



НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА НАУКОВА УСТАНОВА
«КИЇВСЬКИЙ АКАДЕМІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ



ЕКСПРЕСІЯ ТА ПРОСТОРОВИЙ РОЗПОДІЛ НЕЙРОННОГО КАЛЬЦІЄВОГО СЕНСОРНОГО БІЛКА ГІПОКАЛЬЦИНУ В СУБКЛІТИННИХ КОМПАРТМЕНТАХ

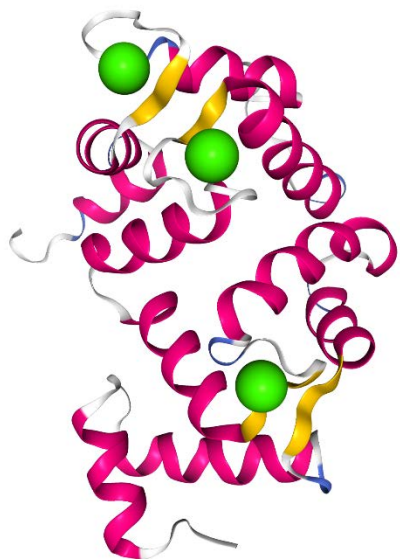
Дисертація на здобуття наукового
ступеня кандидата біологічних наук
03.00.02 – біофізика (біологічні науки)

26.05.2020

Здобувач:
Шеремет Євгеній Юрійович

Науковий керівник:
д.б.н., професор Білан П.В.

Гіпокальцин (HPCA)



(rcsb.org/structure/5G4P)

- нейронний Ca^{2+} -сенсорний (NCS) білок
- експресується нейронами гіпокампа
- має 4 Ca^{2+} -зв'язувальні домени

функція

sAHP

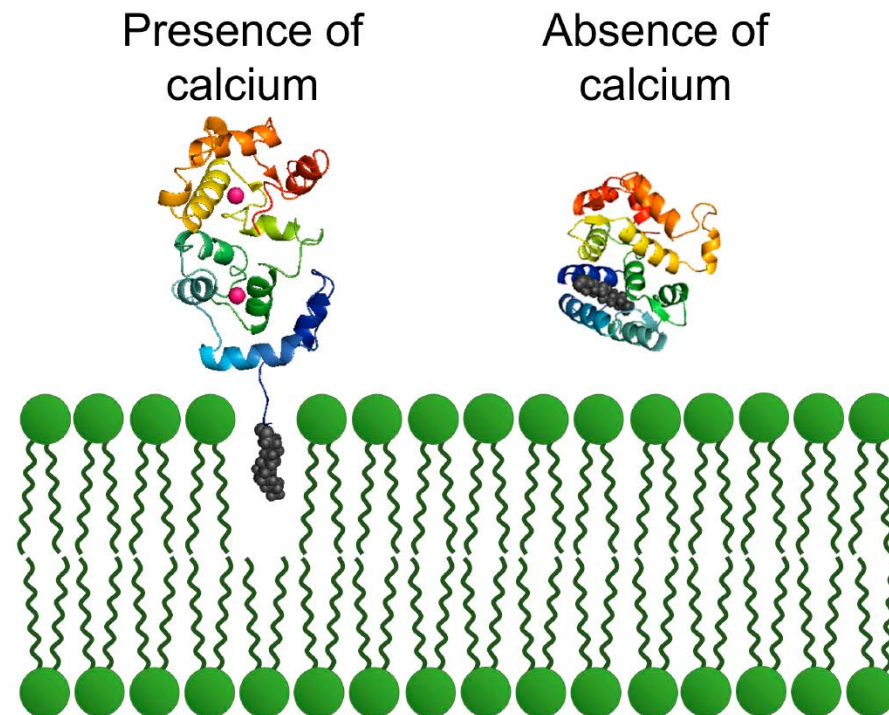
NMDAR LTD

нейропротекція

дисфункція

проблеми з пам'яттю

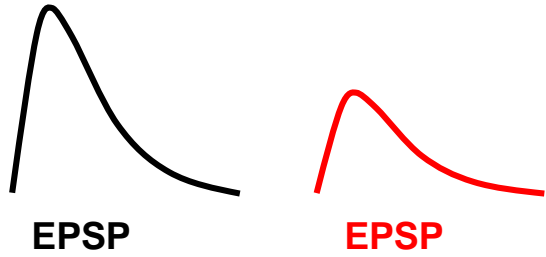
DYT2 дистонія



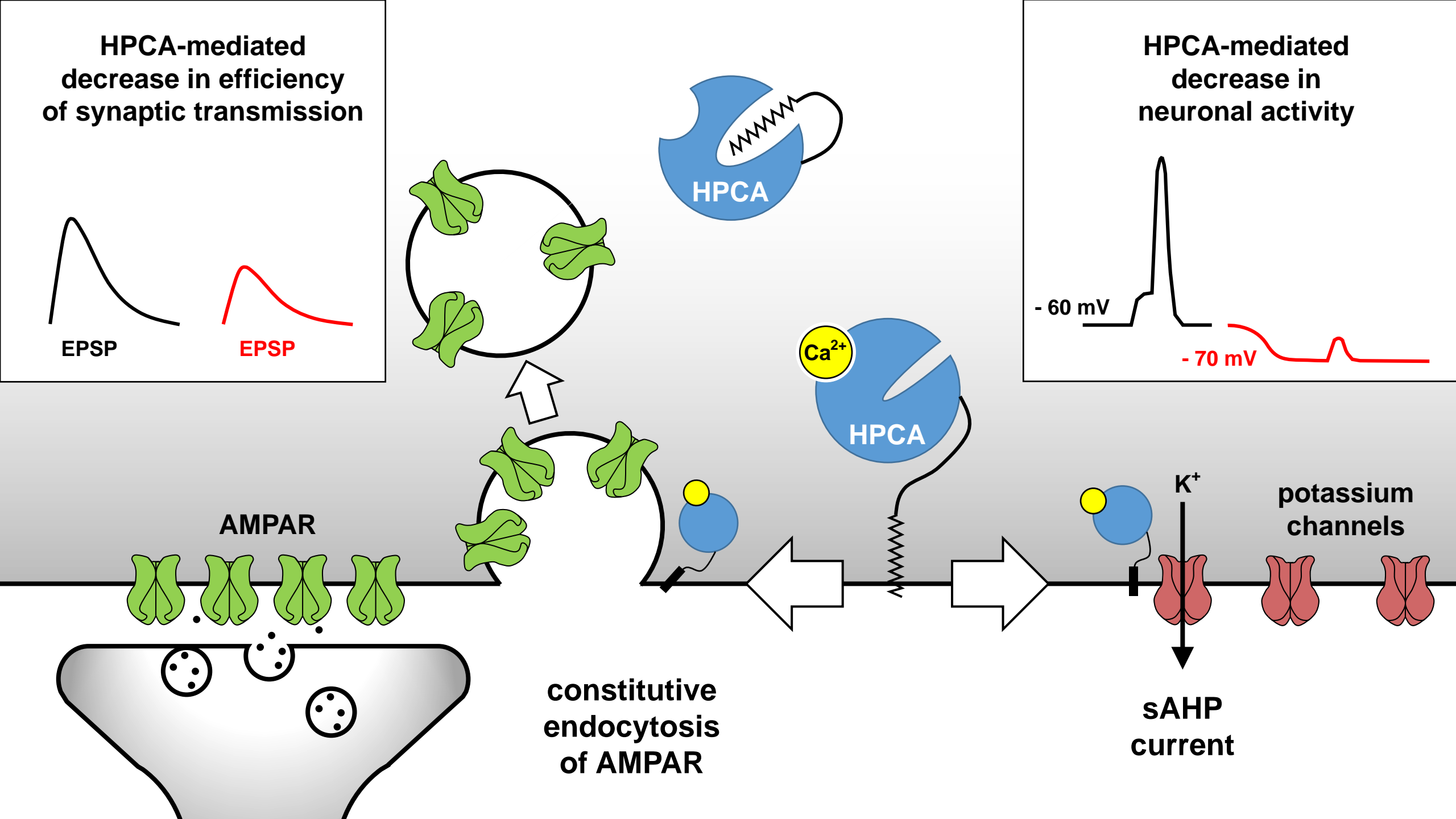
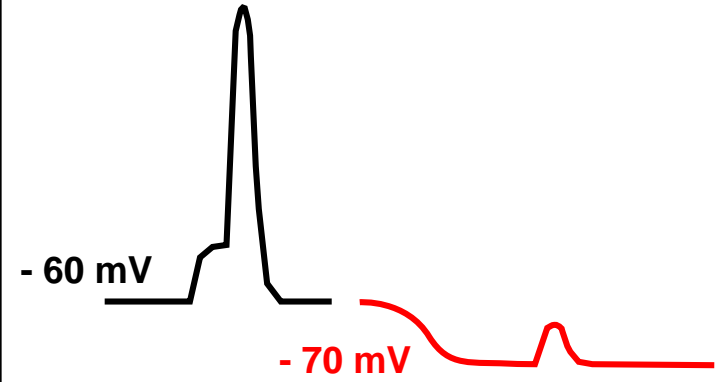
(Potvin-Fournier, Kim et al. 2017)

Жодних кількісних оцінок розподілу гіпокальцину між цитозолем та плазматичною мембраною не отримано.

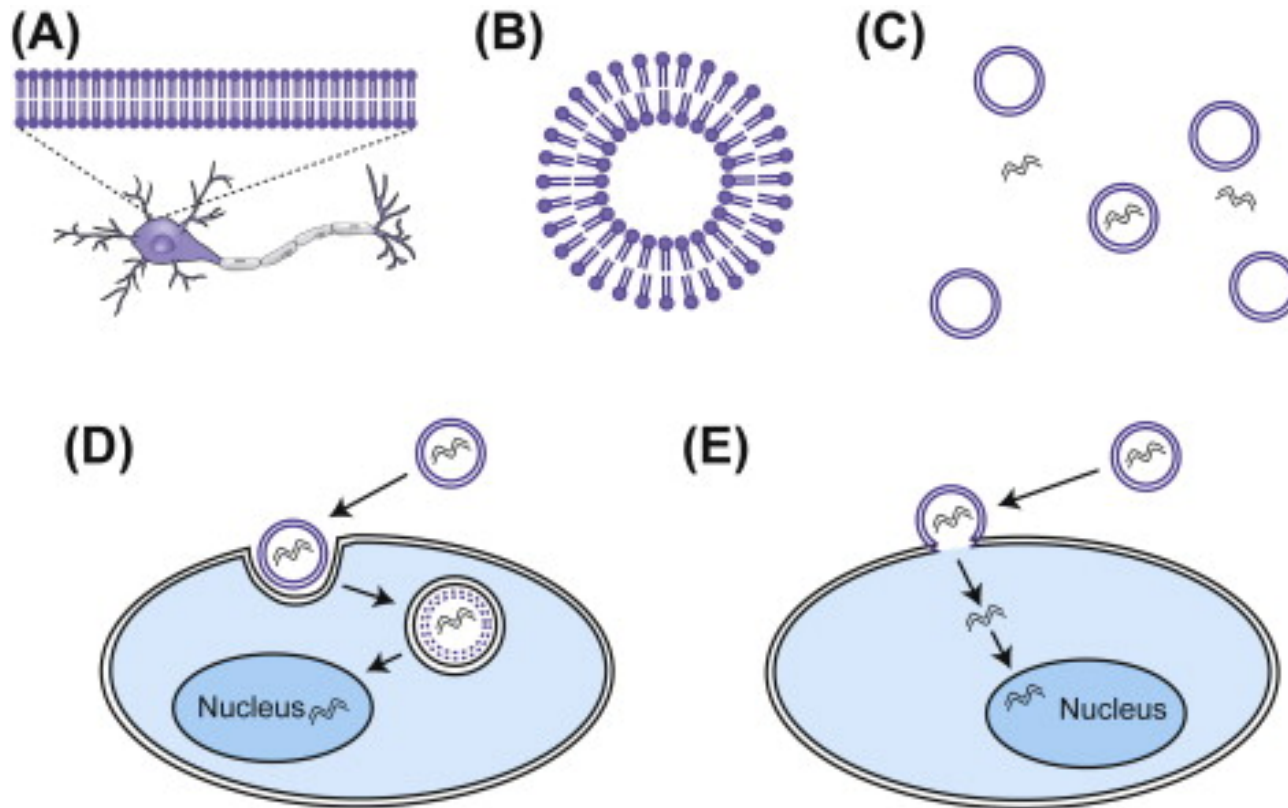
HPCA-mediated decrease in efficiency of synaptic transmission



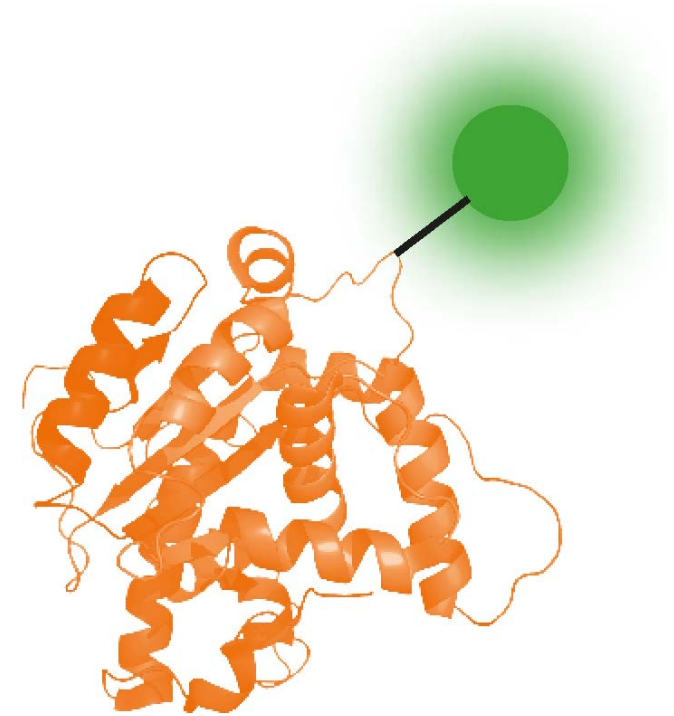
HPCA-mediated decrease in neuronal activity



Транзйєнтна трансфекцйя флуоресцентно-мйчених бйлкйв



(Matt Carter, Jennifer Shieh 2015)



Важливо знати концентрацйю екзогенно-експресованого бйлка порйвняно з ендогенним

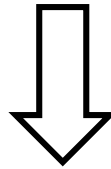
Мета роботи – оцінити експресію та просторовий розподіл нейронного кальцієвого сенсорного білка гіпокальцину в живих клітинах.

Завдання:

1. Розробити підхід для оцінки концентрації флуоресцентно-мічених білків всередині живих, нормально функціонуючих клітин.
2. Розробити підхід для оцінки концентрації мобільної та нерухомої (імобілізованої у внутрішньоклітинних компартментах) фракцій флуоресцентних білків у дифузійно-компактних клітинах.
3. Оцінити концентрацію екзогенно-експресованого флуоресцентно-міченого гіпокальцину в дендритах нейронів гіпокампа.
4. Оцінити розподіл гіпокальцину між цитозолем та плазматичною мембраною дендритів гіпокампальних нейронів.
5. Оцінити фракційний розподіл гіпокальцину між цитозолем та плазматичною мембраною клітин з простою геометрією.

Підхід до оцінки концентрації флуоресцентно-мічених білків у живих клітинах

$$F = E_{ex} E_{em} V [L]$$



$$\frac{F^{tar}}{F^{ref}} = A \frac{[L^{tar}]}{[L^{ref}]}$$

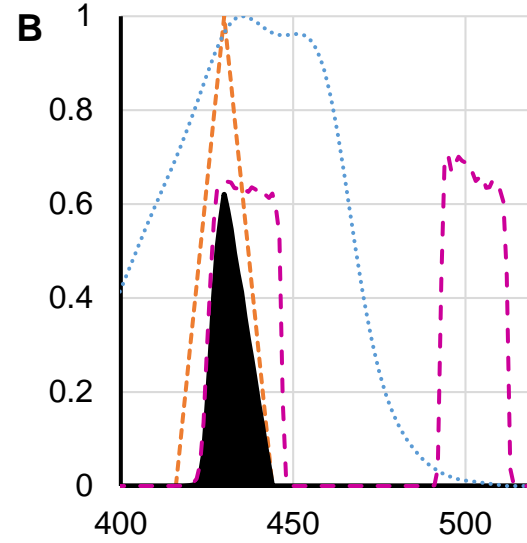
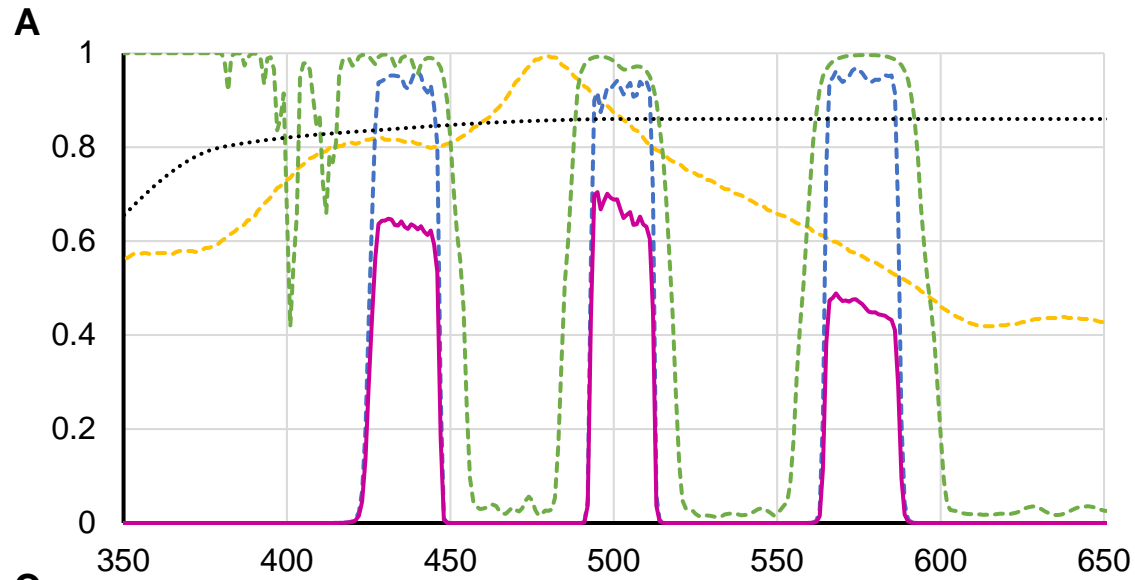
Відношення **інтенсивностей флуоресценції** досліджуваної та контрольної міток

Відношення **концентрацій** досліджуваної та контрольної міток

Коефіцієнт пропорційності

(залежить тільки від параметрів обладнання та флуорофорів)

Підхід до оцінки концентрації флуоресцентно-мічених білків у живих клітинах



$$A = \frac{E_{ex}^1 E_{em}^1}{E_{ex}^2 E_{em}^2}$$

$$A = 2.77$$

Cerulean / Venus

$$A = 1.32$$

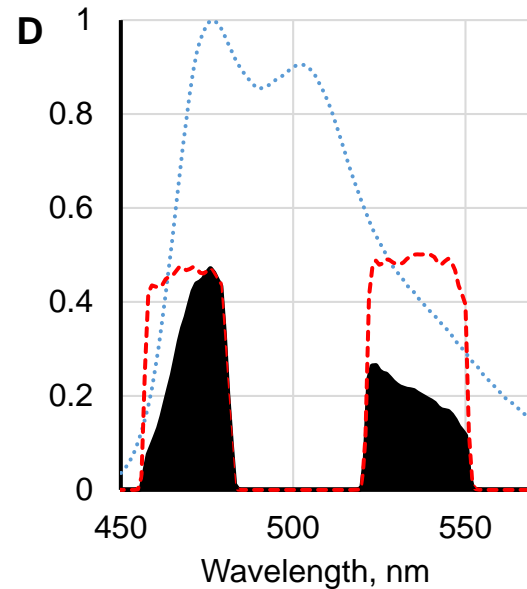
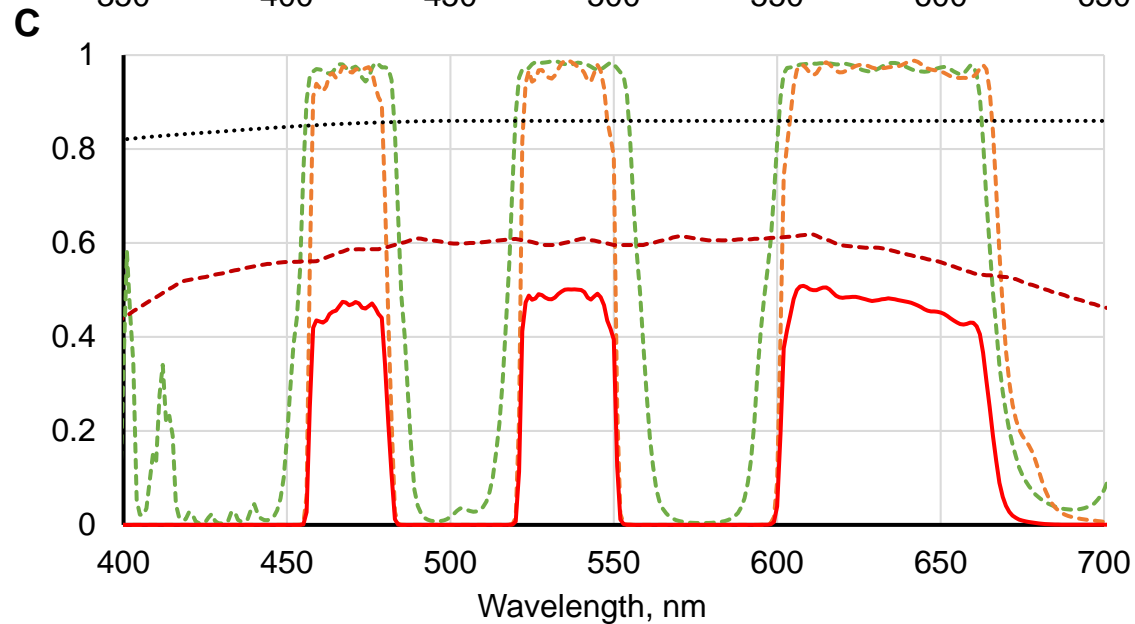
Oregon Green 488 /
Alexa Fluor 594

$$A = 18.6$$

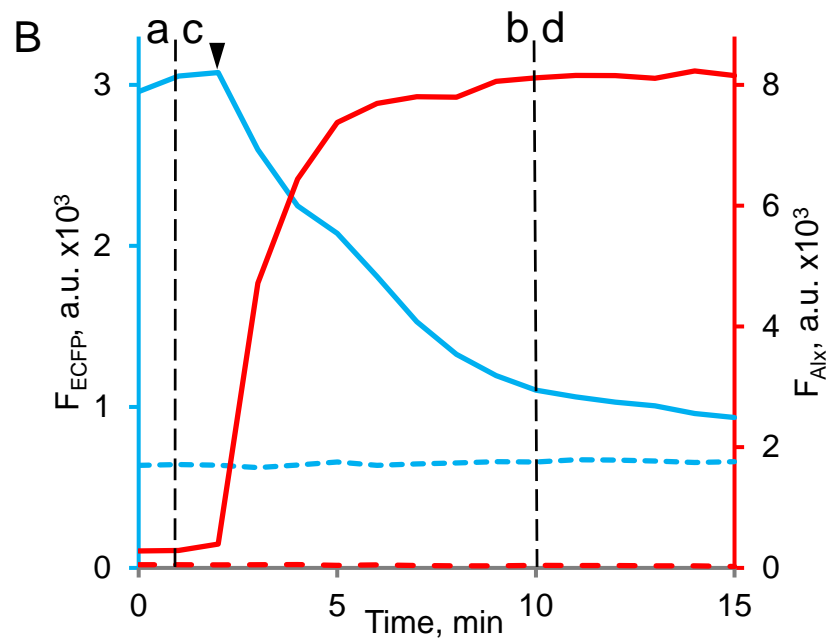
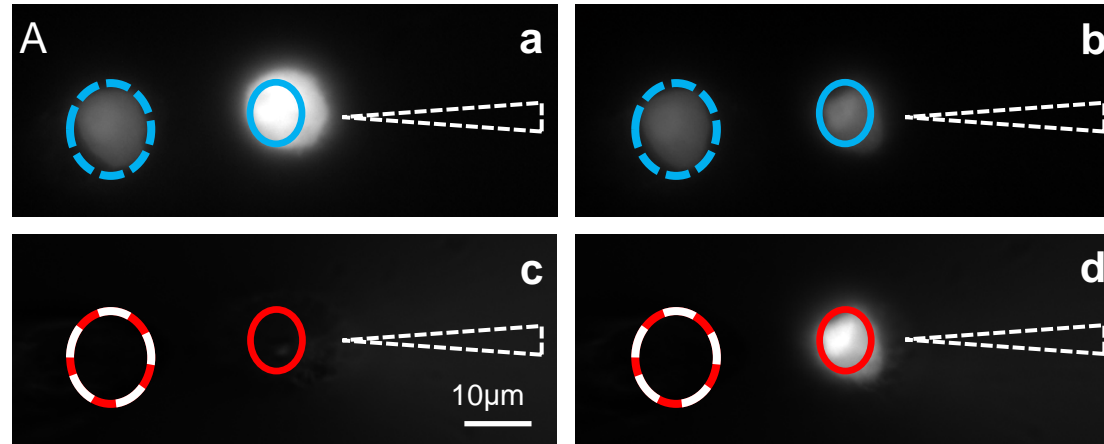
ECFP / Alexa Fluor 594

$$A = 1.02$$

EYFP / Alexa Fluor 594

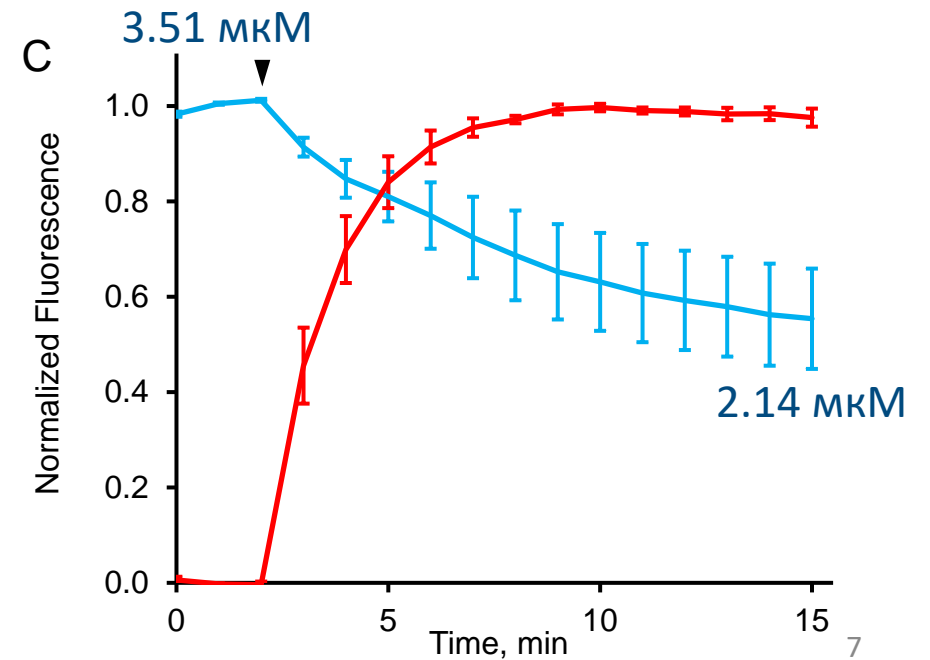


Оцінка концентрації рухомої та нерухомої фракцій флуоресцентного білка в дифузійно-компактних клітинах



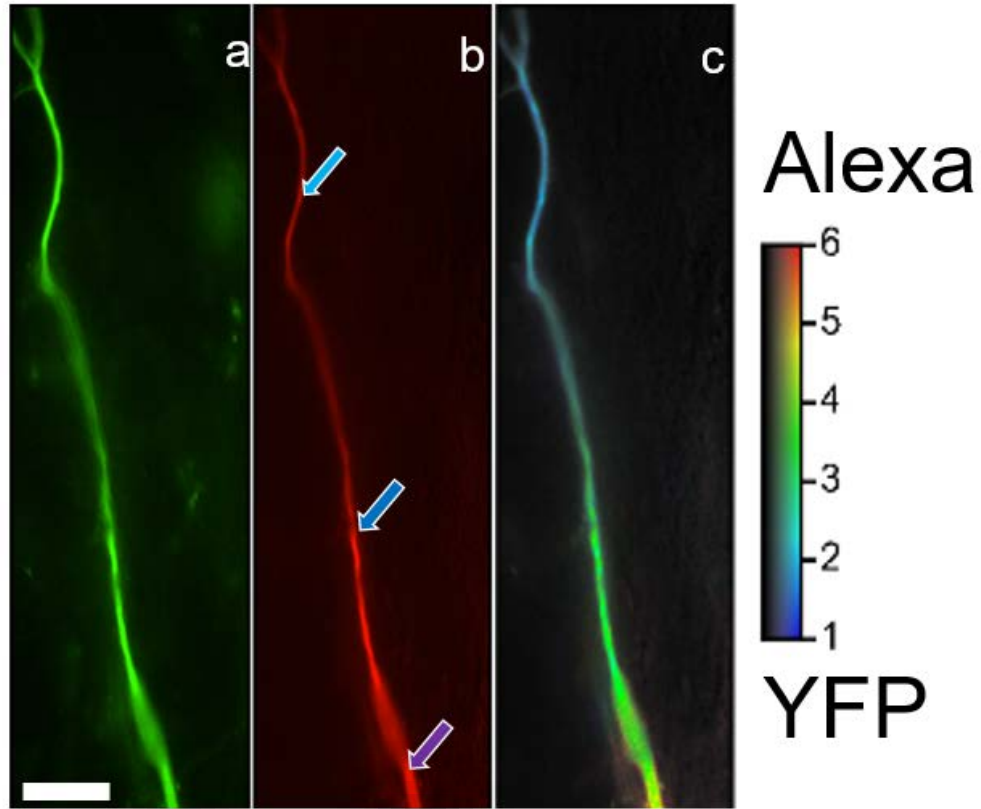
$$\frac{F^{ECFP}}{F^{Alexa}} = A \frac{[L^{ECFP}]}{[L^{Alexa}]}$$

$$[L^{ECFP}] = 3.51 \text{ мкМ}$$

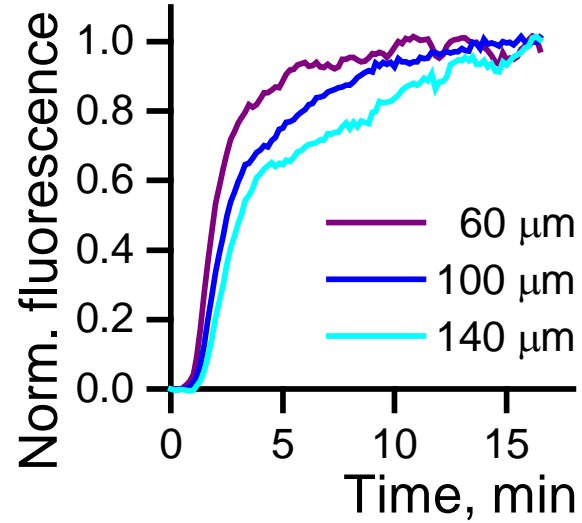


Оцінка концентрації екзогенно-експресованого гіпокальцину в дендритах нейронів гіпокампа

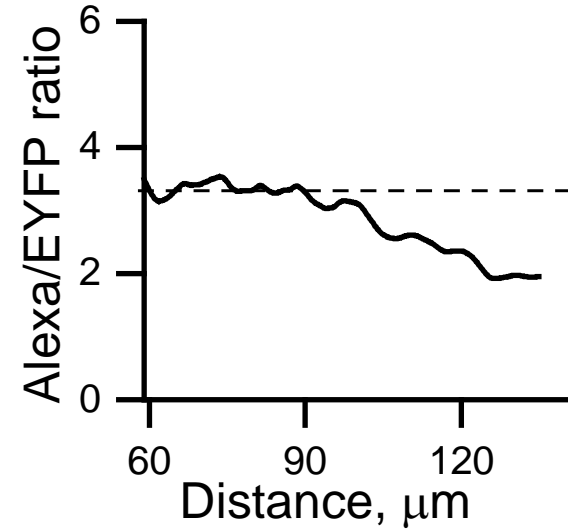
A



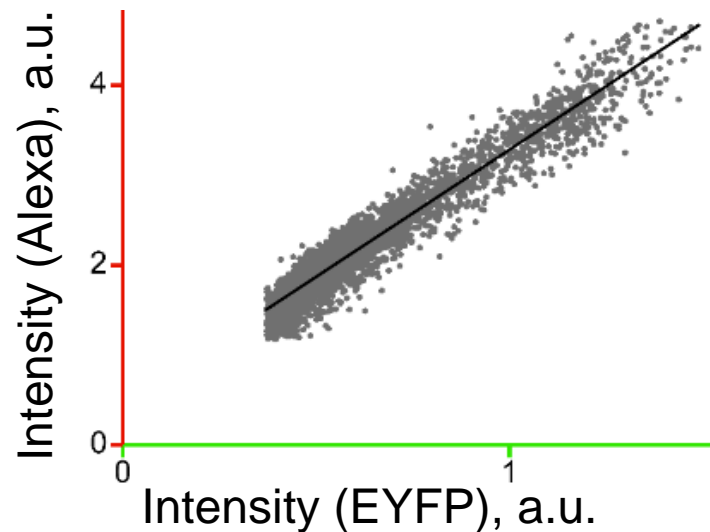
B



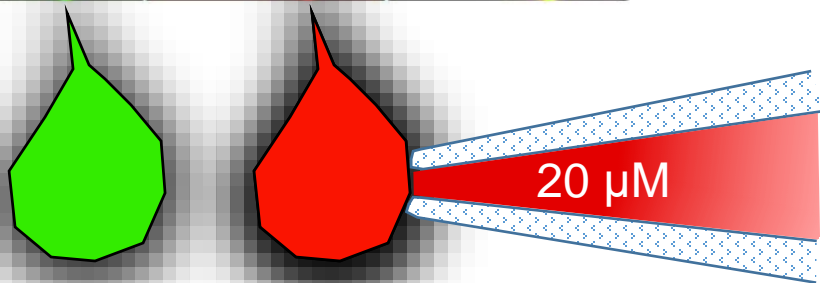
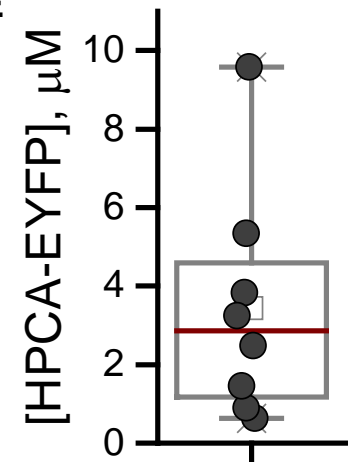
C



D



E

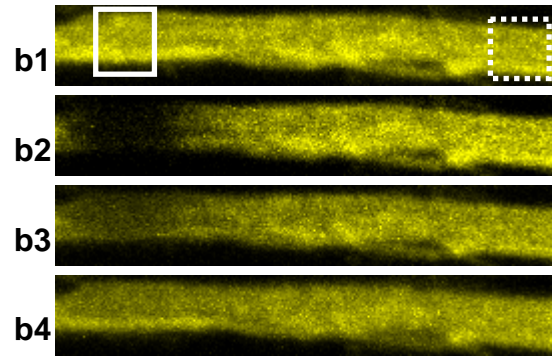
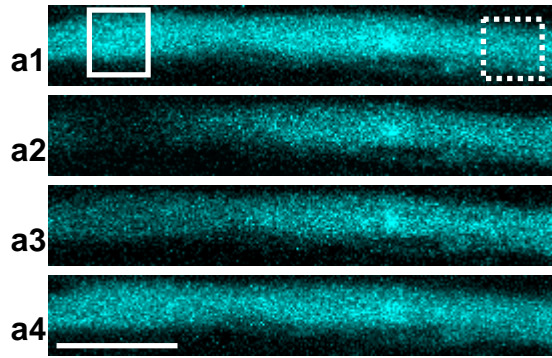


Оцінка розподілу гіпокальцину в дендритах нейронів гіпокампа на основі його коефіцієнта дифузії

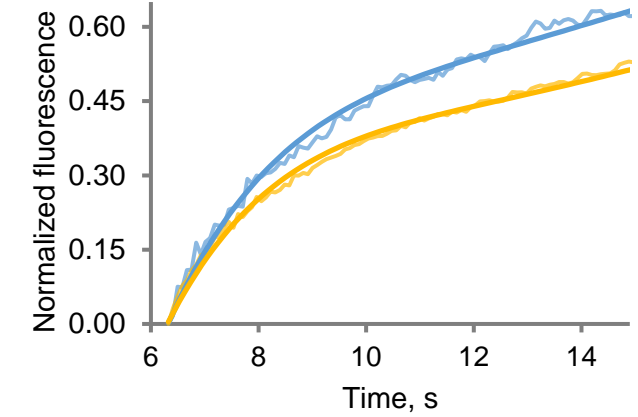
цитозольні – 15–40 $\mu\text{m}^2/\text{s}$

мембранні – $\sim 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$

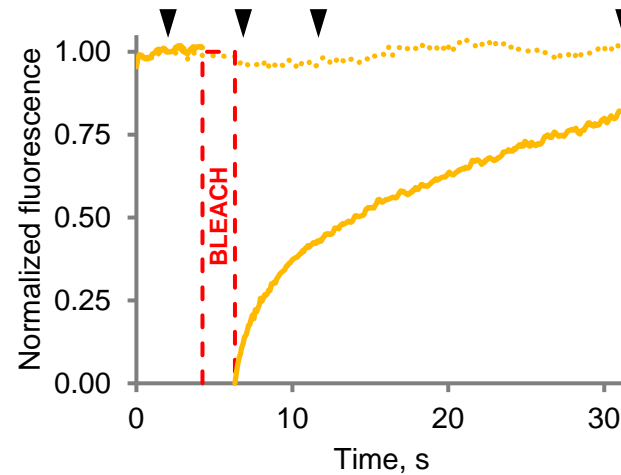
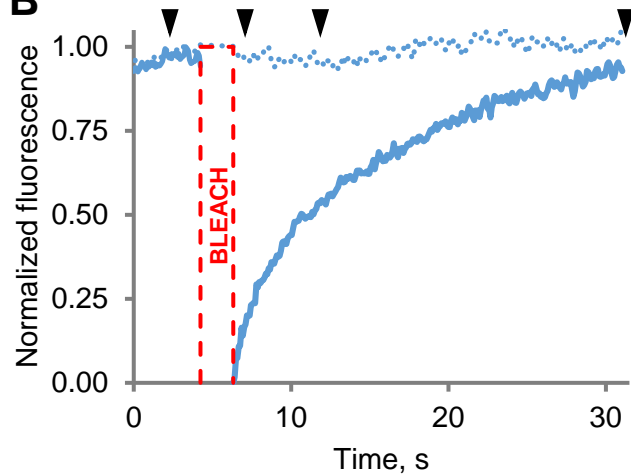
A



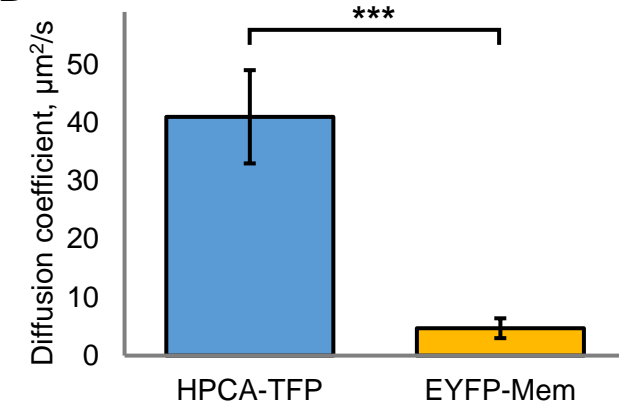
C



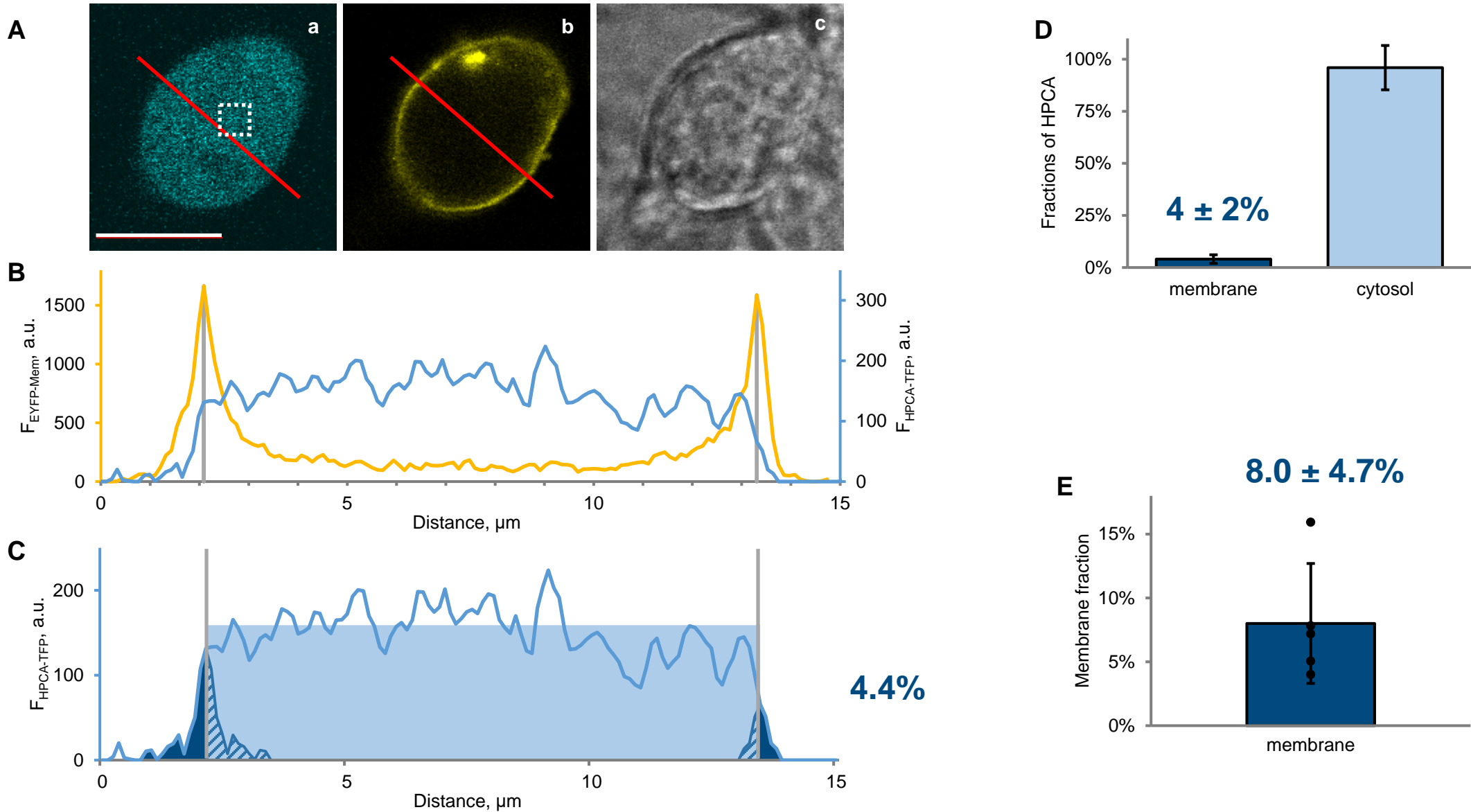
B



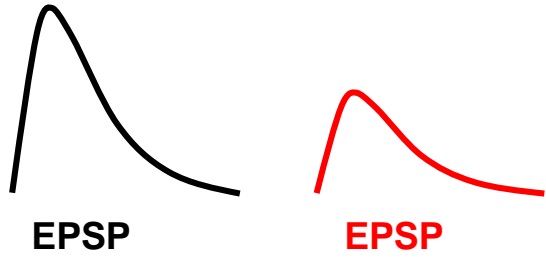
D



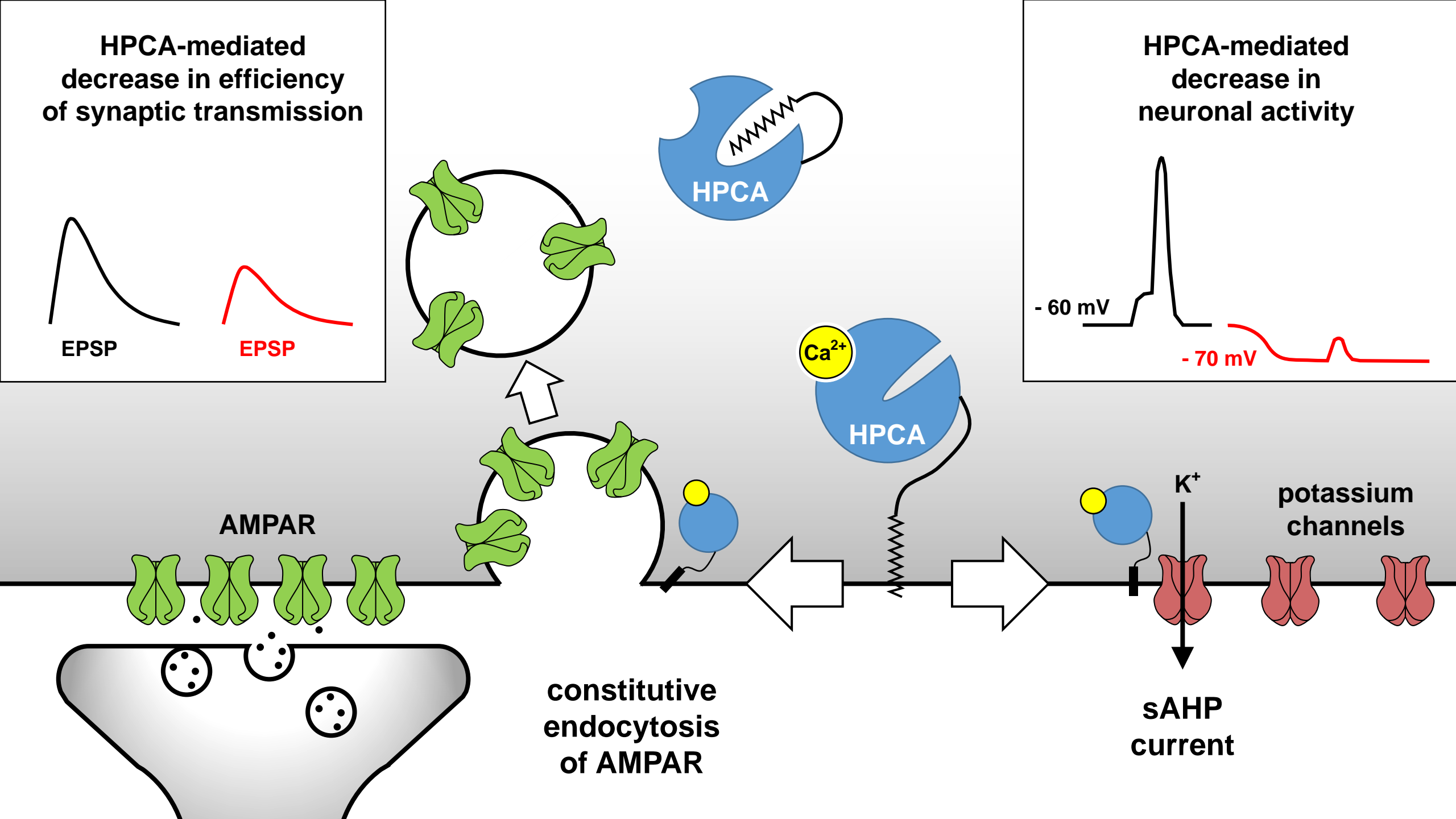
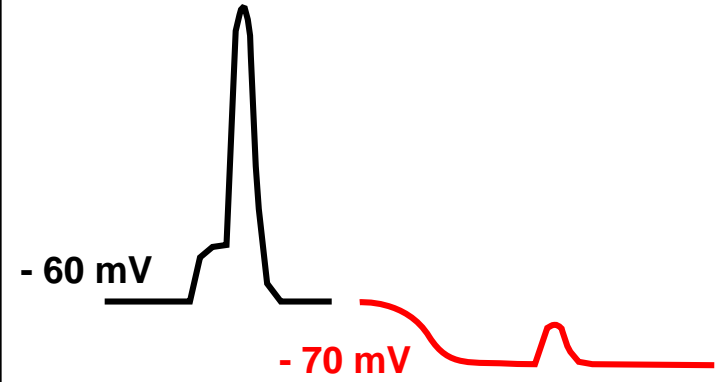
Оцінка цитозольної та мембранної фракцій гіпокальцину в клітинах з простою геометрією



HPCA-mediated decrease in efficiency of synaptic transmission



HPCA-mediated decrease in neuronal activity



Висновки

В дисертаційній роботі відповідно до мети і поставлених завдань було розроблено нові підходи вимірювання й оцінки біофізичних параметрів нейронного кальцієвого сенсорного білка гіпокальцину, проведено їх валідацію та продемонстровано їх реалізацію у експериментах. Було оцінено концентрацію гіпокальцину всередині клітини та у субклітинних компартментах, а також його розподіл між цитозолем та плазматичною мембраною живих клітин.

1. Запропоновано підхід до вимірювання внутрішньоклітинної концентрації флуоресцентно-мічених білків, що базується на спектральних властивостях флуорофорів та оптичного обладнання. Вперше розроблено та проведено оцінку точності такого підходу. Точність підходу дозволяє застосовувати його до вимірювання концентрацій флуоресцентних міток в широкому спектрі біофізичних експериментів у клітинах та субклітинних компартментах, включаючи тонкі відростки нейронів.
2. Розроблено підхід, який дозволяє окремо вимірювати кількість мобільної та нерухомої (імобілізованої у внутрішньоклітинних компартментах) фракцій флуоресцентних білків у дифузійно-компактних клітинах.
3. Концентрація екзогенно-експресованого флуоресцентно-міченого гіпокальцину в дендритах нейронів гіпокампу втричі нижча за концентрацію ендogenousного білка. Це дозволяє використовувати генетичні методи експресії флуоресцентно-міченого гіпокальцину для вивчення його біофізичних властивостей без суттєвого впливу на ендogenousну сигналізацію гіпокальцину.
4. Гіпокальцин при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$ здебільшого перебуває в цитозолі, хоча певна частина молекул все ж може бути вбудована і в плазматичну мембрану.
5. Аналіз конфокальних зображень оптичних зрізів клітин, що експресують гіпокальцин, показав, що в плазматичній мембрані живих клітин при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$ може бути присутня лише невелика частка гіпокальцину. Оцінка мембранної фракції даного білка не перевищувала 8% у досліджуваних клітинах, що говорить про помірну активацію мембранних білків-мішеней гіпокальцину в умовах спокою.

Дякую за увагу