

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.

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.

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.