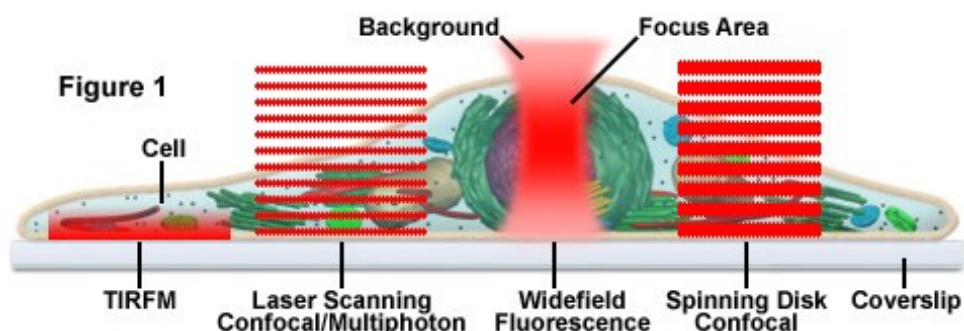


Рис. 1.7. Ілюстрація ефективного об'єму простору в межах якого відбувається детекція сигналу для різних типів флуоресцентної мікроскопії. Відтворено з [ZEISS-campus](#).

Роздільна здатність оптичної системи мікроскопа, тобто мінімальна відстань

між двома точковими джерелами світла, які можливо розрізнити на кінцевому зображенні, обумовлюється довжиною хвилі світла λ та такою характеристикою об'єктива, як числова апертура NA . Варто зауважити, що значення збільшення оптичної системи не впливає на роздільну здатність, як видно з рівняння критерію Релея для латеральної роздільної здатності d_{xy} оптичної системи наведеному в рівнянні (1.1) [69].

$$d_{xy} = \frac{0.61\lambda}{NA} \quad (1.1)$$

Конфокальна скануюча мікроскопія дозволяє ефективно відсікати світло, що надходить поза меж фокальної площини об'єктива. Це стає можливим завдяки використанню в оптичній схемі мікроскопа додаткової конфокальної апертури. У цьому випадку стає можливим об'ємна візуалізація біологічних зразків, шляхом послідовної реєстрації різних фокальних площин (ліворуч від центру на рис. 1.7). Аксіальна роздільна здатність d_{xz} оптичної системи, тобто мінімальна відстань між двома точковими об'єктами, що розташовуються вздовж оптичної осі об'єктива, на жаль, є значно гіршою за латеральну. Це обумовлено фізичними принципами формування PSF і ця величина додатково залежить від коефіцієнта заломлення середовища n в якому відбувається отримання зображення, як наведено в рівнянні для наближеної оцінки глибини різкості (1.2) [69].

$$d_{xz} = \frac{n\lambda}{NA^2} \quad (1.2)$$

1.3.2 Флуоресцентні індикатори Ca^{2+}

Після відкриття ролі іонів кальцію як універсального вторинного месенджера гостро постала потреба в чутливих та селективних індикаторах для *in situ* реєстрації змін $[Ca^{2+}]_i$. Фундаментальною роботою в цій галузі стала стаття Grynkiewicz, Poenie та Tsien, у якій було запропоновано сімейство нових флуоресцентних хелаторів Ca^{2+} на основі стілбенових хромофорів, зокрема Fura-2 та Indo-1 [70]. Fura-2 характеризується зміщенням піка збудження з 380 nm у вільному стані до 340 nm у Ca^{2+} -зв'язаному стані, що дозволяє застосовувати дві довжини хвилі збудження для точного вимірювання співвідношення кількості двох форм барвника та оцінки абсолютного значення концентрації Ca^{2+} . Водночас Indo-1 пропонує альтернативний підхід — розрізнення вільної та зв'язаної форми індикатора за спектром емісії: при фіксованій довжині хвилі збудження близько 350 nm пік емісії зміщується з 475 nm до 400 nm після зв'язування Ca^{2+} . Значення K_d для Fura-2 (145 nM) та Indo-1 (230 nM) є оптимальними для детекції змін $[Ca^{2+}]_i$ в фізіологічних межах. Недоліком обох основних індикаторів першого покоління є відносно невелика яскравість та необхідність використання ультрафіолетового випромінювання збудження, що є фототоксичним та викликає значні рівні автофлуоресценції.

Друге покоління індикаторів Ca^{2+} започаткували Fluo-2 та Fluo-3 — похідні флуоресцеїну, описані Minta, Kao та Tsien[71]. Ці сполуки вже не змінювали спектральні характеристики (однохвильові індикатори) після зв'язування Ca^{2+} , однак набули суттєво більшої квантової ефективності та мали спектр збудження у видимому діапазоні спектра, що дозволило використовувати для збудження широко доступний аргонний лазер (488 nm). Попри однохвильову природу цих індикаторів, точне оцінювання абсолютних значень $[Ca^{2+}]_i$ можливе за умови попиксельного калібрування та корекції на внутрішньоклітинні буфери Ca^{2+} [72]. Подальшим розвитком цього сімейства індикаторів став

Fluo-4 (K_d 350 nM) із підвищеним квантовим виходом майже вдвічі більшою фотостабільною та меншою чутливістю до pH , що зробило цей індикатор дуже зручним інструментом для моніторингу швидкоплинних коливань $[Ca^{2+}]_i$ навіть в межах поодиноких дендритних шипиків[73]. Доступність ацетоксиметил-похідних індикаторів, які легко проникати крізь плазматичну мембрану та здатних до гідролізу під дією внутрішньоклітинних естераз і подальшого накопичення активної форми індикатора в цитозолі робить їх надзвичайно зручним інструментом в роботі з культурами клітин.

У випадку однохвильових флуоресцентних кальцієвих індикаторів інтенсивність флуоресцентного сигналу безпосередньо залежить від концентрації кальцій-зв'язаної форми індикатора ($[F - Ca^{2+}]$), що залежить від загальної концентрації індикатора $[F]_T$ та константи дисоціації K_d (1.3). Співвідношення між зміною концентрацією кальцій-зв'язаної форми індикатора ($\Delta[F - Ca^{2+}]$) та зміни $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) відображає буферну місткість індикатора κ_F , чутливість індикатора до змін концентрації Ca^{2+} (рівняння 1.4).

$$[F - Ca^{2+}] = [F]_T \frac{[Ca^{2+}]_i}{[Ca^{2+}]_i + K_d} \quad (1.3)$$

$$\kappa_F \approx \frac{\Delta[F - Ca^{2+}]}{\Delta[Ca^{2+}]_i} \quad (1.4)$$

Лінійна залежність між $\Delta[F - Ca^{2+}]$, що відображає і зміну інтенсивності флуоресценції, та $\Delta[Ca^{2+}]_i$ зберігається лише за умови великих концентрацій барвника та $[Ca^{2+}]_i \ll K_d$. За таких умов наближене значення концентрації кальцій-зв'язаної форми індикатора $[F - Ca^{2+}]$ та буферна місткість можуть бути оцінені за рівняннями 1.5 та 1.6 [74].

$$[F - Ca^{2+}] = \kappa_F [Ca^{2+}]_i \quad (1.5)$$

$$\kappa_F = \frac{[F]_T}{K_d} \quad (1.6)$$

1.3.3 Фотолабільні кальцієві буфери

Точний контроль $[Ca^{2+}]_i$ з високою просторово-часовою роздільною здатністю в умовах експерименту став можливим завдяки застосуванню фотолабільних («saged-calcium») буферів Ca^{2+} . Серед таких сполук найбільш вживаним є нітрофеніл-EGTA (NP-EGTA), вперше синтезований 1994 році [75]. У темряві NP-EGTA зв'язує Ca^{2+} з високою афінністю, і K_d становить близько 80 nM , а спорідненість до Mg^{2+} є на кілька порядків нижчою, що визначає високу селективність сполуки щодо йонів кальцію. Під дією ультрафіолетового світла відбувається фотоліз нітрофенільної групи й миттєве вивільнення Ca^{2+} у навколишнє середовище. Експериментально показано, що опромінення з довжиною хвилі 350 nm дає напівперіод фотолізу близько 60 μs і енергетичні вимоги до ультрафіолетового опромінення залишаються у безпечному для більшості клітин діапазоні. Фотохімічний вихід реакції високий, завдяки чому практично весь зв'язаний кальцій звільняється після одноразового світлового імпульсу. Відмінною рисою NP-EGTA є також мінімальна зміна pH середовища після фотолізу. Продукти фотолізу не мають високої афінності до двовалентних іонів, тому звільнений кальцій залишається повністю доступним для клітинних реакцій. При цьому фрагменти утворені після фотолізу майже не поглинають у видимому спектрі, що забезпечує сумісність із флуоресцентною мікроскопією. Комбінація NP-EGTA з флуоресцентними індикаторами Ca^{2+} дозволяє то-

чно калібрувати коливання $[Ca^{2+}]_i$ і порівнювати їх з теоретичними моделями буферизації. Після опромінення клітина отримує стрибкоподібне підвищення $[Ca^{2+}]_i$ до мікромольних концентрацій, яке здатне імітувати фізіологічні реакції. Використання точкового лазерного освітлення дає змогу отримувати локальні регіони вивільнення Ca^{2+} у сотні нанометрів, що є особливо корисним в дослідженні мікродоменної кальцієвої сигналізації.

1.3.4 Фьорстеровське резонансне перенесення енергій в дослідженнях біомолекул

Фьорстеровське резонансне перенесення енергії (FRET) є безвипромінювальним механізмом передачі збудження між донорним і акцепторним флуорофорами, це явище проявляється за умови зближення молекул на відстань близько 1–10 *nm*, що зіставно з розміром окремих біологічних макромолекул (рис. 1.8). Залежність ефективності перенесення енергії від шостого степеня величини (r^6) дистанції між флуорофорами дозволяє чітко реєструвати їх колокалізацію. Ця особливість робить FRET чутливим і зручним інструментом для дослідження взаємодій білків, конформаційних змін макромолекул та динаміки сигналізації у живих клітинах [76, 77].

Важливим фактором, що впливає на ефективність FRET є перетин спектра емісії молекули-донора та спектра збудження молекули-акцептора. Для оцінки величини FRET використовують підходи, що ґрунтуються на спектральних властивостях випромінювання (intensity-based), змінах в часі існування флуоресценції (lifetime-based) та змінах в поляризації випромінювання (anisotropy-based) [77, 78].

Підходи, що використовують спектральні властивості випромінювання засновані на оцінці змін інтенсивностей сигналів в спектральних каналах донора та акцептора, з урахуванням паразитного перекриття спектрів флуорофорів. Такі підходи є найбільш уживаними, оскільки не вимагають надто коштовно-

го обладнання, виключно джерело декількох монохроматичних довжин хвиль збудження та набір відповідних світлофільтрів. Однак за належного калібрування ці підходи дозволяють кількісно оцінювати параметри білок-білкових взаємодій та конформаційних перебудов [76, 79, 80, 81, 82, 83].

Тривалість флуоресценції (τ) характеризує час, впродовж якого флуорофори перебувають в збудженому стані перш ніж повернутись до основного стану шляхом випромінювання фотонів чи розсіювання енергії без випромінювання. Кожен флуорофор має власний унікальний характер затухання флуоресценції, тому наявність FRET, який забезпечує новий альтернативний шлях переходу зі збудженого в основний стан, вносить зміни в характер тривалості флуоресценції. За наявності FRET тривалість флуоресценції донора стає коротшою, що можна безпосередньо виміряти з використанням FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy) [76].

Метод флуоресцентної анізотропії заснований на аналізі поляризації флуоресцентного сигналу. За умови нерухомості флуорофора, площина поляризації світла збудження та емісії мають збігатись. Однак у реальному випадку біологічних макромолекул орієнтація флуорофорів впродовж існування збудженого стану встигає змінитись, внаслідок спонтанного теплового руху молекул. Тому у випадку використання світла певної поляризації для збудження, флуоресцентне випромінювання буде деполаризовано (анізотропічне) і ступінь деполаризації буде залежати від мобільності флуорофорів. Анізотропія чутлива до розміру і форми макромолекул та динаміки внутрішньоклітинного середовища. Більші флуорофори матимуть меншу рухливість, тоді як флуорофори меншого розміру будуть швидше змінювати положення. За умови взаємодії різних молекул донора та акцептора час флуоресценції зменшується, як вже було зазначено вище, одже є менше часу для зміни положення флуорофора що призводить до збільшення анізотропії. Натомість за умови FRET між однаковими флуорофорами (homoFRET) не відбувається зміни часу флуоресценції, однак через зменшення мобільності флуорофора внаслідок збільшення його розмірів, кінцева

анізотропія випромінювання буде меншою. Через це цей підхід особливо корисний в дослідженні олігомеризації біологічних макромолекул [76, 84, 85, 86].

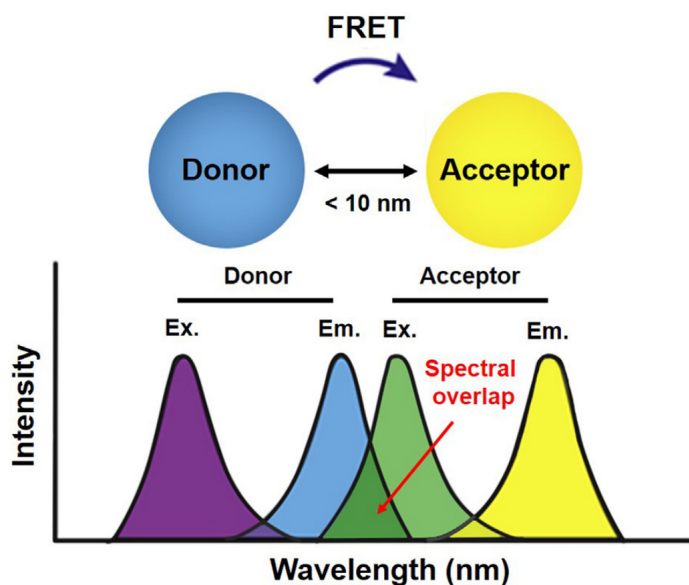


Рис. 1.8. Схема Фьорстеровського резонансного перенесення енергії (FRET). Відтворено з [78].

Окремим фактором, який треба враховувати при застосуванні FRET в дослідженнях макромолекул що локалізуються на мембранах є proximity FRET, перенесення енергії між флуорофорами яке відбувається внаслідок їх спонтанного зближення без подальшої специфічної взаємодії в процесі латеральної дифузії по поверхні мембрани [87]. Детальний аналіз показав, що навіть рецептори які специфічно не взаємодіють перебуваючи на поверхні мембрани можуть демонструвати значущі величини FRET виключно через збіг у площині мембрани, що встановлює нижню межу чутливості для досліджень білок-білкових взаємодій мембранних білків. Проте сучасні симуляції цього явища для мономерних і олігомерних мембранних білків кількісно описали залежність величини такої похибки від поверхневої густини флуорофорів та ступеня олігомеризації, що дозволило розробити методи корекції експериментальних даних [88, 89, 90, 91].

1.3.5 Флуоресцентні білки та зонди на їх основі в біофізичних дослідженнях

Флуоресцентні білки є незамінними інструментами сучасної біофізики та нейронаук, відкриваючи можливість безпосередньої візуалізації клітинних процесів в живих системах [92]. Першою хвилею розвитку флуоресцентних білків було отримання ціанового та жовтого варіантів зеленого флуоресцентного білка (green fluorescent protein/ GFP) дикого типу із медузи *Aequorea victoria*. Штучний варіант підсиленого ціанового флуоресцентного білка (enhanced cyan fluorescent protein/ ECFP) був отриманий шляхом заміни критичних амінокислот у хромофорному ядрі GFP, що спричинило батохромний зсув максимуму збудження до 433 nm та емісії до 475 nm. ECFP характеризується коротшим часом існування збудженого стану порівняно з батьківським білком, проте демонструє достатню фотостабільність для багаторазової експозиції в живих системах [92]. Підсилений жовтий флуоресцентний білок (enhanced yellow fluorescent protein/ EYFP) був одержаний шляхом заміни в області Tyr66-His67-Gly68, що призвело до формування спряженої електронної π -системи та зсуву максимум емісії до 527 nm і збільшення квантового виходу флуорофора [93]. Значне перекриття спектра емісії ECFP та спектра збудження EYFP зробило цю пару білків класичною системою для досліджень з використанням FRET.

Подальший розвиток різноманітних за спектральними характеристиками флуоресцентних білків супроводжувався створенням TagRFP — яскравого мономерного червоного білка з підвищеною фотостабільністю, а спектральні властивості дозволили використовувати його в комбінаціях із зеленими та жовтими флуорофорами, наприклад для одночасної реєстрації сигналів індикаторів Ca^{2+} сімейства Fluo та білків інтересу [94]. Арсенал флуоресцентних білків розширювався і в бік синьої області спектра, де варто звернути увагу на стабільний і яскравий білок TagBFP, отриманий шляхом перетворення червоного

білка на яскравий синій з максимумом емісії 456 nm [95]. TagBFP також є зручним донором в досліджах з використанням FRET, коли акцептором виступають білки з зелено-жовтої області спектра.

Нещодавно описаний варіант флуоресцентного білка mBaoJin, що бере свій початок від флуорофору дикого типу що був виділений з медузи *Cyrtia uchidae* наразі є одним з найбільш довершених флуорофорів білкового походження. Надзвичайна фотостабільність, висока яскравість (у 8-10 разів більша в порівнянні із білками першого покоління) та нечутливість до змін pH в широких фізіологічних межах роблять його зручним інструментом в досліджах, що вимагають тривалої або високочастотної візуалізації досліджуваних білків із одночасним зменшенням фототоксичності через зменшення необхідного часу експозиції [96].

Окрім використання химер із білків інтересу та флуоресцентної мітки, широкого вжитку набули спеціалізовані флуоресцентні зонди та індикатори на основі флуоресцентних білків. Так для селективної візуалізації клітинних мембран в складі клітини використовується похідна EYFP, де до С-кінця флуоресцентного білка приєднано домен нейромодуліну із сигнальними послідовностями для подвійного пальмітилювання (EYFP-Mem). Це забезпечує інтеграцію мітки в склад ліпідних мембран [97].

Також варто виокремити зонди на основі плекстринового домену (РН-домену) PLC δ , які дозволяють селективно візуалізувати розподіл мінорного фосфоліпіда PIP_2 в живих клітинах [98]. Використання РН-домену із флуоресцентними білками GFP та EYFP шляхом спостереження за перерозподілом флуоресцентного сигналу дозволив безпосередньо візуалізувати процес гідролізу PIP_2 в результаті активації PLC δ [99].

Використання FRET-пари із РН-доменів з мітками ECFP та EYFP дало змогу кількісно оцінити кінетику активності PLC δ в межах окремих дендритних гілочок [100, 101], а аналіз траєкторій поодиноких молекул зонда з використанням TIRF мікроскопії показав, що окремі регіони зв'язування РН-доменів

майже не дифундують латерально, вказуючи на їх утримання в складі ліпідних нанодоменів або через взаємодію із цитоскелетом [102].

1.4 Іонофорез

1.4.1 Іонофорез в дослідженнях синаптичної передачі та синаптичної пластичності

Іонофорез є зручним методом введення малих кількостей фармакологічних препаратів та барвників або ін'єкції неорганічних іонів в околиці досліджуваної клітини. Однак цей метод є досить неточним. Абсолютна швидкість вивільнення (а отже, і концентрація, досягнута біля кінчика мікроелектрода) зазвичай невідома в межах коефіцієнта 2-5. Швидкість зміни концентрації препарату на поверхні клітини при початку імпульсу викиду залежить не лише від відстані до кінчика мікроелектрода, але й від фізичних властивостей самого електрода.

Короткі іонофоретичні прикладання фармакологічних препаратів давно широко застосовували для селективної активації різних типів рецепторів. У випадку глутаматних рецепторів досліджували індивідуальні внески AMPA- та NMDA-компонентів у потенціал постсинаптичної клітини [103], а варіювання полярності та амплітуди струмів прикладання надавало можливості градуйовано пригнічувати або посилювати синаптичну передачу з точністю до кількох десятків відсотків [104]. Також поєднання парних внутрішньоклітинних записів з локальним швидким іонофорезом глутамату та NMDA ($0.2-1\text{ ms}$) дозволили з'ясувати що амплітуди mEPSC коливаються переважно через пресинаптичні варіації кількості вивільненого нейромедіатора, а не через насичення рецепторів [105], а варіювання тривалостей іонофоретичних імпульсів дозволили відтворювати різні режими частотної залежності викиду нейромедіатора, моделюючи фізіологічні патерни активності нейронів [106, 107]. А надшвидкі прикладання глутамату ($< 100\mu s$) були використані для дослідження кінетичних вла-

стивостей NMDA-рецептор залежних йонних струмів [108]. Окрім як для прикладання лігандів глутаматних та GABA рецепторів, іонофорез застосовувався в дослідженнях впливу Li^+ на синаптичну провідність [109] та дофамінергічної синаптичної передачі [110].

Однак застосування іонофорезу в дослідженнях довготривалої синаптичної пластичності та кальцієвої сигналізації є вкрай обмеженим. Так серії із 5 повторюваних іонофоретичних прикладань NMDA тривалістю 10 s використовували для моделювання LTP в зрізах гіпокампа [111], а поодинокі прикладання глутамату тривалістю одиниці секунд було використано в нашій лабораторії для досліджень сигналізації НРСА в нейронах гіпокампа [66]. Проте потенціал іонофорезу в експериментальних дослідженнях поза галуззю біофізики йонних каналів та активації поодиноких синаптичних закінчень є вельми великим. І поєднання іонофоретичних підходів із сучасними методами візуалізації живих клітин є дуже перспективним, як з погляду підвищення точності фармакологічного впливу на досліджувані клітини, так і з погляду збільшення продуктивності експериментальної роботи, на відміну від повної заміни позаклітинного розчину (bath application).

1.4.2 Фізичні основи іонофоретичного прикладання

Вивільненню речовини з кінчика іонофоретичного електроду сприяє чотири основних механізми: безпосередньо електричне поле, що забезпечує іонофорез, дифузія, об'ємний потік через градієнт гідростатичного тиску та об'ємний потік через електроосмотичні ефекти. Розділення внесків цих чотирьох механізмів є складною задачею і загальний переніс маси речовини є складнішим процесом, аніж проста алгебраїчна сума внесків всіх чотирьох механізмів. Подальший опис фізичних принципів процесу іонофорезу ґрунтуватиметься на ранніх роботах, що мали на меті описати процеси перенесення за кожного з механізмів за стаціонарних умов [112] та уточнити їх взаємодію і часову динаміку

[113, 114].

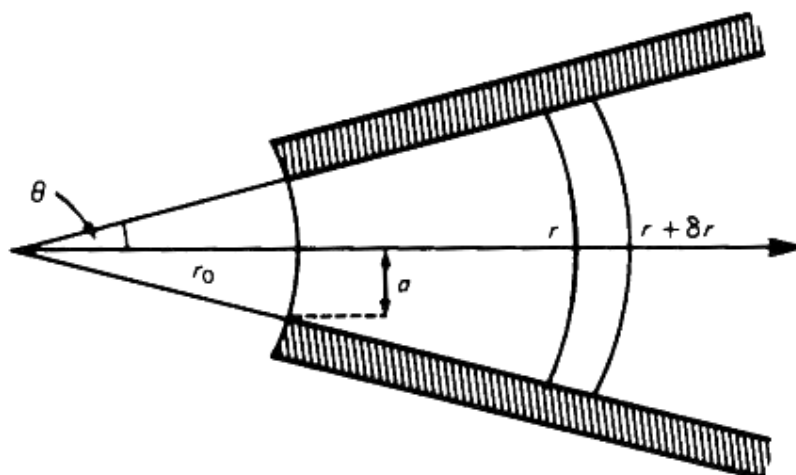


Рис. 1.9. Геометрія конічного кінчика іонофоретичного електрода.

Відтворено з [115].

Іонофорез — це електрофоретична міграція іонів у градієнті електричного потенціалу [116]. Якби електрофоретичне перенесення було єдиним транспортним механізмом, то вивільнення певного виду йонів з електрода описувались би співвідношенням (1.7). q представляє загальний потік в mol/s , I це струм, z — заряд йона і F це стала Фарадея ($96480 C/mol$). Фактор перенесення n представляє емпіричний коефіцієнт, що описує внесок окремого типу йонів, що обумовлюють загальний струм. Наприклад, у випадку вивільнення певного типу катіонів з електрода у зовнішній розчин, у формуванні струму водночас братимуть участь аніони із зовнішнього розчину, що рухаються всередину електрода. Значення фактору перенесення n знаходяться в межах 0.1 – 0.5 для катіонів, але є значно для більшим аніонів. Знак мінус в наведеному рівнянні є наслідком того, що за умови струму назовні іони рухаються у напрямку зменшення r (рис. 1.9. Якщо імпульс струму, що забезпечує перенесення заряду Q кулон, то загальна кількість іонів цільової речовини, що покинула електрод, дорівнює nQ/zF моль. Невідповідність такої простої моделі з експериментальними даними виникає за умови, коли струм I є нульовим, що означало б нульовий потік

речовини q . Однак в дослідних умовах завжди спостерігається незначне спонтанне витікання речовини з електрода.

$$q = -\frac{nI}{zF} \quad (1.7)$$

Важливим чинником, що сприяє витіканню речовини, є дифузія йонів, тепловий рух за градієнтом хімічного потенціалу [116]. Для конічного електрода (1.9) з внутрішнім діаметром $2a$ та кутом сходження $2\theta \text{ rad}$ із початковою концентрацією речовини $C_0 \text{ mol}$ з коефіцієнтом дифузії D рівноважний дифузійний потік речовини q_D буде описуватись рівнянням (1.8). Для мінімізації спонтанного дифузійного витікання варто прагнути зменшувати концентрацію речовини C_0 в розчині для заповнення електрода, або використовувати електроди з більшим опором, відповідно зменшуючи радіус a та/або кут сходження θ електрода. Альтернативно, ефективним є застосування струму запирання зворотного напрямку.

$$q_D = \pi D C_0 \theta a \quad (1.8)$$

Потік обумовлений гідростатичним тиском розчину в електроді q_H викликається впливом гравітації та обмежується опором в'язкості й описується рівнянням (1.9). Прискорення вільного падіння $g=9.8 \text{ m/s}^2$, щільність розчину ρ , висота стовпа розчину h та характеристики геометрії електрода характеризують тиск стовпа розчину, а в'язкість розчину η обумовлює опір, що протидіє цьому тиску.

$$q_H = \frac{3\pi\theta a^3 C_0 \rho g h}{8\eta} \quad (1.9)$$

Електроосмотичний внесок в загальне перенесення маси в іонофоретичних електродах обумовлюється дією електрокінетичних сил і є проявом властивостей подвійного електричного шару на поверхні скла електрода. Зважаючи на негативний заряд поверхні силікатного скла, рухома компонента подвійного електричного шару несе позитивний заряд і прагне переміщуватись в електричному полі, що прикладається в процесі іонофорезу. Це обумовлює менші значення фактора перенесення для аніонів, оскільки за негативної полярності струму, необхідної для їх вивільнення з електрода, напрямок міграції подвійного електричного шару є зустрічним, що загалом перешкоджає потоку аніонів інтересу назовні.

РОЗДІЛ 2

Матеріали та методи

2.1 Культури клітин

2.1.1 Первинна культура нейронів гіпокампа щура

Модельною системою в роботі виступає первинна культура нейронів гіпокампа щура, для якої характерна висока експресія ендogenousного гіпокальцину, наявний протокол отримання первинної культури нейронів гіпокампа є адаптацією протоколів [117, 118]. Біологічний матеріал отримували з новонароджених щурів лінії Wistar, після декапітації гіпокамп виділяли в асептичних умовах, відокремлювали зону CA1 та піддавали тканину трипсинізації в розчині із 0.25% v/v трипсину (MilliporeSigma, США) у Minimum Essential Medium (MEM GlutaMax) при 37°C, 10 хв. Після ферментації, для інгібування ферменту тканину додавали в пробірку епандорф з 1 ml середовища MEM GlutaMax з 10% кінської сироватки (horse serum/HS) і обережно перемішували. Фінальним етапом виділення клітинної суспензії є перенесення тканини у пробірку об'ємом 5 ml із 3 ml MEM GlutaMax з 10% horse serum та осадження клітин на дно пробірки. Після цього супернатант з клітинами наносили на стерильні круглі покривні скельця діаметром 18 мм у 12-лункові планшети (greiner, США). Скельця попередньо оброблені сумішшю полі-L-лізину (PLL, 40 $\mu\text{g/ml}$, MilliporeSigma) з ламініном (5 $\mu\text{g/ml}$, Thermo Fisher Scientific Inc., США) для поліпшення адгезії клітин до поверхні та створення оптимальних умов для їх росту. Клітини культивували у живильному середовищі MEM GlutaMax (Thermo Fisher Scientific Inc., США) з додаванням 1% horse serum, 0.25% гентаміцину, 2% суміші нутрієнтів B27 та 1% суміші нутрієнтів N2 (Thermo Fisher Scientific, США). Інкубацію проводили за температури 37°C та з вмістом 5% CO_2 в атмосфері. Заміну поживного середовища здійснювали кожні 3-4 доби.

Роботи з культурою виконували в стерильних умовах спеціально обладнаного приміщення, оснащеного ламінарними боксами II класу біологічної безпеки (ESCO, Тайвань), CO_2 -інкубаторами (ESCO, Тайвань) та інвертованим мікроскопом (Nikon, Японія). Всі маніпуляції проводили відповідно до норм безпеки та захисту.

Усі процедури з тваринами проводили відповідно до вимог Комітету з питань захисту тварин Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та згідно з Настановами Національного інституту охорони здоров'я США щодо догляду та використання тварин. Всі щури були з віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

2.1.2 Лінійна культура клітин НЕК 293

Клітинна лінія НЕК 293 (human embryonic kidney/НЕК - клітини людської ембріональної нирки) була отримана з Банку клітинних культур НАН України (Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, Україна). Культивування клітин проводили в поживному середовищі наступного складу: DMEM з додаванням 10% FBS (fetal bovine serum/ембріональна сироватка бика) та 0.25% розчину гентаміцину із концентрацією 100 mg/ml . Інкубацію здійснювали при температурі 37°C та з вмістом 5% CO_2 в атмосфері. Заміну поживного середовища здійснювали кожні 3-4 доби, а пересадку клітин за допомогою розчину трипсин-EDTA здійснювали по досягненню 80-90% щільності покриття клітин. Всі використані для культивування клітин реагенти виробництва Thermo Fisher Scientific Inc. (США).

Для подальших експериментів клітини вирощувались в пластикових чашках Петрі діаметром 35 mm зі скляним дном (Nest, США), решту часу клітинна лінія підтримувалась в культуральних флаконах з площею поверхні для росту 25 cm^2 (greiner, США). Роботи з культурою виконували в стерильних умовах спеціально обладнаного приміщення, оснащеного ламінарними боксами II кла-

су біологічної безпеки (ESCO, Тайвань), CO_2 -інкубаторами (ESCO, Тайвань) та інвертованим мікроскопом (Nikon, Японія). Всі маніпуляції проводили відповідно до норм безпеки та біологічного захисту.

2.1.3 Генетичні конструкції для трансфекції клітин

В роботі було використано ряд генетичних конструкцій, що представляли плазмідну ДНК для конститутивної експресії рекомбінантних білків інтересу з флуоресцентними мітками в культурах клітин.

Для дослідження поведінки НРСА використовувались наступні плазмідні: НРСА-EYFP [64], НРСА-TagRFP [18], НРСА-mBaoJin (генетична конструкція створена спільно з колегами з YPBiotech).

Для дослідження взаємодії НРСА з AP2 використано плазмиду із міченою β -субодиницею AP2 (AP2B1). Плазміда з AP2B1-EYFP та плазмиди із мембранною міткою (EYFP-Mem) і міткою до PIP_2 (PHD-ECFP) є подарунком лабораторії dr. Robert D. Burgoyne (the Physiological Laboratory, University of Liverpool, Liverpool, UK).

Як мітку для постсинаптичної щільності використано плазмиду із PSD95-TagRFP (червоний колір флуоресценції, addgene 52671).

2.1.4 Транзієнтна трансфекція первинних культур клітин

На 10-14 день *in vitro* (Day *in vitro*/DIV) нейрони трансфікували використовуючи реагент Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США), по протоколу, описаному постачальником. Перед трансфекцією все культуральне середовище у лунці замінювали на підігрітий MEM GlutaMAX без будь-яких добавок. Для кожної лунки 0.3-1 μg ДНК в 150 μl MEM GlutaMAX поєднували з 3.5 μl Lipofectamine 2000 в 150 μl MEM GlutaMAX. Суміш інкубували 20 хвилин при кімнатній температурі, а потім додавали до нейронів. Через 2 го-

дини середовище замінювали свіжим нагрітим культуральним середовищем і витримували при 37 °C в 5% CO_2 протягом 1-2 днів.

2.1.5 Транз'єнтна трансфекція лінійних культур клітин

Для трансфекції клітин НЕК 293 було використано реагент Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Процедуру трансфекції проводили відповідно до рекомендацій та протоколу виробника. Максимальна загальна маса плазмідної ДНК на один зразок клітин не перевищувала 2 μg .

2.1.6 Підготовка культур клітин до експерименту

Тривале культивування клітин призводить до незначного випаровування культурального середовища, навіть в умовах зволоженої атмосфери інкубатора, що викликає зміни осмолярності середовища. Для подальших експериментальних досліджень культивовані клітини переносились в збалансований соловий розчин фіксованого складу із HEPES як буферного компонента (HEPES buffered saline/HBS, $pH = 7.3$, див. склад в 2.1).

Компонент	Концентрація	Маса чи об'єм
$NaCl$	150 mM	4383 mg
KCl	2.5 mM	92.5 mg
$CaCl_2$	2 mM	147 mg
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1 mM/0.3 mM	102 mg/30.5 mg
HEPES	10 mM	1192 mg
ddH_2O	n/a	500 ml

Таблиця 2.1. Склад позаклітинного розчину HBS (HEPES buffered saline).

Перед початком експериментів із первинною культурою нейронів гіпокампа готується аліквота HBS з додатками (лінійна культура НЕК 293 вимагає лише глюкози) та підігрівається до 37°C перед початком роботи:

- 1) Глюкоза до кінцевої концентрації 5 *mM* (9 *mg* на 10 *ml*);
- 2) Гліцин до кінцевої концентрації 10 μM (1 μl на 10 *ml* за використання stockового розчину 100 *mM*), необхідний ко-активатор NMDA-рецепторів;
- 3) ТТХ до кінцевої концентрації 500 *nM* (1 μl на 10 *ml* за використання stockового розчину 5 *mM*), необхідний для блокування спонтанної мережевої активності в культурі шляхом пригнічення розповсюдження потенціалів дії.

Пряме перенесення клітин з культурального середовища в HBS може призвести до осмотичного шоку та провокування відшарування клітин і зниження їх життєздатності. Для запобігання осмотичного шоку перенесення клітин в сольовий розчин відбувалось поступово, шляхом заміни культурального середовища за кілька етапів з періодами інкубації між кожним; послідовність етапів наведено в 2.2. Впродовж експериментів з клітинами для підтримання життєздатності використовувалась система проточної перфузії експериментальної камери із підігрівом позаклітинного розчину. Детальна схема та загальний вигляд системи перфузії наведено у додатку В.

Видалений об'єм	Доданий об'єм	Інкубація
-	500 μl	10 <i>min</i>
500 μl	700 μl	10 <i>min</i>
700 μl	1000 μl	10 <i>min</i>

Таблиця 2.2. Послідовність заміни культурального середовища на позаклітинний розчин для запобігання осмотичного шоку клітин

2.2 Мікроскопічні та флуоресцентні методи

2.2.1 Завантаження культур клітин проникними АМ-похідними індикатора Fluo-4 та фотолабільного хелатора NP-EGTA

Для експериментів, що вимагали візуалізації концентрації Ca^{2+} , або фотоіндукованого підвищення $[Ca^{2+}]_i$ клітини проникними завантажували ацетоксиметил (АМ) похідними [119, 120] флуоресцентного індикатора Fluo-4 або фотолабільного кальцієвого хелатора NP-EGTA за протоколом, адаптованим із [121].

Для приготування розчинів для завантаження використовували стокові розчини Fluo-4/АМ (Thermo Fisher Scientific Inc., США) та NP-EGTA/АМ (Thermo Fisher Scientific Inc., США) в DMSO (MilliporeSigma, США) з концентрацією 5 mM. Стокові розчини розводили в позаклітинному розчині HBS: для завантаження Fluo-4/АМ в співвідношенні 1:1000 до кінцевої концентрації 5 μM ; NP-EGTA в співвідношенні 1:2500 до кінцевої концентрації 2 μM . Клітини переносили в розчин з АМ-похідними реагентів і проводили інкубацію впродовж 20 хвилин за 37 °C. Після інкубації розчин для завантаження видаляли, а клітини один раз промивали 500 μl HBS після чого розчин замінювали 1 ml свіжого HBS, а завантажені клітини підтримували при 37 °C до використання.

2.2.2 Епіфлуоресцентна та конфокальна мікроскопія

Для проведення флуоресцентних реєстрацій в комбінації з іонофорезом використовувалась експериментальна установка на базі інвертованого мікроскопа IX71 (Olympus, Японія) до якої входили: високоапертурний об'єктив UAp0/340 40 $\times$ /1.35 (Olympus, Японія), цифрова камера Sensicam QE (PCO, Німеччина), монохроматор Polychrome V (TillPhotonics, Німеччина), модуль керування ICU2

(TillPhotonics, Німеччина), оптичний розділювач Dual-view (Optical Insights, США), набори флуоресцентних фільтрів 69002 та 69008 (Chroma, США).

Для проведення конфокальних реєстрацій клітин НЕК 293 використовувався мікроскоп FV1000 (Olympus, Японія) центру загального користування НАН України (інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.). Зображення поодиноких фокальних площин отримували з використанням водно-імерсійного об'єктива з високою апертурою ($60\times$, NA 1.00; Olympus, Японія). НРСА-mBaoJin збуджували за допомогою аргонного лазера з довжиною хвилі 488 nm , а його емісію реєстрували в діапазоні $497\text{--}535\text{ nm}$. Фотоліз NP-EGTA проводили за допомогою напівпровідникового лазера з довжиною хвилі 405 nm . Одиначна подія фотостимуляції застосовувалася до всієї площі клітини в межах кадру, використовуючи потужність лазера 20–25% та час експозиції 8 ms на піксель.

2.2.3 Оцінка ефективності Фьорстеровського резонансного перенесення енергії

Для детекції та кількісної оцінки величини FRET в роботі було використано трикубовий метод (3-cube approach/ E-FRET) [79, 122]. Стандартним підходом детекції FRET є кількісна оцінка величини сенсibilізованої емісії (sensitized emission/ F_c), інтенсивності сигналу акцептора за збудження донора (I_{DA}) з урахуванням перетину спектрів збудження та емісії флуорофорів виражених через відповідні коефіцієнти a , b , c та d (2.1). За умови низького сигналу акцептора в спектральному каналі донора за довжини хвилі збудження донора та низького сигналу донора в каналі емісії акцептора за довжини хвилі збудження акцептора коефіцієнти $b \approx c \approx 0$ і вираз для загальної оцінки F_c набуває простішого вигляду (2.2).

Для отримання чотирьох необхідних спектральних каналів використовувались дві довжини хвилі збудження та два спектральних канали реєстрації. Для збудження донора (НРСА-ECFP) використовували довжину хвилі 435 nm , для

збудження акцептора (AP2B1-EYFP) використовували довжину хвилі 505 *nm*. Реєстрацію двох спектральних каналів забезпечувало використання приставки Dual-View із дихроїчним фільтром з граничною довжиною хвилі 505 *nm* що дозволяло отримувати зображення в обох каналах одночасно. Проведена оцінка калібрувальних коефіцієнтів для нашої дослідної установки з використанням клітини що експресували або лише донор, або лише акцептор дала наступні значення: $a = 0.12 \pm 0.07$ (2.3) та $d = 0.79 \pm 0.1$ (2.6).

$$F_c = I_{DA} - a(I_{AA} - cI_{DD}) - d(I_{DD} - bI_{AA}) \quad (2.1)$$

$$F_c = I_{DA} - aI_{AA} - dI_{DD} \text{ (for } b = c = 0) \quad (2.2)$$

$$a = I_{DA(A)} / I_{AA(A)} \quad (2.3)$$

$$b = I_{DD(A)} / I_{AA(A)} \quad (2.4)$$

$$c = I_{AA(D)} / I_{DD(D)} \quad (2.5)$$

$$d = I_{DA(D)} / I_{DD(D)} \quad (2.6)$$

Оскільки F_c є безрозмірною величиною та залежить від характеристик наявного обладнання, наступним кроком була оцінка ефективності FRET (E_{app}), величини що характеризує відсоток від загальної кількості збуджених молекул донора, що передали свою енергію молекулам акцептора. Найпростішим способом оцінки E_{app} є вимірювання відновлення сигналу донора після фотодеструкції акцептора (2.7), однак цей підхід не можна застосовувати у випадку тривалих візуалізацій живих клітин. Метод E-FRET передбачає обхід цього обмеження шляхом впровадження параметра G , коефіцієнта що відображає співвідношення між сенсibiliзованою емісією F_c та рівнем відновлення донора

(2.8). Оцінка G дозволяє позбавитись необхідності в фотодеструкції акцептора та оцінювати E_{app} безпосередньо із величини F_c та сигналу з каналу реєстрації донора I_{DD} (2.9), що більш детально представлено в рівнянні 2.10.

$$E_{app} = \frac{I_{DD}^{post} - I_{DD}}{I_{DD}^{post}} \quad (2.7)$$

$$G = \frac{F_c}{I_{DD}^{post} - I_{DD}} \quad (2.8)$$

$$E_{app} = \frac{F_c}{F_c + GI_{DD}} \quad (2.9)$$

$$E_{app} = \frac{I_{DA} - aI_{AA} - dI_{DD}}{I_{DA} - aI_{AA} + (G - d)I_{DD}} \quad (2.10)$$

Значення коефіцієнта G було отримано з використанням тандемної конструкції що містила одночасно донор та акцептор (ECFP-EYFP) та подальшої оцінки відновлення флуоресцентного сигналу донора (ΔI_{DD}) та падіння інтенсивності сенсibilізованої емісії (ΔF_c) після фотодеструкції акцептора (2.11). Для нашої дослідної установки оцінка становила $G = 3.6 \pm 0.2$.

$$G = \frac{(I_{DA} - aI_{AA} - dI_{DD}) - (I_{DA}^{post} - aI_{AA}^{post} - dI_{DD}^{post})}{I_{DD}^{post} - I_{DD}} = \frac{\Delta F_c}{\Delta I_{DD}} \quad (2.11)$$

Отримані значення коефіцієнтів a , d та G дозволили надалі оцінювати значення E_{app} для кожного окремого пікселя в тривалих флуоресцентних реєстраціях живих клітин.

2.3 Флуоресцентні та електрофізіологічні реєстрації в комбінації з іонофоретичними прикладаннями

2.3.1 Підготовка до виконання іонофоретичних прикладань

Іонофоретичні електроди виготовляли із капіляра OD 1.5 *mm* та ID 0.86 *mm* із філаментом для спрощення заповнення розчином (Sutter Instrument, США). Налаштування програми для пулера P-97 (Sutter Instrument, США) наведені в таблиці 2.4. Опір готових електродів був у межах 100–120 *MΩ*. Враховуючи малий діаметр кінчиків електродів, доцільно використовувати виключно капіляри з філаментом, щоб уникнути проблем із заповненням. Впродовж експериментального дня через засмічення електродів використовувалось до 4–6 електродів.

HEAT	PULL	VEL	TIME	PRESSURE
Ramp	55-60	70-80	250	500

Таблиця 2.3. Програма для виготовлення іонофоретичний електродів.

Для заповнення електродів використовувався розчин NMDA (MilliporeSigma, США) концентрацією 100 *mM* або 15 *mM* в позаклітинному розчині (HBS, *pH* = 7.3). Після заповнення електрод закріплювався у тримачі головки підсилювача. Кінчик електрода розташовувався над поверхнею розчину в експериментальній камері (2.1Aa). В програмному забезпеченні PatchMaster, відкривши вікна підсилювача (Amplifier) та осцилоскопа (Oscilloscope). Для позиціювання кінчика електрода всередині камери дотримувалися певної процедури, виходячи з конфігурації установки з мікроманіпулятором, встановленим ліворуч від експериментальної камери. Спочатку, коли електрод знаходиться над камерою, його кінчик позиціювався позаду та праворуч від оптичної осі

об'єктива (2.1Ab). Процес занурювання кінчика електрода у розчин в камері контролювався шляхом спостереження за пором електрода, занурення завершувалось, коли опір падав з діапазону $G\Omega$ до цільового значення приблизно 100–120 $M\Omega$.

У програмному забезпеченні PatchMaster налаштування каналу прикладання скидалось натисканням "Setup" у вікні підсилювача, переходили у режим фіксації струму (current clamp) і встановлювався струм утримання (retention current) $+3-5$ nA. Полярність цього струму визначалась зарядом йона фармакологічної сполуки; за $pH = 7.3$ йони NMDA заряджені негативно. Встановлення струму утримання відбувалось якомога швидше, оскільки інакше NMDA міг вільно витікати з електрода і спричиняти передчасну активацію навколишніх нейронів. Для візуалізації кінчика під час фінального позиціювання електрод переміщувався на себе вздовж осі Y, доки в полі зору не з'являлась тінь (2.1B). Потім електрод переміщувався вліво вздовж осі X, утримуючи його тінь у центрі. Точка, де яскрава пляма накладалась на тінь, вказувала на місце перетину електрода з поверхнею рідини в експериментальній камері (2.1C). Електрод переміщувався далі вліво вздовж осі X до кінця його тіні, а потім опускався вниз уздовж осі Z, доки кінчик не опинявся у фокусі. Для досягнення максимальної глибини різкості на цьому етапі повністю закривали ірисову діафрагму конденсора (2.1D), оскільки за відкритої діафрагми візуалізація електрода була б надзвичайно складною (2.1E).

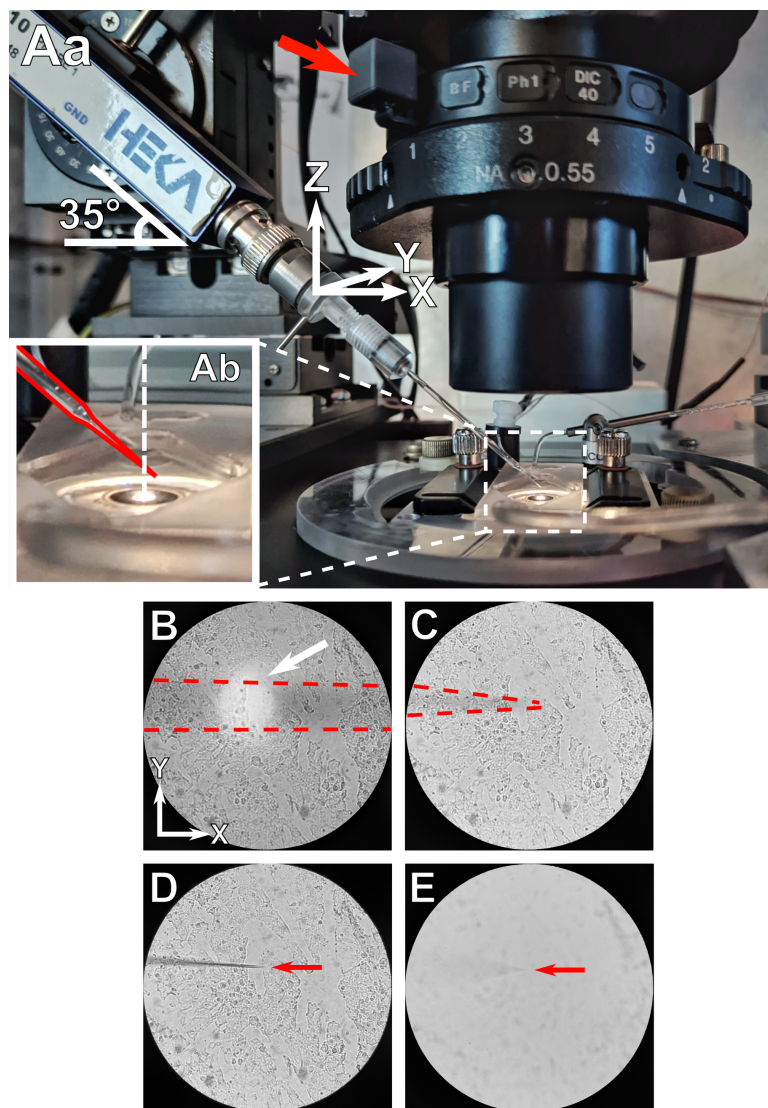


Рис. 2.1. Встановлення та позиціонування іонофоретичного електроду на експериментальній установці.

2.3.2 Підготовка та виконання флуоресцентних реєстрацій

Протокол іонтофорезу налаштовували у програмному забезпеченні PatchMaster. Загальна тривалість типового протоколу становила 4 хвилини й він складався з 25 *s* запису фонові активності, 60 *s* прикладання NMDA та наступних 155 *s* відмивання. Для синхронізації протоколу іонтофорезу із реєстрацією флуоресцентних зображень було використано функцію зовнішнього тригера (опція "Trigger Series"), а частоту дискретизації електрофізіологічного запису було

(1-4) Налаштування вводу-виводу для каналу прикладання. (5-7) Часові сегменти протоколу прикладання, режим запису та попередній перегляд протоколу.

Для контролю флуоресцентної візуалізації живих клітин використовували програмне забезпечення Live Acquisition (FEI, Німеччина) та обирали тип експерименту "Multi Channels". Налаштовувався один канал реєстрації, а довжину хвилі збудження встановлювали на 505 *nm* для детекції EYFP у трансфікованих нейронах або 495 *nm* для нейронів, завантажених індикатором Fluo-4. Для огляду клітин та вибору поля зору ініціювали тестовий запуск із кількома десятками циклів експозиції, при цьому час експозиції зводили до мінімуму для зменшення фотодеструкції флуорофорів. Фокусувались на обраному нейроні та розташовували його в центрі поля зору. Після цього кінчик іонофоретичного електрода розміщували приблизно на 10 μm вище клітини. Для підвищення відтворюваності та спрощення аналізу кінчик електрода позиціювали точно в центрі поля зору. Протокол флуоресцентної реєстрації створювали в редакторі протоколів ("Protocol Editor"), додавши три основні елементи: цикл ("Loop", 1 $\times$), тригер ("Trigger") для синхронізації підсилювача та елемент "Multi Channel". Для опціональної двоканальної візуалізації трансфікованих клітин у вкладці "Multi Channel" обирали два канали з довжинами хвиль збудження 505 *nm* для EYFP та 575 *nm* для TagRFP. Альтернативно, для візуалізації концентрації Ca^{2+} в клітинах, завантажених індикатором Fluo-4, обирали один канал із довжиною хвилі збудження 495 *nm*. Кількість циклів ("Loop Count") було встановлено на 48 $\times$ із загальним часом циклу ("Total Cycle Time") 5 *s*, що забезпечувало загальну тривалість запису 4 хвилини з частотою кадрів 0.2 *Hz*. Запис протоколу ініціювали натисканням кнопки "Acquire" у програмному забезпеченні Live Acquisition 2.3.

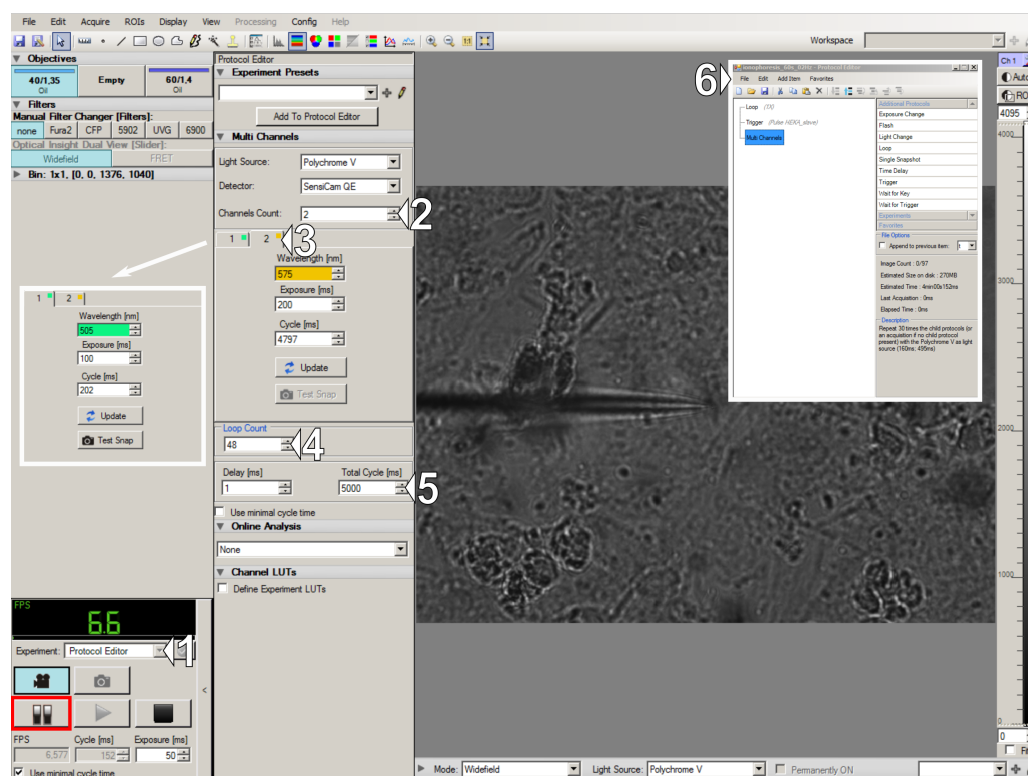


Рис. 2.3. Протокол флуоресцентної реєстрації у двох спектральних каналах в PZ Live Acquisition.

(1) Налаштування типу досліджу. (2-5) Налаштування довжин хвиль збудження та тривалості реєстрації. (6) Вікно налаштування протоколу реєстрації

2.3.3 Підготовка до виконання patch-clamp реєстрацій mEPSCs

В електрофізіологічних експериментах індукція NMDA-рецептор залежної LTD потребує зняття блокування Mg^{2+} з NMDA-рецепторів. Для цього іонофоретичне прикладання супроводжувалось деполяризацією нейрона до потенціалу -40 mV . Деполяризацію можна пропустити, якщо використовується HBS з Mg^{2+} у концентрації 0.3 mM . Також можна використовувати HBS без Mg^{2+} , однак відсутність Mg^{2+} у позаклітинному розчині негативно впливає на виживання клітин.

Комбінований протокол для одночасної електрофізіологічної реєстрації mEPSCs

та іонофоретичного прикладання вимагав налаштування протоколу для двох каналів підсилювача в програмному забезпеченні Patch Master. Для першого каналу іонтофорезу було використано струм утримання $+5 \text{ nA}$ впродовж 170 s , прикладання тривалістю 60 s зі східчастою зміною струму до -100 nA та подальше повернення до струму утримання $+5 \text{ nA}$ на 320 s . Для зменшення розміру файлу запису було використано зменшену частоту дискретизації 3.33 kHz (інтервал запису $300 \text{ } \mu\text{s}$). Встановлено вихідний канал (Stim-1) для іонофоретичного електрода, відповідний канал для моніторингу струму прикладання (Imon-1) і визначено три часові сегменти: базовий сегмент з ретенційним струмом (I-memb) на 170 s , сегмент покладання зі струмом -100 nA на 60 s і сегмент відмивання зі струмом утримання (I-memb) на 320 s . Для каналу було обрано режим current-clamp і значення підсилення встановлювалось на самому низькому можливому рівні (0.005 mV/pA), щоб забезпечити максимальний струм прикладання -100 nA . Відповідні налаштування каналу у вікні Pulse Generator наведено на рисунку 2.4.

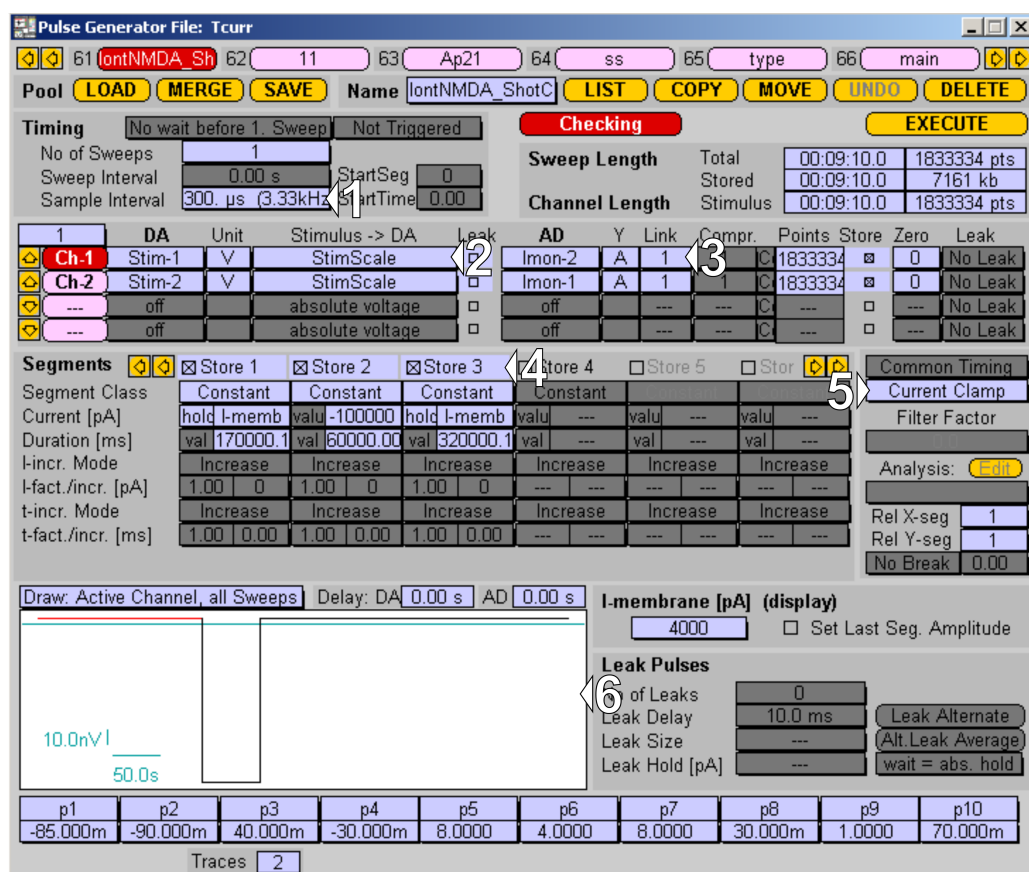


Рис. 2.4. Протокол каналу 1 для іонофоретичного прикладання в ПЗ PatchMaster.

(1-3) Налаштування вводу-виводу для каналу прикладання. (4-6) Часові сегменти протоколу прикладання, режим запису та попередній перегляд протоколу.

Для другого каналу, що відповідав за запис mEPSC, було налаштовано вихідний канал (Stim-2) та відповідний канал запису у режимі voltage-clamp (Imon-2). Окремо було встановлено режим запису voltage-clamp, і обрано опцію Separate Timing, щоб забезпечити можливість налаштування незалежних часових сегментів протоколу. Часові сегменти протоколу: утримання -60 mV впродовж 150 s , деполяризація до -40 mV на 100 s для зняття Mg^{2+} -блоку з NMDA-рецепторів і повернення до -60 mV на 300 s . Відповідні налаштування каналу у вікні Pulse Generator наведено на рисунку 2.5.

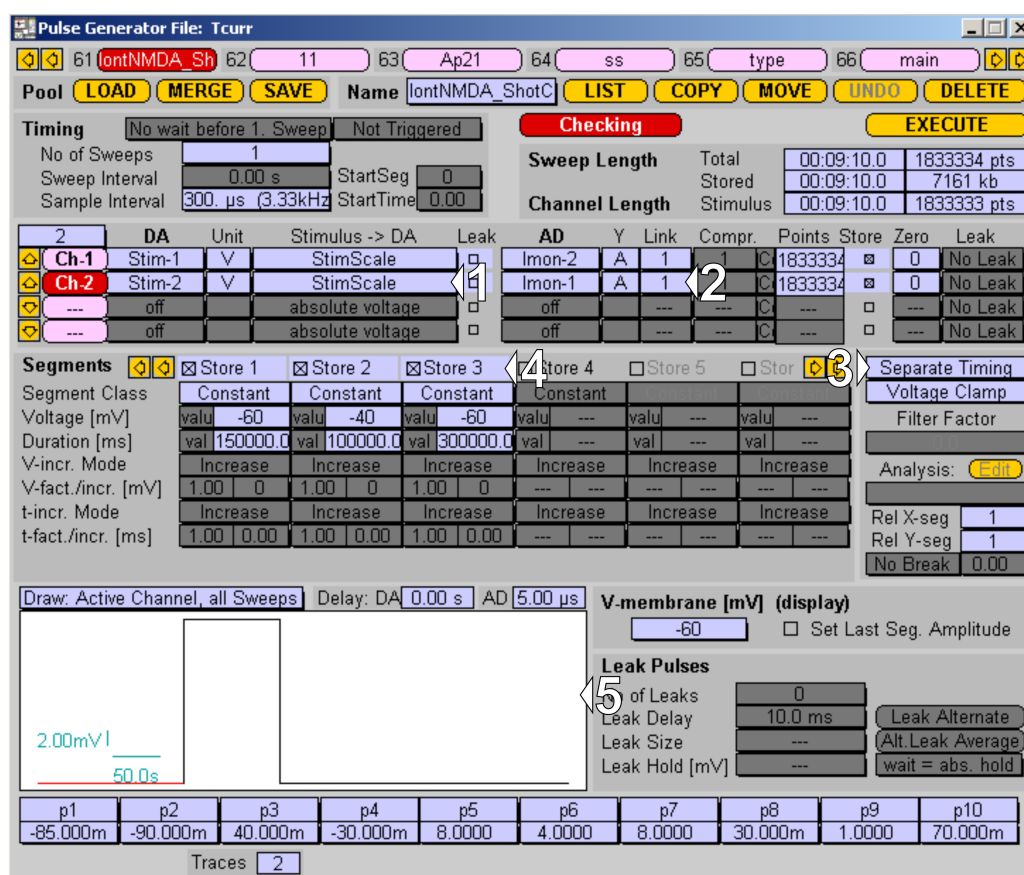


Рис. 2.5. Протокол каналу 2 для запису mEPSCs в ПЗ PatchMaster.

(1-2) Налаштування вводу-виводу для каналу запису. (4-5) Часові сегменти протоколу запису, режим запису та попередній перегляд протоколу.

Patch-піпетки виготовляли із капіляра OD 1.5 *mm* та ID 0.86 *mm* із філаментом для спрощення заповнення розчином (Sutter Instrument, США). Налаштування програми для пулера P-97 (Sutter Instrument, США) наведені в таблиці 2.4. Опір готових піпеток був у межах 3–4 *MΩ*. Для заповнення піпеток було використано внутрішньоклітинний KCl-метансульфонатний розчин, детальний склад наведено в таблиці 2.5, всі використані реагенти виготовлення MilliporeSigma (США). Готовий розчин аліквотувався по 0.5 *ml* і зберігався замороженим.

2.3.4 Виконання patch-clamp реєстрацій mEPSCs

Заповнену внутрішньоклітинним розчином піпетку фіксували в тримачі на голівці підсилювача що змонтована на мікроманіпуляторі (Sutter Instrument, США), і розташовують її над поверхнею рідини в камері після чого кінчик піпетки занурюють у камеру. У програмному забезпеченні PatchMaster виконують процедуру Setup у вікні підсилювача, щоб скинути налаштування каналів запису. Далі фокусуються на кінчику піпетки. Проводять візуальний огляд, щоб переконатися, що отвір піпетки не забитий, і перевіряють опір, який повинен бути в межах 3–4 *MΩ*. Для перешкоджання забивання піпетки в процесі підведення її до клітини подають позитивний тиск через трубку, що під'єднана до тримача піпетки, після чого закривають вентиль на трубці та вмикають Test Pulse у вікні підсилювача.

Коли піпетка наближалась до шару клітин, маніпулятор перемикався на низьку швидкість і кінчик піпетки позиціювався над центром соми обраного нейро-

HEAT	PULL	VEL	TIME	PRESSURE
Ramp	0	18-25	250	500

Таблиця 2.4. Програма для виготовлення patch-піпеток.

на. Спускаючись до поверхні нейрона, уважно контролювався опір. Коли опір збільшувався приблизно вдвічі ($5\text{--}7\text{ M}\Omega$), обережно прикладався негативний тиск через трубку тримача електрода і закривався клапан. На цьому етапі опір між піпеткою та референтним Ag-AgCl електродом різко зростає. Коли він сягав $200\text{--}300\text{ M}\Omega$, негативний тиск знімався. Чекали допоки опір досягав значень близько $1\text{ G}\Omega$, що свідчило про формування надійного контакту із поверхнею клітини. Якщо цього не відбувається, формуванню контакту додатково сприяли приклавши додатковий негативний тиск.

Компонент	Концентрація	Маса чи об'єм
KCl	10 mM	18.64 mg
Метансульфонієва кислота	135 mM	324.37 mg
Mg-ATP	4 mM	50.7 mg
Na-GTP	0.4 mM	5.23 mg
Фосфокреатин-2Na	5 mM	31.89 mg
EGTA	0.5 mM	4.75 mg
HEPES	10 mM	59.5 mg
ddH ₂ O	n/a	25 ml

Таблиця 2.5. Склад внутрішньоклітинного розчину для заповнення patch-піпеток.

Для компенсації паразитної ємності піпетки використовували функцію “С-Fast” compensation, і давали кілька хвилин на стабілізацію контакту між клітиною і піпеткою. Стежити за значенням струму витоку, який мав бути в діапа-

зоні 10–20 pA . Перед проривом мембрани клітини та створенням конфігурації whole-cell, потенціал утримання встановлювали на рівні $-60 mV$. Створенням негативного тиску через трубку проривали клітинну мембрану, що визначалось за виникненням транзєнтів ємності на тестовому імпульсі напруги. Після появи транзєнтів, негативний тиск негайно припинявся. Паразитну ємність мембрани клітини компенсували функцією “C-Slow compensation”. Електрод для іонтофорезу встановлювали приблизно на $10 \mu m$ над апікальним дендритом нейрона, з яким щойно було встановлено контакт, та ініціювали протокол. Для подальшого аналізу були використані виключно реєстрації, впродовж яких значення опору доступу змінювались не більше як на 20%.

2.4 Аналіз зображень

Для аналізу мікроскопічних зображень був розроблений спеціальний плагін domb-napari [123] для napari, відкритого переглядача багатовимірних зображень на базі Python [124], щоб забезпечити швидкий і зручний аналіз експериментальних даних.

Він розроблений таким чином, щоб бути доступним навіть для дослідників без навичок програмування. Нижче буде наведено короткий опис процесу аналізу даних. Вичерпна документація та можливість повідомити про проблеми доступні в репозиторії GitHub (github.com/wisstock/domb-napari); весь вихідний код опубліковано під ліцензією MIT Open Source License.

Оскільки цифрові зображення є багатовимірними масивами даних, в основному було використано функціонал бібліотеки numpy [125] з використанням функціоналу бібліотеки numba [126] для оптимізації та пришвидшення програмного забезпечення шляхом попередньої компіляції найбільш вживаних елементів коду. Для роботи із часовими рядами, перетвореннями та вирівнюваннями багатовимірних масивів використано бібліотеки scipy, scikit-image, pybaseline та DIPY [127, 128, 129, 130]. Робота з табличними даними проводилась з засто-

суванням бібліотеки `pandas` [131]. Для візуалізації даних використано бібліотеки `vispy` та `matplotlib` [132, 133]. Наразі плагін `domb-napari` підходить лише для малих і середніх за обсягом даних, але не для високопродуктивних реєстрацій з великим обсягом даних. Плагін був протестований на наборах даних епіфлуоресцентної мікроскопії, LSM-конфокальної мікроскопії та конфокальної мікроскопії з обертовим диском.

Процедура аналізу даних експериментів із комбінацією іонофоретичного прикладання NMDA та флуоресцентної реєстрації первинної культури нейронів із ко-експресією HPCA-EYFP та PSD95-TagRFP. Кожен окремий етап обробки забезпечується окремим віджетом в складі плагіна `domb-napari`:

- 1) **Попередня обробка даних:** Віджет попередньої обробки стека зображень із декількома спектральними каналами надає загальні функції розділення спектральних каналів на окремі серії зображень, медіанний фільтр та корекцію фотовицвітання флуорофорів з експоненційною або біекспоненційною оцінкою вицвітання (2.6A).
- 2) **Детекція перерозподілу флуоресценції:** Основним методом виявлення перерозподілу флуоресцентно мічених білків є серія диференціальних або «червоно-зелених» зображень. Диференціальне зображення розраховується як попиксельна різниця в інтенсивності між одним кадром зображення та попереднім, як описано в [66, 22]. Віджет надає налаштування для легкого регулювання таких параметрів, як відстань між кадрами зображення, для яких обчислюється диференціальне зображення, що допомагає налаштувати віджет відповідно до кінетики процесу що детектується. Назва підходу походить від спеціальної палітри псевдокольників, в якій червоний колір позначає пікселі зі інтенсивністю що зростає, а зелений — з інтенсивністю що зменшується (2.6Б). Важливим кроком у створенні відповідних червоно-зелених зображень є правильна оцінка взаємозв'язку між частотою реєстрації зображень та кінетикою досліджуваного процесу. Оптимальна кількість рознесених кадрів становить кілька кадрів між початком процесу та макси-

мальною реакцією для отримання максимально можливих амплітуд на диференційному зображенні.

- 3) **Побудова масок:** Етап маскуваннн дозволяє створювати мітки на основі інтенсивності для областей інтересу (ROI) на зображеннях обох типів: з прямою інтенсивністю флуоресценції та диференціальними зображеннями перерозподілу інтенсивності. Плагін містить спеціальний віджет маскуваннн для виявлення компактних яскравих областей, таких як мічений PSD95 в постсинаптичних щільностях чи регіонів скупчення AP2B1 (2.6C). Маскуваннн на основі інтенсивності за допомогою наступного віджета можна виконувати в межах цілого кадру, або з обмежувальною маскою (наприклад, маскою з точковим візерунком для постсинаптичних щільностей), щоб розрізнити різні типи ROI на основі цитоморфології (наприклад, уздовж усього дендритного дерева і тільки в дендритних шипиках, 2.6D).
- 4) **Швидкий аналіз даних та збереження результатів обробки зображень:** Швидка оцінка змін інтенсивності для будь-якого типу побудованих масок доступна за допомогою віджета, який створює усереднені профілі інтенсивності для кожної ROI у вибраній масці в абсолютних (*a.u.*) або відносних одиницях зміни інтенсивності ($\Delta F / F_0$). Результати аналізу можна зберегти у вигляді упорядкованої таблиці даних з інтенсивностями в окремих ROI для всіх кадрів вхідного зображення у форматі CSV. Альтернативним варіантом візуалізації результатів аналізу зображень є підсумковий графік середньої або медіанної інтенсивності всіх ROI для однієї маски та декількох спектральних каналів або одного зображення та декількох масок (2.6E та 2.6F).

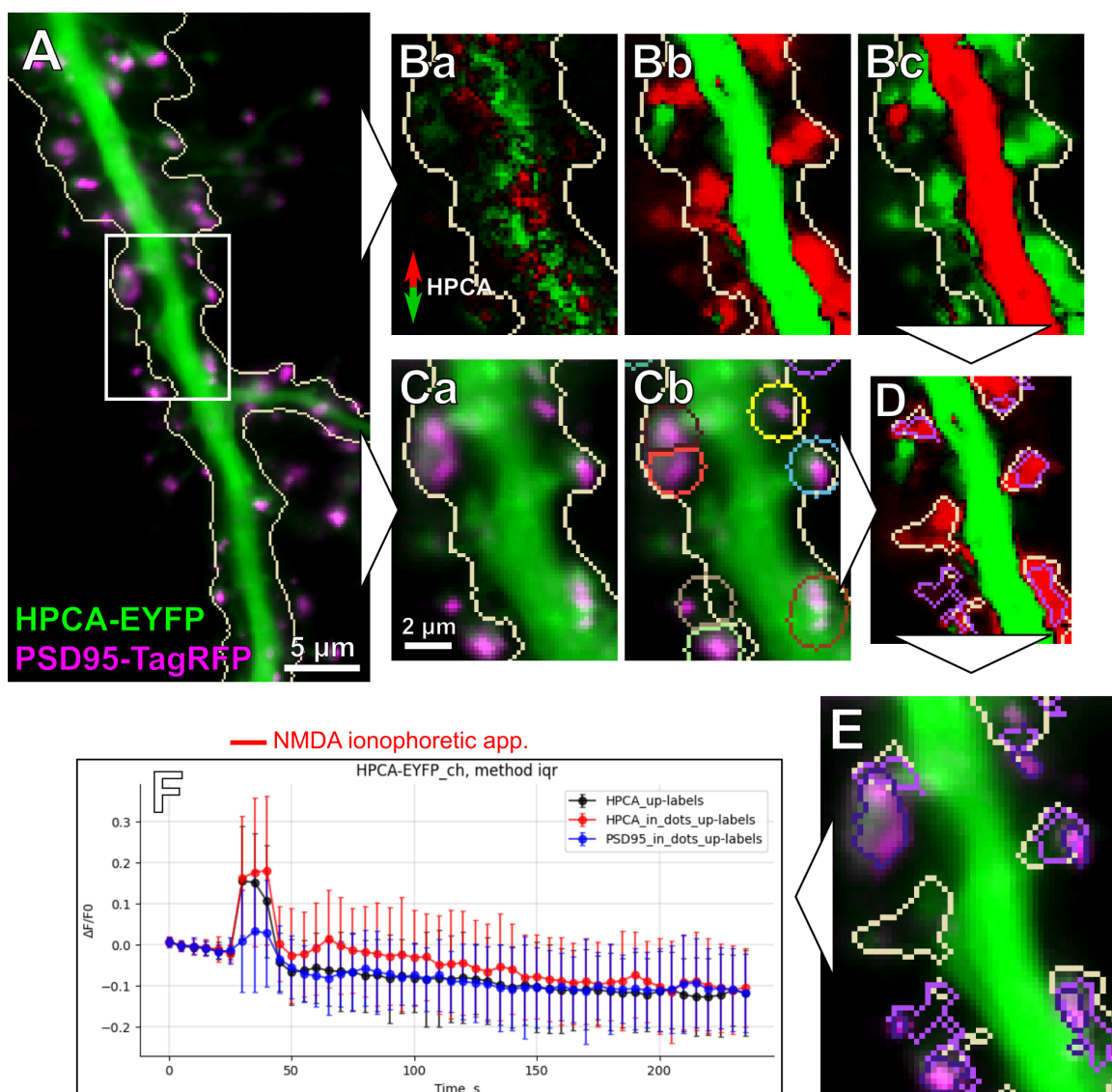


Рис. 2.6. Огляд процесу аналізу експериментальних даних.

(A) Накладення спектральних каналів HPCA-EYFP і PSD95-TagRFP. Білий прямокутник позначає область, збільшену в (B) і (C). (B) Диференційні зображення, що показують транслокацію HPCA-EYFP на трьох етапах іонофоретичного прикладання NMDA: початковий розподіл, перед прикладанням (Ba), максимальний перерозподіл HPCA-EYFP на початку прикладання, що демонструє транслокацію HPCA-EYFP до певних ділянок дендритного дерева (показано червоним) з цитозоллю дендрита (показано зеленим) (Bb), та зворотний перерозподіл HPCA-EYFP після закінчення прикладання (Bc). (C) Збільшене накладене зображення (Ca) та те саме зображення з круглими маска-

ми для окремих постсинаптичних щільностей (Cb). (D) Маски транслокації НРСА що були створені на основі зображення максимально-го перерозподілу (Bb), з масками, що вказують місця транслокації на дендритному дереві (бежевий колір), та масками, специфічними для місць транслокації НРСА, обмеженими масками місць PSD95, показаними в Cb (фіолетовий колір). (E) Зображення, що показує три різні типи масок: маски для місць транслокації НРСА вздовж стовбуру дендрита (бежеві), маски для місць транслокації НРСА поблизу дендритних шипиків (фіолетові) та маски для місць транслокації НРСА в зонах постсинаптичних щільностей (фіолетові). (F) Профілі транслокації НРСА, індукованої іонофоретичним прикладанням NMDA в різних масках (знімок екрана парегі).

2.5 Детекція подій mEPSCs

Записи mEPSCs були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення NeuroExpress відповідно до рекомендацій авторів. Події були виявлені за допомогою алгоритму відхилення від базової лінії (*Deviation from baseline*). Амплітуди та інтервали між подіями виявлених mEPSC були згодом використані для статистичного аналізу. Для перетворення формату .dat програмного забезпечення НЕКА у формат .abf програмного забезпечення Axon, яке придатне для подальшого аналізу за допомогою Neuro Express ми виконали наступні кроки: експортували обрані записи з файлу .dat у форматі ASCII, помножили всі значення на 10^{12} , щоб отримати значення в pA , і зберегли змінений файл з розширенням .atf, відкрили файл .atf у програмному забезпеченні Clampfit, налаштували відповідну частоту дискретизації та тип одиниці виміру (у нашому випадку pA) у вікні відновлення файлу та зберегли як .abf файл.

2.6 Статистичний аналіз

Статистичний аналіз та візуалізація даних проведено з використанням мови програмування R [134]. Для роботи з даними та виконання статистичних тестів використано колекцію бібліотек tidyverse [135] та бібліотеку rstatix [136]; для побудови моделей суміші гаусіан (gaussian mixture model/ GMM) було використано бібліотеки mixtools та Rbeast [137, 138]; для просунутої візуалізації даних було використано бібліотеки ggpubr та ggforce [139, 140].

Як описові статистики для досліджених величин в тексті наводяться значення медіан та міжквартильного розмаху (Inter Quartile Range/IQR) якщо не вказано іншого. Для порівняння кумулятивних розподілів характеристик мініатюрних спонтанних збудливих постсинаптичних струмів використано тест Колмогорова-Смірнова. Для порівняння двох груп використано непараметричний U-критерій Мана-Уїтні. Для порівняння декількох груп використано непараметричний критерій Краскала-Уоліса, в якості post-hoc тесту використано попарний тест Вілкоксона із поправкою Бенжаміні-Хохберга [141] для критичного значення p -value у випадку множинних порівнянь.

РОЗДІЛ 3

Результати та обговорення

3.1 Розробка методики тривалих іонофоретичних прикладань для фармакологічної індукції довготривалої синаптичної депресії

3.1.1 Просторово-часові характеристики іонофоретичних прикладань

Щоб схарактеризувати вивільнення речовини з кінчика іонофоретичного електрода впродовж прикладання було проведено серію калібрувальних дослідів із барвником Alexa Fluor 594 (розчин із концентрацією $100\ \mu M$). Обраний барвник, як і NMDA, має негативний заряд йонів за pH 7.3. Схема експерименту була такою ж, як і для застосування NMDA, іонофоретичний електрод було розміщено на відстані $10\ \mu m$ над поверхнею клітин, дані записували з частотою $1\ Hz$ (72 кадри), використовуючи довжину хвилі збудження $570\ nm$. Протокол реєстрації: (I) базова лінія $4\ s$ зі струмом утримання $+5\ nA$, (II) іонофоретичне прикладання тривалістю $17\ s$ зі значенням струму $-100\ nA$, і (III) відмивання із поверненням до струму утримання $+5\ nA$ тривалістю $51\ s$.

Було виявлено, що розподіл барвника Alexa Fluor 594 був майже симетричним вздовж вертикальній вісі кадру (правий профіль на рис. 3.1A), що свідчить про те, що потік проточної перфузії в експериментальній камері перешкоджав розповсюдженню речовини в напрямку проти течії. Водночас розподіл інтенсивності вздовж вісі електрода був виражено асиметричним (верхній профіль на рис. 3.1A). Однак цей ефект, вочевидь, є результатом паразитного сигналу від барвника всередині електрода поза фокальною площиною, а не дійсною асиметрією самого градієнта концентрації речовини в межах поля зору. Іонофоретичне прикладання є значно локалізованим, враховуючи швидке зменшення концентрації барвника з відстанню: максимальна амплітуда інтенсивності

флуоресценції була в 4 рази меншою вже на відстані 50-70 μm від кінчика електрода (рис. 3.1B-D). Показано, що максимальна амплітуда в зоні *Max* (1776 а.у., IQR 426) у близько у 2 рази вища, ніж в обох зонах *Mid* (*Mid up* - 952 а.у., IQR 190, *Mid down* - 808 а.у., IQR 209) і майже в 4 рази вища, ніж в обох зонах *Min* (*Min up* - 520 а.у., IQR 103, *Min down* - 377 а.у., IQR 80). Не було виявлено значущого впливу розташування зон відносно напрямку проточної перфузії камери ($n = 4$, парний критерій Вілкоксона із поправкою Бенжаміні-Хохберга, * - p -значення $< 0,05$). Ми дійшли висновку, що кінцевий розподіл сполуки навколо кінчика електрода демонструє симетричну картину концентрації, попри активний перфузійний потік.

Впродовж іонофоретичного прикладання інтенсивність флуоресценції барвника Alexa Fluor 594 зростала логарифмічно, за чим слідував експоненційний спад після завершення прикладання (рис. 3.1C). Кінетичні характеристики прикладання демонстрували досить велику швидкість (рис. 3.1E, F): стала часу наростання сигналу коливалася в межах 5-12 s , а стала часу спаду сигналу – в межах 4-7 s . Як і очікувалося, час наростання був найшвидшим у зоні навколо кінчика електрода і зменшувався з віддаленням (рис. 3.1E). Значення часу наростання були нижчими для зон, що розташовувались в напрямку проти потоку перфузії, в порівнянні із зонами, що розташовувались за потоком позаклітинного розчину. Це свідчить про те, що проточна перфузія дещо розсіювала іонофоретичний розчин вздовж напрямку потоку, але не перешкоджала дифузії в напрямку протилежному до току перфузії. Водночас стала часу спаду інтенсивності не сильно варіювалась в межах всього поля зору (рис. 3.1F), вказуючи на те, що відмивання іонофоретичного розчину залежало виключно від дифузії барвника і швидкості перфузії. Час наростання в зоні *Min up* (11.4 s , IQR 0.94) приблизно на 30% повільніший, ніж в зоні *Mid up* (8.27 s , IQR 0.84) і *Min down* (7.74 s , IQR 0.93), і майже на 70% повільніший, ніж в зоні *Mid down* (6.82 s , IQR 0.62) та зоні *Max* (6.55 s , IQR 0.32) ($n = 4$, парний критерій Вілкоксона із поправкою Бенжаміні-Хохберга). Стала часу спаду інтенсивності не

демонструє значних відмінностей між всіма зонами в полі зору ($n = 4$, Н-критерій Краскала-Уоліса $p\text{-value} = 0.541$), а медіанна стала часу спаду становить 5.1 s , IQR 1.49). Загалом, іонофоретичне прикладання продемонструвало швидку кінетику наростання та відмивання речовини, а також створювало локальний градієнт концентрації, який був переважно симетричним відносно кінчика електрода.

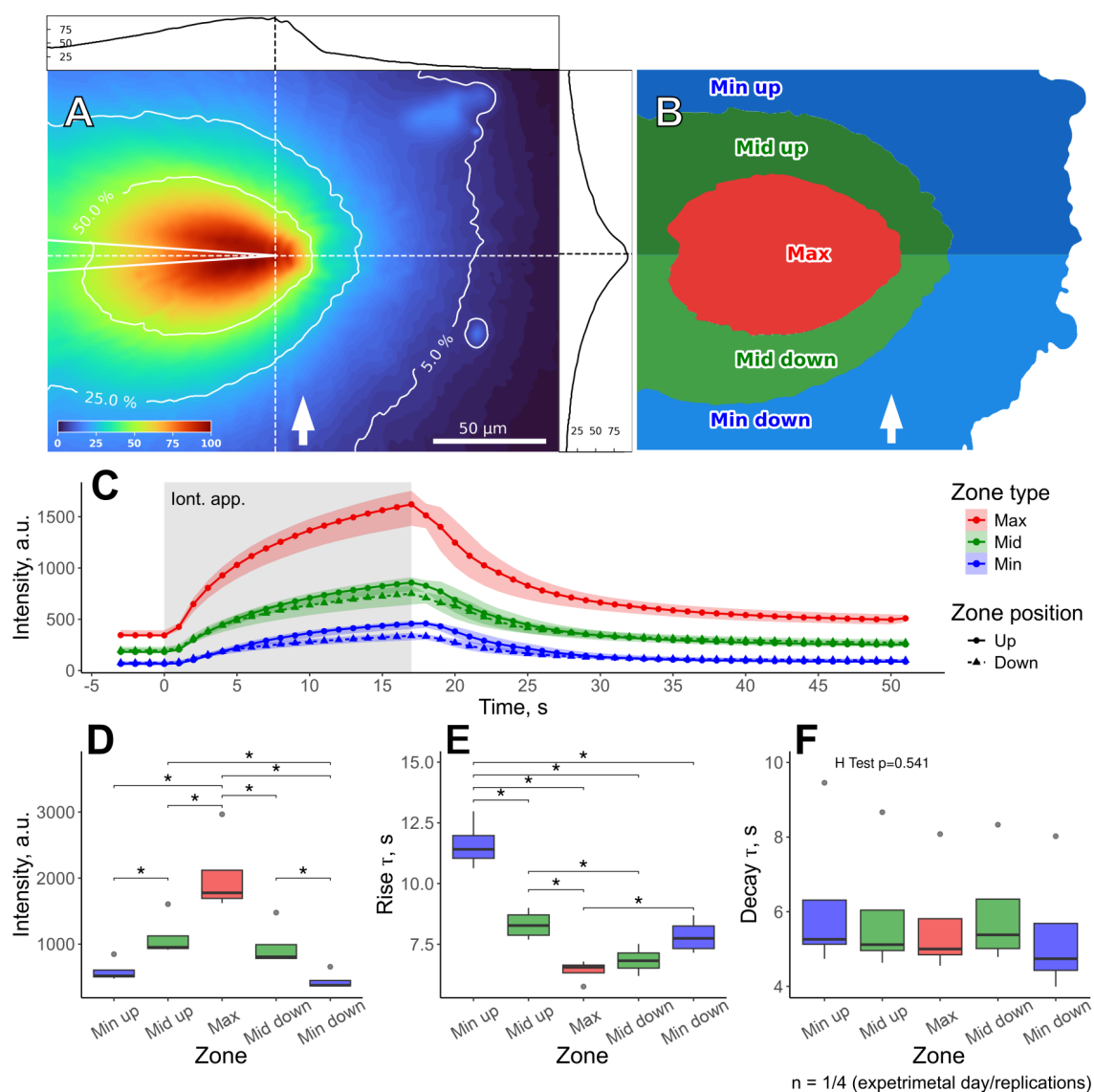


Рис. 3.1. Оцінка просторово-часових характеристик іонофоретичних прикладань за допомогою барвника Alexa Fluor 594.

(A) Розподіл Alexa Fluor 594 в полі зору наприкінці іонофоретичного прикладання. Кольори відповідають нормалізованій інтенсивно-

сті флуоресценції, контурні лінії відповідають рівням 50%, 25% і 5% від максимальної інтенсивності. Верхній і лівий профілі представляють значення інтенсивності вздовж пунктирних ліній, що перетинаються на кінчику електрода. Біла стрілка вказує напрямок потоку проточної перфузії експериментальної камери. **(В)** Маска, що відображає зони розподілу Alexa Fluor 594 в полі зору. **(С)** Профілі зміни інтенсивності флуоресценції для різних зон кадру до, впродовж (затемнена прямокутна область) та після іонофоретичного прикладання. **(D)** Максимальні інтенсивності флуоресценції в різних зонах наприкінці іонофоретичного прикладання. **(E-F)** Кінетика наростання та спаду інтенсивності для різних зон кадру (стала часу експоненти) для різних зон. * - $p < 0.05$, парний критерій Вілкоксона із поправкою Бенжаміні-Хохберга.

Також було досліджено вплив величини струму прикладання на амплітуду та кінетику вивільнення барвника Alexa Fluor 594 з електрода. В широкому діапазоні значень струмів прикладання (від -25 до -100 nA) не виявили суттєвих відмінностей як в максимальних амплітудах інтенсивності барвника в межах всіх зон в полі зору (рис. 3.2A), так і кінетики наростання інтенсивності сигналу в безпосередній близькості до кінчика електрода, де цей вплив мав би бути найбільшим (рис. 3.2B); були помітні лише незначні тенденції. Тому для подальших експериментів було вирішено обрати найбільше значення струму подачі, яке здатен підтримувати наявний підсилювач (у нашому випадку -100 nA). Що стосується струму утримання, то ми спостерігали витік флуоресцентного барвника при значеннях нижче +1-2 nA . Однак високі значення струму утримання (понад +10 nA) призводили до тривалого і непостійного латентного періоду між перемиканням на струм прикладання і початком вивільнення барвника Alexa Fluor 594 з іонофоретичного електрода (дані не показані). Тому в подальших експериментах значення струму утримання було встановлено на

рівні $+5 \text{ nA}$.

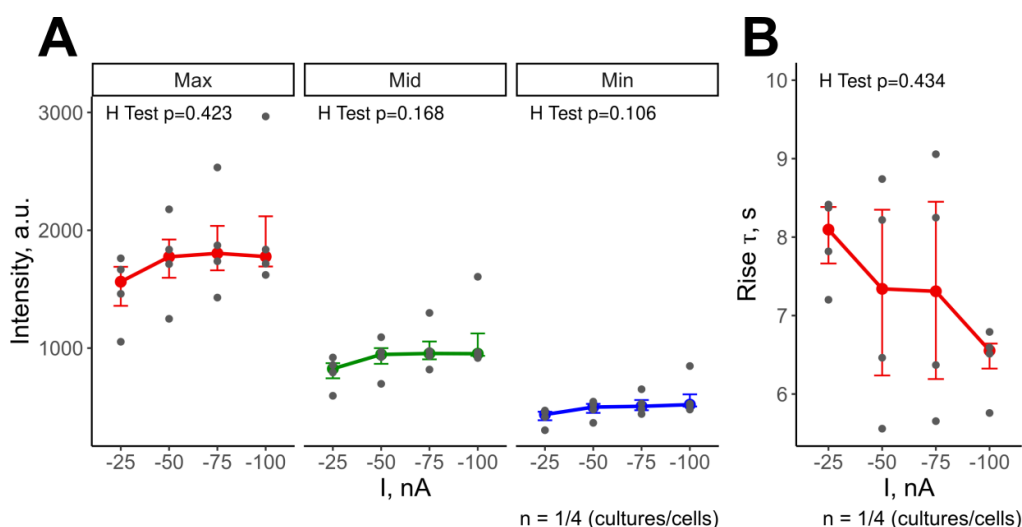


Рис. 3.2. Просторово-часові характеристики іонофоретичного прикладання за різних значень струму прикладання.

(A) Максимальна амплітуда інтенсивності флуоресценції барвника Alexa Fluor 594 для різних зон в межах поля зору наприкінці прикладання. (B) Стала часу наростання сигналу в зоні довкола кінчика електрода.

3.1.2 Зміни внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+}

у відповідь на тривале іонофоретичне прикладання NMDA

На наступному кроці валідації методики було схарактеризовано збільшення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у відповідь на іонофоретичне прикладання NMDA. Для цього первинну культуру нейронів гіпокампа щура було завантажено проникною АМ-похідною флуоресцентного індикатора Ca^{2+} Fluo-4. Збудження флуоресценції здійснювали довжиною хвилі 495 nm , частота реєстрації складала 1 Hz . Іонофоретичний електрод розташовували на відстані $30\text{--}50 \text{ }\mu\text{m}$ від соми обраного нейрона та на висоті $10 \text{ }\mu\text{m}$ над апікальним дендритом. Протокол реєстрації був наступним: (і) базова лінія 5 s , струм утримання встановлювали на рівні $+5 \text{ nA}$

для запобігання витоку NMDA з іонофоретичного електрода, (ii) іонофоретичне прикладання тривалістю 20 s зі струмом -100 nA, і (iii) вимивання NMDA протягом 35 s зі струмом утримання +5 nA. Враховуючи, що NMDA-рецептори насичуються вже за концентрації близько 1 mM NMDA [3], для цих експериментів було використано розчин для заповнення електродів із концентрацією 15 mM NMDA, щоб створити градієнт концентрації що призводить до насичення по всьому полю зору. Прикладання NMDA індукувало вхід Ca^{2+} вздовж всього дендритного дерева в межах поля зору (рис. 3.3A-B). Однак просторово-часові характеристики підвищення $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 3.3C-E) різко відрізнялись від характеристик вивільнення речовини з іонофоретичного електрода, що були наведені в попередньому підрозділі. Попри варіабельність показників, ані відносні зміни інтенсивності флуоресценції Fluo-4 (рис. 3.3D), ані сталі часу наростання інтенсивності (рис. 3.3E) не показали суттєвих відмінностей між зонами в безпосередній близькості до кінчика електрода і зонами на межі поля зору.

Не було виявлено значущих відмінностей у максимальних відносних змінах інтенсивності Fluo-4 ($\Delta F/F_0$) між зонами *Max* (0.99, IQR 0.512), *Mid* (0.89, IQR 0.460) та *Min* (0.527, IQR 0.391) ($n=2/4/34$ культури/клітини/ROI, Н-критерій Краскала-Уоліса, $p\text{-value}= 0.0548$). Через швидкий час наростання амплітуди для перших 10 секунд після початку аплікації використовували експоненціальну залежність. Як і у випадку з максимальною амплітудою, сталі часу наростання інтенсивності для всіх зон в межах поля зору не продемонстрували значущої різниці: 3.65 s (IQR 1.56) для зони *Max*, 3.56 s (IQR 1.57) для зони *Mid* та 5.99 s (IQR 12.1) для зони *Min* ($n = 2/4/35$ культур/клітин/ROI, Н-критерій Краскала-Уоліса $p\text{-value}= 0.056$).

Ці спостереження вказують на те, що гетерогенність морфології дендритного дерева, просторовий розподіл NMDARs, внутрішньоклітинних депо Ca^{2+} та/або розташування і щільність дендритних шипиків мають впливати на транзєнти $[Ca^{2+}]_i$ більше, ніж градієнт концентрації NMDA, створений іонофоре-

тичним прикладанням.

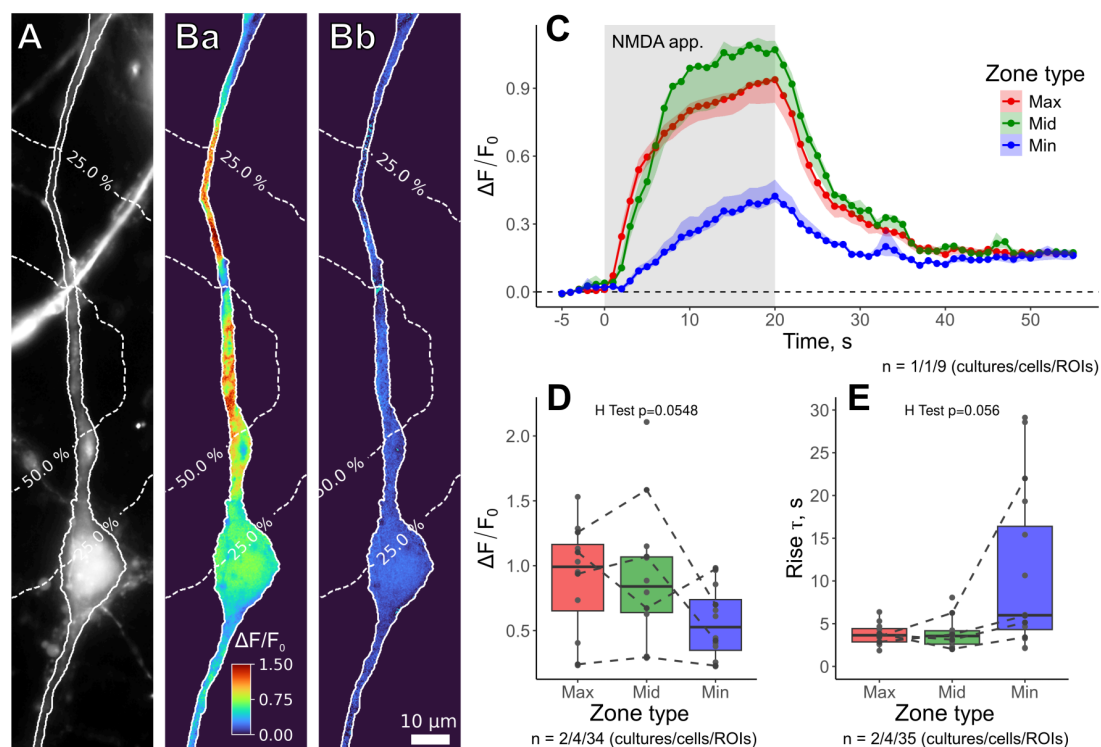


Рис. 3.3. Просторово-часові характеристики змін $[Ca^{2+}]_i$ у відповідь на іонофоретичне прикладання NMDA.

(A) Флуоресцентне зображення репрезентативного досліджуваного нейрона, завантаженого індикатором Ca^{2+} Fluo-4. Пунктирні лінії представляють контурні лінії інтенсивності з рис. 3.1A. (Ba) Відносні зміни інтенсивності флуоресценції індикатора Fluo-4 ($\Delta F/F_0$) наприкінці прикладання NMDA. (Bb) Відносні зміни значення інтенсивності флуоресценції індикатора в наприкінці реєстрації. (C) Профілі відносних змін флуоресценції індикатора впродовж прикладання NMDA (затемнений прямокутник) у різних зонах в межах поля зору. (D-E) Статистичне порівняння максимальних відносних інтенсивностей флуоресценції індикатора (D) і часу наростання інтенсивності сигналу (E, стала часу) між різними зонами в межах поля зору.

3.1.3 Довготривалі зміни характеристик mEPSCs у відповідь на тривалі іонофоретичні прикладання NMDA

Для підтвердження того, що тривале іонофоретичне прикладання NMDA дійсно здатне індукувати довготривалу NMDA-рецептор залежну синаптичну пластичність, було проведено електрофізіологічні реєстрації мініатюрних збуджувальних постсинаптичних струмів (miniature excitatory postsynaptic currents/ mEPSCs). Оскільки ці експерименти проводили з використанням 1 mM Mg^{2+} у позаклітинному розчині, іонофоретичне прикладання супроводжувалося деполяризацією нейрона до потенціалу утримання -40 mV , щоб зняти Mg^{2+} -блок NMDA-рецепторів. Для аналізу та порівняння характеристики mEPSCs оцінені характеристики усереднювали в часових вікнах тривалістю 75 секунд, як показано на рисунку 3.4А. Враховуючи, що у відповідь на прикладання 15 mM NMDA спостерігалися насичуючі транзйєнти $[\text{Ca}^{2+}]_i$, було висунуто припущення, що такої концентрації агоніста в розчині для заповнення іонофоретичного електрода може бути достатньо для індукції довготривалої NMDA-рецептор залежної депресії. Однак прикладання 15 mM розчину NMDA призводило до неконсистентних змін амплітуди mEPSCs.

Медіанні значення амплітуд в інтервалі $-t75$ становили 33.0 pA (IQR 20.0) та 27.2 pA (IQR 12.6) в інтервалі $t0$, зросли до 29.6 pA (IQR 15.5) в інтервалі $t150$, і потім знову зменшувались до 25.5 pA (IQR 9.7) в інтервалі $t300$ ($n = 5/6$ культур/клітин). Ймовірно, градієнт концентрації, створений прикладанням 15 mM розчину NMDA, був занадто локальним і не зміг модулювати значну кількість синапсів дендритного дерева досліджуваного нейрона, впливаючи лише на незначну популяцію синапсів. Таким чином, комбінована активність інтактних (основний пул) і модульованих (мінорний пул) синапсів сприяла виникненню спостережуваної неконсистентності амплітуд mEPSCs.

Прикладання NMDA у концентрації 100 mM в електродному розчині впро-

довж 60 секунд індукувало значуще зниження амплітуди mEPSCs (рис. 3.4B-D). Порівняння нормалізованих амплітуд mEPSCs між початком реєстрації ($t-75$) та інтервалами після прикладання NMDA показало стійке зниження амплітуди mEPSCs на 25% (рис. 3.4C). Порівняння розподілів абсолютних амплітуд (рис. 3.4D) між інтервалами на початку реєстрації та до прикладання NMDA $t-75$ (21.3 pA, IQR 18.8) і t_0 (20.3 pA, IQR 18.4) не виявило суттєвих відмінностей. Однак після прикладання NMDA спостерігалось зменшення абсолютних амплітуд на 25% у часових інтервалах $t150$ (16.5 pA, IQR 14.5) і $t300$ (13.2 pA, IQR 11.5) ($n = 5/5$, культур/клітин). Статистичний аналіз з використанням тесту Колмогорова-Смірнова для 500 випадково відібраних подій з кожного часового інтервалу дав $p\text{-value} = 0.129$ для порівняння інтервалів $t-75$ і t_0 , тоді як порівняння між інтервалами $t-75$ і $t150$, а також $t-75$ і $t300$ продемонстрували значущу різницю ($p\text{-value} = 0.001$).

Оскільки інтервали між подіями mEPSC не змінювалися (рис. 3.4E), зменшення амплітуд mEPSCs чітко вказувало на індукцію довготривалої NMDA-залежної синаптичної депресії й дозволило зробити висновок, що спостережувані зміни викликані не змінами в нейронах впродовж дослідження. Таким чином, іонофоретичне прикладання розчину із концентрацією 100 mM NMDA протягом 60 секунд є ефективним підходом для фармакологічної індукції LTD на рівні окремих нейронів. Водночас іонофоретичні прикладання розчинів з меншим вмістом NMDA можуть бути використані для індукції LTD у специфічних субпопуляціях синапсів.

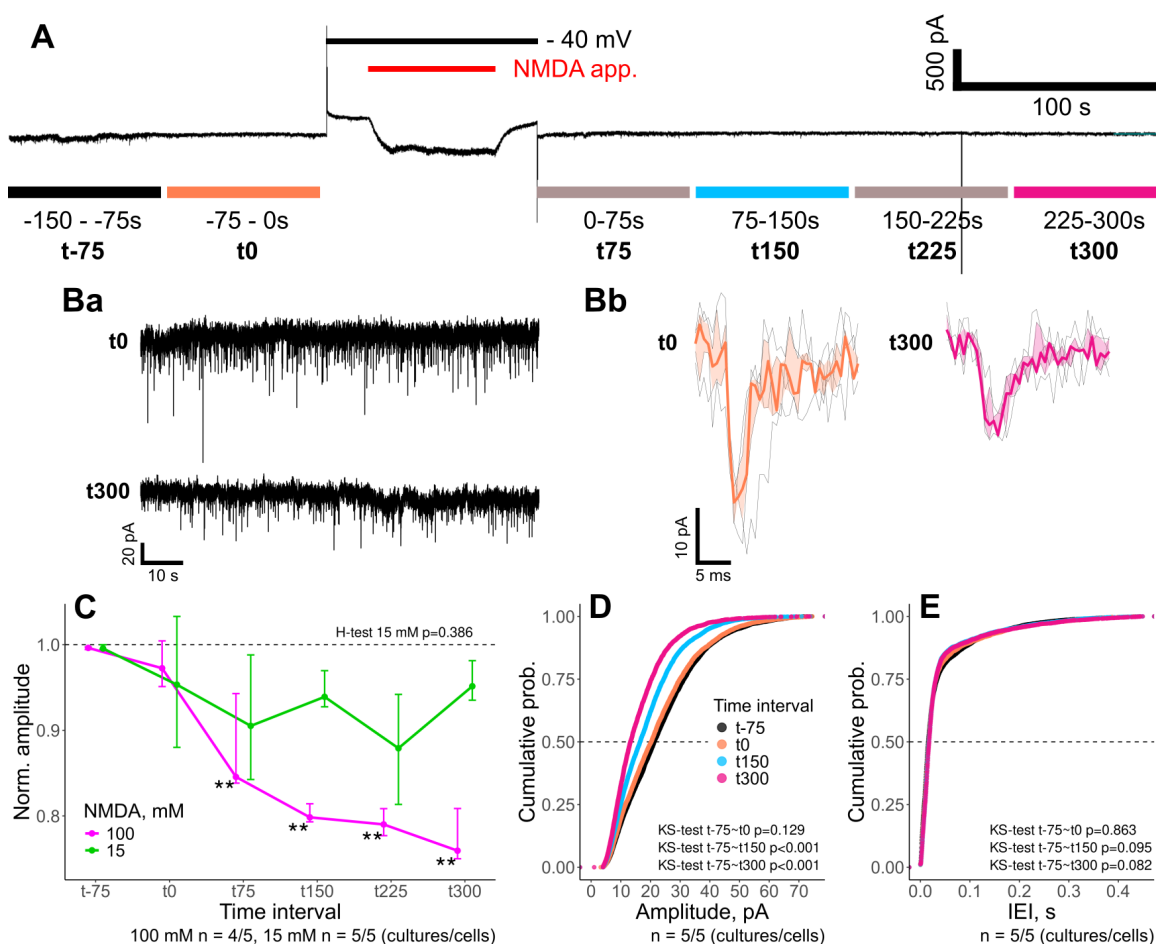


Рис. 3.4. Довготривала NMDAR-залежна депресія, індукована іонофоретичним прикладанням NMDA.

(A) Репрезентативний запис струму впродовж протоколу індукції LTD, patch-clamp в конфігурації whole-cell. Сходінка деполяризації до потенціалу -40 mV показана чорною рисою, іонофоретичне прикладання NMDA показано червоною рисою. Часові інтервали, використані для подальшого аналізу підписані знизу. (Ba) Репрезентативні записи mEPSCs для часових інтервалів до (t_0) та після (t_{300}) протоколу індукції LTD; (Bb) усереднені mEPSCs для вибраних часових інтервалів. (C) Нормалізовані амплітуди mEPSCs для окремих часових інтервалів в експериментах з прикладанням 15 mM (зелений) і 100 mM (пурпуровий) NMDA в іонофоретичному електроді. Було показано зменшення амплітуди mEPSCs на 25% після прикладання 100 mM NMDA. (D-E) Кумулятивні гістограми абсолютних значень

амплітуд mEPSC (**D**) та інтервалів між подіями (**E**) для вибраних часових інтервалів в експериментах зі прикладанням 100 *mM* NMDA в іонофоретичному електроді.

3.1.4 Транслокація гіпокальцина у відповідь на протокол індукції довготривалої NMDA-рецептор залежної синаптичної депресії

Враховуючи потенційну сигнальну функцію HPCA в регуляції LTD та ендоцитозу AMPARs в процесі індукції цієї форми довготривалої пластичності [142], були проведені спостереження транслокації HPCA з цитозолу в клітинні мембрани у відповідь на протокол фармакологічної індукції LTD (іонофоретичне прикладання розчину з концентрацією 100 *mM* NMDA впродовж 60 секунд). Для виявлення вбудовування HPCA в плазматичну мембрану використовували метод детекції FRET. Проведено спостереження за перенесенням енергії між HPCA (HPCA-ECFP, донор) і мембранозв'язаним EYFP (EYFP-Memb, акцептор), неспецифічною мембранною міткою [97]. Оскільки FRET вимагає, щоб відстань між молекулами донора та акцептора становила порядку 100 Å, збільшення FRET свідчило б про вбудовування HPCA-ECFP у клітинні мембрани та спонтанне зближення молекул кальцієвого сенсора із молекулами мембранної мітки [88]. В проведеній серії експериментів було використано трикубовий підхід для реєстрації флуоресценції акцептора, викликаній збудженням донора [79, 122], і була кількісно оцінена ефективність FRET (E_{app}). Виявлено, що протокол фармакологічної індукції LTD провокував суттєве збільшення E_{app} (рис. 3.5Aa-b), і ці зміни можна було легко ідентифікувати на диференціальних зображеннях (рис. 3.5Ab). Профілі зміни абсолютних значень E_{app} впродовж реєстрації (рис. 3.5B) показали, що початок іонофоретичного прикладання NMDA провокував швидке зростання E_{app} на 20-50%, за яким слідувала

фаза плато впродовж решти часу прикладання. Значення E_{app} повільно відновлювалися після припинення аплікації, що свідчить про зворотний перерозподіл НРСА назад у цитозоль. Відносні зміни ефективності FRET ($\Delta E_{app}/E_{app0}$) демонстрували подібні зміни рис. 3.5C-D). Ці результати підтверджують транзиторну транслокацію НРСА до клітинних мембран, що відбувається впродовж індукції LTD.

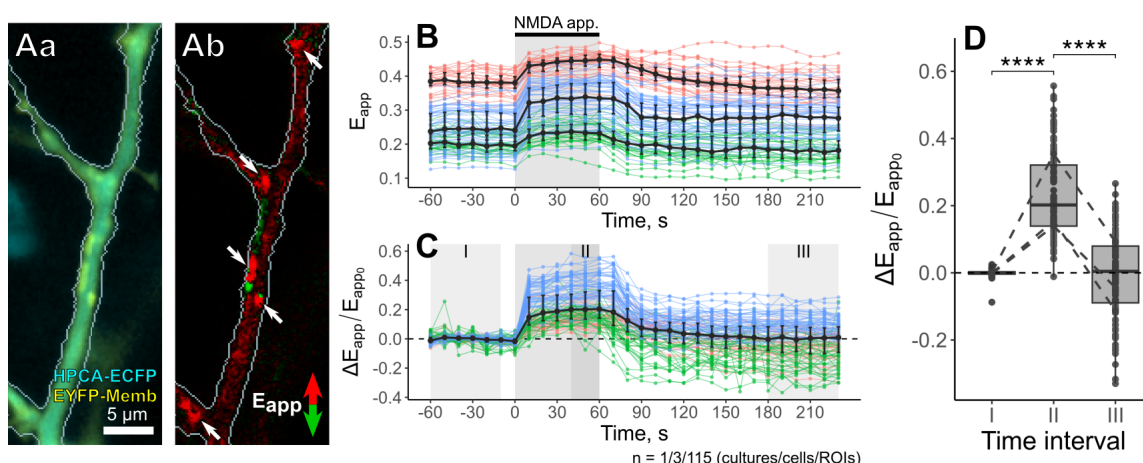


Рис. 3.5. Транслокація гіпокальцина, нейронного сенсорного Ca^{2+} , у відповідь на іонофоретичний протокол фармакологічної індукції LTD.

(**Aa**) Накладання спектральних каналів НРСА-ECFP та мембранної мітки EYFP-Memb, а також (**Ab**) диференційне зображення змін ефективності FRET (E_{app}) у відповідь на іонофоретичне прикладання розчину із концентрацією 100 *mM* NMDA. Білі стрілки вказують на ділянки транслокації НРСА, які характеризуються найвищими значеннями E_{app} . (**B-C**) Профілі зміни абсолютної (**B**) та відносної ($\Delta E_{app}/E_{app0}$, **C**) величини ефективності FRET впродовж прикладання NMDA тривалістю 60 секунд (затемнена область) для трьох репрезентативних нейронів. (**D**) Порівняння значень $\Delta E_{app}/E_{app0}$ до (I), під час (II) і після (III) іонофоретичного прикладання NMDA ($n = 1/3/115$, культур/клітин/ROI, парний тест Вілкоксона з поправ-

кою Бенжаміні-Хохберга, **** - $p < 0.0001$).

3.1.5 Транслокація гіпокальцина у відповідь на короткі іонофоретичні прикладання NMDA

Додатково було досліджено як іонофоретичні прикладання також можуть бути використані для дослідження LTD-незалежної транслокації та локальної сигналізації НРСА.

Для цього ми проводили повторювані короткі іонофоретичні прикладання NMDA (100 *mM* в електродному розчині) зі зменшеною тривалістю (5 *s*, 2.5 *s* і 0.5 *s*). За всіх досліджуваних тривалостей було виявлено стійку транслокацію НРСА вздовж дендритного дерева, що вказує на вбудовування НРСА в клітинні мембрани (рис. 3.6Aa). Після завершення дії NMDA НРСА залишали місця вбудовування і перерозподілялися назад у цитозоль (рис. 3.6Ab). Місця вбудовування НРСА насичувались і не демонстрували збільшення амплітуд транслокації вже за прикладання тривалістю 2.5 *s*; ні додаткових сайтів транслокації, ні збільшення амплітуд вбудовування НРСА не було виявлено за триваліших прикладань NMDA (5 *s*) (рис. 3.6B-C). Зворотний перерозподіл НРСА в цитозоль повністю відбувався протягом 10 *s* після закінчення іонофоретичного прикладання (рис. 3.6B), що свідчить про відносно короткий період вимивання (1-2 хвилини), необхідний для послідовних іонофоретичних прикладань. Ці факти підтверджують, що повторні іонофоретичні прикладання NMDA є придатним методом для вивчення Ca^{2+} -залежної транслокації нейронних сенсорних білків, таких як НРСА.

Таким чином, тривалі іонофоретичні прикладання є зручним інструментом для дослідження довготривалої синаптичної пластичності в первинних культурах нейронів. Іонофоретичні прикладання створюють високо локалізований градієнт концентрації речовини. Ця особливість зменшує використання фарма-

кологічних препаратів, необхідних для модуляції досліджуваної клітини (порівняно зі стандартним прикладанням речовини шляхом заміни всього об'єму розчину в експериментальній камері), і дозволяє індукувати синаптичну пластичність в окремих нейронах на одному і тому ж покривному склі. Останнє особливо зручно для роботи з трансфікованими клітинами, враховуючи, що ефективність трансфекції нейронів зазвичай досить низька. Крім того, короткі іонофоретичні прикладання NMDA можуть також бути використані для дослідження локальних Ca^{2+} -залежних процесів.

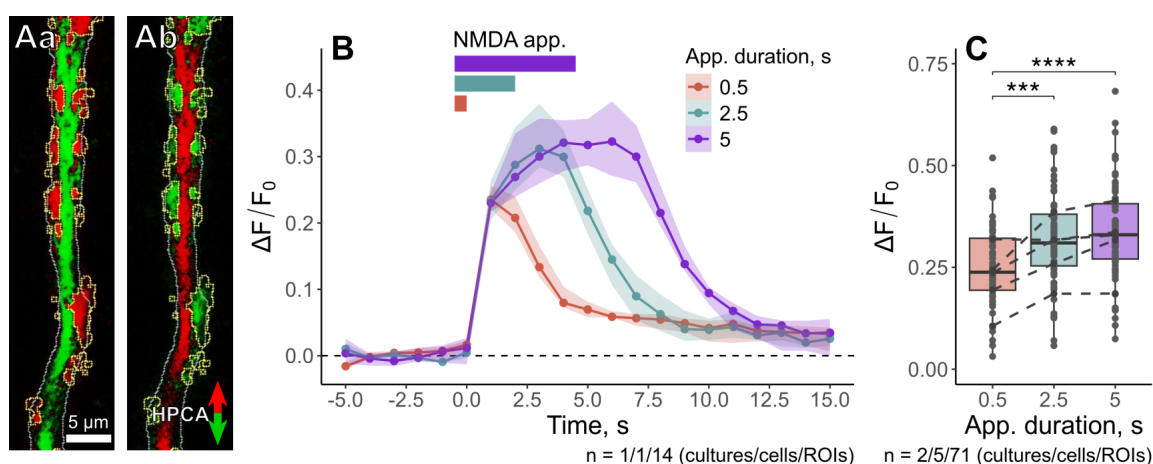


Рис. 3.6. Транслокація гіпокальцина у відповідь на короткі іонофоретичні прикладання NMDA.

(A) Репрезентативні диференційні зображення, що ілюструють NMDA-індуковану транслокацію НРСА. (Aa) Максимальний перерозподіл НРСА на початку прикладання; регіони найбільшого скопчення НРСА вздовж дендритного дерева, що використовувались для подальшого кількісного аналізу виділено жовтим кольором. (Ab) Зворотний перерозподіл НРСА після завершення прикладання NMDA. (B) Профілі зміни відносної інтенсивності флуоресценції ($\Delta F/F_0$) для поодинокого репрезентативного нейрона у відповідь на серію прикладань NMDA зі зменшуваною тривалістю. (C) Порівняння максимальних амплітуд транслокації НРСА за різної тривалості

прикладання NMDA ($n = 2/5/71$, культур/клітин/ROI, парний тест Вілкоксона з поправкою Бенжаміні-Хохберга, *** - $p < 0.001$, **** - $p < 0.0001$).

3.2 Транслокація гіпокальцина в різних структурах дендритного дерева у відповідь на активацію NMDA-рецепторів

3.2.1 Характер перерозподілу гіпокальцина між різними структурами дендритного дерева у відповідь на активацію NMDA-рецепторів

У ході окремої серії дослідів було проаналізовано особливості перерозподілу гіпокальцина в різних ділянках дендритного дерева нейронів гіпокампа щура у відповідь на іонофоретичне прикладання NMDA концентрацією 15 *mM*. Зменшена концентрація NMDA в розчині, що заповнював іонофоретичний електрод була обрана для забезпечення більшої локальності активації рецепторів. Для візуалізації кальцієвого сенсора було використано плазмідну для експресії HPCA із жовтою флуоресцентною міткою (HPCA-EYFP), а для точного визначення розташування постсинаптичних щільностей було використано плазмідну для експресії структурного білка постсинаптичної щільності PSD95 із червоною флуоресцентною міткою (PSD95-TagRFP). Це дало змогу одночасно спостерігати за поведінкою HPCA та локалізацією постсинаптичних зон для подальшого просторового аналізу регіонів вбудовування HPCA відносно синаптичних структур у відповідь на активацію NMDA-рецепторів (рис. 3.7A).

Було виявлено, що у відповідь на активацію NMDA-рецепторів HPCA активно перерозподіляється не тільки вздовж регіонів розташованих на дендритному стовбурі (рис. 3.7B), але й активно накопичується в межах дендритних шипиків. На прикладі репрезентативного поодинокого дендритного шипика, що

представлено на рисунку 3.7C, розглянемо загальні спостереження щодо поведінки HPCA у відповідь активацію NMDA-рецепторів, статистика стосовно яких буде наведена далі. В межах репрезентативного шипика було обрано ROI що відповідають різним цитоморфологічним структурам дендритного дерева: на дендритному дереві біля основи шипика, в шийці шипика, в зоні довкола постсинаптичної щільності та безпосередньо в постсинаптичній щільності (була визначена за сигналом PSD95-TagRFP). У відповідь на активацію рецепторів спостерігався швидкий перерозподіл HPCA із простору стовбуру дендритного дерева, проходження білка крізь шийку та активне накопичення в областях безпосередньо прилеглих до постсинаптичної щільності; додатково варто зауважити, що в самій постсинаптичній щільності накопичення HPCA менше, ніж на периферії (профілі відносної зміни інтенсивності флуоресценції для відповідних ROI наведено на рис. 3.7D). Це наштовхнуло на думку щодо першочергової транслокації HPCA саме до EZ, прилеглих до синаптичної щільності високоспеціалізованих регіонів що відповідають за активний трафік синаптичних рецепторів.

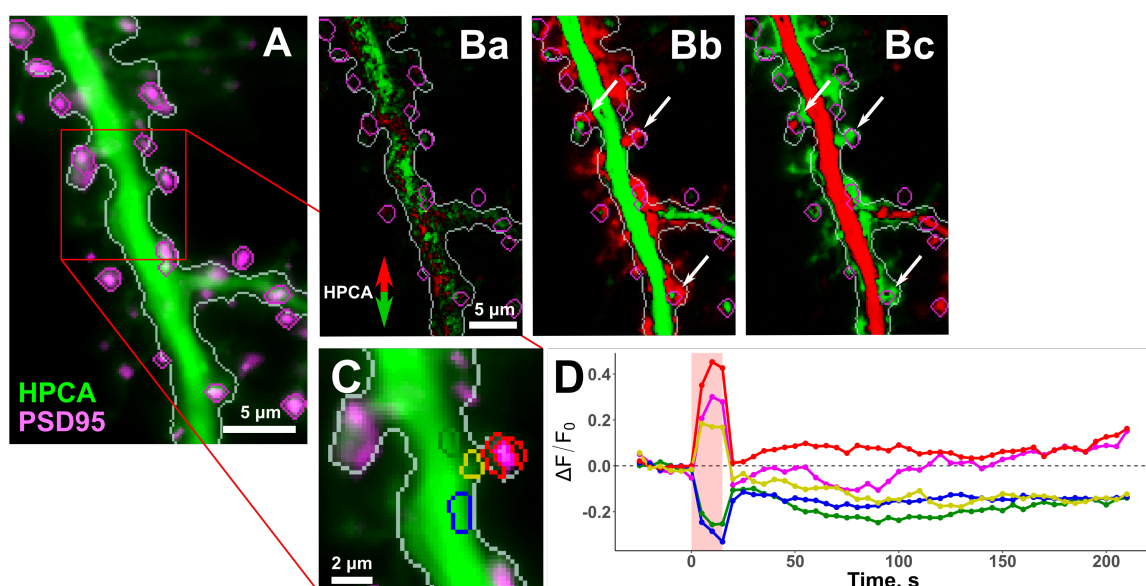


Рис. 3.7. Перерозподіл HPCA в межах поодинокого дендритного шипика у відповідь на активацію NMDA-рецепторів.

(A) Репрезентативне флуоресцентне зображення фрагмента дендритного дерева нейрона, що спільно експресує HPCA-EYFP та PSD95-TagRFP. (B) Диференційні зображення, що показують транслокацію HPCA-EYFP на трьох етапах іонофоретичного прикладання NMDA (білими стрілками позначено дендритні шипики): початковий розподіл, перед прикладанням (Ba), максимальний перерозподіл HPCA-EYFP на початку прикладання, що демонструє транслокацію HPCA-EYFP до певних ділянок дендритного дерева (показано червоним) з цитозоллю дендрита (показано зеленим) (Bb), та зворотний перерозподіл HPCA-EYFP після закінчення прикладання (Bc). (C) ROI в межах обраного поодинокого дендритного шипика: вздовж стовбура дендрита біля основи шипика (зелений і синій), шийка шипика (жовтий), ділянка навколо PSD (червоний) і безпосередньо локалізація PSD (пурпуровий). (D) Профіль змін відносної інтенсивності ($\Delta F/F_0$) HPCA-EYFP в межах обраних ROI, що відповідають різним цитоморфологічним структурам в межах дендритного шипика зображених у C. Червоний сегмент позначає іонофоретичне прикладання NMDA тривалістю 15 с.

Подальший аналіз більшої кількості дослідних клітин підтвердив попередні репрезентативні спостереження. Для загального аналізу було використано три типи ROI для регіонів транслокації HPCA. Вони розрізнялись за цитоморфологічними ознаками їх розташування в різних структурах дендритного дерева: регіони вздовж стовбуру дендритного дерева (shaft, блакитний колір контурів на рис. 3.8A-B), регіони безпосередньо в складі постсинаптичних щільностей (PSD, пурпуровий колір контурів на рис. 3.8A-B) та регіони в областях прилеглих до постсинаптичних щільностей в структурі дендритних шипиків (oreol/halo, оранжевий колір контурів на рис. 3.8A-B). Після напівавтоматичної детекції ROI відбувалась їх ручна фільтрація, спрямована на відкидання вира-

жених викидів, що могли бути спричинені зсувом клітин або небажаною орієнтацією (накладання постсинаптичних щільностей на стовбур дендрита, накладання гілок дендрита тощо).

Було виявлено, що у відповідь на активацію NMDA-рецепторів у всіх досліджених клітинах спостерігається стрімкий перерозподіл HPCA та збільшення його кількості в регіонах вздовж дендритного стовбура та довкола постсинаптичних щільностей, натомість одночасно білок покидав регіони постсинаптичних щільностей. А по завершенню прикладання NMDA розподіл HPCA повертався до початкових значень, як профілі відносних змін інтенсивності флуоресценції в різних типах регіонів на рисунку 3.8C (напівпрозорі області відповідають оцінці розкиду величини, IQR).

Аналіз відносних змін інтенсивної флуоресценції в момент пікової транслокації показав, що зниження інтенсивності в регіонах постсинаптичних щільностей значущо відмінне від нуля (-0.033 , IQR 0.097 , $n = 1/7/1345$ культур/клітин/ROI, $p\text{-value} < 0.0001$, одновибірковий тест Мана-Уїтні для медіани набору значень), на відміну від областей довкола постсинаптичних щільностей (0.061 , IQR 0.136 , $n = 1/7/642$ культур/клітин/ROI, $p\text{-value} < 0.0001$, одновибірковий тест Мана-Уїтні для медіани набору значень) та вздовж стовбуру дендрита (0.104 , IQR 0.12 , $n = 1/7/593$ культур/клітин/ROI, $p\text{-value} < 0.0001$, одновибірковий тест Мана-Уїтні для медіани набору значень), як показано на рисунку 3.8D. Тобто можна говорити про активне покидання HPCA областей локалізації синаптичних NMDA-рецепторів, хоча рецептори і є безпосереднім джерелом надходження Ca^{2+} в клітину. Виявлено, що максимальні амплітуди транслокації в області вздовж дендритного стовбура майже у два рази більші за амплітуди для регіонів довкола постсинаптичних щільностей (парний критерій Вілкоксона із поправкою Бенжаміні-Хохберга, рис. 3.8E). Це, скоріш за все, може бути наслідком активації як синаптичних, так і позасинаптичних NMDA-рецепторів через саму природу іонофоретичного прикладання. Натомість за фізіологічної активності синапсів варто очікувати набагато менший вклад позасинаптичних

рецепторів.

Додатковим свідченням щодо просторової розрізненості регіонів транслокації НРСА в межах дендритних шипиків було те, що перетин отриманих наборів ROI для постсинаптичних щільностей і та регіонів довкола них складав лише 8.75 %, IQR 6.91 та був статистично значущо менший за 100

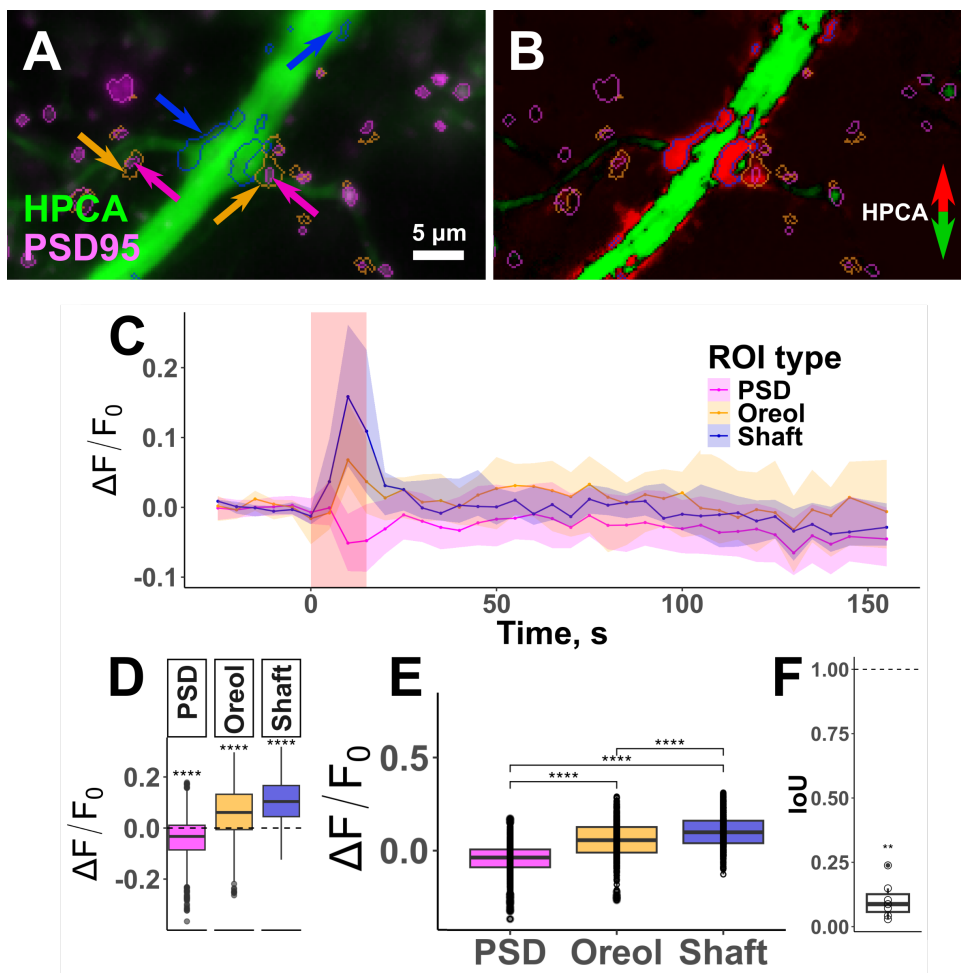


Рис. 3.8. Транслокація НРСА в різні домени дендритного дерева у відповідь на активацію NMDA-рецепторів.

Три групи регіонів інтересу для подальшого аналізу в різних цитоморфологічних структурах дендритного древа на кладені на флуоресцентне зображення (**A**) та диференційне зображення максимального перерозподілу інтенсивності флуоресценції НРСА-EYFP (**A**). Виділено наступні типи регіонів: вздовж стовбуру дендритного древа (shaft, блакитний колір контурів), безпосередньо в складі постсина-

птичних щільностей (PSD, пурпуровий колір контурів) та регіони в областях прилеглих до постсинаптичних щільностей (oreol, оранжевий колір контурів). (C) Профілі відносних змін інтенсивності флуоресценції ($\Delta F/F_0$) в усіх означених регіонах демонструють виражену реакцію на прикладання NMDA (час прикладання виділено червоним кольором). (D) Регіони PSD у відповідь на іонофоретичне прикладання NMDA демонструють значуще зменшення $\Delta F/F_0$ нижче нуля (покидання білком областей постсинаптичних щільностей), натомість регіони shaft та ore1 демонстрували значуще збільшення інтенсивності флуоресценції. (E) Порівняння пікових значень $\Delta F/F_0$ між різними типами регіонів виявило майже вдвічі більшу амплітуду транслокацій в регіони вздовж дендритного стовбура в порівнянні із регіонами довкола постсинаптичної щільності. (F) Порівняння площ перетину (intersection over union/ IoU) регіонів постсинаптичних щільностей та прилеглих до них регіонів виявили відсутність значущого просторового перетину (<10 %). Для статистичного аналізу використовували U-критерій Манна-Уїтні та критерій Вілкоксона з поправкою на множинність за методом Бенжаміні-Хохберга, * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$, **** - $p < 0.0001$.

Отримані результати свідчать, про цікаву тенденцію в просторовому розподілі регіонів транслокації НРСА у відповідь на активацію NMDA-рецепторів. Попри наявність значної кількості регіонів транслокації вздовж стовбуру, значних за площею та амплітудами транслокації, представлені численні регіони накопичення НРСА в межах дендритних шипиків. Кальцієвий сенсор віддавав перевагу регіонам довкола постсинаптичних щільностей, навіть покидаючи області безпосередньої близькості до каналів. Хоча там варто було б очікувати навіть більших значень $[Ca^{2+}]_i$. Це вказує на явну преференцію НРСА до регіонів в складі дендритних шипиків, що за розташуванням збігаються із відомими

зонами активного ендоцитозу (EZ), навіть за присутності значного входу Ca^{2+} через позасинаптичні рецептори. Це дозволяє припустити, що вибіркова і висококалізована транслокація HPCSA в такі регіони може відігравати роль в трафіку синаптичних рецепторів.

3.2.2 Взаємодія гіпокальцина та β -субодиниці комплексу адаптерних білків 2 в різних структурах дендритного дерева

Для дослідження потенційної взаємодії між HPCSA та β -субодиниці комплексу адаптерних білків 2 (AP2B1) шляхом спостереження за FRET було використано плазмідни для експресії HPCSA-ECFP (донор) та AP2B1-EYFP (акцептор). Репрезентативне зображення фрагмента дендритного дерева, що експресує обидва флуоресцентно мічені білки інтересу наведено на рисунку 3.9А. Варто зауважити, що спостережуваний у всіх досліджених клітинах точковий патерн розподілу сигналу AP2B1-EYFP збігається з очікуванням, згідно з літературними даними. Кожне окреме компакте скупчення AP2B1-EYFP відповідає ССР, що постійно присутні на поверхні плазматичної мембрани.

Експериментальне моделювання NMDA-рецептор залежної LTD проводилось шляхом іонофоретичного прикладання розчину NMDA з концентрацією 15 *mM* впродовж 60 *s*. Для зменшення впливу Mg^{2+} -блоку NMDA-рецепторів було використано позаклітинний розчин зі зменшеною концентрацією цих йонів (0.15 *mM*). Оцінка ефективності FRET (E_{app}) проводилась на основі аналізу трьох спектральних каналів, як описано у відповідному підрозділі *матеріалів та методів*.

У відповідь на активацію NMDA-рецепторів у всіх досліджених клітинах спостерігався стрімкий перерозподіл HPCSA та збільшення його кількості в регіонах вздовж дендритного стовбура та дендритних шипиків (рис. 3.9В). Одночасно підвищення E_{app} спостерігалось як в дендритних шипиках, так і в стовбу-

рі дендрита, регіоні де відбувалось зменшення сигналу НРСА. На рисунку 3.9С відповідні області підвищення E_{app} , що були визначені за цитоморфологічними ознаками, позначено стрілками: червоні стрілки позначають ідентифіковані дендритні шипики, зелені стрілки – регіони в дендритному стовбурі.

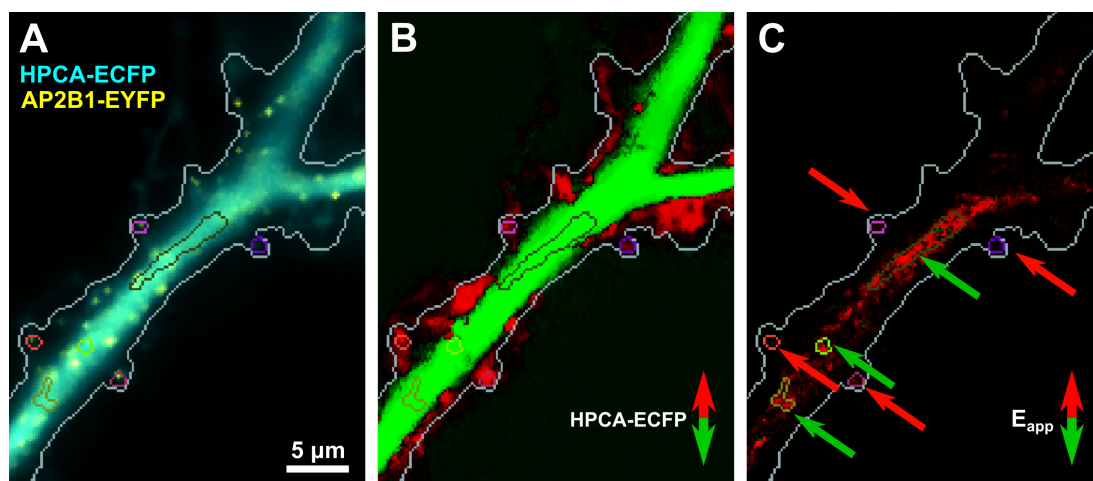


Рис. 3.9. Активація NMDA-рецепторів провокує транслокацію НРСА та збільшення значень FRET між НРСА й AP2B1 як в здовж стовбура дендрита, так і в дендритних шипиках.

(А) Репрезентативне флуоресцентне зображення фрагмента дендритного дерева нейрона, що спільно експресує НРСА-ECFP (ціановий) та AP2B1-EYFP (жовтий). Точковий патерн розподілу сигналу AP2B1-EYFP демонструє розподіл ССР, що постійно присутні на плазматичній мембрані. (В) Диференційне зображення перерозподілу інтенсивності флуоресценції НРСА-EYFP у відповідь на іонофоретичне прикладання NMDA. (С) Диференційне зображення змін інтенсивності ефективності FRET (E_{app}) у відповідь на іонофоретичне прикладання NMDA. Червоними стрілками вказано регіони збільшення E_{app} в межах дендритних шипиків; зеленими стрілками вказано регіони збільшення E_{app} в стовбурі дендрита.

Профілі відносної міні інтенсивності флуоресценції ($\Delta F/F_0$) та E_{app} в на-

борі ROI для репрезентативної клітини із рисунка 3.9 представлені на рисунку 3.10. Криві червоних відтінків відповідають обраним регіонам в дендритних шипиках, криві зелених відтінків – регіонам в межах стовбура дендрита (відповідно до позначок стрілками на рис. 3.9С).

Профілі $\Delta F/F_0$ в спектральному каналі HPCA-ECFP (рис. 3.10А) для регіонів в дендритних шипиках демонстрували виражену оборотню транслокацію HPCA до них у відповідь на активацію NMDA-рецепторів. Натомість регіони вздовж дендритного стовбура, як і варто було очікувати, відповідно до оцінки за диференційним зображенням (рис. 3.9В), демонстрували зменшення інтенсивності сигналу із подальшим відновленням за завершення іонофоретичного прикладання. Ці спостереження узгоджувались із попередніми результатами щодо характеру перерозподілу HPCA у відповідь на активацію NMDA-рецепторів.

Профілі $\Delta F/F_0$ в спектральному каналі AP2B1-EYFP (рис. 3.10В) не демонстрували відмінностей між різними типами регіонів та помітної реакції на іонофоретичне прикладання NMDA, виключно низхідний тренд, спричинений фотознебарвленням флуорофора. Це було вагомим свідченням щодо стабільності AP2B1-EYFP і відсутності технічних артефактів, викликаних іонофоретичними прикладаннями та дозволяло бути більш певними щодо отриманих оцінок FRET.

Одночасно з тим, профілі змін E_{app} у відповідному наборі ROI (рис. 3.10С) для репрезентативної клітини продемонстрували ряд цікавих особливостей. В регіонах дендритних шипиків був присутній значний рівень E_{app} навіть до початку іонофоретичного прикладання NMDA. Натомість у відповідь на активацію NMDA-рецепторів у всіх регіонах спостерігалось поступове збільшення E_{app} впродовж всього часу іонофоретичного прикладання NMDA і по завершенню прикладання не спостерігалось жодного тренду щодо повернення до початкових значень.

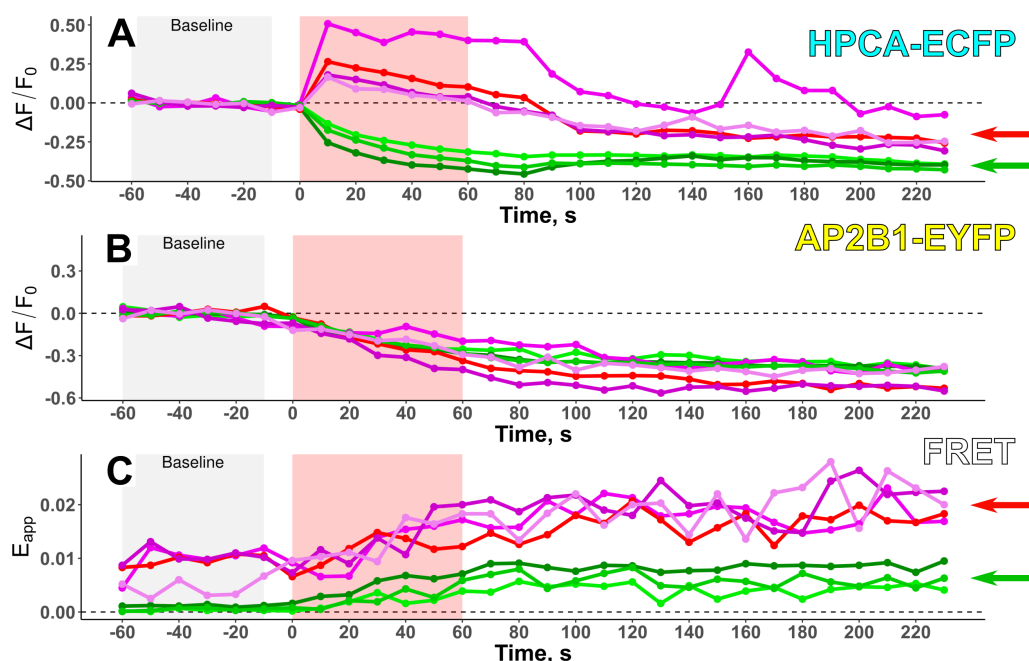


Рис. 3.10. (Профілі зміни ефективності FRET в різних структурах дендритного дерева у відповідь на активацію NMDA-рецепторів; обрані ROI в межах репрезентативної ділянки дендрита позначені на рис. 3.9), червоні відтінки відповідають регіонам в дендритних шипиках, зелені відтінки – в межах стовбура дендрита, червона область позначає час іонофоретичного прикладання NMDA.

А) Профілі відносної зміни інтенсивності флуоресценції ($\Delta F/F_0$) в спектральному каналі HPCA-ECFP, спостерігається виражена транслокація в дендритні шипики та зменшення кількості кальцієвого сенсора в стовбурі дендритного дерева. **(В)** Профілі $\Delta F/F_0$ в спектральному каналі AP2B1-EYFP не демонструють виражених змін у відповідь на іонофоретичне прикладання NMDA/ **(С)** Профілі змін ефективності FRET (E_{app}) демонструють суттєві рівні E_{app} в межах дендритних шипиків навіть до початку іонофоретичного прикладання NMDA, водночас всі регіони демонструють збільшення E_{app} у відповідь на активацію рецепторів.

Виявлена відмінність між початковими значеннями E_{app} в різних типів ре-

гіонів спонукала до аналізу цього спостереження на більшому обсягу дослідних клітин ($n = 3/9/81$ культур/клітин/ROI). Для того, щоб оцінити гетерогенність початкових значень E_{app} в різних ROI було використано модель суміші гаусіан (gaussian mixture model/ GMM). Для розподілу початкових значень E_{app} в ROI було послідовно змодельовано серію теоретичних розподілів, що склалися із різної кількості розподілів Гауса. За інформаційним критерієм Баєса (BIC) було визначено, що оптимальна кількість гаусіан в моделі для апроксимації емпіричного розподілу значень E_{app} є 2-3 (значення BIC наведені на врізці на рис. 3.11A). Таким чином був зроблено висновок, що групи ROI виділені за цитоморфологічними ознаками (в дендритних шипиках та стовбурі дендрита) дійсно відображають два окремих розподіли згідно зі значеннями E_{app} (рис. 3.11A). Оцінені за побудованими розподілами середні значення E_{app} для регіонів в межах дендритних шипиків та стовбура дендритного дерева склалися 0.028 ± 0.018 та 0.0031 ± 0.0029 відповідно, тобто відрізнялись більше як у 9 разів. Умовне порогове значення E_{app} між двома типами регіонів було оцінено як 0.014.

Для зручної візуальної репрезентації та візуального аналізу взаємозалежності $\Delta F/F_0$ в спектральному каналі HPCA-ECFP та значення E_{app} в окремих ROI було побудовано аналог двовимірного фазового портрета нашої системи (рис. 3.11B). Кожна траєкторія відображає зміни параметрів у окремих ROI від початку іонофоретичного прикладання NMDA (сині позначки) і до кінця (червоні позначки). Відповідні напівпрозорі кольорові області окреслюють ROI різних типів, в дендритних шипиках (spine, червоний колір) та в стовбурі дендрита (shaft, зелений колір). Особливу увагу у наведеному фазовому портреті привертає саме пул регіонів в складі стовбура дендрита, де траєкторії переважної більшості ROI демонструють одночасне падіння $\Delta F/F_0$ та зростання E_{app} (виражена зелена лопать в лівій нижній чверті графіка). Це може вказувати на наявність взаємодій між HPCA та AP2B1 і в межах стовбура дендрита.

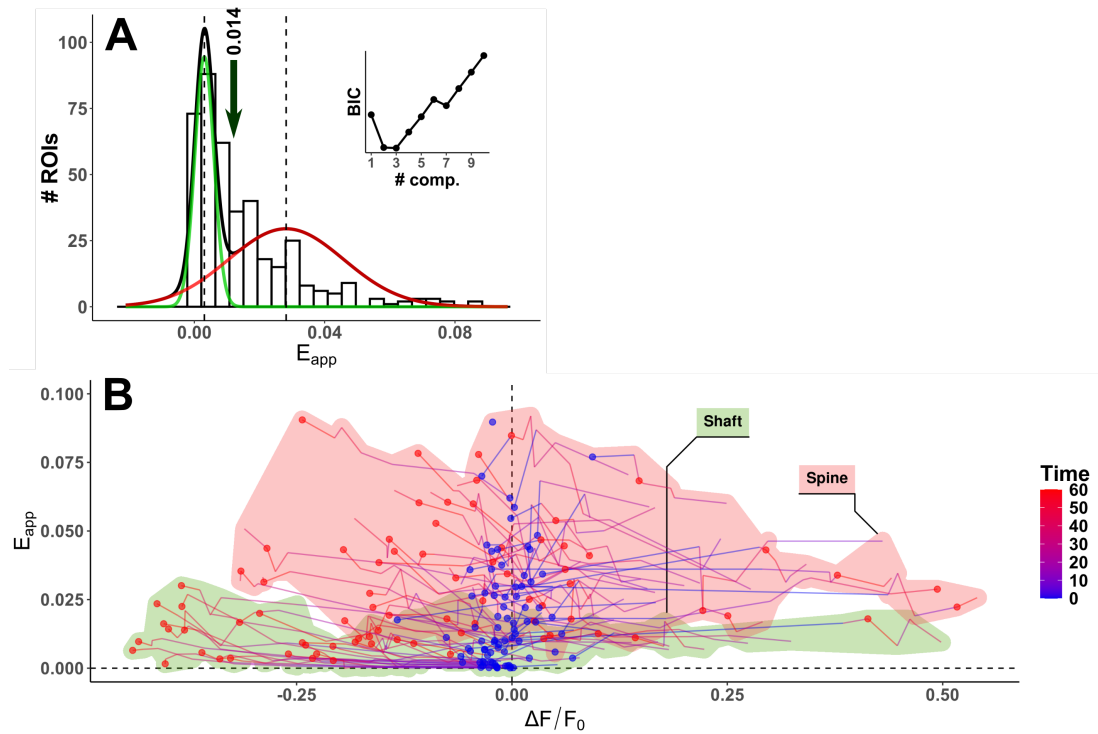


Рис. 3.11. Аналіз неоднорідності значень ефективності FRET в різних структурах дендритного дерева.

A) Гістограма розподілу значень ефективності FRET (E_{app}) в усіх досліджених ROI ($n = 3/9/81$ культур/клітин/ROI) до активації NMDA-рецепторів. Аналіз з використанням моделі суміші гаусіан (gaussian mixture model/ GMM) дозволив виявити дві основні компоненти, які збігались із цитоморфологічною приналежністю ROI, значення інформаційного критерію Баєса (BIC) для різної кількості компонент GMM наведено на врізаному графіку. Компонента меншої початкової інтенсивності (зелена крива) відповідала регіонам в межах стовбура дендритного дерева; компонента більшої початкової інтенсивності (червона крива) відповідала регіонам в дендритних шипиках. **B)** Взаємозалежність відносної зміни інтенсивності флуоресценції ($\Delta F/F_0$) в спектральному каналі HPCA-ECFP та значення E_{app} . Зеленою областю позначено регіони в стовбурі дендритного дерева (shaft), червоною областю – в дендритних шипиках (spine); ко-

лір траєкторій відповідає моменту часу від початку іонофоретичного прикладання NMDA: від синього для початку до червоного для кінця прикладання.

Для подальшого статистичного аналізу обраних наборів ROI для регіонів в дендритних шипиках (spine, $n = 3/9/44$ культур/клітин/ROI) та стовбурі дендритного дерева (shaft, $n = 3/9/37$ культур/клітин/ROI) проводилося усереднення значень за трьома часовими проміжками реєстрації: I - початок реєстрації до іонофоретичного прикладання NMDA; II - кінець прикладання NMDA із найбільшою очікуваною амплітудою змін E_{app} ; III - кінець реєстрації.

Порівняння абсолютних значень E_{app} із нулем було спрямовано на перевірку, чи присутній суттєвий рівень потенційної взаємодії між HPCSA та AP2B1 і до протоколу фармакологічної індукції LTD. Виявлено, що навіть попри надзвичайно низький початковий рівень E_{app} в регіонах стовбура дендрита (проміжок I, 0.0021, IQR 0.00575), його значення статистично значущо відмінні від нуля, як і в регіонах дендритних шипиків (проміжок I, 0.029, IQR 0.019) (p -value < 0.0001, одновибірковий тест Мана-Уїтні для медіан, box-plot на врізці на рис. 3.12A).

Як збільшення величини E_{app} , так і необоротність цих змін у всіх типах регіонів була підтверджена множинним порівнянням між різними часовими проміжками в межах одного типу регіонів (рис. 3.12B). В регіонах дендритних шипиків відбувалось майже півтора кратне збільшення E_{app} (проміжок II, 0.0374, IQR 0.02) без значущого повернення до початкових значень навіть наприкінці реєстрації (проміжок III, 0.0374, IQR 0.0302). Схожа картина спостерігалась і для регіонів, розташованих вздовж стовбура дендрита – збільшення у відповідь на іонофоретичне NMDA (проміжок II, 0.0111, IQR 0.0081) без значущого відновлення до початкових значень впродовж всього періоду спостережень (проміжок III, 0.0097, IQR 0.0082).

Варто зауважити, що в регіонах шипиків були значущо вищі значення E_{app}

до початку протоколу LTD, вони лишались значущо вищими за показники регіонів вздовж стовбура дендрита (рис. 3.12C).

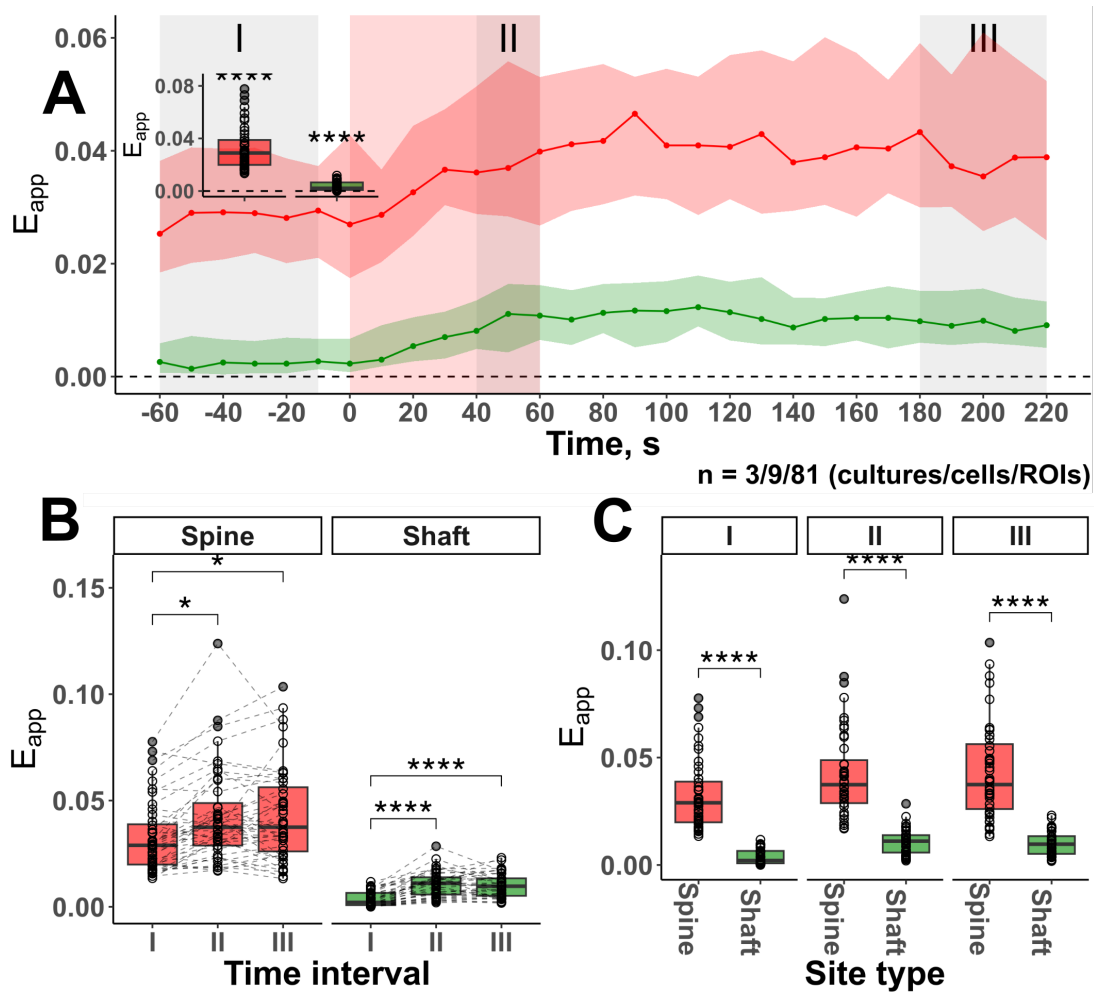


Рис. 3.12. Аналіз змін ефективності FRET (E_{app}) в різних структурах дендритного дерева.

(A) Усереднені профілі змін E_{app} в межах різних типів регіонів (червоний - дендритні шипики, зелений - стовбур дендритного дерева). Червона область позначає іонофоретичне прикладання NMDA тривалістю 60 s для фармакологічної індукції LTD. Напівпрозорі області позначають часові інтервали, що були використані для подальшого статистичного аналізу: I - до початку прикладання NMDA, II - наприкінці прикладання NMDA, III - наприкінці реєстрації. Врізка демонструє перевірку початкових значень E_{app} на відмінність від нуля. (B)

Порівняння змін E_{app} між різними часовими проміжками для різних типів регіонів. (С) Порівняння змін E_{app} між різними типами регіонів для часових проміжків. Для статистичного аналізу використовували U-критерій Манна-Уїтні та критерій Вілкоксона з поправкою на множинні порівняння за методом Бенжаміні-Хохберга, * - $p < 0.05$, **** - $p < 0.0001$.

У випадку порівнянь відносних змін E_{app} ($\Delta E_{app}/E_{app0}$) спостережувана картина, очікувано, зворотна. Зміни в межах шипиків мали відносно невеликі значення підвищення, на 26.3%, IQR 47.5 наприкінці іонофоретичного прикладання NMDA (проміжок II) та 17.9%, IQR 51.5 наприкінці реєстрації (проміжок III). Натомість $\Delta E_{app}/E_{app0}$ в регіонах вздовж дендритного дерева сягали 100%, однак давались в знаки надзвичайно малі абсолютні значення, що драматично впливало на розкид отриманих оцінок $\Delta E_{app}/E_{app0}$. Так наприкінці прикладання NMDA (проміжок II) збільшення сягало 95.5%, IQR 439% та 97%, IQR 348% наприкінці реєстрації (проміжок III). Результати статистичних порівнянь наведено на рисунку 3.13.

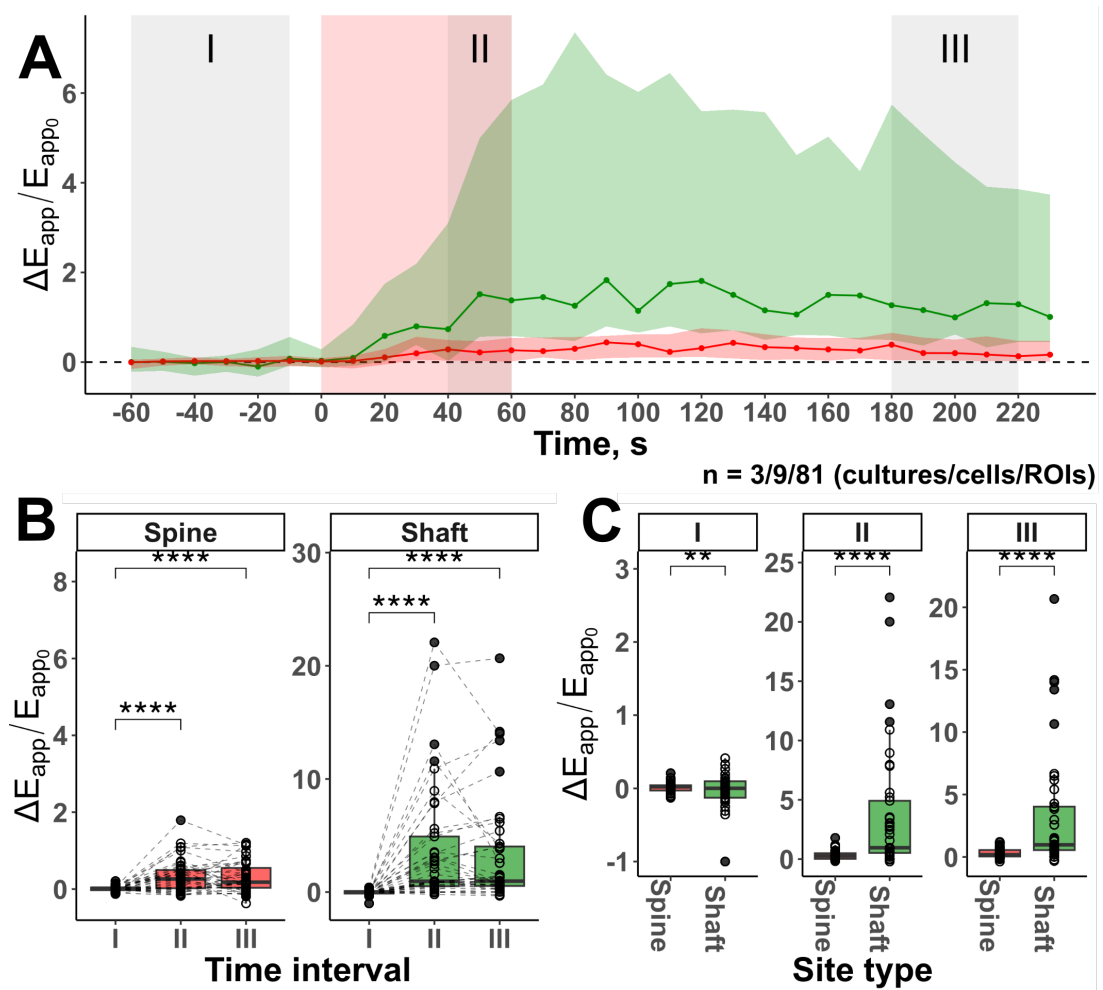


Рис. 3.13. Аналіз відносних змін ефективності FRET ($\Delta E_{app}/E_{app0}$) в різних структурах дендритного дерева.

(A) Усереднені профілі змін $\Delta E_{app}/E_{app0}$ в межах різних типів регіонів (червоний - дендритні шипики, зелений - стовбур дендритного дерева). Червона область позначає іонофоретичне прикладання NMDA тривалістю 60 s для фармакологічної індукції LTD. Напівпрозорі області позначають часові інтервали, що були використані для подальшого статистичного аналізу: I - до початку прикладання NMDA, II - наприкінці прикладання NMDA, III - наприкінці реєстрації. Врізка демонструє перевірку початкових значень E_{app} на відмінність від нуля. (B) Порівняння змін $\Delta E_{app}/E_{app0}$ між різними часовими проміжками для різних типів регіонів. (C) Порівняння змін $\Delta E_{app}/E_{app0}$ між різними типами регіонів для часових проміж-

ків. Для статистичного аналізу використовували U-критерій Манна-Уїтні та критерій Вілкоксона з поправкою на множинні порівняння за методом Бенжаміні-Хохберга, ** - $p < 0.01$, **** - $p < 0.0001$.

Виявлені значні рівні FRET удендритних шипиках в сукупності з попередніми даними щодо транслокації HPCSA у регіони довкола постсинаптичних щільностей дозволяють припустити що, взаємодія між HPCSA та AP2B1 відбувається якраз у межах зон ендоцитозу дендритних шипиків. А наявність FRET між дослідженими білками навіть за базальних умов дозволяє зробити висновок про роль HPCSA в процесах конститутивного трафіку синаптичних рецепторів в межах зон ендоцитозу.

Глобальне підвищення FRET між HPCSA та AP2B1 у всіх структурах дендритного дерева впродовж протоколу фармакологічної індукції LTD дозволяє зробити висновок щодо значущих змін в регуляції ендоцитозу, до яких залучається і HPCSA. Загальне і не зворотне збільшення FRET вказує на взаємодію між досліджуваними білками. Це може свідчити про стабілізацію AP2 на плазматичній мембрані за допомогою HPCSA і підвищення рівня ендоцитозу синаптичних рецепторів впродовж індукції LTD шляхом підсилення наявних зон ендоцитозу в шипиках разом з одночасним підвищенням темпів ендоцитозу також і в пересинаптичних ділянках.

Водночас не до кінця зрозуміла необоротність взаємодії між HPCSA та AP2B1 після завершення активації NMDA-рецепторів. Оскільки значення $[Ca^{2+}]_i$ мають швидко повертатись до базальних значень, HPCSA мав би лишати мембрану і переходити в Ca^{2+} -вільну форму. Це дозволяє припустити, що утримання FRET на високому рівні після припинення іонофоретичного прикладання NMDA може бути свідченням формування стабільних комплексів із HPCSA та білків-учасників СМЕ і це питання вимагає подальших глибоких досліджень.

3.3 Порівняння транслокації гіпокальцину та розподілу мінорних фосфоліпідів

3.3.1 Дослідження Ca^{2+} -залежного перерозподілу гіпокальцину між різними типами клітинних мембран

За базальних внутрішньоклітинних концентрацій кальцію НРСА поводить переважно як цитоплазматичний білок [143]. Водночас у всіх досліджуваних клітинах були виявлені темні внутрішньоклітинні ділянки (рис. 3.14Аа, внутрішньоклітинні ділянки з низькою інтенсивністю флуоресценції виділені штриховою лінією). Примітно, що ці внутрішньоклітинні ділянки, які спочатку демонстрували низьку інтенсивність флуоресценції НРСА, показали збільшення флуоресценції після індукованого фотолізом вивільнення Ca^{2+} (рис. 3.14Аб, та сама ділянка виділена панелі Аа). Це є переконливим доказом вбудовування НРСА у внутрішньоклітинні мембрани (intracellular membranes/ IMs), найімовірніше, органел, які виділяються в результаті дифузії НРСА-mBaolip з цитоплазми. Для більш точної візуалізації IMs було введено корекцію інтенсивності відносно зображень перед вивільненням індукованого фотолізом Ca^{2+} . Віднімання усередненої інтенсивності цитоплазми значно підвищило контрастність дифузійно ізолюваних внутрішньоклітинних компартментів. Інтенсивність цитоплазми оцінювали як усереднену інтенсивність сигналу в ділянках між зовнішнім контуром клітини та темними внутрішньоклітинними ділянками. На скоригованих зображеннях, IMs демонструють складну структуру з множинними ізолюваними компартментами, як показано на рисунку 3.14В (виділена область збігається з такою на панелі А).

Для кількісної оцінки динаміки транслокації НРСА у відповідь на індуковане фотолізом вивільнення Ca^{2+} було використано метод диференціальної візуалізації. Цей метод дозволив виявити зміни інтенсивності флуоресценції з ча-

сом, що дало змогу ідентифікувати ділянки, пов'язані з вбудовуванням НРСА. Перерозподіл флуоресценції було визначено порівнянням зміни інтенсивності пікселів на послідовних кадрах, на псевдокольорових зображеннях ділянки підвищеної флуоресценції відображалися червоним кольором, а ділянки зниженої флуоресценції - зеленим [22]. Області транслокації НРСА були задетектовані на диференційних зображеннях, було виявлено масивні ділянки по всій плазматичній мембрані (plasma membrane/ PM, позначені білими стрілками на рис. 3.14C), а також чіткі множинні ділянки в цитоплазмі (виділені на рис. 3.14C). Як і очікувалося, ділянки внутрішньоклітинного вбудовування НРСА на диференційних зображеннях чітко перекриваються з раніше виявленими внутрішньоклітинними компартментами (рис. 3.14C, виділена ділянка збігається з такими на панелях А і В). Згідно з цими спостереженнями, виділені області інтересу (ROI) для сайтів транслокації в межах регіонів PM та IMs були використані для подальшого аналізу.

Для всіх досліджених клітин ($n = 12$) у відповідь на індуковане фотолізом вивільнення Ca^{2+} , відносні зміни флуоресценції ($\Delta F / F_0$) у загальній кількості сайтів транслокації для червоних сайтів збільшення інтенсивності (червоний слід на рис. 3.14D) супроводжувалися зеленими ділянками зменшення інтенсивності в цитоплазмі (зелений слід на рис. 3.14D), а середні зміни інтенсивності флуоресценції по всій клітині (білий контур на рис. 3.14C і синій слід на рис. 3.14D) були незначними, що свідчить про те, що загальна кількість НРСА-mBaοJin була сталою.

На жаль, через значні відмінності в початковій інтенсивності флуоресценції (F_0) між сайтами транслокації в межах регіонів PM та IMs, пряма безпосередня нормалізація відносно F_0 не застосовувалась. Замість цього, для порівняння амплітуд транслокацій між PM та IMs, зміни інтенсивності були виражені як $\Delta F - F_0$. Ця величина виражає різницю між абсолютною зміною інтенсивності ΔF одразу після індукованого фотолізом вивільнення Ca^{2+} , що позначена пунктирною лінією на рисунку 3.14D ($t = 10$ с), і середньою початковою інтен-

сивністю F_0 до вивільнення Ca^{2+} ($t = 0-8$ с).

Регресійний аналіз оцінив зв'язок між максимальною транслокацією НРСА до регіонів РМ та ІМс і продемонстрував виражену лінійну залежність (рис. 3.14Е, $R^2 = 0.945$), а кутовий коефіцієнт регресії значуще не відрізнявся від 1 (одновибірковий t -тест, $p = 0.381$), вказуючи на те, що амплітуди транслокації НРСА були однаковими без переваг для обох типів регіонів. Рівномірний розподіл на графіку Бланда-Альтмана (рис. 3.14F, 95% довірчий інтервал $-42.8 \dots 54.3$ а.о.) і середні відмінності між максимальними амплітудами транслокацій лише 5.8 а.о. ± 24.8 також підтверджують певність наших вимірювань.

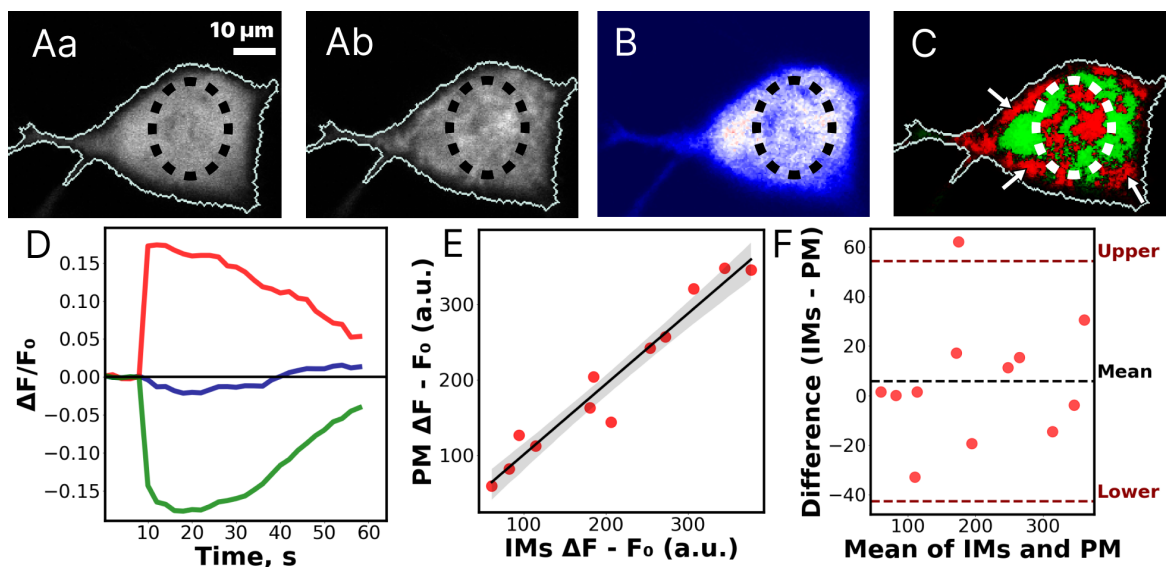


Рис. 3.14. Порівняння транслокації гіпокальцину до різних типів клітинних мембран.

(А) Флуоресцентне зображення репрезентативної клітини, що демонструє розподіл НРСА до (Аа) та перерозподіл після вивільнення Ca^{2+} , спричиненого фотолізом (Аб). (Б) Компенсація на усереднену інтенсивність цитоплазми до вивільнення Ca^{2+} , спричиненого фотолізом. (С) Диференційне зображення, що відображає транслокацію НРСА. Пунктирною лінією виділено зони внутрішньоклітинної

транслокації; стрілками позначено ділянки транслокації вздовж плазматичної мембрани. **(D)** Профілі інтенсивності з ділянок зменшення інтенсивності флуоресценції НРСА (зелений), збільшення (червоний) та по всій площі клітині (синій). **(E)** Регресійний аналіз взаємозв'язку між максимальною транслокацією НРСА до ділянок на плазматичній мембрані (PM) та внутрішньоклітинними мембранами (IMs). **(F)** Аналіз Бланда-Альтмана для оцінки відповідності між максимальною транслокацією НРСА до регіонів PM та IMs.

3.3.2 Дослідження вмісту PIP_2 в різних типах клітинних мембран

Для того, щоб охарактеризувати розподіл міnorного фосфоліпиду PIP_2 між різними типами клітинних мембран було проведено наступну серію експериментів з використанням комбінації неспецифічної мембранної мітки EYFP-Мем [97] та PIP_2 -специфічної мітки PHD-ECFP [99, 100]. Дослідивши взаємний розподіл міток і співвідношення між інтенсивністю їх флуоресцентних сигналів, ми змогли безпосередньо напівкількісно оцінити як вміст, так і розподіл PIP_2 в межах регіонів PM та IMs.

EYFP-Мем локалізувався переважно в мембранах (рис. 3.15A), тоді як для PHD-ECFP спостерігали значну цитоплазматичну фракцію (рис. 3.15B). PH домен має значну спорідненість не тільки до PIP_2 , але ще вищу до інозитолтрифосфату (IP_3), і висока цитоплазматична концентрація IP_3 може бути особливістю клітин HEK293, що зумовлює спостережуваний розподіл мітки.

Накладання каналів EYFP-Мем і PHD-ECFP виявляє численні ділянки спільної локалізації по всій ПМ (стрілки на рис. 3.15C) і в цитоплазмі (обведено пунктирною лінією на 3.15C), що дозволило виділити регіони PM та IMs для подальшого аналізу. Для оцінки щільності розподілу PIP_2 у мембранах роз-

раховували попільсьельно співвідношення інтенсивностей флуоресценції PHD-ECFP та EYFP-Мем (I_{CFP}/I_{YFP}). Неоднорідність густини PIP_2 в ділянках РМ спостерігається у вигляді суттєвої варіативності значень I_{CFP}/I_{YFP} , як показано на рисунку 3.15D, де стрілками вказано декілька ділянок з підвищеною концентрацією PIP_2 . Виражена асиметрія і мультимодальність розподілу I_{CFP}/I_{YFP} в регіонах РМ (помаранчевий колір на рис. 3.15E) спонукала нас виконати аналіз за допомогою моделі суміші гаусіан (gaussian mixture model/ GMM). Для репрезентативної клітини було виявлено чотири компоненти GMM згідно з байєсівським інформаційним критерієм (BIC), як показано на рисунку 3.15F, що вказує на дуже неоднорідний розподіл PIP_2 в складі плазматичної мембрани клітини. З іншого боку, медіанні значення I_{CFP}/I_{YFP} значно вищі в ділянках ІМс порівняно з ділянками РМ (рис. 3.15G, KS -тест = 0.6410, $p < 0.001$). Подібні співвідношення медіанних значень спостерігалися у всіх досліджених клітинах, без чіткого зв'язку між щільністю PIP_2 в регіонах РМ та ІМс ($n = 7$, рис. 3.15H, $R^2 = 0.832$), а нахил регресії суттєво відрізнявся від 1 (одно вибіркового t -тест, $t = -3.842$, $p = 0.0121$), що свідчить про нерівномірний розподіл PIP_2 між плазматичною мембраною та мембранами внутрішньоклітинних компартментів.

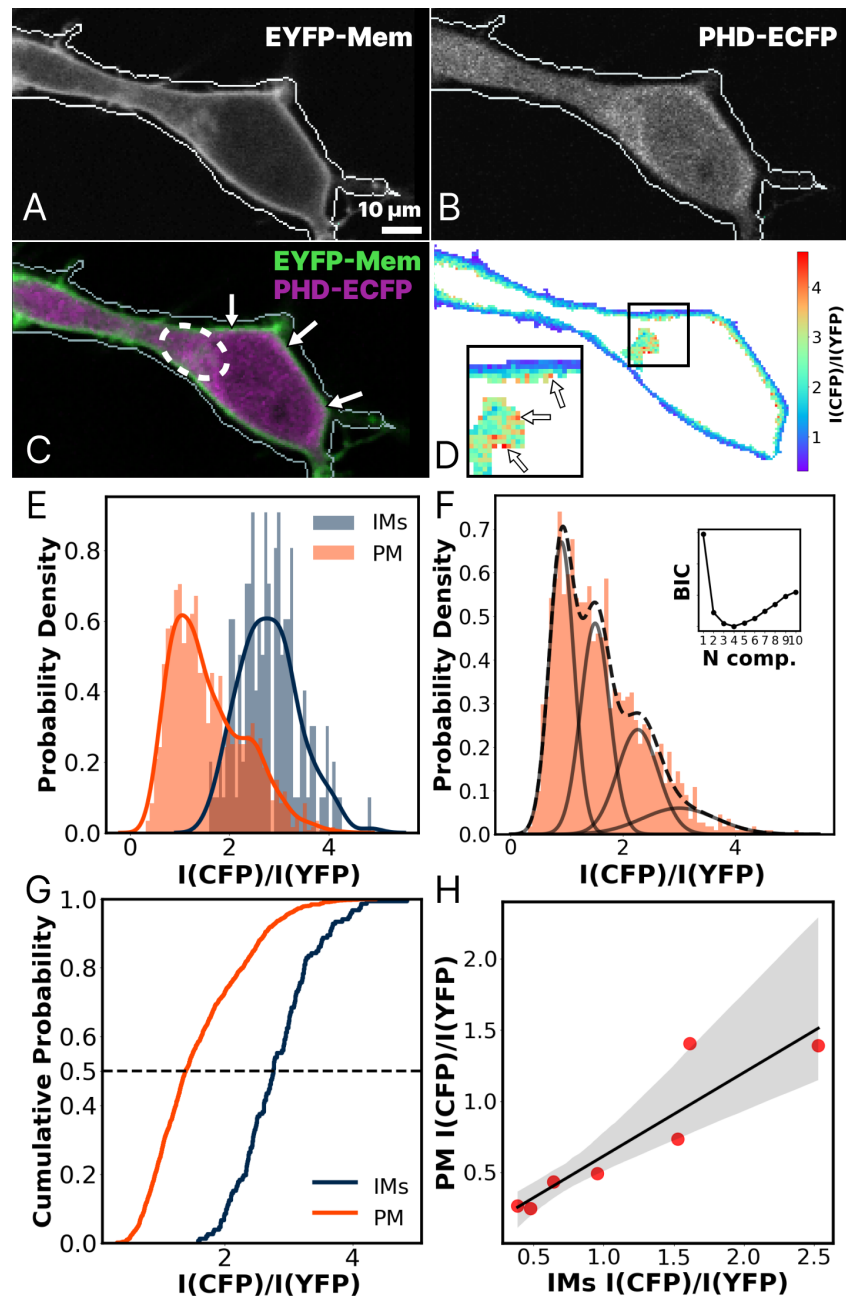


Рис. 3.15. Порівняння розподілу мінорного фосфоліпіда PIP_2 між різними типами клітинних мембран.

Флуоресцентні зображення репрезентативної клітини, що показує розподіл EYFP-Mem (A) і PHD-ECFP (B). (C) Накладання спектральних каналів EYFP-Mem та PHD-ECFP. Колокалізація позначена білою пунктирною лінією (внутрішньоклітинні мембрани) та білими стрілками (плазматична мембрана). (D) Попіксельне співвідношення інтенсивностей флуоресценції PHD-ECFP до EYFP-Mem (I_{CFP}/I_{YFP}). Чорний прямокутник показує збільшену область, де

червоні ділянки (позначені стрілками) вказують на ділянки з високим співвідношенням I_{CFP}/I_{YFP} . **(E)** Розподіл співвідношення I_{CFP}/I_{YFP} в областях інтересу (ROI), що відповідають плазматичній мембрані (plasma membrane/PM, помаранчевий колір) та внутрішньоклітинним мембранам (intracellular membranes/IMs, чорний колір). **(F)** Аналіз співвідношення I_{CFP}/I_{YFP} у регіонах плазматичної мембрани за допомогою моделі гауссової суміші (GMM) на основі оптимізації за баєсівським інформаційним критерієм (BIC, значення показано на вставці). **(G)** Кумулятивна функція розподілу (CDF) співвідношення I_{CFP}/I_{YFP} в регіонах PM та IMs. **(H)** Регресійний аналіз медіанних значень співвідношень I_{CFP}/I_{YFP} в різних типах регіонів для всіх досліджених клітин ($n = 7$).

РОЗДІЛ 4

Узагальнення результатів

Довготривала синаптична пластичність є фізіологічним підґрунтям процесів запам'ятовування, набуття навичок і формування досвіду. Одним з основних різновидів довготривалої пластичності в глутаматергічних синапсах є NMDA-рецептор залежна LTD. В основі розвитку LTD є тривале зменшення кількості AMPA-рецепторів на мембрані постсинаптичного нейрона, що призводить до зниження здатності окремих синапсів передавати сигнали. Широко відомо, що розвиток LTD відбувається у відповідь на тривалу, але низьку за інтенсивністю, активацію синапсів і вторинним посередником в цьому процесі виступають іони Ca^{2+} які на початкових етапах індукції LTD надходять через активні NMDA-рецептори [4]. Подальші сигнальні каскади провокують дисоціацію AMPA-рецепторів з ділянки постсинаптичної щільності та їх вилучення з плазматичної мембрани дендрита шляхом СМЕ. Однак точні механізми, що забезпечують Ca^{2+} -залежність і локалізацію СМЕ в процесі індукції LTD, залишаються маловивченими. Наявні дослідження висували нейронний кальцієвий сенсор НРСА на роль потенційної сигнальної ланки в індукції LTD. Особливість НРСА полягає в наявності міристильного перемикача, що обумовлює Ca^{2+} -залежність та оборотне вбудовування до ліпідних мембран [10, 11]. Згідно з наявними уявленнями, НРСА функціонує як шатл, що забезпечує Ca^{2+} -залежну доставку до поверхні мембран комплексу адаптерних білків 2, що взаємодіє з AMPA-рецепторами та ініціює їхній подальший ендоцитоз шляхом СМЕ [36]. Однак використані в попередніх роботах висновки ґрунтувались виключно на біохімічних, імунологічних та непрямих електрофізіологічних методах, без прямого спостереження за досліджуваними білками в процесі індукції LTD [9]. Тому метою дисертаційного дослідження було дослідити участь НРСА в процесі індукції NMDA-рецептор залежної LTD з використанням методів візуалізації живих клітин.

Для фармакологічної індукції NMDA-рецептор залежної LTD в первинній культурі нейронів гіпокампа було розроблено та валідовано нову методику тривалих локальних іонофоретичних прикладань NMDA. Новий підхід дозволив гнучко та ефективно моделювати LTD в поодиноких нейронах. Застосування іонофорезу для тривалих прикладань будь-яких полярних водорозчинних речовин в широкому спектрі експериментальних підходів, що передбачають фармакологічну обробку досліджуваних клітин в культурі, робить створений метод перспективною альтернативою обробки всіх клітин в зразку розчином із фармакологічними препаратами.

В дослідях із використанням додаткової флуоресцентної мітки, специфічної до постсинаптичної щільності (PSD95-TagRFP) було оцінено просторові характеристики Ca^{2+} -залежного перерозподілу HPCA в дендритному дереві у відповідь на активацію NMDA-рецепторів. Виявлено, що регіони вбудовування кальцієвого сенсора є гетерогенними вздовж всього дендритного дерева та спостерігається значне накопичення HPCA в дендритних шипиках. Важливо зауважити, що вбудовування HPCA в межах дендритних шипиків спостерігалось виключно в регіонах, що оточували постсинаптичні щільності. Виявлені регіони цитоморфологічно відповідають зонам ендоцитозу, регіонам, що забезпечують активне вилучення синаптичних рецепторів в межах дендритних шипиків.

Вперше були проведені прямі спостереження за взаємною локалізацією та потенційною взаємодією між HPCA (HPCA-ECFP) та β -субодиницею комплексу адаптерних білків 2 (AP2B1-EYFP) як в нативних клітинах, так і процесі індукції довготривалої депресії. Використання підходів для детектування FRET між флуорофорами дозволило кількісно оцінити локалізацію та ступінь потенційної білок-білкової взаємодії на рівні окремих фрагментів дендритного дерева та поодиноких дендритних шипиків. Було виявлено значущі рівні FRET до початку індукції LTD, але лише в межах дендритних шипиків, що вказує на колокалізацію і потенційну взаємодію досліджуваних білків навіть за відсутності синаптичної активності. Натомість у відповідь на протокол індукції LTD

збільшення рівнів FRET спостерігалось як в дендритних шипиках, так і масивних ділянках вздовж стовбуру дендрита, а по завершенню протоколу значення FRET не демонстрували повернення до початкових. Це є вагомим свідченням щодо стійкої та тривалої взаємодії між кальцієвим сенсором та комплексом адаптерних білків 2, яка може лежати як в основі збільшення ступеня ендоцитозу AMPA-рецепторів на стадії індукції LTD, так і підтриманні цієї форми довготривалої пластичності шляхом незворотного збільшення темпів ендоцитозу AMPA-рецепторів.

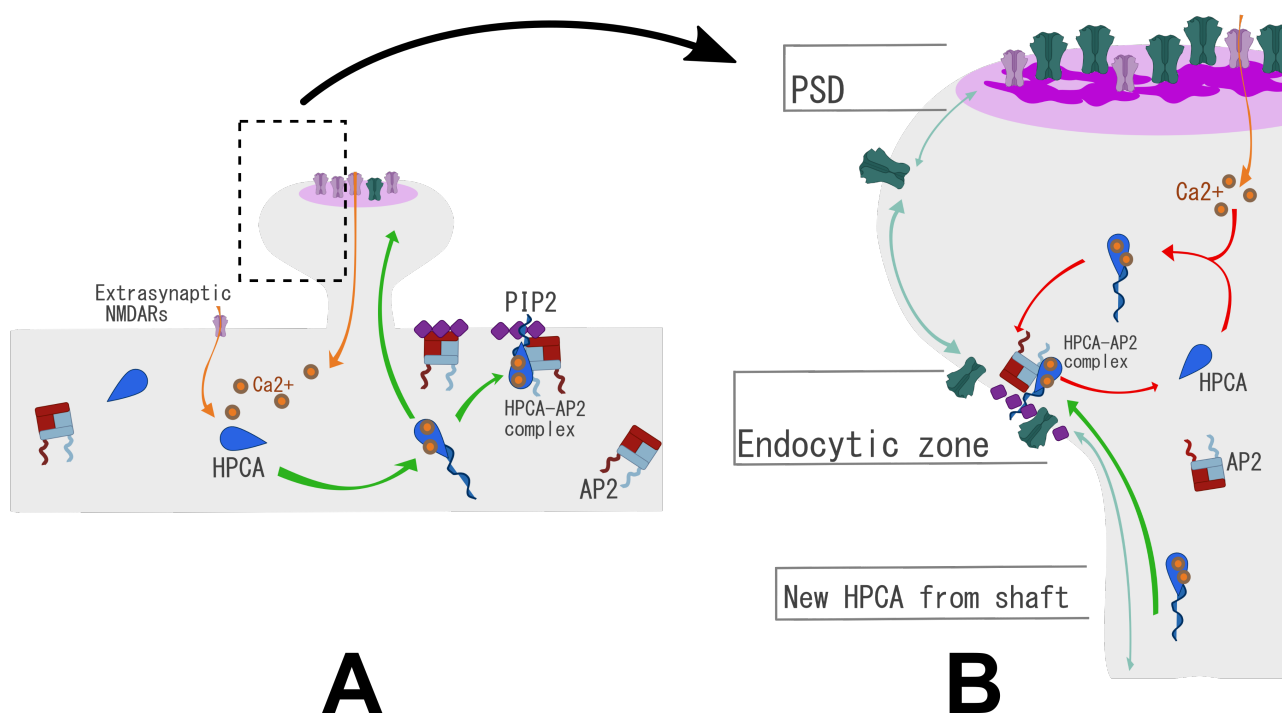


Рис. 4.1. Загальна схема сигналізації HPCA в процесах трафіку синаптичних рецепторів та індукції LTD у стовбурі дендритного дерева (A) та окремих дендритних шипиках (B).

Оскільки FRET відображає виключно колокалізацію флуорофорів, а з літературних джерел відомо про високу спорідненість обох білків інтересу до мінорного фосфоліпіда PIP_2 , була проведена додаткова перевірка, щоб виключити можливість впливу локальних відмінностей складу ліпідних мембран на

спостережуване явище. Використовуючи клітини лінії НЕК 293 та комбінацію неспецифічної флуоресцентної мембранної мітки (EYFP-Mem) та флуоресцентно міченого плекстринового домену фосфоліпази C (PHD-ECFP) як мітки, специфічної до PIP_2 , було охарактеризовано розподіл мінорного фосфоліпіда між різними типами клітинних мембран. Подальше дослідження Ca^{2+} -залежного перерозподілу НРСА між різними типами клітинних мембран в клітинах НЕК 293 та порівняння отриманих даних із попередніми оцінками дозволило зробити висновок про відсутність преференції НРСА до вмісту PIP_2 в мембранах. Це є додатковим опосередкованим свідченням щодо специфічності взаємодії між НРСА та AP2B1.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі відповідно до мети та поставлених завдань був розроблений новітній підхід щодо використання іонтофорезу. За допомогою цього підходу та молекулярно-генетичних, електрофізіологічних і флуоресцентних методів проведено дослідження участі гіпокальцину в NMDA-рецептор залежній довготривалій синаптичній депресії. За результатами проведених експериментів було зроблено наступні висновки:

- 1) Іонофорез вперше було застосовано як метод тривалих локальних прикладань речовини. Просторово-часова динаміка вивільнення речовини з електрода робить цей метод ефективною альтернативою заміні розчину в експериментальній камері (bath-application).
- 2) Тривале локальне іонофоретичне прикладання NMDA є ефективним методом для фармакологічного моделювання LTD в первинній культурі нейронів гіпокампа щура.
- 3) Транслокація HPCSA у відповідь на тривалу активацію NMDA-рецепторів відбувається в окремі регіони дендритного дерева та в потенційні зони ендоцитозу, локалізованих в околицях постсинаптичних щільностей синапсів.
- 4) Вміст PIP_2 в різних типах клітинних мембран суттєво не впливає на Ca^{2+} -залежний перерозподіл HPCSA в клітинах НЕК 293, що вказує на потенційні додаткові фактори, які можуть обумовлювати нерівномірність транслокацій білка в різних компартментах живих клітин; також це є опосередкованим свідченням специфічності взаємодії між HPCSA та AP2B1, а не спонтанним підвищенням FRET через колокалізацію обох білків в багатих на PIP_2 регіонах плазматичної мембрани нейронів.
- 5) Взаємодія між HPCSA та AP2B1 впродовж індукції LTD виявлена як в дендритному стовбурі, так і в дендритних шипиках, та продовжується після її завершення, що може вказувати на роль HPCSA як в процесах індукції, так

і підтримання LTD шляхом підвищення рівня ендоцитозу AMPA рецепторів.

- 6) Значний рівень взаємодії HPCSA та AP2B1 був присутній в межах дендритних шипиків до активації NMDA-рецепторів, що вказує на потенційну роль HPCSA не тільки в процесах індукції та підтримання LTD, але й в процесах конститутивного трафіку синаптичних рецепторів.

ДОДАТКИ

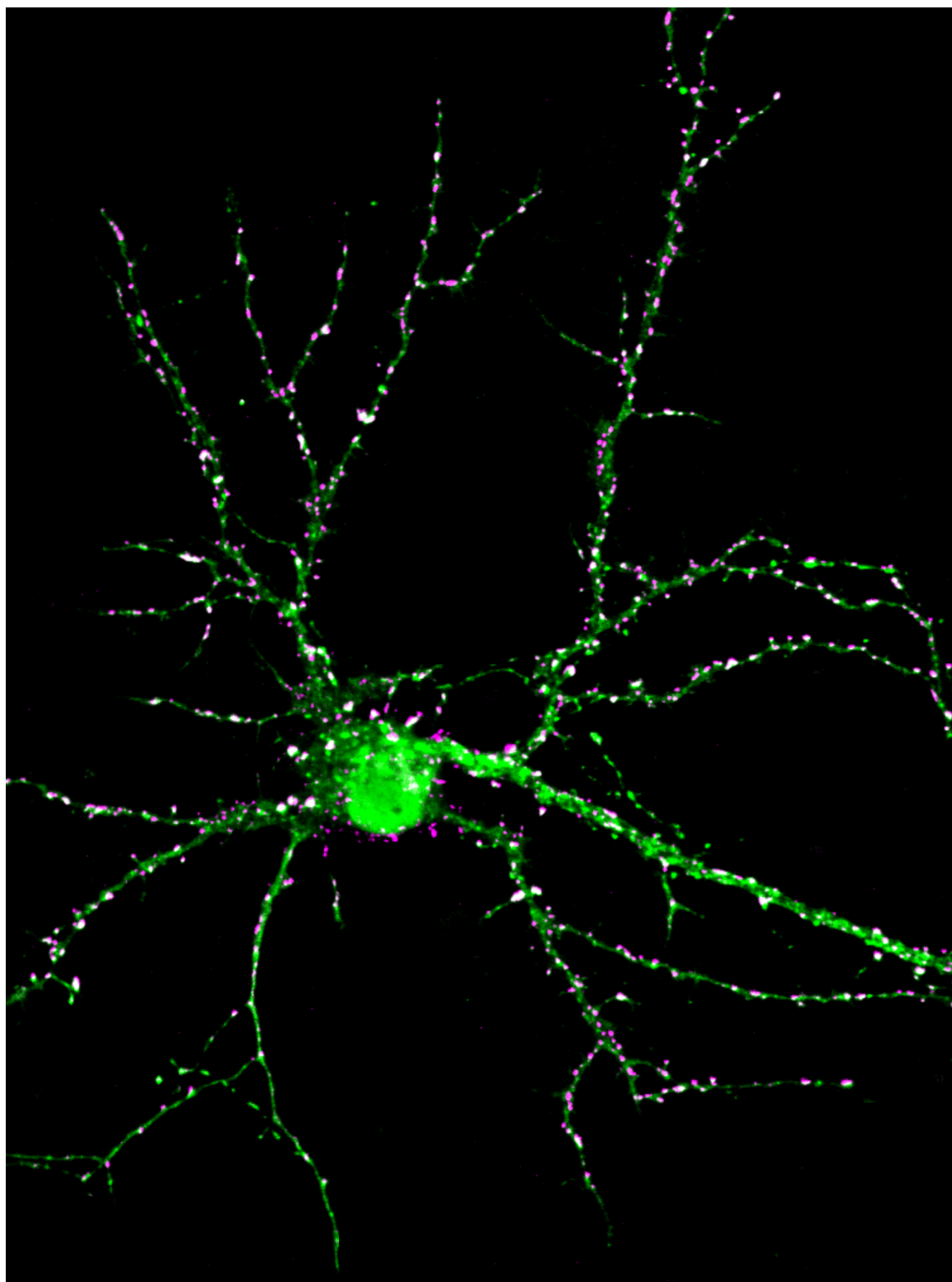
Додаток А

Рис. S.1. Нейрон гіпокампа щура, зелений колір відображає гіпокальцин, а пурпуровий – синапси (структурний білок PSD95).

СИСТЕМА ПРОТОЧНОЇ ПЕРФУЗІЇ

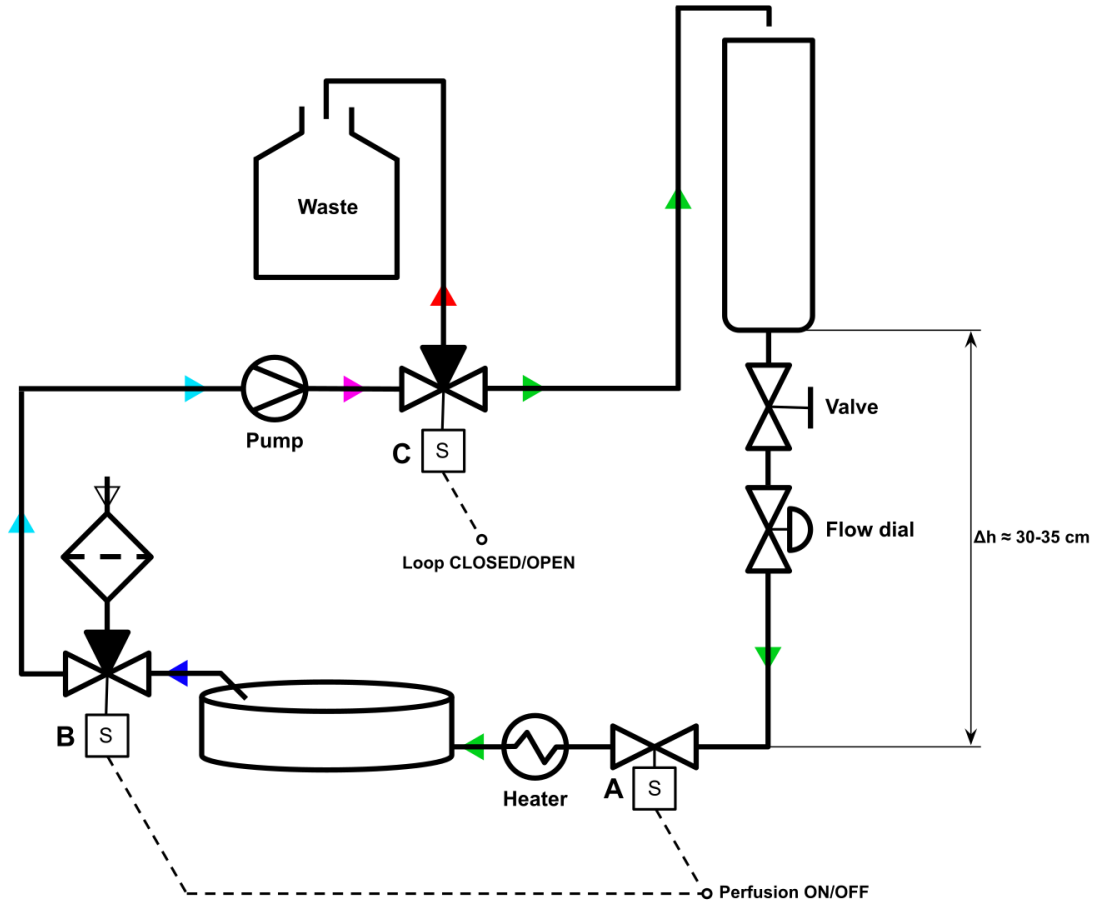


Рис. S.2. Схема системи проточної перфузії.

Кольорові стрілки вказують на різні потоки позаклітинного розчину: *зелений* - вхід експериментальної камери, *синій* - вхід експериментальної камери, *ціановий* - вхід перистальтичної помпи, *пурпурний* - вихід перистальтичної помпи, *червоний* - злив у відходи. Вмикання/вимикання перфузії працює шляхом одночасного перекриття входу рідини за допомогою клапана А і перемикання помпи на атмосферу за допомогою клапана В, щоб запобігти коливанням рівня рідини в експериментальній камері. За замовчуванням перфузійна система працює в замкнутому режимі, коли позаклітинний розчин повертається в основний резервуар, але за допомогою триходового клапана С ми можемо спрямувати потік рідини в резервуар для відходів і працювати в розімкненому режимі.

Побудовано за допомогою The Engineering ToolBox www.engineeringtoolbox.com/p-id-drawing-d_1639.html.

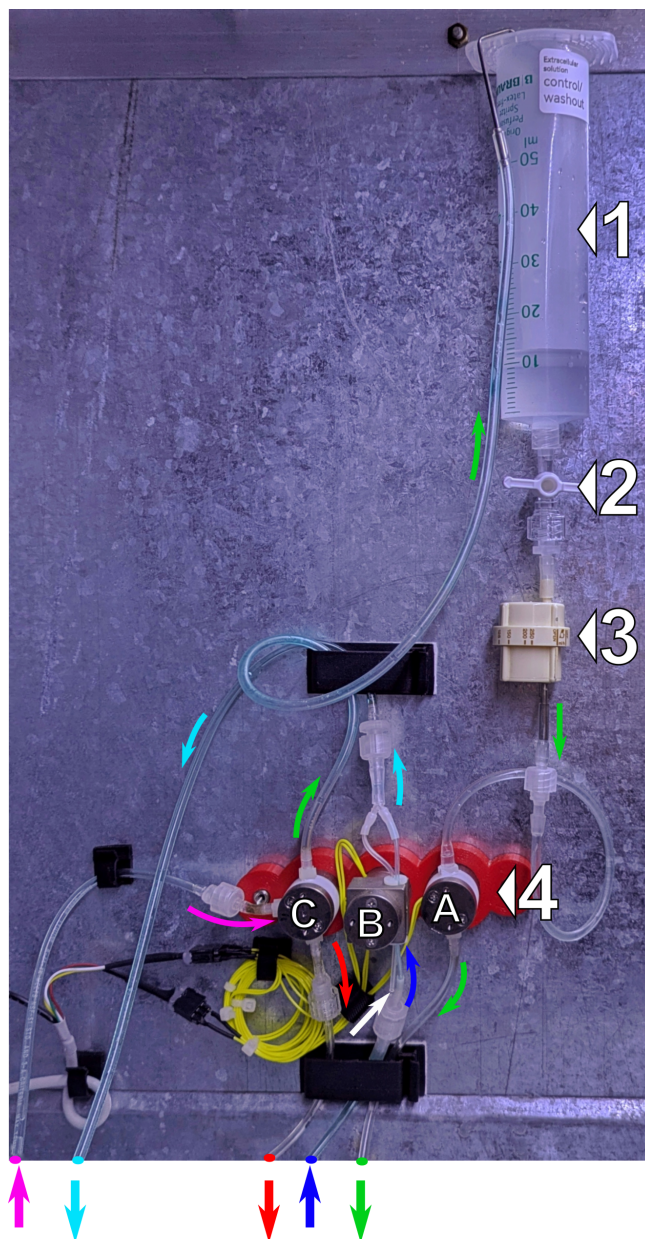


Рис. S.3. Зібрана система проточної перфузії.

Кольорові стрілки вказують на різні потоки позаклітинного розчину: *зелений* - вхід експериментальної камери, *синій* - вхід експериментальної камери, *ціановий* - вхід перистальтичної помпи, *пурпурний* - вихід перистальтичної помпи, *червоний* - злив у відходи. Біла стрілка вказує на вхід повітря для розриву петлі перфузії.

1 - Основний резервуар для позаклітинного розчину,

2 - Двоходовий клапан,

3 - Регулятор потоку,

4 - Блок електромагнітних клапанів для автоматичного керування: *Клапан А* - вхід експериментальної камери ВІДКРИТО/ЗАКРИТО; *Клапан В* - клапан розриву перфузійної петлі З'ЄДНУВАЧ ВИХОДУ КАМЕРИ/АТМОСФЕРА; *Клапан С* - вихід перистальтичної помпи в основний резервуар/в відходи.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] John Lisman. Glutamatergic synapses are structurally and biochemically complex because of multiple plasticity processes: long-term potentiation, long-term depression, short-term potentiation and scaling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372, 3 2017. ISSN 14712970. doi: 10.1098/RSTB.2016.0260. URL <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2016.0260>.

- [2] D.K. Apps. Ionic channels of excitable membranes (second edition): By bertil hille; sinauer associates (distributed by w.h. freeman); sunderland, ma, 1992; xiv + 607 pages. £37.95. isbn 0878933239. *FEBS Letters*, 306(2–3):277–278, July 1992. ISSN 1873-3468. doi: 10.1016/0014-5793(92)81020-m. URL [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81020-M](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(92)81020-M).

- [3] W. Sather, S. Dieudonné, J. F. MacDonald, and P. Ascher. Activation and desensitization of n-methyl-d-aspartate receptors in nucleated outside-out patches from mouse neurones. *The Journal of Physiology*, 450:643–672, 5 1992. ISSN 1469-7793. doi: 10.1113/JPHYSIOL.1992.SP019148. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/jphysiol.1992.sp019148><https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1113/jphysiol.1992.sp019148><https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/jphysiol.1992.sp019148>.

- [4] Christian Luscher and Robert C. Malenka. Nmda receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (ltp/ltd). *IEEE Technology and Society Magazine*, 28:3, 2009. ISSN 02780097. doi: 10.1109/MTS.2009.931859.

- [5] Marcel Mettlen, Ping Hung Chen, Saipraveen Srinivasan, Gaudenz Danuser, and Sandra L. Schmid. Regulation of clathrin-mediated endocytosis, 6 2018. ISSN 15454509.

- [6] Edda Thiels, Xiaping Xie, Mark F. Yeckel, German Barrionuevo, and Theodore W. Berger. Nmda receptor-dependent ltd in different subfields of hippocampus in vivo and in vitro. *Hippocampus*, 6:43–51, 1996. ISSN 10509631. doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:1<43::AID-HIPO8>3.0.CO;2-8.
- [7] Vijeta Raghuram, Yogendra Sharma, and Michael R. Kreutz. Ca²⁺ sensor proteins in dendritic spines: A race for ca²⁺. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5:1–12, 2012. ISSN 16625099. doi: 10.3389/fnmol.2012.00061.
- [8] Eric R Kandel, James H Schwartz, Thomas M Jessell, Steven A Siegelbaum, and A J Hudspeth. *Principles of neural science, fifth edition*. McGraw-Hill Education/Medical, 5 edition, October 2012.
- [9] Claire L Palmer, Wonil Lim, Peter G R Hastie, Marie Toward, Viktor I Korolchuk, Stephen A Burbidge, George Banting, Graham L Collingridge, John T R Isaac, and Jeremy M Henley. Hippocalcin functions as a calcium sensor in hippocampal ltd. 47:487–494, 2006. doi: 10.1016/j.neuron.2005.06.014.Hippocalcin.
- [10] Robert D. Burgoyne, Dermott W. O’Callaghan, Burcu Hasdemir, Lee P. Haynes, and Alexei V. Tepikin. Neuronal ca²⁺-sensor proteins: Multitalented regulators of neuronal function. *Trends in Neurosciences*, 27:203–209, 2004. ISSN 01662236. doi: 10.1016/j.tins.2004.01.010.
- [11] Robert D. Burgoyne. Neuronal calcium sensor proteins: Generating diversity in neuronal ca²⁺ signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, 8:182–193, 2007. ISSN 1471003X. doi: 10.1038/nrn2093.
- [12] Robert D. Burgoyne, Nordine Helassa, Hannah V. McCue, and Lee P. Haynes. Calcium sensors in neuronal function and dysfunction. *Cold Spring Harbor*

- Perspectives in Biology*, 11, 2019. ISSN 19430264. doi: 10.1101/cshperspect.a035154.
- [13] David A. Brown, Barrie Lancaster, and Mala M. Shah. Hippocalcin: A new solution to an old puzzle. *Neuron*, 53:467–468, 2007. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.026. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.026>.
- [14] Anastassios V. Tzingounis, Masaaki Kobayashi, Ken Takamatsu, and Roger A. Nicoll. Hippocalcin gates the calcium activation of the slow afterhyperpolarization in hippocampal pyramidal cells. *Neuron*, 53:487–493, 2007. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.011.
- [15] Claudio Villalobos, Robert C. Foehring, Jonathan C. Lee, and Rodrigo Andrade. Essential role for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the expression, regulation, and gating of the slow afterhyperpolarization current in the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*, 31:18303–18312, 2011. ISSN 02706474. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3203-11.2011.
- [16] M. V. Roshchin, V. N. Ierusalimsky, P. M. Balaban, and E. S. Nikitin. Ca²⁺-activated kca3.1 potassium channels contribute to the slow afterhyperpolarization in l5 neocortical pyramidal neurons. *Scientific Reports*, 10(1), September 2020. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-020-71415-x. URL <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-71415-x>.
- [17] Debora Laker, Frederik Tolle, Michael Stegen, Marco Heerdeggen, Rüdiger Köhling, Timo Kirschstein, and Jakob Wolfart. Kv7 and kir6 channels shape the slow ahp in mouse dentate gyrus granule cells and control burst-like firing behavior. *Neuroscience*, 467:56–72, July 2021. ISSN 0306-4522. doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.05.025. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.05.025>.

- [18] Dermott W. O’Callaghan, Lee P. Haynes, and Robert D. Burgoyne. High-affinity interaction of the n-terminal myristoylation motif of the neuronal calcium sensor protein hippocalcin with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemical Journal*, 391:231–238, 2005. ISSN 02646021. doi: 10.1042/BJ20051001.
- [19] Gavin Charlesworth, Plamena R. Angelova, Fernando Bartolomé-Robledo, Mina Ryten, Daniah Trabzuni, Maria Stamelou, Andrey Y. Abramov, Kailash P. Bhatia, and Nicholas W. Wood. Mutations in hpca cause autosomal-recessive primary isolated dystonia. *American Journal of Human Genetics*, 96: 657–665, 4 2015. ISSN 15376605. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.02.007.
- [20] Burcu Atasü, Hasmet Hanagasi, Basar Bilgic, Meltem Pak, Nihan Erginel-Unaltuna, Ann Kathrin Hauser, Gamze Guven, Javier Simón-Sánchez, Peter Heutink, Thomas Gasser, and Ebba Lohmann. Hpca confirmed as a genetic cause of dyt2-like dystonia phenotype. *Movement Disorders*, 33:1354–1358, 2018. ISSN 15318257. doi: 10.1002/mds.27442.
- [21] Nordine Helassa, Svetlana V. Antonyuk, Lu Yun Lian, Lee P. Haynes, and Robert D. Burgoyne. Biophysical and functional characterization of hippocalcin mutants responsible for human dystonia. *Human Molecular Genetics*, 26:2426–2435, 2017. ISSN 14602083. doi: 10.1093/hmg/ddx133.
- [22] D. S. Osyenko, A. V. Dovgan, N. I. Kononenko, A. V. Dromaretsky, M. Matvieienko, O. A. Rybachuk, J. Zhang, S. M. Korogod, V. Venkataraman, and P. Belan. Perturbed Ca²⁺-dependent signaling of DYT2 hippocalcin mutant as mechanism of autosomal recessive dystonia. *Neurobiology of Disease*, 132(July):104529, 2019. ISSN 1095953X. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104529. URL <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104529>.
- [23] Patric K Stanton and K Stanton. Ltd, ltp, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. Technical report, 1991.

- [24] Jeanette Hellgren Kotaleski and Kim T. Blackwell. Modelling the molecular mechanisms of synaptic plasticity using systems biology approaches. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(4):239–251, April 2010. ISSN 1471-0048. doi: 10.1038/nrn2807. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2807>.
- [25] Xing Liu, Qin Hua Gu, Kaizheng Duan, and Zheng Li. Nmda receptor-dependent ltd is required for consolidation but not acquisition of fear memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34:8741–8748, 2014. ISSN 1529-2401. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2752-13.2014. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24966374/>.
- [26] Yanis Inglebert, Johnatan Aljadeff, Nicolas Brunel, and Dominique Debanne. Synaptic plasticity rules with physiological calcium levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117: 33639–33648, 2020. ISSN 10916490. doi: 10.1073/PNAS.2013663117.
- [27] Christian Lüscher and Robert C. Malenka. Nmda receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (ltp/ltd). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4:1–15, 6 2012. ISSN 19430264. doi: 10.1101/cshperspect.a005710.
- [28] Wei-Yang Lu, Heng-Ye Man, William Ju, William S. Trimble, John F. MacDonald, and Yu Tian Wang. Activation of synaptic nmda receptors induces membrane insertion of new ampa receptors and ltp in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, 29(1):243–254, January 2001. ISSN 0896-6273. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00194-5. URL [http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00194-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00194-5).
- [29] Shumpei Fujii, Hiromitsu Tanaka, and Tomoo Hirano. Suppression of ampa receptor exocytosis contributes to hippocampal ltd. *Journal of Neuroscience*,

- 38:5523–5537, 6 2018. ISSN 15292401. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3210-17.2018.
- [30] Tomonari Sumi and Kouji Harada. Mechanism underlying hippocampal long-term potentiation and depression based on competition between endocytosis and exocytosis of ampa receptors. *Scientific Reports*, 10, 12 2020. ISSN 20452322. doi: 10.1038/s41598-020-71528-3.
- [31] Victor C Wong, Patrick R Houlihan, Hui Liu, Deepika Walpita, Michael C DeSantis, Zhe Liu, and Erin K O’Shea. Plasticity-induced actin polymerization in the dendritic shaft regulates intracellular ampa receptor trafficking. *eLife*, 13, August 2024. ISSN 2050-084X. doi: 10.7554/elife.80622. URL <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.80622>.
- [32] Marcus J. Taylor, David Perrais, and Christien J. Merrifield. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biology*, 9, 2011. ISSN 15457885. doi: 10.1371/journal.pbio.1000604.
- [33] Sarah M Smith, Gabrielle Larocque, Katherine M Wood, Kyle L Morris, Alan M Roseman, Richard B Sessions, Stephen J Royle, and Corinne J Smith. Multi-modal adaptor-clathrin contacts drive coated vesicle assembly. *The EMBO Journal*, 40:1–16, 2021. ISSN 0261-4189. doi: 10.15252/embj.2021108795.
- [34] Matheus F. Sathler, Latika Khatri, Jessica P. Roberts, Isabella G. Schmidt, Anastasiya Zaytseva, Regina C.C. Kubrusly, Edward B. Ziff, and Seonil Kim. Phosphorylation of the ampa receptor subunit glua1 regulates clathrin-mediated receptor internalization. *Journal of Cell Science*, 134, 9 2021. ISSN 14779137. doi: 10.1242/jcs.257972.
- [35] Yuuta Imoto, Sumana Raychaudhuri, Ye Ma, Pascal Fenske, Eduardo

- Sandoval, Kie Itoh, Eva Maria Blumrich, Hideaki T. Matsubayashi, Lauren Mamer, Fereshteh Zarebidaki, Berit Söhl-Kielczynski, Thorsten Trimbuch, Shraddha Nayak, Janet H. Iwasa, Jian Liu, Bin Wu, Taekjip Ha, Takanari Inoue, Erik M. Jorgensen, Michael A. Cousin, Christian Rosenmund, and Shigeki Watanabe. Dynamin is primed at endocytic sites for ultrafast endocytosis. *Neuron*, 110:2815–2835.e13, 9 2022. ISSN 10974199. doi: 10.1016/j.neuron.2022.06.010.
- [36] Jonathan G. Hanley. The regulation of ampa receptor endocytosis by dynamic protein-protein interactions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12:1–10, 2018. ISSN 16625102. doi: 10.3389/fncel.2018.00362.
- [37] Kathrin Kastning, Viktoria Kukhtina, Josef T Kittler, Guojun Chen, Arndt Pechstein, Sven Enders, Sang Hyoung Lee, Morgan Sheng, Zhen Yan, and Volker Haucke. Molecular determinants for the interaction between ampa receptors and the clathrin adaptor complex ap-2. Technical report, 2007. URL www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0611170104.
- [38] Nadja Jung and Volker Haucke. Clathrin-mediated endocytosis at synapses, 9 2007. ISSN 13989219.
- [39] Luis L.P. DaSilva, Mark J. Wall, Luciana P. de Almeida, Sandrine C. Wauters, Yunan C. Januário, Jürgen Müller, and Sonia A.L. Corrêa. Activity-regulated cytoskeleton-associated protein controls ampar endocytosis through a direct interaction with clathrin-adaptor protein 2. *eNeuro*, 3:125–140, 2016. ISSN 23732822. doi: 10.1523/ENEURO.0144-15.2016.
- [40] Graham H. Diering and Richard L. Huganir. The ampa receptor code of synaptic plasticity. *Neuron*, 100:314–329, 2018. ISSN 10974199. doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.018. URL <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.018>.

- [41] Michael C. Ashby, Sarah A. De La Rue, G. Scott Ralph, James Uney, Graham L. Collingridge, and Jeremy M. Henley. Removal of ampa receptors (ampars) from synapses is preceded by transient endocytosis of extrasynaptic ampars. *Journal of Neuroscience*, 24:5172–5176, 2004. ISSN 02706474. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1042-04.2004.
- [42] Michael C. Ashby, Susie R. Maier, Atsushi Nishimune, and Jeremy M. Henley. Lateral diffusion drives constitutive exchange of ampa receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. *Journal of Neuroscience*, 26: 7046–7055, 2006. ISSN 02706474. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1235-06.2006.
- [43] Heesung Sohn and Mikyoung Park. Palmitoylation-mediated synaptic regulation of ampa receptor trafficking and function. *Archives of Pharmacal Research*, 42:426–435, 2019. ISSN 19763786. doi: 10.1007/s12272-019-01134-z. URL <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01134-z>.
- [44] Takashi Hayashi, Gavin Rumbaugh, and Richard L. Huganir. Differential regulation of ampa receptor subunit trafficking by palmitoylation of two distinct sites. *Neuron*, 47(5):709–723, September 2005. ISSN 0896-6273. doi: 10.1016/j.neuron.2005.06.035. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2005.06.035>.
- [45] Jyoji Morise, Kenichi G.N. Suzuki, Ayaka Kitagawa, Yoshihiko Wakazono, Kogo Takamiya, Taka A. Tsunoyama, Yuri L. Nemoto, Hiromu Takematsu, Akihiro Kusumi, and Shogo Oka. Ampa receptors in the synapse turnover by monomer diffusion. *Nature Communications*, 10, 12 2019. ISSN 20411723. doi: 10.1038/s41467-019-13229-8.
- [46] KATHRYN H. CONDON and MICHAEL D. EHLERS. *Postsynaptic Machinery for Receptor Trafficking*, page 143–174. Elsevier, 2007. ISBN 9780123694379. doi: 10.1016/b978-012369437-9/50013-x. URL <http://dx.doi.org/10.1016/B978-012369437-9/50013-X>.

- [47] Jiuyi Lu, Thomas D. Helton, Thomas A. Blanpied, Bence Rácz, Thomas M. Newpher, Richard J. Weinberg, and Michael D. Ehlers. Postsynaptic positioning of endocytic zones and ampa receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to homer. *Neuron*, 55:874–889, 9 2007. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2007.06.041.
- [48] Morgane Rosendale, Damien Jullié, Daniel Choquet, and David Perrais. Spatial and temporal regulation of receptor endocytosis in neuronal dendrites revealed by imaging of single vesicle formation. *Cell Reports*, 18:1840–1847, 2 2017. ISSN 22111247. doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.081.
- [49] Lisa A.E. Catsburg, Manon Westra, Annemarie M.L. van Schaik, and Harold D. Macgillavry. Dynamics and nanoscale organization of the postsynaptic endocytic zone at excitatory synapses. *eLife*, 11, 1 2022. ISSN 2050084X. doi: 10.7554/eLife.74387.
- [50] Nicky Scheefhals, Lisa A.E. Catsburg, Margriet L. Westerveld, Thomas A. Blanpied, Casper C. Hoogenraad, and Harold D. MacGillavry. Shank proteins couple the endocytic zone to the postsynaptic density to control trafficking and signaling of metabotropic glutamate receptor 5. *Cell Reports*, 29:258–269.e8, 10 2019. ISSN 22111247. doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.102.
- [51] Jonathan M. Wong and John A. Gray. Long-term depression is independent of glun2 subunit composition. *Journal of Neuroscience*, 38:4462–4470, 2018. ISSN 15292401. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0394-18.2018.
- [52] Kim Dore and Roberto Malinow. Elevated psd-95 blocks ion-flux independent ltd: A potential new role for psd-95 in synaptic plasticity. *Neuroscience*, 456: 43–49, 2021. ISSN 18737544. doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.02.020. URL <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.02.020>.
- [53] Domenico Azarnia Tehran, Gaga Kochlamazashvili, Niccolò P Pampaloni,

- Silvia Sposini, Jasmeet Kaur Shergill, Martin Lehmann, Natalya Pashkova, Claudia Schmidt, Delia Löwe, Hanna Napieczynska, Arnd Heuser, Andrew J R Plested, David Perrais, Robert C Piper, Volker Haucke, and Tanja Maritzen. Selective endocytosis of Ca^{2+} -permeable AMPARs by the Alzheimer's disease risk factor *calm* bidirectionally controls synaptic plasticity. Technical report, 2022. URL <https://www.science.org>.
- [54] Benjamin Compans, Come Camus, Emmanouela Kallergi, Silvia Sposini, Magalie Martineau, Corey Butler, Adel Kechkar, Remco V. Klaassen, Natacha Retailleau, Terrence J. Sejnowski, August B. Smit, Jean Baptiste Sibarita, Thomas M. Bartol, David Perrais, Vassiliki Nikolettou, Daniel Choquet, and Eric Hosy. NMDAR-dependent long-term depression is associated with increased short term plasticity through autophagy mediated loss of PSD-95. *Nature Communications*, 12, 12 2021. ISSN 20411723. doi: 10.1038/s41467-021-23133-9.
- [55] T. Tanaka, J. B Ames, T. S. Harvey, L. Stryer, and M. Ikura. Sequestration of the membrane-targeting myristoyl group of recoverin in the calcium-free state, 1995.
- [56] Edouard Decastro, Hubert Fiumelli, Stefan E. Lenz, and Satoru Kawamura. Regulation of rhodopsin phosphorylation by a family of neuronal calcium sensors, 1995.
- [57] Christina Spilker and Karl Heinz Braunewell. Calcium-myristoyl switch, subcellular localization, and calcium-dependent translocation of the neuronal calcium sensor protein *vilip-3*, and comparison with *vilip-1* in hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24:766–778, 2003. ISSN 10447431. doi: 10.1016/S1044-7431(03)00242-2.
- [58] Jihoon Jo, Seok Heon, Myung Jong Kim, Gi Hoon Son, Yunkyung Park, Jeremy M. Henley, Jamie L. Weiss, Morgan Sheng, Graham L. Collingridge,

- and Kwangwook Cho. Metabotropic glutamate receptor-mediated ltd involves two interacting ca^{2+} sensors, ncs-1 and pick1. *Neuron*, 60:1095–1111, 2008. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.050.
- [59] Lenka Ivings, Stephen R Pennington, Roz Jenkins, Jamie L Weiss, and Robert D Burgoyne. Sensor protein neurocalcin Δ : Interaction with actin , clathrin and tubulin. *Biochem. J.*, 363:599–608, 2002.
- [60] Yoshitaka Furuta, Masaaki Kobayashi, Tamotsu Masaki, and Ken Takamatsu. Age-related changes in expression of hippocalcin and nvp2 in rat brain. *Neurochemical Research*, 24:651–658, 1999. ISSN 03643190. doi: 10.1023/A:1021000425070.
- [61] M Kobayashi, K Takamatsu, S Saitoh, and T Noguchi. Myristoylation of hippocalcin is linked to its calcium-dependent membrane association properties ”. *Journal of Biological Chemistry*, 268:18898–18904, 1993. ISSN 0021-9258. doi: 10.1016/S0021-9258(17)46711-1. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)46711-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(17)46711-1).
- [62] Ken Takamatsu and Tetsuya Noguchi. Hippocalcin: a calcium-binding protein of the ef-hand superfamily dominantly expressed in the hippocampus. *Neuroscience Research*, 17:291–295, 1993. ISSN 01680102. doi: 10.1016/0168-0102(93)90112-4.
- [63] Dermott W. O’Callaghan, Lenka Ivings, Jamie L. Weiss, Michael C. Ashby, Alexei V. Tepikin, and Robert D. Burgoyne. Differential use of myristoyl groups on neuronal calcium sensor proteins as a determinant of spatio-temporal aspects of ca^{2+} signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 14227–14237, 2002. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M111750200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111750200>.
- [64] Dermott W O Callaghan, Alexei V Tepikin, and Robert D Burgoyne. Dynamics

- and calcium sensitivity of the Ca^{2+} / myristoyl switch protein hippocalcin in living cells. 163:715–721, 2003. doi: 10.1083/jcb.200306042.
- [65] Dermott W. O’Callaghan, Burcu Hasdemir, Mark Leighton, and Robert D. Burgoyne. Residues within the myristoylation motif determine intracellular targeting of the neuronal Ca^{2+} sensor protein kchip1 to post-er transport vesicles and traffic of kv4 K^{+} channels. *Journal of Cell Science*, 116: 4833–4845, 2003. ISSN 00219533. doi: 10.1242/jcs.00803.
- [66] A. V. Dovgan, V. P. Cherkas, A. R. Stepanyuk, D. J. Fitzgerald, L. P. Haynes, A. V. Tepikin, R. D. Burgoyne, and P. V. Belan. Decoding glutamate receptor activation by the Ca^{2+} sensor protein hippocalcin in rat hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 32:347–358, 2010. ISSN 0953816X. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07303.x.
- [67] M Kobayashi, T Masaki, K Hori, Y Masuo, M Miyamoto, H Tsubokawa, H Noguchi, M Nomura, and K Takamatsu. Hippocalcin-deficient mice display a defect in camp response element-binding protein activation associated with impaired spatial and associative memory. 133:471–484, 2005. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.02.034.
- [68] Jihoon Jo, Gi Hoon Son, Bryony L. Winters, Myung Jong Kim, Daniel J. Whitcomb, Bryony A. Dickinson, Youn Bok Lee, Kensuke Futai, Mascia Amici, Morgan Sheng, Graham L. Collingridge, and Kwangwook Cho. Muscarinic receptors induce ltd of nmdar epscs via a mechanism involving hippocalcin, ap2 and psd-95. *Nature Neuroscience*, 13:1216–1224, 2010. ISSN 10976256. doi: 10.1038/nn.2636. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2636>.
- [69] *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*. Springer US, 2006. ISBN 9780387455242. doi: 10.1007/978-0-387-45524-2. URL <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-45524-2>.

- [70] G. Grynkiewicz, M. Poenie, and R. Y. Tsien. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260:3440–3450, 3 1985. ISSN 0021-9258. doi: 10.1016/S0021-9258(19)83641-4.
- [71] Budi Soediono. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53:160, 1989. ISSN 1098-6596. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- [72] M. Maravall, Z. F. Mainen, B. L. Sabatini, and K. Svoboda. Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophysical journal*, 78:2655–2667, 2000. ISSN 0006-3495. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76809-3. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10777761/>.
- [73] O. Friedrich, S. J. Reiling, J. Wunderlich, and P. Rohrbach. Assessment of plasmodium falciparum pfmdr1 transport rates using fluo-4. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18:1851–1862, 2014. ISSN 15821838. doi: 10.1111/jcmm.12313.
- [74] Michael J. Higley and Bernardo L. Sabatini. Calcium signaling in dendrites and spines: Practical and functional considerations. *Neuron*, 59:902–913, 2008. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2008.08.020.
- [75] Graham C R Ellis-Davies and Jack H Kaplan. Nitrophenyl-egta, a photolabile chelator that selectively binds Ca^{2+} with high affinity and releases it rapidly upon photolysis, 1994.
- [76] Dilip Shrestha, Attila Jenei, Péter Nagy, György Vereb, and János Szöllősi. *Understanding FRET as a research tool for cellular studies*, volume 16. 2015. ISBN 3652532201. doi: 10.3390/ijms16046718.

- [77] Bryce T. Bajar, Emily S. Wang, Shu Zhang, Michael Z. Lin, and Jun Chu. A guide to fluorescent protein fret pairs. *Sensors (Switzerland)*, 16:1–24, 2016. ISSN 14248220. doi: 10.3390/s16091488.
- [78] Tongkai Chen, Bing He, Jingsong Tao, Yuan He, Hailiang Deng, Xueqing Wang, and Ying Zheng. Application of förster resonance energy transfer (fret) technique to elucidate intracellular and in vivo biofate of nanomedicines, 3 2019. ISSN 18728294.
- [79] Tomasz Zal and Nicholas R.J. Gascoigne. Photobleaching-corrected fret efficiency imaging of live cells. *Biophysical Journal*, 86:3923–3939, 2004. ISSN 00063495. doi: 10.1529/biophysj.103.022087.
- [80] Lichun Wei, Jiang Zhang, Zihao Mai, Fangfang Yang, Mengyan Du, Fangrui Lin, Junle Qu, and Tongsheng Chen. Quantitative dual-channel fret microscopy. *Optics Express*, 25:26089, 10 2017. ISSN 10944087. doi: 10.1364/oe.25.026089.
- [81] Jakub Wlodarczyk, Andrew Woehler, Fritz Kobe, Evgeni Ponimaskin, Andre Zeug, and Erwin Neher. Analysis of fret signals in the presence of free donors and acceptors. *Biophysical Journal*, 94:986–1000, 1 2008. ISSN 00063495. doi: 10.1529/biophysj.107.111773.
- [82] Edwin Li, Jesse Placone, Mikhail Merzlyakov, and Kalina Hristova. Quantitative measurements of protein interactions in a crowded cellular environment. *Analytical Chemistry*, 80:5976–5985, 2008. ISSN 00032700. doi: 10.1021/ac800616u.
- [83] Lirong Chen, Lawrence Novicky, Mikhail Merzlyakov, Tihomir Hristov, and Kalina Hristova. Measuring the energetics of membrane protein dimerization in mammalian membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 132: 3628–3635, 2010. ISSN 00027863. doi: 10.1021/ja910692u.

- [84] Marc Tramier and Maïté Coppey-Moisan. Fluorescence anisotropy imaging microscopy for homo-fret in living cells. *Methods in Cell Biology*, 85:395–414, 2008. ISSN 0091679X. doi: 10.1016/S0091-679X(08)85017-0.
- [85] Arjen N. Bader, Erik G. Hofman, Jarno Voortman, Paul M.P. Van Bergen En Henegouwen, and Hans C. Gerritsen. Homo-fret imaging enables quantification of protein cluster sizes with subcellular resolution. *Biophysical Journal*, 97:2613–2622, 2009. ISSN 15420086. doi: 10.1016/j.bpj.2009.07.059. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2009.07.059>.
- [86] Edwin K.L. Yeow and Andrew H.A. Clayton. Enumeration of oligomerization states of membrane proteins in living cells by homo-fret spectroscopy and microscopy: Theory and application. *Biophysical Journal*, 92:3098–3104, 2007. ISSN 00063495. doi: 10.1529/biophysj.106.099424. URL <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.099424>.
- [87] B. Snyder and E. Freire. Fluorescence energy transfer in two dimensions. a numeric solution for random and nonrandom distributions. *Biophysical Journal*, 40:137–148, 1982. ISSN 00063495. doi: 10.1016/S0006-3495(82)84468-8.
- [88] Christopher King, Sarvenaz Sarabipour, Patrick Byrne, Daniel J. Leahy, and Kalina Hristova. The fret signatures of noninteracting proteins in membranes: Simulations and experiments. *Biophysical Journal*, 106:1309–1317, 2014. ISSN 15420086. doi: 10.1016/j.bpj.2014.01.039. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.01.039>.
- [89] Luís M.S. Loura and Manuel Prieto. Fret in membrane biophysics: An overview. *Frontiers in Physiology*, 2 NOV, 2011. ISSN 1664042X. doi: 10.3389/fphys.2011.00082.
- [90] Christopher King, Valerica Raicu, and Kalina Hristova. Understanding the fret

- signatures of interacting membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 292:5291–5310, 3 2017. ISSN 1083351X. doi: 10.1074/jbc.M116.764282.
- [91] Xinming Zhuo and Barry E. Knox. Interaction of human crx and nrl in live hek293t cells measured using fluorescence resonance energy transfer (fret). *Scientific Reports*, 12, 12 2022. ISSN 20452322. doi: 10.1038/s41598-022-10689-9.
- [92] Roger Heim and Roger Y Tsien. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology*, 6(2):178–182, February 1996. ISSN 0960-9822. doi: 10.1016/s0960-9822(02)00450-5. URL [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)00450-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00450-5).
- [93] Mats Ormö, Andrew B. Cubitt, Karen Kallio, Larry A. Gross, Roger Y. Tsien, and S. James Remington. Crystal structure of the aequorea victoria green fluorescent protein. *Science*, 273(5280):1392–1395, September 1996. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.273.5280.1392. URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.273.5280.1392>.
- [94] Ekaterina M Merzlyak, Joachim Goedhart, Dmitry Shcherbo, Mariya E Bulina, Aleksandr S Shcheglov, Arkady F Fradkov, Anna Gaintzeva, Konstantin A Lukyanov, Sergey Lukyanov, Theodorus W J Gadella, and Dmitriy M Chudakov. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nature Methods*, 4(7):555–557, June 2007. ISSN 1548-7105. doi: 10.1038/nmeth1062. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth1062>.
- [95] Oksana M. Subach, Illia S. Gundorov, Masami Yoshimura, Fedor V. Subach, Jinghang Zhang, David Grünwald, Ekaterina A. Souslova, Dmitriy M. Chudakov, and Vladislav V. Verkhusha. Conversion of red fluorescent protein into a bright blue probe. *Chemistry amp; Biology*, 15(10):1116–1124, October

2008. ISSN 1074-5521. doi: 10.1016/j.chembiol.2008.08.006. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.08.006>.
- [96] Hanbin Zhang, Gleb D. Lesnov, Oksana M. Subach, Wenhao Zhang, Tatyana P. Kuzmicheva, Anna V. Vlaskina, Valeriya R. Samygina, Liangyi Chen, Xianxin Ye, Alena Yu. Nikolaeva, Azat Gabdulkhakov, Stavriini Papadaki, Wenming Qin, Valentin Borshchevskiy, Maxim M. Perfilov, Alexey S. Gavrikov, Mikhail Drobizhev, Alexander S. Mishin, Kiryl D. Piatkevich, and Fedor V. Subach. Bright and stable monomeric green fluorescent protein derived from staygold. *Nature Methods*, 21(4):657–665, February 2024. ISSN 1548-7105. doi: 10.1038/s41592-024-02203-y. URL <http://dx.doi.org/10.1038/s41592-024-02203-y>.
- [97] Yuechueng Liu, Daniel A Fisher, and Daniel R Storm. Intracellular sorting of neuromodulin (gap-43) mutants modified in the membrane targeting domain. Technical report, 1994.
- [98] Péter Várnai and Tamás Balla. Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: Calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[3h]inositol-labeled phosphoinositide pools. *The Journal of Cell Biology*, 143(2):501–510, October 1998. ISSN 1540-8140. doi: 10.1083/jcb.143.2.501. URL <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.143.2.501>.
- [99] Ronald W. Holz, Michael D. Hlubek, Scott D. Sorensen, Stephen K. Fisher, Tamas Balla, Shoichiro Ozaki, Glenn D. Prestwich, Edward L. Stuenkel, and Mary A. Bittner. A pleckstrin homology domain specific for phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (ptdins-4, 5-p2) and fused to green fluorescent protein identifies plasma membrane ptdins-4, 5-p2 as being important in exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(23): 17878–17885, June 2000. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.m000925200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m000925200>.

- [100] Jose Van der Wal, Ron Habets, Péter Várnai, Tamas Balla, and Kees Jalink. Monitoring agonist-induced phospholipase c activation in live cells by fluorescence resonance energy transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 276:15337–15344, 2001. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M007194200.
- [101] Zsófia Szentpetery, Andras Balla, Yeun J. Kim, Mark A. Lemmon, and Tamas Balla. Live cell imaging with protein domains capable of recognizing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; a comparative study. *BMC Cell Biology*, 10:67, 9 2009. ISSN 14712121. doi: 10.1186/1471-2121-10-67.
- [102] Gregory I. Mashanov, Daryl Tacon, Michelle Peckham, and Justin E. Molloy. The spatial and temporal dynamics of pleckstrin homology domain binding at the plasma membrane measured by imaging single molecules in live mouse myoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 279:15274–15280, 2004. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M312140200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M312140200>.
- [103] Xing E Fang Li Russell Phillips Joseph LeDoux, X F Li J E LeDoux, and R J Phillips E LeDoux. Nmda and non-nmda receptors contribute to synaptic transmission between the medial geniculate body and the lateral nucleus of the amygdala. Technical report, 1995.
- [104] Peter C. Schwindt and Wayne E. Crill. Local and propagated dendritic action potentials evoked by glutamate iontophoresis on rat neocortical pyramidal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 77:2466–2483, 1997. ISSN 00223077. doi: 10.1152/JN.1997.77.5.2466/ASSET/IMAGES/LARGE/JNP.MY39F12.JPEG. URL <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/jn.1997.77.5.2466>.
- [105] A. Kimberley McAllister and Charles F. Stevens. Nonsaturation of ampa and nmda receptors at hippocampal synapses. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 97:6173–6178, 5 2000. ISSN 00278424. doi: 10.1073/pnas.100126497.
- [106] Jonathan G Murnick, Gilles Dubé, Boris Krupa, and Guosong Liu. High-resolution iontophoresis for single-synapse stimulation. Technical report. URL www.elsevier.com/locate/jneumeth.
- [107] Christina Müller and Stefan Remy. Fast micro-iontophoresis of glutamate and gaba: a useful tool to investigate synaptic integration. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 2013. ISSN 1940087X. doi: 10.3791/50701.
- [108] Guilherme Testa-Silva, Marius Rosier, Suraj Honnuraiah, Robertas Guzulaitis, Ana Morello Megias, Chris French, James King, Katharine Drummond, Lucy M. Palmer, and Greg J. Stuart. High synaptic threshold for dendritic nmda spike generation in human layer 2/3 pyramidal neurons. *Cell Reports*, 41, 12 2022. ISSN 22111247. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111787.
- [109] Péter Kovács and István Hernádi. Iontophoresis of lithium antagonizes noradrenergic action on prefrontal neurons of the rat. *Brain Research*, 947: 150–156, 8 2002. ISSN 0006-8993. doi: 10.1016/S0006-8993(02)03150-5.
- [110] Natalie R Herr. Improved techniques for examining rapid dopamine signaling with iontophoresis. *Frontiers in Bioscience*, E5(1):249–257, 2013. ISSN 1945-0508. doi: 10.2741/e612. URL <http://dx.doi.org/10.2741/e612>.
- [111] Robert J. Cormier, Michael D. Mauk, and Paul T. Kelly. Glutamate iontophoresis induces long-term potentiation in the absence of evoked presynaptic activity. *Neuron*, 10:907–919, 5 1993. ISSN 0896-6273. doi: 10.1016/0896-6273(93)90206-7. URL <https://www.cell.com/action/showFullText?pii=0896627393902067><https://www.cell.com/action/showAbstract?pii=0896627393902067>[https://www.cell.com/neuron/abstract/0896-6273\(93\)90206-7](https://www.cell.com/neuron/abstract/0896-6273(93)90206-7).

- [112] K. Krnjević, J. F. Mitchell, and J. C. Szerb. Determination of iontophoretic release of acetylcholine from micropipettes. *The Journal of physiology*, 165: 421–436, 3 1963. ISSN 0022-3751. doi: 10.1113/JPHYSIOL.1963.SP007067. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14035888/>.
- [113] I. Hill-Smith and R. D. Purves. Synaptic delay in the heart: an ionophoretic study. *The Journal of physiology*, 279:31–54, 6 1978. ISSN 0022-3751. doi: 10.1113/JPHYSIOL.1978.SP012329. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/209176/>.
- [114] Robert D. Purves. The physics of iontophoretic pipettes. *Journal of neuroscience methods*, 1:165–178, 1979. ISSN 0165-0270. doi: 10.1016/0165-0270(79)90014-1. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/544961/>.
- [115] R. D.. Purves. Microelectrode methods for intracellular recording and ionophoresis. page 146, 1981. URL <https://search.worldcat.org/title/781326434>.
- [116] John O’M. Bockris and Amulya K. N. Reddy. Modern electrochemistry. *Modern Electrochemistry*, 1970. doi: 10.1007/978-1-4615-8600-5.
- [117] Madhusmita Priyadarshini Sahu, Outi Nikkilä, Seija Lagas, Sulo Kolehmainen, and Eero Castrén. Culturing primary neurons from rat hippocampus and cortex. *Neuronal Signaling*, 3:20180207, 6 2019. ISSN 20596553. doi: 10.1042/NS20180207/110991. URL </neuronal/signaling/article/3/2/NS20180207/110991/Culturing-primary-neurons-from-rat-hippocampus-andhttps://dx.doi.org/10.1042/NS20180207>.
- [118] Enora Moutin, Anne Laure Hemonnot, Vincent Seube, Nathalie Linck, François Rassendren, Julie Perroy, and Vincent Compan. Procedures for culturing and genetically manipulating murine hippocampal postnatal neurons.

- Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 4 2020. ISSN 16633563. doi: 10.3389/fnsyn.2020.00019.
- [119] R.Y. Tsien. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells, 4 1981.
- [120] L D J Pau and S Ba L A Ba N. Limited utility of acetoxymethyl (am)-based intracellular delivery systems, in vivo: interference by extracellular esterases, 2007.
- [121] Austin L. Reese and Ege T. Kavalali. Spontaneous neurotransmission signals through store-driven ca^{2+} transients to maintain synaptic homeostasis. *eLife*, 4, 7 2015. ISSN 2050084X. doi: 10.7554/eLife.09262.001.
- [122] Huanmian Chen, Henry L. Puhl, Srinagesh V. Koushik, Steven S. Vogel, and Stephen R. Ikeda. Measurement of fret efficiency and ratio of donor to acceptor concentration in living cells. *Biophysical Journal*, 91:L39–L41, 2006. ISSN 00063495. doi: 10.1529/biophysj.106.088773. URL <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.106.088773>.
- [123] wisstock. wisstock/domb-napari: Zenodo release v0.3.0. 2025. doi: 10.5281/ZENODO.14843771. URL <https://zenodo.org/records/14843771>.
- [124] Nicholas Sofroniew, Talley Lambert, Grzegorz Bokota, Juan Nunez-Iglesias, Peter Sobolewski, Andrew Sweet, Lorenzo Gaifas, Kira Evans, Alister Burt, Draga Doncila Pop, Kevin Yamauchi, Melissa Weber Mendonça, Genevieve Buckley, Wouter-Michiel Vierdag, Loic Royer, Ahmet Can Solak, Kyle I. S. Harrington, Jannis Ahlers, Daniel Althviz Moré, Oren Amsalem, Ashley Anderson, Andrew Annex, Peter Boone, Jordão Bragantini, Matthias Bussonnier, Clément Caporal, Jan Eglinger, Andreas Eisenbarth, Jeremy Freeman, Christoph Gohlke, Kabilar Gunalan, Hagai Har-Gil, Mark Harfouche, Volker Hilsenstein, Katherine Hutchings, Jessy Lauer, Gregor

- Lichtner, Ziyang Liu, Lucy Liu, Alan Lowe, Luca Marconato, Sean Martin, Abigail McGovern, Lukasz Migas, Nadalyn Miller, Hector Muñoz, Jan-Hendrik Müller, Christopher Nauroth-Kreß, David Palecek, Constantin Pape, Eric Perlman, Kim Pevey, Gonzalo Peña-Castellanos, Andrea Pierré, David Pinto, Jaime Rodríguez-Guerra, David Ross, Craig T. Russell, James Ryan, Gabriel Selzer, MB Smith, Paul Smith, Konstantin Sofiiuk, Johannes Soltwedel, David Stansby, Jules Vanaret, Pam Wadhwa, Martin Weigert, Jonas Windhager, Philip Winston, and Rubin Zhao. napari: a multi-dimensional image viewer for python. doi: 10.5281/ZENODO.14719463. URL <https://zenodo.org/records/14719463>.
- [125] Charles R Harris, K Jarrod Millman, Stéfan J van der Walt, Ralf Gommers, Pauli Virtanen, David Cournapeau, Eric Wieser, Julian Taylor, Sebastian Berg, Nathaniel J Smith, Robert Kern, Matti Picus, Stephan Hoyer, Marten H van Kerkwijk, Matthew Brett, Allan Haldane, Jaime Fernández del Río, Mark Wiebe, Pearu Peterson, Pierre Gérard-Marchant, Kevin Sheppard, Tyler Reddy, Warren Weckesser, Hameer Abbasi, Christoph Gohlke, and Travis E Oliphant. Array programming with {NumPy}. *Nature*, 585:357–362, 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2649-2. URL <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2649-2>.
- [126] Siu Kwan Lam, Antoine Pitrou, and Stanley Seibert. Numba: a llvm-based python jit compiler. In *Proceedings of the Second Workshop on the LLVM Compiler Infrastructure in HPC*, SC15, page 1–6. ACM, November 2015. doi: 10.1145/2833157.2833162. URL <http://dx.doi.org/10.1145/2833157.2833162>.
- [127] Donald Erb. pybaselines: A Python library of algorithms for the baseline correction of experimental data. URL <https://github.com/derb12/pybaselines>.
- [128] Stéfan van der Walt, Johannes L Schönberger, Juan Nunez-Iglesias, François

- Boulogne, Joshua D Warner, Neil Yager, Emmanuelle Gouillart, Tony Yu, and the scikit-image contributors. scikit-image: image processing in {P}ython. *PeerJ*, 2:e453, 2014. ISSN 2167-8359. doi: 10.7717/peerj.453. URL <https://doi.org/10.7717/peerj.453>.
- [129] Pauli Virtanen, Ralf Gommers, Travis E Oliphant, Matt Haberland, Tyler Reddy, David Cournapeau, Evgeni Burovski, Pearu Peterson, Warren Weckesser, Jonathan Bright, Stéfan J van der Walt, Matthew Brett, Joshua Wilson, K Jarrod Millman, Nikolay Mayorov, Andrew R J Nelson, Eric Jones, Robert Kern, Eric Larson, C J Carey, İlhan Polat, Yu Feng, Eric W Moore, Jake VanderPlas, Denis Laxalde, Josef Perktold, Robert Cimrman, Ian Henriksen, E A Quintero, Charles R Harris, Anne M Archibald, Antônio H Ribeiro, Fabian Pedregosa, Paul van Mulbregt, and SciPy 1.0 Contributors. {SciPy} 1.0: Fundamental algorithms for scientific computing in python. *Nature Methods*, 17:261–272, 2020. doi: 10.1038/s41592-019-0686-2.
- [130] Eleftherios Garyfallidis, Matthew Brett, Bagrat Amirbekian, Ariel Rokem, Stefan van der Walt, Maxime Descoteaux, and Ian Nimmo-Smith. Dipy, a library for the analysis of diffusion mri data. *Frontiers in Neuroinformatics*, 8, February 2014. ISSN 1662-5196. doi: 10.3389/fninf.2014.00008. URL <http://dx.doi.org/10.3389/fninf.2014.00008>.
- [131] The pandas development team. pandas-dev/pandas: Pandas, February 2020. URL <https://doi.org/10.5281/zenodo.3509134>.
- [132] Luke Campagnola, Eric Larson, Almar Klein, David Hoese, Siddharth, Cyrille Rossant, Adam Griffiths, Nicolas P. Rougier, asnt, Lorenzo Gaifas, Kai Mühlbauer, Alexander Taylor, MSS, Talley Lambert, sylv21, Ashley Anderson, Alex J. Champandard, Max Hunter, Thomas Robitaille, Mustafa Furkan Kaptan, Elliott Sales de Andrade, Grzegorz Bokota, Guillaume Favelier, Mark Harfouche, Etienne Combrisson, ThenTech, fschill, Alessandro

- Bacchini, and Michael Aye. vispy/vispy: v0.15.0, 2025. URL <https://zenodo.org/doi/10.5281/zenodo.15263124>.
- [133] J. D. Hunter. Matplotlib: A 2d graphics environment. *Computing in Science & Engineering*, 9(3):90–95, 2007. doi: 10.1109/MCSE.2007.55.
- [134] Norman Matloff. The art of r programming. *Book*, page 373, 2011. ISSN 0003-066X. doi: QA276.4.M29252011. URL <http://www.nostarch.com/artofr.htm>.
- [135] Hadley Wickham, Mara Averick, Jennifer Bryan, Winston Chang, Lucy McGowan, Romain François, Garrett Grolemond, Alex Hayes, Lionel Henry, Jim Hester, Max Kuhn, Thomas Pedersen, Evan Miller, Stephan Bache, Kirill Müller, Jeroen Ooms, David Robinson, Dana Seidel, Vitalie Spinu, Kohske Takahashi, Davis Vaughan, Claus Wilke, Kara Woo, and Hiroaki Yutani. Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4:1686, 11 2019. doi: 10.21105/JOSS.01686.
- [136] Pipe-friendly framework for basic statistical tests • rstatix. URL <https://rpkgs.datanovia.com/rstatix/>.
- [137] Derek Young, Tatiana Benaglia, Didier Chauveau, David Hunter, and Kedai Cheng. mixtools: Tools for analyzing finite mixture models, October 2006. URL <http://dx.doi.org/10.32614/CRAN.package.mixtools>.
- [138] Tongxi Hu, Yang Li, Xuesong Zhang, and Kaiguang Zhao. Rbeast: Bayesian change-point detection and time series decomposition, May 2019. URL <http://dx.doi.org/10.32614/CRAN.package.Rbeast>.
- [139] Alboukadel Kassambara. ggpubr: “ggplot2” based publication ready plots, July 2016. URL <http://dx.doi.org/10.32614/CRAN.package.ggpubr>.
- [140] Thomas Lin Pedersen. ggforce: Accelerating “ggplot2”, November 2016. URL <http://dx.doi.org/10.32614/CRAN.package.ggforce>.

- [141] Yoav Benjaminit and Yosef Hochberg. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology*, 57:289–300, 1 1995. ISSN 1369-7412. doi: 10.1111/J.2517-6161.1995.TB02031.X. URL <https://dx.doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>.
- [142] Claire L. Palmer, Wonil Lim, Peter G.R. Hastie, Marie Toward, Viktor I. Korolchuk, Stephen A. Burbidge, George Banting, Graham L. Collingridge, John T.R. Isaac, and Jeremy M. Henley. Hippocalcin functions as a calcium sensor in hippocampal ltd. *Neuron*, 47:487–494, 8 2005. ISSN 08966273. doi: 10.1016/j.neuron.2005.06.014.
- [143] Ye Sheremet, B Olifirov, A Okhrimenko, V Cherkas, O Bagatskaya, and P Belan. Hippocalcin distribution between the cytosol and plasma membrane of living cells. 52:2–13, 2020. doi: 10.1007/s11062-020-09845-6.