

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

ШЕРЕМЕТ ЄВГЕНІЙ ЮРІЙОВИЧ

УДК 612.822 : 577.112 : 577.322

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

03.00.02 – біофізика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2020

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі молекулярної біофізики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Білан Павло Володимирович
Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України
завідувач відділу молекулярної біофізики.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Сиволоб Андрій Володимирович
Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Тараса
Шевченка
професор кафедри загальної та медичної генетики

доктор медичних наук, професор
Соловйов Анатолій Іванович
Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
НАМН України»
завідувач відділу фармакології клітинних сигнальних систем
та експериментальної терапії

Захист дисертації відбудеться « 22 » вересня 2020 р. о 12:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ, вул. Богомольця, 4

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та на сайті інституту:
http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council

Автореферат розісланий « 20 » серпня 2020 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

кандидат біологічних наук



Любанова О.П

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Складні просторово-часові зміни внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) можуть бути ефективно декодовані нейронними кальцієвими сенсорними білками (англ. Neuronal Ca^{2+} -sensor proteins, NCS), які належать до суперсімейства EF-hand-вмісних білків (Burgoyne 2007; Burgoyne et al. 2019). Більшість цих білків здатні змінювати конформацію після зв'язування одного-чотирьох йонів кальцію, що дозволяє їм вибірково взаємодіяти та регулювати свої молекулярні мішені (Burgoyne and Haynes 2015; Ikura and Ames 2006). Гіпокальцин (англ. Hippocalcin, HPCA) – це NCS білок, який експресується виключно в ЦНС, при чому найвищі рівні експресії спостерігаються в гіпокампі, корі, смугастому тілі та мозочку (Charlesworth et al. 2015). Експерименти з мишами, яким було виконано процедуру нокауту гену, що кодує білок гіпокальцин, продемонстрували важливість HPCA для функціонування просторової та асоціативної пам'яті (Kobayashi et al. 2005). Показано, що аномалії в експресії або у функціонуванні HPCA пов'язані з різними розладами розвитку мозку та нейродегенеративними захворюваннями (Burgoyne et al. 2019). Крім того, останні результати свідчать про те, що аутосомно-рецесивна первинна ізольована дистонія (DYT2) може бути пов'язана з певними точковими мутаціями в гені, що кодує HPCA (Charlesworth et al. 2015; Osypenko et al. 2019).

Молекула гіпокальцину містить три функціональні EF-hand домени, які здатні зв'язувати Ca^{2+} , а N-кінець амінокислотної послідовності HPCA в ході посттрансляційної модифікації ковалентно зв'язується із залишком міристинової кислоти (Helassa et al. 2017; O'Callaghan, Terpik, and Burgoyne 2003). Завдяки цим особливостям будови, HPCA здатен до швидкої та оборотної Ca^{2+} -залежної зміни конформації (Ames et al. 1997), що призводить до його подальшого переміщення (або транслокації) на плазматичну мембрану у відповідь на нейронну активність (Dovgan et al. 2010; Markova et al. 2008). Перебуваючи безпосередньо на внутрішній поверхні плазматичної мембрани, HPCA може активувати та регулювати свої мембранні молекулярні мішені (Palmer et al. 2005; Tzingounis et al. 2007).

Хоча явище Ca^{2+} -залежної транслокації HPCA на плазматичну мембрану досить добре вивчене, жодних кількісних оцінок розподілу HPCA між цитозолем та плазматичною мембраною отримано не було. Дані оцінки, а також розробка методів їх отримання є важливими для кращого розуміння біофізичних механізмів, що лежать в основі функціонування як HPCA, так і інших NCS білків.

Зв'язок роботи з науковими програмами, грантами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана відповідно до загального плану науково-дослідних робіт структурної лабораторії молекулярної біофізики відділу загальної фізіології нервової системи (з 22.05.2017 р. – відділу молекулярної біофізики) Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в рамках науково-дослідних робіт: «Ендогенна та фармакологічна регуляція внутрішньоклітинної та міжклітинної сигналізації в клітинах нервової системи в нормі та патології» (2011 – 2013; номер державної реєстрації – 0110U004750), «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» (2012 – 2016; номер державної реєстрації – 0112U001475),

«Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014 – 2018; номер державної реєстрації – 0113U007273), «Сигналізація нейрональних кальцієвих сенсорних білків в нейронах ЦНС в нормі і патології» (2019 – 2023; номер державної реєстрації – 0118U007345), «Біофізичні та молекулярно-генетичні механізми регуляції фізіологічних та патологічних процесів» (2017 – 2021; номер державної реєстрації – 0116U004470), а також в рамках науково-дослідних проектів «Створення сучасної нанобіомедичної технології для реєстрації електричної активності збудливих клітин організму за допомогою квантових точок» (2015 – 2019, номер державної реєстрації – 0115U003683).

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

Для досягнення мети дослідження було поставлено такі **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.

Об'єкт дослідження – нейронний кальцієвий сенсорний білок гіпокальцин.

Предмет дослідження – зміни біофізичних властивостей, експресії та розподілу нейронного кальцієвого сенсорного білка гіпокальцину.

Методи дослідження. Методи клітинної біології (культивування клітин різних типів), молекулярної фізіології та генетики (екзогенна експресія білків за допомогою транз'єнтної трансфекції), електрофізіології (внутрішньоклітинна перфузія), біофізики (флуоресцентна та конфокальна мікроскопія, відновлення флуоресценції після фотознебарвлення), математики й статистики (точкове перемноження спектральних характеристик оптичних елементів, алгебраїчна обробка флуоресцентних зображень, розв'язання систем рівнянь у часткових похідних, апроксимація експериментальних кривих, статистична обробка даних тощо).

Наукова новизна отриманих результатів. В дисертаційній роботі вперше запропоновано підхід до оцінки внутрішньоклітинної концентрації флуоресцентно міченого гіпокальцину, який базується виключно на спектральних характеристиках компонентів оптичного обладнання та параметрах флуорофорів. Вперше розроблено та реалізовано процедуру оцінки точності такого підходу. За допомогою запропонованого підходу в даній роботі вдалося вперше отримати кількісну оцінку концентрації екзогенно експресованого гіпокальцину в субклітинних компартментах, дендритах нейронів гіпокампа. Вперше було проведено оцінку одновимірного коефіцієнта дифузії флуоресцентно міченого гіпокальцину в дендритах гіпокампальних нейронів. На клітинах з простою геометрією вперше було отримано

кількісну оцінку розподілу гіпокальцину між цитозолем та плазматичною мембраною при базальному рівні внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} .

Практичне значення отриманих результатів. Підхід до вимірювання внутрішньоклітинної концентрації флуоресцентно мічених білків може бути застосований в надзвичайно широкому спектрі біофізичних досліджень, адже його можна реалізувати практично для будь-яких флуоресцентних барвників та конфігурацій експериментального обладнання для реєстрації флуоресценції. Більше того, якщо одноразово отримати усю необхідну інформацію, то результати проміжних обчислень можна застосовувати для багатьох пар різноманітних флуорофорів протягом усього періоду експлуатації оптичного обладнання. Даний підхід в комбінації з електрофізіологічним методом фіксації мембранного потенціалу в конфігурації «ціла клітина» за рахунок природньої перфузії внутрішньоклітинного середовища дозволяє окремо вимірювати мобільну та нерухому (імобілізовану у внутрішньоклітинних компартментах) фракції флуоресцентних білків.

Результати вимірювань рівня експресії гіпокальцину в дендритах нейронів гіпокампа, біофізичних параметрів та розподілу білка між цитозолем та плазматичною мембраною живих клітин мають переважно фундаментальне значення. Той факт, що концентрація екзогенно експресованого гіпокальцину принаймні втричі нижча за оціночну концентрацію ендогенного білка, дає можливість використовувати генетичні методи експресії флуоресцентно міченого гіпокальцину для вивчення його біофізичних властивостей без суттєвого впливу на ендогенну сигналізацію гіпокальцину. Порівняно низьке значення оцінки мембранної фракції говорить про відносно низьку концентрацію гіпокальцину на мембрані при базальному рівні $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Проте цього може бути цілком достатньо для помірної активації мембранних білків-мішеней гіпокальцину, що є цікавою основою для майбутніх досліджень. Зрештою, експериментальні підходи та кількісні оцінки, запропоновані у роботі, можна застосувати для розробки точної біофізичної моделі клітинної сигналізації гіпокальцину та інших NCS білків в живих клітинах.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем були сформульовані завдання дослідження, разом з співавторами були сплановані та виконані усі серії експериментів. Експерименти, пов'язані з конфокальною мікроскопією; аналіз флуоресцентних зображень, статистична обробка та узагальнення отриманих результатів були проведені здобувачем самостійно.

Електрофізіологічні та флуоресцентні експерименти на інвертованих системах IX70, IX71 були проведені разом із співавторами опублікованих робіт науковими співробітниками Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, к. б. н. Черкасом В. П. та к. б. н. Довганем О. В. Розробка методу оцінки мембранної фракції білка гіпокальцину в клітинах НЕК 293 проводилася у співпраці з магістрантом Київського академічного університету Оліфіровим Б. О.

Формулювання мети дослідження, обговорення отриманих результатів та формулювання висновків проводилося за безпосередньої участі наукового керівника доктора біологічних наук, професора Білана П. В., а також доктора біологічних наук, професорки Войтенко Н. В. Науковий керівник, д. б. н., професор Білан П. В. є відповідальним автором усіх наукових праць, в яких опубліковані результати роботи.

Апробація результатів дисертації. Дисертаційну роботу апробовано у вигляді усних доповідей з публікацією тез на наукових конференціях: XVIII Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Теоретичні і прикладні проблеми фізики, математики та інформатики» (12–13 травня 2020 року, Київ, Україна); XVII Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Теоретичні і прикладні проблеми фізики, математики та інформатики» (25–26 квітня 2019 року, Київ, Україна); VI з'їзді Українського біофізичного товариства (26–29 травня 2015 року, Луцьк – Світязь, Україна); XIX з'їзді Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченого 90-річчю від дня народження академіка П. Г. Костюка (24–26 травня 2015 року, Львів, Україна); у вигляді публічних лекцій на щорічних студентських школах «Біофізичні методи досліджень в нейронауках та фізіології» (2017–2019, Київ, Україна), а також на семінарах сектору нейронаук Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України (2016).

Публікації. Результати досліджень опубліковано у 6 працях: 2 – статті у наукових фахових виданнях, які індексуються в міжнародних наукометричних базах Scopus та Web of Science Core Collection. (одна з яких входить до першого квартилю (Q1) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank) та 4 тез доповідей на конференціях, симпозіумах і з'їздах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, 4 розділів, висновків, списку використаних джерел (86 посилань), 1 додатку, 17 рисунків та 1 таблиці. Основний текст роботи викладено на 109 сторінках. Загальний обсяг роботи становить 129 сторінок.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Всі процедури виконано з урахуванням положень Європейської Конвенції із захисту тварин, яких використовують в експериментах (Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 № 3447–IV та положень Комітету з біоетики Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Культура нейронів гіпокампа. Гіпокампи були отримані від новонароджених щурів лінії Вістар (вік 0–1 день), що були швидко декапітовані без наркозу. Усі щури були з віварію Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця (Київ, Україна). Гіпокампи новонароджених щурів ферментативно дисоціювали трипсином. Суспензію клітин при початковій щільності $3\text{--}5 \cdot 10^5$ клітин на см^2 наносили на покривне скло, покрите ламініном та полі-D-лізином. Клітини витримували в живильному розчині, що складався з мінімально необхідного середовища (Minimal Essential Medium, MEM-), 1% кінської сироватки та інших необхідних добавок у зволоженій атмосфері, що містить 5% CO_2 при 37°C , як описано раніше (O'Callaghan et al. 2002).

Недиференційовані клітини PC12 та клітини людської ембріональної нирки (НЕК 293) були отримані з Банку клітинних культур Національної академії наук України (Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна). Клітини

культивували на круглих скляних покривних скельцях у Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки, 5% кінської сироватки (тільки для клітин PC12) та 0.25% гентаміцину. Клітини вирощували в культуральних 12-лункових чашках при 37°C, у вологій атмосфері, що містила 5% CO₂.

Транзйентна трансфекція. Клітини трансфікували плазмiдами за допомогою двокомпонентного реагенту Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, США). Всі процедури виконувались згідно протоколів та рекомендацій, наданих виробником. Кількість ДНК для трансфекції одного круглого покривного скельця діаметром 18 мм складала 0.2–0.5 мкг для клітин PC12 та HEK 293, та 0.5–1.0 мкг для культуральних нейронів гіпокампа відповідно. Ефективність трансфекції становила ~75% для клітин PC12 та HEK 293, та ~ 1–5% для нейронів гіпокампа відповідно.

Плазмiди, що кодують тандемний конструктор Cerulean-Venus (CTV), посилений цiановий флуоресцентний білок (ECFP) та гіпокальцин, мічений посиленим жовтим флуоресцентним білком (HPCA-EYFP), були ампліфіковані з конструкторів, описаних раніше (O'Callaghan et al. 2002; Thaler et al. 2005). Плазмiда pEYFP-Mem кодує химерний білок, що складається з короткої ділянки N-кінця білка нейромодуліну (також відомого як GAP-43), довжиною 20 амінокислот, та жовто-зеленого варіанта посиленого зеленого флуоресцентного білка, EYFP. Дану плазмiду було ампліфіковано з конструктору, наданого компанією BD Biosciences Clontech (Becton, Dickinson and Company, США). Плазмiда, що кодує гіпокальцин, мічений тіаловим флуоресцентним білком (HPCA-TFP), була субклонована з конструктору HPCA-YFP, описаного раніше (O'Callaghan et al. 2002).

Електрофізіологічні реєстрації. Електрофізіологічні реєстрації методом локальної фіксації потенціалу клітинної мембрани (петч-клемп) в режимі фіксації струму або напруги проводилися в конфігурації «ціла клітина» за допомогою підсилювача EPC-10/2, керованого програмним забезпеченням PatchMaster (НЕКА, Фрайбург, Німеччина) у поєднанні з інвертованим мікроскопом на базі шасі IX70 або IX71 (Olympus, Токіо, Японія). Позаклітинний розчин мав наступний склад (у ммоль/л): NaCl – 150, KCl – 2, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 1, HEPES – 10, глюкоза – 10 (pH 7.3, осмолярність 320 мОсм). Експерименти з нейронами гіпокампа проводили у присутності d-2-аміно-5-фосфонопентанової кислоти (AP5 або APV, 40 мкМ). Скляні петч-піпетки витягували на пуллері Sutter P-87 (Sutter instruments, США), із скляних заготовок BF150-86-10 Borosilcate glass with filament (зовнішній діаметр – 1.5 мм, внутрішній діаметр – 0.86 мм, довжина – 10 см) виробництва Sutter instruments (США). Петч-піпетки мали діаметр кінчика 1–2 мкм, а їх опір складав 3–5 МОм. Внутрішньоклітинний розчин містив (у ммоль/л): метансульфонову кислоту – 135, KCl – 10, MgATP – 4, EGTA – 1, Na₂GTP – 0.4, HEPES 10, фосфокреатин – 5 (рівень pH 7.3 досягався титруванням розчину за допомогою KOH, осмолярність 290 мОсм). У деяких експериментах внутрішньоклітинний розчин був доповнений барвниками Oregon Green 488 та Alexa Fluor 594.

Флуоресцентна мікроскопія. Клітини PC12 та нейрони гіпокампа, транзйентно трансфіковані плазмiдами, які кодують флуоресцентні білки, та клітини, заповнені флуоресцентними барвниками, візуалізували на епіфлуоресцентній системі TILL

Photonics (TILL Photonics, Gräfelfing, Німеччина), що контролюється програмним забезпеченням TILLvision. Епіфлуоресцентна система встановлена на інвертованих мікроскопах (IX70 або IX71, Olympus, Японія), обладнаних об'єктивами з масляною імерсією (40×1.35 або 60×1.25 ; Olympus, Японія). В якості джерела світла для збудження флуоресценції використовували ксенонову лампу з монохроматором. З метою мінімізації вицвітання флуорофорів, флуоресцентні зображення реєструвалися з низькою частотою (в діапазоні 0.03–0.1 Гц).

Конфокальна мікроскопія. Флуоресцентні реєстрації, пов'язані з оцінкою фракційного розподілу білка, а також з оцінкою одновимірного коефіцієнта дифузії гіпокальцину, були виконані на конфокальному лазерному скануючому мікроскопі Olympus FluoView FV1000 (Olympus, Японія) Центру колективного користування «Прилади і обладнання клітинної біофізики та фізіології» (Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна) з високоапертурним водо-імерсійним об'єктивом (60×1.00 , Olympus, Японія). Управління мікроскопом здійснювалося через пакет FV10-ASW. Типовий параметр конфокальності становив 150–300 мкм. Флуоресцентні зображення реєструвалися з частотою 5–15 Гц. Для збудження флуоресценції HPCA-TFP та EYFP-Mem використовувалися лінії 458 нм та 514.5 нм аргонного лазера з вихідною потужністю 40 мВт. З метою одержання найкращої роздільної здатності в часі, сканування проводили на максимальній швидкості з експозицією 2 мкс/піксель.

Фінішна обробка отриманих зображень (компенсація фотовицвітання, фонового шуму та автофлуоресценції), розв'язання рівнянь числовими методами та апроксимація експериментальних кривих методом найменших квадратів здійснювали за допомогою вбудованих модулів в середовищі MATLAB (Mathworks, США).

Кількісні результати подаються як середні значення чи медіана вибірки. Похибки визначалися як середньоквадратичні відхилення. Вірогідність різниці оцінювали за допомогою t-критерію Ст'юдента (* – $P \leq 0.05$, ** – $P \leq 0.01$, *** – $P \leq 0.001$).

Результати досліджень та їх обговорення

Візуалізацію розподілу та переміщення білків у живих клітинах як правило проводять за допомогою методів флуоресцентної мікроскопії у поєднанні з генетичними методами екзогенної експресії флуоресцентно мічених білків (Chalfie et al. 1994; Zlokarnik et al. 1998; Phair and Misteli 2001). Однією з головних проблем при використанні генетично кодованих білків є оцінка рівня експресії екзогенного білка порівняно з рівнем відповідного ендогенного. Важливо розуміти, чи не порушується клітинна сигналізація гіпокальцину через наявність додаткового, екзогенно експресованого флуоресцентно міченого гіпокальцину. Дану інформацію можна отримати з порівняння концентрації ендогенного та екзогенного білків. На жаль, засоби для кількісного аналізу концентрації білків на рівні окремих клітин та субклітинних компартментів залишаються недостатньо розвиненими, і оцінка концентрації гіпокальцину в живих клітинах потребує розробки нового, більш точного та простого підходу.

1. Підхід до вимірювання концентрації флуоресцентно мічених молекул

Інтенсивність флуоресценції, що надходить від флуоресцентної мітки, прямо пропорційна концентрації даної мітки (Lakowicz 2006):

$$F = E_{ex} E_{em} V [L], \quad (1.1)$$

де E_{ex} , E_{em} – ефективності збудження та емісії флуоресценції відповідно, V – об'єм зразка, наповненого флуорофором, а $[L]$ – концентрація флуоресцентної мітки.

Для обчислення E_{ex} та E_{em} необхідно враховувати спектральні властивості кожного оптичного елемента на відповідному світловому шляху епіфлуоресцентної системи, а також власні спектральні властивості флуоресцентної мітки в процесах поглинання збуджуючого світла та емісії флуоресцентного випромінювання (Gell, Brockwell, and Smith 2006). Розберемо це детально на прикладі флуоресцентного мікроскопа Olympus IX70/71 (Olympus, Японія).

Ефективність збудження можна представити у вигляді інтегралу-згортки:

$$E_{ex} = I \varepsilon \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} S_{src}(\lambda) S_{slit}(\lambda) S_{ex}(\lambda) (1 - S_{dichr}(\lambda)) S_{obj}(\lambda) S_{abs}^L(\lambda) d\lambda, \quad (1.2)$$

де $[\lambda_1, \lambda_2]$ – інтервал довжин хвиль пропускання монохроматора епіфлуоресцентної системи, $S_{src}(\lambda)$ – спектр випромінювання джерела світла, $S_{slit}(\lambda)$ – спектр пропускання монохроматора, $S_{ex}(\lambda)$ – спектр пропускання фільтра збудження, $S_{dichr}(\lambda)$ – спектр пропускання дихроїчного дзеркала, $S_{obj}(\lambda)$ – спектр пропускання об'єктива, а $S_{abs}^L(\lambda)$ – нормалізований спектр поглинання флуоресцентної мітки. ε – коефіцієнт екстинкції флуоресцентної мітки. I – інтенсивність джерела світла на максимумі його спектру. I скорочується в подальших обчисленнях.

Ефективність емісії, у свою чергу, можна виразити наступним інтегралом:

$$E_{em} = Q \int_{\lambda_3}^{\lambda_4} S_{em}^L(\lambda) S_{obj}(\lambda) S_{dichr}(\lambda) S_{em}(\lambda) S_{det} d\lambda, \quad (1.3)$$

де $[\lambda_3, \lambda_4]$ – інтервал довжин хвиль каналу реєстрації флуоресценції, Q – квантовий вихід флуоресцентної мітки, $S_{em}^L(\lambda)$, $S_{obj}(\lambda)$, $S_{dichr}(\lambda)$, $S_{em}(\lambda)$, S_{det} – це спектри випромінювання флуоресцентної мітки, пропускання об'єктива, пропускання дихроїчного дзеркала, пропускання фільтра емісії та нормалізованої чутливості детектора відповідно. Приклад обчислення E_{ex} та E_{em} для флуоресцентної мітки Cerulean показано на рис. 1.

Якщо уявити ситуацію, за якої один і той самий об'єм наповнений розчином двох флуоресцентних міток (які хімічно та оптично між собою не взаємодіють), при чому концентрація однієї з міток точно відома, то відповідно до рівняння (1.1) відношення інтенсивностей флуоресценції даних міток пропорційне відношенню їх концентрацій:

$$\frac{F^{tar}}{F^{ref}} = A \frac{[L^{tar}]}{[L^{ref}]}, \quad A = \frac{E_{ex}^{tar} E_{em}^{tar}}{E_{ex}^{ref} E_{em}^{ref}}, \quad (1.4)$$

де $[L^{tar}]$ та $[L^{ref}]$ – концентрації досліджуваної та контрольної (еталонної) міток відповідно; A – коефіцієнт, який залежить виключно від параметрів експериментального обладнання та оптичних властивостей флуорофорів, який надалі ми називатимемо *коефіцієнтом пропорційності*. Варто зауважити, що значення об'єму V скоротилося, тому визначати його не потрібно.

У свою чергу, концентрація досліджуваної мітки може бути обчислена як:

$$[L^{tar}] = \frac{1}{A} \frac{F^{tar}}{F^{ref}} [L^{ref}] \quad (1.5)$$

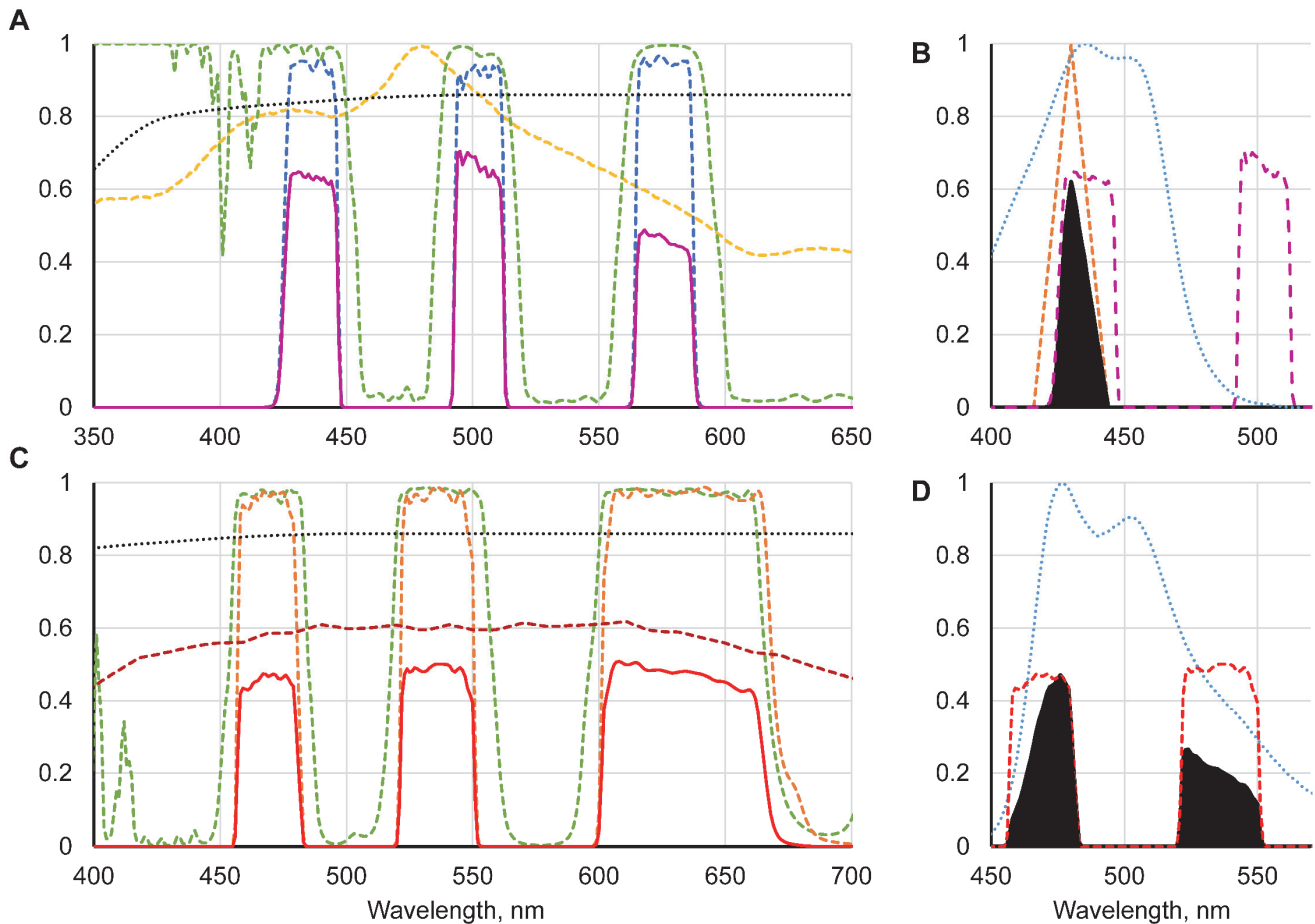


Рис. 1. Обчислення ефективностей збудження та емісії флуоресценції на прикладі Cerulean. Точкове множення оптичних компонентів на шляху збудження (А) та емісії флуоресценції (С). Пунктирні лінії – спектри усіх оптичних компонентів флуоресцентної системи мікроскопа; суцільні лінії – результат точкового множення. Подальша згортка даних кривих зі спектральними властивостями флуоресцентної мітки Cerulean дають величини, пропорційні E_{ex} та E_{em} (чорні області на В та D відповідно).

Зазвичай спектральні властивості оптичного обладнання, необхідні для обчислення коефіцієнта пропорційності, вважаються невідомими. Однак, з нашого досвіду, спектри у вигляді графіків чи таблиць постачаються разом із відповідним обладнанням, за винятком, хіба що, об'єтивів. Спектри пропускання об'єтивів були надані виробником (Olympus, Німеччина) в особистому листуванні. Таким чином, коефіцієнт пропорційності A може бути прямо обчислений для конкретної епіфлуоресцентної системи та конкретної пари флуоресцентних міток (рівняння 1.4), і надалі може бути використаний для оцінки концентрації цільової мітки, якщо концентрація еталонної мітки відома (рівняння 1.5).

Беручи до уваги усі наступні серії експериментів та тримаючи в голові всі флуоресцентні конструкти, що були в нашому розпорядженні, ми обчислили коефіцієнт пропорційності A для всіх необхідних пар флуорофорів (2.77 для Cerulean / Venus; 1.32 для Oregon Green 488 / Alexa Fluor 594; 18.6 для ECFP / Alexa Fluor 594; 1.02 для EYFP / Alexa Fluor 594).

2. Вимірювання внутрішньоклітинної концентрації флуоресцентних білків у дифузійно-компактних клітинах

Для того, аби продемонструвати можливість застосування нашого підходу для оцінки концентрації флуоресцентно мічених білків всередині живих клітин, ми вирішили виміряти концентрацію посиленого ціанового флуоресцентного білка (ECFP) у клітинах PC12, попередньо трансфікованих відповідною плазмідною. В якості контрольної флуоресцентної мітки було обрано Alexa Fluor 594. Для завантаження клітин контрольною міткою (з концентрацією 200 мкМ), ми застосували стандартну методику внутрішньоклітинної перфузії за допомогою методу локальної фіксації потенціалу клітинної мембрани (петч-клемп) у конфігурації «ціла клітина».

Ми обрали таке поле зору, куди потрапляють одразу дві клітини PC12, трансфіковані ECFP, та візуалізували флуоресценцію даної мітки (рис. 2Аа). Ліва клітина залишалася інтактною упродовж усього експерименту та використовувалася для моніторингу фотовицвітання флуоресцентного білка (блакитна пунктирна на рис. 2В) та фонового шуму для контрольної мітки (червона пунктирна на рис. 2В).

До правої клітини спершу підвели петч-піпетку, що містить відому концентрацію Alexa Fluor 594 та встановили конфігурацію «cell-attached» (без прориву плазматичної мембрани). Клітини візуалізували зі швидкістю один кадр в хвилину одразу після досягнення високоомного контакту. Після отримання перших трьох кадрів мембрану клітини проривали, встановлюючи конфігурацію «ціла клітина». Це дозволило Alexa Fluor 594 дифундувати в цитозоль клітини. Через 5–10 хв після прориву мембрани інтенсивність флуоресценції ECFP та Alexa Fluor 594 досягли стаціонарного рівня, що вказує на те, що концентрації Alexa Fluor 594 в піпетці та цитозолі вирівнялися, а ECFP вимився з цитозолем клітини. Важливо відмітити, що динаміка процесів врівноваження інтенсивностей флуоресценції співпадала для усіх клітин в даній серії експериментів (усереднені криві на рис. 2С).

Перші 3 кадри в каналі ECFP, отримані до прориву мембрани, і 5 кадрів у каналах ECFP та Alexa Fluor 594, отриманих у стаціонарному стані, були усереднені та використані для подальшого аналізу (ECFP-контроль, ECFP-плато та Alexa-плато, відповідно). Зображення ECFP-контролю та Alexa-плато використовувались для визначення відношення інтенсивностей флуоресценції міток та для подальшого обчислення концентрації ECFP за формулою 1.5. Для цього значення інтенсивності в результуючих зображеннях усереднювали всередині овальних областей (англ. region of interest або ROI), що відповідають цитозолем клітини, і контури яких показані на рис. 2А суцільними блакитною та червоною лініями.

Відношення інтенсивностей флуоресценції досліджуваної (ECFP-контроль) та контрольної (Alexa-плато) міток склало $\frac{F_{ECFP}}{F_{Alexa}} = 0.33$. Маючи завчасно обчислений коефіцієнт пропорційності A , специфічний для пари міток ECFP та Alexa Fluor 594 (див. попередній пункт), нам вдалося за формулою 1.5 обчислити ефективну цитоплазматичну концентрацію ECFP. Вона становила 3.51 мкМ для репрезентативної клітини та 4.01 ± 1.68 мкМ (медіана з міжквартильним розмахом, $n = 5$) в середньому для всіх протестованих клітин.

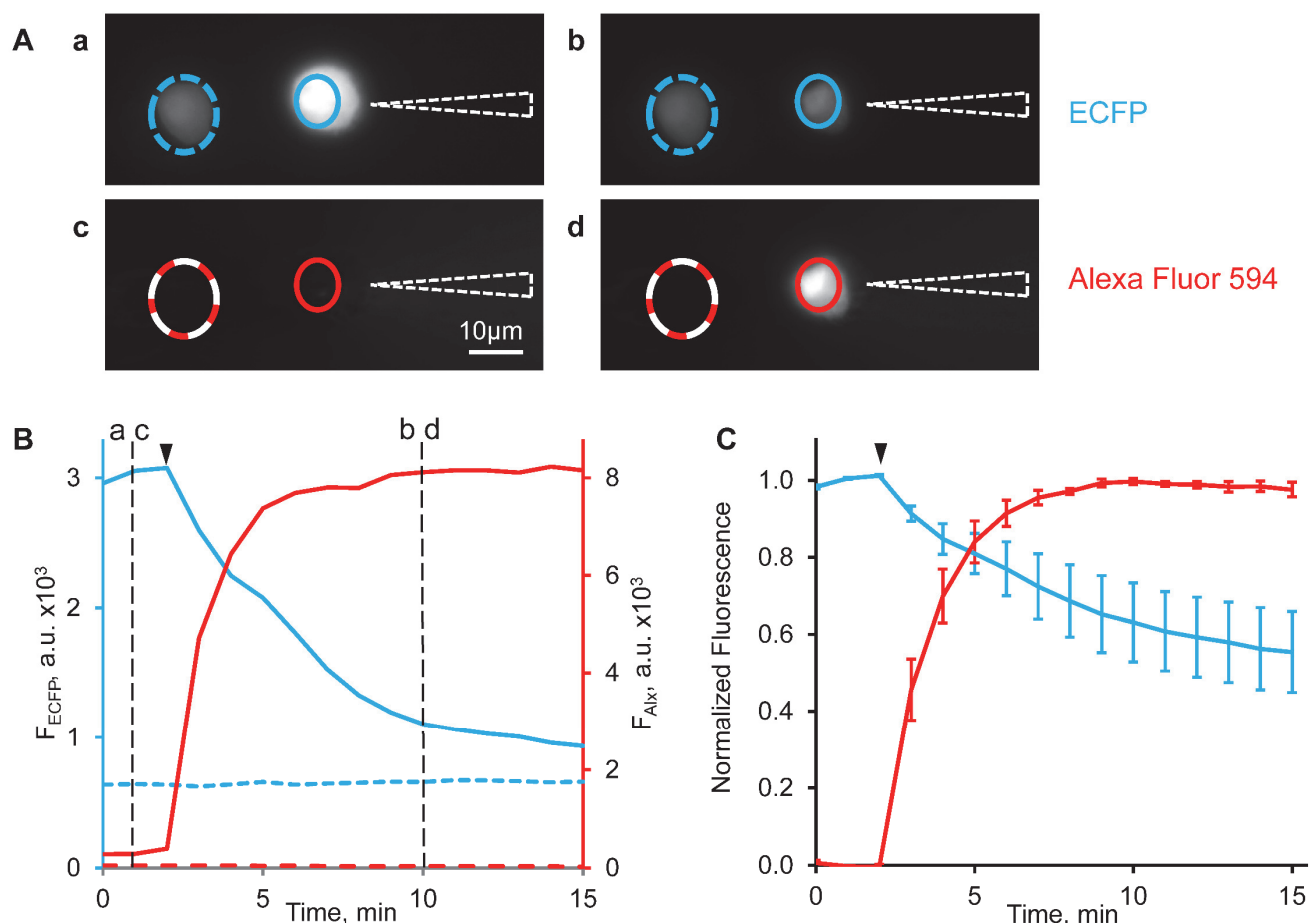


Рис. 2. Оцінка концентрації ECFP у клітинах PC12. А) Зображення двох клітин PC12, отриманих у каналах ECFP (a, b) та Alexa Fluor 594 (c, d), безпосередньо перед проривом клітинної мембрани (a, c) та через 10 хв після прориву (b, d). Відповідні моменти часу позначені чорними пунктирними лініями в (В). Положення петч-піпетки зображено на (А) білими пунктирними трикутниками. Мірна паличка 10 мкм. В) часові залежності вмивання Alexa Fluor 594 (червона крива) та вмивання ECFP (синя крива) та аналогічні залежності для інтактної контрольної клітини (пунктирні криві). Момент прориву мембрани позначено чорними стрілками на (В) та (С). С) нормалізовані та усереднені часові залежності вмивання Alexa Fluor 594 та вмивання ECFP, аналогічні тим, що в (В) ($n = 5$).

Запропонований підхід ґрунтується, серед іншого, на тому факті, що флуорофори, флуоресценція яких аналізується, займають однаковий об'єм. У всіх протестованих клітинах PC12 не вдалося повністю вимити ECFP з соми, що вказує на те, що суттєва частина ECFP зберігалася у внутрішньоклітинних компартаментах (наприклад, ендоплазматичному ретикулумі або комплексі Гольджі). Шляхом віднімання зображення ECFP-плато від ECFP-контролю, нам вдалося оцінити концентрацію рухомої фракції білка (2.14 мкМ (порівняно з ефективною цитоплазматичною концентрацією 3.51 мкМ).

Таким чином було продемонстровано, що даний підхід, серед іншого, дозволяє оцінювати окремо концентрації рухомої та нерухомої (імобілізованої у внутрішньоклітинних компартаментах) фракцій флуоресцентних білків.

3. Вимірювання концентрації екзогенно експресованого гіпокальцину в дендритах нейронів гіпокампа

Нейронний Ca^{2+} -сенсорний (NCS) білок гіпокальцин бере участь у Ca^{2+} -залежній сигналізації в дендритах гіпокампальних нейронів (Dovgan et al. 2010; Markova et al. 2008). Тому важливо було переконатися, що клітинна сигналізація гіпокальцину в нейронах гіпокампа істотно не порушується через наявність додаткового, екзогенно експресованого флуоресцентно міченого гіпокальцину. Рівень ендогенної експресії гіпокальцину в нейронах гіпокампа є найвищим серед усіх NCS-білків: концентрація білка становить близько 30 мкМ (Furuta et al. 1999; O'Callaghan et al. 2003).

Маючи на озброєнні підхід, описаний вище, ми виміряли концентрацію гіпокальцину, міченого посиленням жовтим флуоресцентним білком, HPCA-EYFP, у дендритному дереві нейронів гіпокампа, попередньо трансфікованих відповідною плазмідною. В якості контрольної флуоресцентної мітки ми обрали Alexa Fluor 594, як і в попередній серії експериментів.

Спершу ми зареєстрували флуоресценцію HPCA-EYFP у довгому апікальному дендриті нейрона гіпокампа (рис. 3Aa). Після цього ми підвели петч-піпетку до клітинної соми мембрану після досягнення високоомного контакту, встановивши конфігурацію «ціла клітина». Розчин, яким була заповнена петч-піпетка, містив контрольну мітку в концентрації 20 мкМ. Одразу після прориву клітинної мембрани контрольна мітка дифундувала у внутрішньоклітинне середовище, в тому числі у візуалізований раніше апікальний дендрит (рис. 3Ab).

Для реалізації нашого підходу дуже важливо, щоб концентрація контрольної мітки стала рівноважною, а розподіл – співпадав з HPCA-EYFP. Ми оцінили характерний час, необхідний для врівноваження концентрації Alexa Fluor 594 в проксимальній та дистальній частинах апікального дендрита при застосуванні конфігурації «ціла клітина». В даній серії експериментів (електричний опір доступу складав ~ 15 МОм) цей час становив близько 15 хв після прориву мембрани. Про це говорить і вихід кривої вмивання на полицку (рис. 3B), і стає відношення флуоресценції Alexa до гіпокальцину на перших 100 мкм від клітинної соми (рис. 3C).

З метою підвищення точності визначення відношення інтенсивностей флуоресценції досліджуваного білка до контрольної мітки, ми побудували кореляційний графік, відклавши по осях інтенсивності флуоресценції гіпокальцину та Alexa (кожна точка на такому графіку відповідає кожному пікселю зображення). Спостерігалася сильна лінійна кореляція (рис. 3D, $R^2 = 0.87$, нахил $\frac{F_{HPCA-YFP}}{F_{Alexa}} = 0.35$), тому надалі ми повернулися до обчислень через відношення середніх значень в ROI. Коефіцієнт пропорційності A для пари міток Alexa Fluor 594 та EYFP ми обчислили вище, і він становить 1.02. Тому концентрація екзогенно експресованого HPCA-EYFP у дендриті (за формулою 1.5) складає:

$$[L_{HPCA-EYFP}] = \frac{1}{A} \frac{F_{HPCA-YFP}}{F_{Alexa}} [L_{Alexa}] = \frac{1}{1.02} * 0.28 * 20 \mu\text{M} = 5.5 \text{ мкМ}, \quad (3.1)$$

для репрезентативної клітини, та 3.4 ± 1.1 мкМ (медіана з міжквартильним розмахом, $n = 8$, рис. 3E) для усіх нейронів в даній серії експериментів.

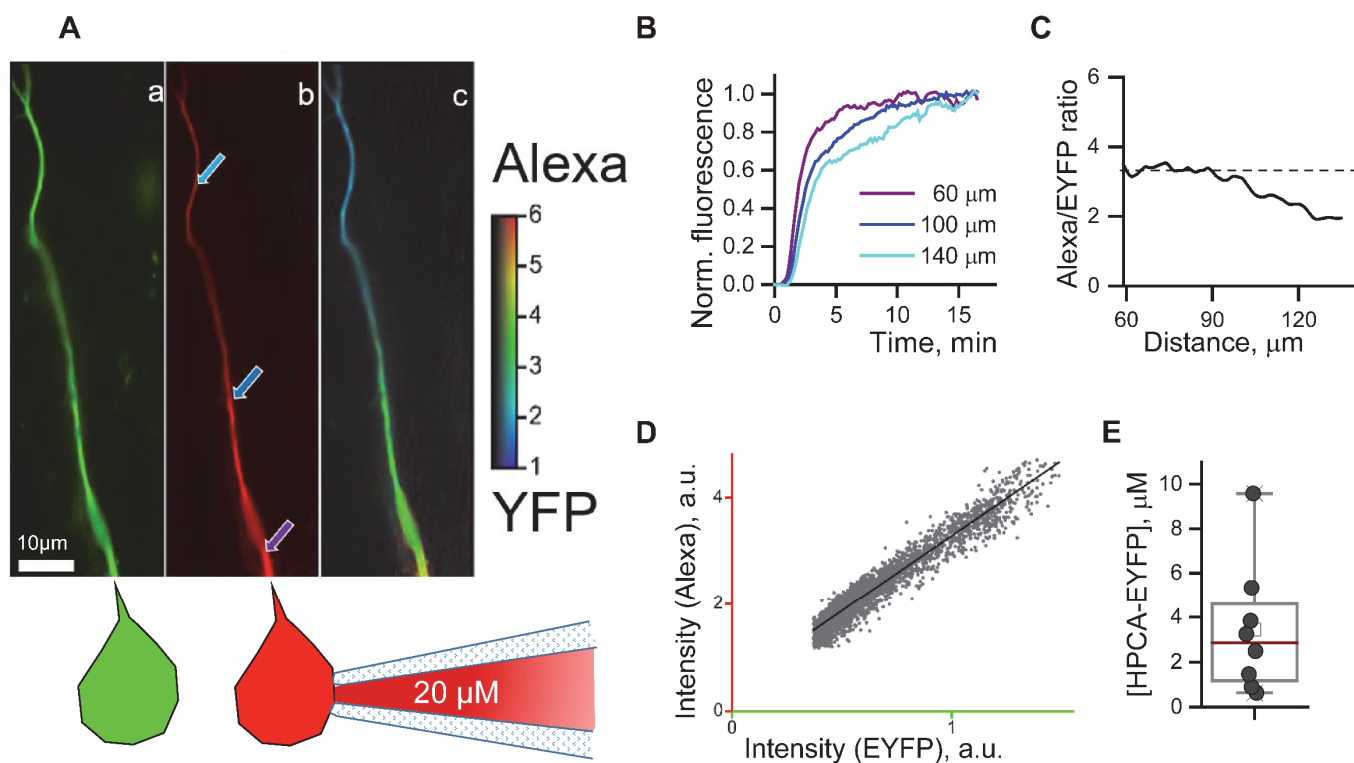


Рис. 3. Оцінка концентрації екзогенно експресованого гіпокальцину в дендритах нейронів гіпокампа. Аа) Флуоресцентне зображення дендриту в каналі HPCA-EYFP, отримане до прориву мембрани. (Ab) Зображення тієї ж області в каналі Alexa Fluor 594, отримане через 15 хв після прориву мембрани. Стрілками позначено ROI, де вимірювали середні інтенсивності флуоресценції як функцію часу, показані в (B). (Ac) Попіксельне відношення флуоресценції Alexa Fluor 594 до HPCA-EYFP в псевдокольоровій палітрі, що наведена поруч. B) Часові профілі інтенсивності флуоресценції Alexa Fluor 594 на відстані 60, 100 та 140 мкм від соми, нормовані на максимальні значення. Кольори ліній відповідають кольорам стрілок в (Ab). C) Профіль відношення середньої інтенсивності флуоресценції Alexa Fluor 594 до HPCA-EYFP уздовж дендрита. Графік має область плато в інтервалі 60–100 мкм, що вказує на діапазон відстаней від соми, де концентрація HPCA-EYFP може бути оцінена точно. D) Кореляційний графік інтенсивностей флуоресценції HPCA-EYFP та Alexa Fluor 594 для всіх пікселів дендритного сегмента, що відповідає області плато в (C). Лінійна регресія демонструє значну лінійну кореляцію між флуоресценціями міток ($R^2 = 0.87$). Г) Оцінка дендритної концентрації гіпокальцину в усіх восьми протестованих нейронах.

Оцінка концентрації екзогенного гіпокальцину в даній серії експериментів не перевищує 10 мкМ при медіані близько 3 мкМ (рис. 3E), що майже на порядок нижче за літературне значення концентрації ендogenous гіпокальцину, 30 мкМ (Furuta et al. 1999; O'Callaghan et al. 2003).

Таким чином, транзйентна трансфекція гіпокампальних нейронів плазмідною, яка кодує флуоресцентно мічений гіпокальцин, є дієвим інструментом для вивчення його біофізики без суттєвого впливу на ендogenous сигналізацію гіпокальцину.

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

Гіпокальцин сигналізує в дендритах гіпокампальних нейронів за рахунок Ca^{2+} -залежної зміни конформації (Ames et al. 1997), та подальшого переміщення (або транслокації) на плазматичну мембрану у відповідь на нейронну активність (Dovgan et al. 2010; Markova et al. 2008). Тому дуже важливо розуміти, як гіпокальцин розподілений між цитозолем та плазматичною мембраною. Ми спершу вирішили порівняти гіпокальцин з суто мембранним білком на основі їх здатності до дифузії.

Добре відомо, що коефіцієнти дифузії цитозольних водорозчинних білків, що мають аналогічну до гіпокальцину молекулярну масу, знаходяться в межах 15–40 $\text{мкм}^2/\text{с}$ у клітинах різних типів (Arrio-Dupont et al. 2000; Coscoy et al. 2002; Swaminathan, Hoang, and Verkman 1997). У той же час коефіцієнт латеральної дифузії білків, локалізованих на плазматичній мембрані, становить приблизно 0.5 $\text{мкм}^2/\text{с}$ (Marguet et al. 1999; Oyola-Cintrón et al. 2015). Тому ми вирішили порівняти ефективний коефіцієнт дифузії гіпокальцину з коефіцієнтом дифузії суто мембранного білка, EYFP-Mem, трансфікувавши клітини плазмідами, що кодують обидва білки EYFP-Mem та гіпокальцин, мічений тіловим флуоресцентним білком, HPCA-TFP.

Для візуалізації дифузії білка та подальшої оцінки коефіцієнтів дифузії HPCA-TFP та EYFP-Mem в дендритному дереві нейронів гіпокампа (субклітинний компартмент, в якому відбувається сигналізація HPCA) (Markova et al. 2008) ми застосовували методику відновлення флуоресценції після фотознебарвлення (англ. fluorescence recovery after photobleaching, FRAP). Ми очікували, що швидке локальне фотознебарвлення обох білків у короткому (~ 2 мкм) сегменті циліндричного дендрита призведе до дифузії нових флуоресцентно мічених молекул обох білків в дану область. За допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопа ми отримали флуоресцентні зображення дендритного сегмента нейрона, що експресує білки HPCA-TFP (рис. 4Aa1) та EYFP-Mem (рис. 4Ab1). Стартовий етап FRAP-протоколу налічував 50 кадрів і в подальшому використовувався для компенсації фотовицвітання. Після перших 50 знімків проводилося повне фотознебарвлення обох білків у прямокутній області дендритного сегмента на повній потужності лазерних ліній 458 та 515 нм (рис. 4Aa2). Відновлення флуоресценції після фотознебарвлення реєстрували в обох каналах з однаковою частотою кадрів, 12 Гц (рис. 4Aa3–4).

З огляду на простоту геометрії та відсутність компартменталізації, відновлення флуоресценції в тонкому дендритному сегменті в першому наближенні описується одновимірним рівнянням дифузії з початковою та граничною умовами:

$$\begin{cases} \frac{\partial I}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 I}{\partial x^2} \\ I_{(t,x=20\mu m)} = 1; I_{(t,x=-20\mu m)} = 1, \\ I_{(t=0)} = H(|x| - 1\mu m) \end{cases} \quad (4.1)$$

де I – нормалізована інтенсивність флуоресценції як функція координати вздовж дендритного сегмента, x та часу, t ; $x = 0$ – координата центру області знебарвлення; відлік часу t починається одразу після фотознебарвлення; H – функція Гевісайда.

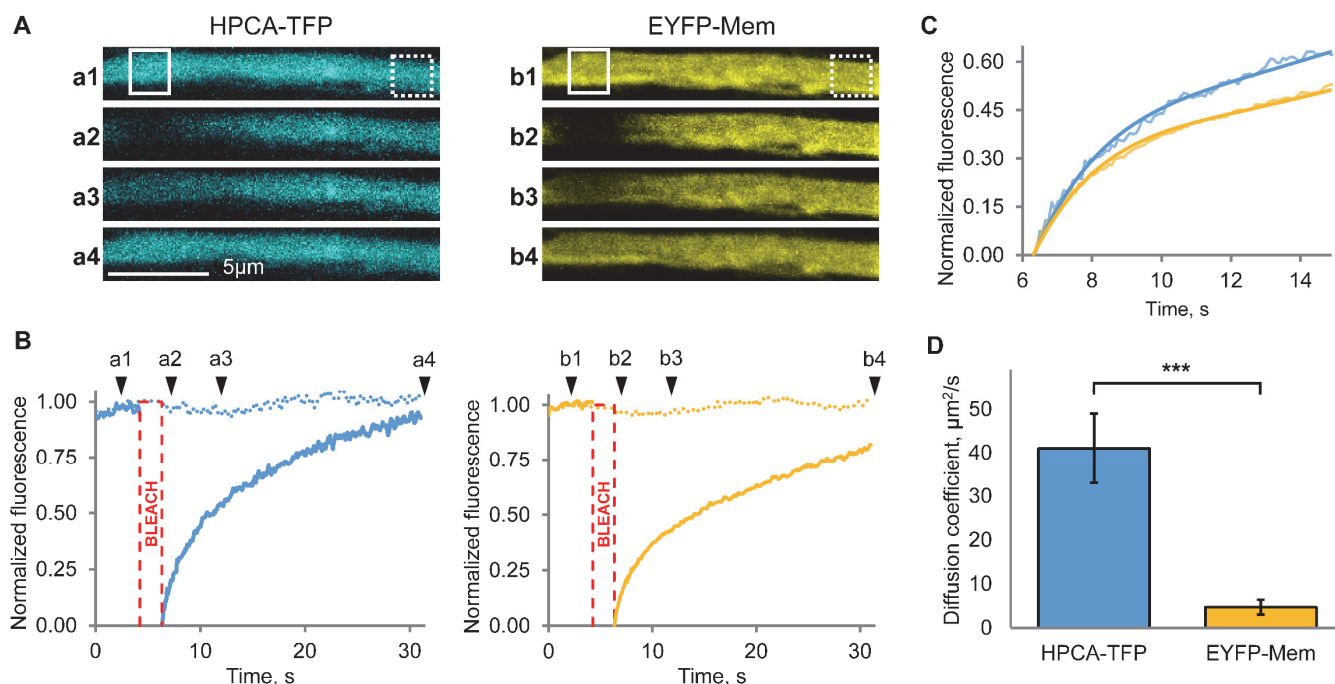


Рис. 4. Вимірювання одновимірних коефіцієнтів дифузії HPCA-TFP і EYFP-Мет в дендритах нейронів гіпокампа. А) Флуоресцентні зображення дендритного сегмента нейрона гіпокампа, котрансфікованого плазмідками з генами HPCA-TFP та EYFP-Мет. Зображення реєстрували у каналах TFP та EYFP безпосередньо до (a1, b1), одразу після фотознебарвлення (a2, b2), а також на 5-й (a3, b3) та 25-й секундах (a4, b4) відновлення. Фотознебарвлення проводили в межах області, позначеної білим суцільним контуром в a1 та b1. В) Часовий профіль змін нормалізованої інтенсивності флуоресценції в прямокутних областях, обмежених білими лініями на (А). Суцільними лініями позначені середні інтенсивності флуоресценції білків у фотознебарвленій області, а пунктирними лініями – профілі середньої інтенсивності флуоресценції на відстані 20 мкм від фотознебарвленої області. С) Криві відновлення флуоресценції після фотознебарвлення в каналах HPCA-TFP (синя зашумлена крива) та EYFP-Мет (жовта зашумлена крива). Шляхом апроксимації експериментальних даних рішенням одновимірного рівняння дифузії методом найменших квадратів, було отримано криві нелінійної регресії (гладенькі суцільні криві на (С)). D) Усереднене значення коефіцієнтів дифузії HPCA-TFP ($41 \pm 8 \text{ мкм}^2/\text{с}$) і EYFP-Мет ($4.7 \pm 1.7 \text{ мкм}^2/\text{с}$) у всіх протестованих клітинах ($n = 6$ нейронів, $*** P < 0.001$).

Розв'язавши систему рівнянь (4.1) числовими методами, ми отримали нелінійну теоретичну функцію координати x і часу t , що залежить від одного параметра, коефіцієнта дифузії D . Далі ми виконали ітераційну варіацію коефіцієнта дифузії, щоб нелінійна теоретична функція якомога точніше відповідала експериментальним даним за допомогою методу найменших квадратів, ми отримали значення коефіцієнтів дифузії, $41 \pm 8 \text{ мкм}^2/\text{с}$ для HPCA-TFP та $4.7 \pm 1.7 \text{ мкм}^2/\text{с}$ для EYFP-Mem відповідно ($n = 6$, рис. 4D). Даний результат наближає гіпокальцин до суто цитозольних білків, проте не виключає існування невеликої фракції білка на плазматичній мембрані. Тому ми потребували нового, кількісного підходу для оцінки такої фракції гіпокальцину.

5. Оцінка цитозольної та мембранної фракцій гіпокальцину в клітинах з простою геометрією

Детальний аналіз конфокальних зображень дендритів гіпокампальних нейронів, трансфікованих плазмідями з генами EYFP-Mem, показав, що через малий діаметр дендритів (~ 2 мкм), що практично співпадає з найкращою роздільною здатністю нашої конфокальної системи по осі Z (1.2 мкм) і, в той же час, досить близький до її найкращої роздільної здатності по XY (0.2 мкм), неможливо отримати поперечний оптичний зріз дендрита з достатньою контрастністю між пікселями, які представляють цитозоль та плазматичну мембрану. Тому ми вирішили провести цю серію експериментів на клітинах НЕК 293. Вони не експресують ендогенний гіпокальцин, мають примітивну геометрію, а розміри їх сом значно більші за роздільну здатність конфокальної мікроскопії.

Візуалізуюючи клітини НЕК 293, котрансфіковані плазмідями, що кодують НРСА-TFR та EYFP-Mem, за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопа, ми побачили, що НРСА-TFR дифузно розподілений в межах оптичного зрізу, що проходить поблизу половини висоти клітини (рис. 5Aa), тоді як EYFP-Mem переважно перебуває на плазматичній мембрані (рис. 5Ab).

Спершу ми ідентифікували пікселі, що відповідають плазматичній мембрані. Для цього ми провели випадковим чином січну лінію через геометричний центр клітини (червона лінія на рис. 5Aa та рис. 5Ab) та отримали лінійні профілі інтенсивності флуоресценції EYFP-Mem та НРСА-TFR (рис. 5B). Яскраві піки на профілі мембранного білка дозволили встановити координати перетину з плазматичною мембраною, які ми позначили сірими вертикальними лініями на рис. 5B та рис. 5C і надалі вважали їх границями клітини.

Флуоресценція EYFP, що реєструється в пікселях за межами границь клітини, представляє дифракційну розмитість флуоресценції молекул EYFP-Mem, вбудованих в тонку (менше 0.1 мкм) плазматичну мембрану. Додаткове розширення піків лінійного профілю флуоресценції EYFP-Mem може бути пов'язане з тим, що плазматична мембрана не завжди суворо перпендикулярна площині оптичного зрізу. В цілому ці артефакти можуть призвести до реєстрації флуоресцентного сигналу EYFP на відстані, що перевищує дифракційне обмеження роздільної здатності конфокальної системи по XY (0.25 мкм), тобто на відстані 2–4 пікселя (розмір пікселя 0.14×0.14 мкм). Ці міркування узгоджуються з експериментальними даними: половина ширини піків флуоресценції EYFP на їх піввисоті становить менше 0.3 мкм (рис. 5B). Тому далі ми вважали, що флуоресценція TFR у 2–4-му пікселях за межами клітинних границь (координати яких співпадають з максимумами флуоресценції EYFP-Mem), може надходити лише від молекул НРСА-TFR, що перебувають на плазматичній мембрані та в тонкому (0.3 мкм) примембранному шарі цитозолу.

Для того, щоб обчислити оцінку зверху мембранної фракції НРСА-TFR, ми проінтегрували відрізки лінійного профілю інтенсивності НРСА-TFR від клітинних границь до пікселів, де середня інтенсивність флуоресценції TFR опустилася нижче 2σ (де σ – просторовий шум фону в каналі TFR) або де відстань від границь перевищувала 1.0 мкм (темно-сині області на рис. 5C). Беручи до уваги, що профілі

флуоресценції мембранного білка EYFP-Mem симетричні (рис. 5B), і допускаючи аналогічний симетричний профіль флуоресценції молекул HPCA-TFR, вбудованих у плазматичну мембрану, ми подвоїли інтеграл, отриманий на попередньому етапі оцінки (заштриховані темно-сині області на рис. 5C). Отримане значення вважалося пропорційним мембранній фракції HPCA-YFP, тоді як залишкова площа під синьою кривою на рис. 5C вважалася пропорційною цитозольній фракції гіпокальцину.

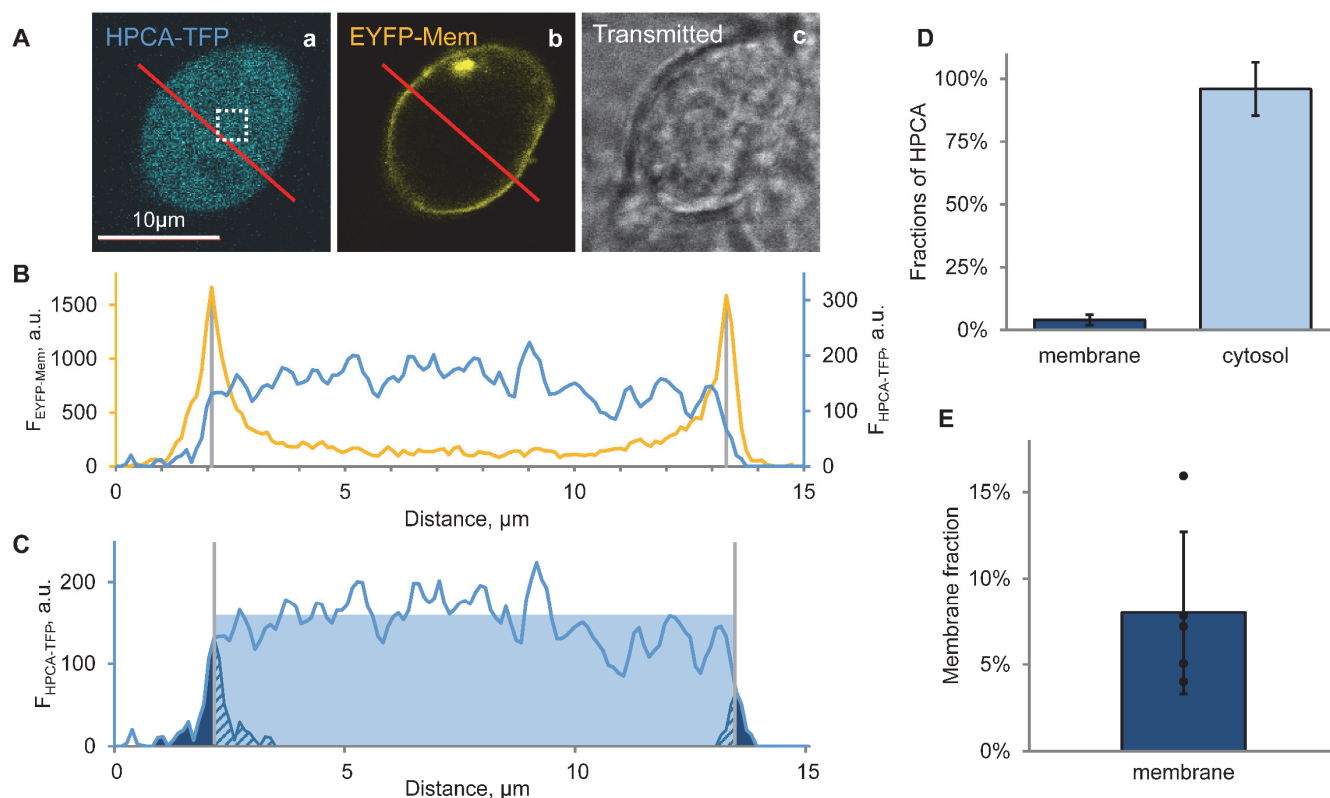


Рис. 5. Оцінка мембранної та цитозольної фракцій гіпокальцину в клітинах HEK 293. А) флуоресцентні зображення клітини HEK 293 в каналах HPCA-TFR (a) та EYFP-Mem (b); (c) зображення клітини в світловому контрасті. Пунктирна біла лінія позначає область, що використовується для обчислення середньої інтенсивності флуоресценції в цитозолі. В) Лінійні профілі інтенсивності флуоресценції у каналах HPCA-TFR (синя крива) та EYFP-Mem (жовта крива) уздовж червоної січної лінії, показаної на (А). Точки перетину вертикальних сірих ліній з віссю X вказують координати плазматичної мембрани (клітинних границь). Вертикальні сірі лінії перпендикулярні до осі X і проходять через вершини профілю EYFP-Mem. С) Лінійний профіль інтенсивності флуоресценції в каналі HPCA-TFR (синя крива). Мембранну фракцію HPCA-TFR оцінювали як інтеграл профілю інтенсивності флуоресценції за межами клітинних границь (темно-синя область), збільшений вдвічі з урахуванням симетрії розсіювання світла (заштрихована темно-синя область). Цитозольну фракцію оцінювали як площу синього прямокутника висотою в середнє значення флуоресценції HPCA-TFR у цитозолі і довжиною між границями клітини. D) Усереднені значення мембранної ($4 \pm 2\%$) та цитозольної ($96 \pm 10\%$) фракцій HPCA-TFR для репрезентативної клітини. E) Оцінка мембранної фракції HPCA-TFR в усіх протестованих клітинах ($8.0 \pm 4.7\%$, $n = 5$ клітин).

Далі ми розробили процедуру в середовищі Python, яка автоматично будувала 12 січних ліній (лінію щоразу повертали на 30° відносно попередньої), що проходили через геометричний центр клітини для кожного проаналізованого оптичного зрізу. Процедура самостійно обчислювала оцінки мембранної та цитозольної фракцій для кожної лінії, та усереднювала отримані результати. Розподіл HPCA-TFR між цитозолем і плазматичною мембраною в репрезентативній клітині показано на рис. 5D. Зведені результати показали, що при базальному рівні внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} гіпокальцин перебуває здебільшого в цитозолі, а його мембранна фракція в середньому не перевищує $8.0 \pm 4.7\%$ (рис. 5E). Варто зауважити, що даний результат є оцінкою зверху, адже в ті області, які ми інтерпретуємо за дифракційне розмиття мембранного гіпокальцину, потрапляє також флуоресценція цитозольних молекул примембранного шару.

У попередніх дослідженнях було показано, що кількість гіпокальцину та кількох інших NCS білків збільшується в плазматичній мембрані внаслідок підвищення рівня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у клітинах багатьох різних типів, включно з нейронами (O'Callaghan, Teripkin, and Burgoyne 2003; Spilker and Braunewell 2003; Helassa et al. 2017; Markova et al. 2008; Dovgan et al. 2010). Однак досі було невідомо, чи присутні ці білки на плазматичній мембрані при базальному рівні $[\text{Ca}^{2+}]_i$. В такому випадку вони могли б регулювати свої мембранні білки-мішені навіть у стані спокою клітини.

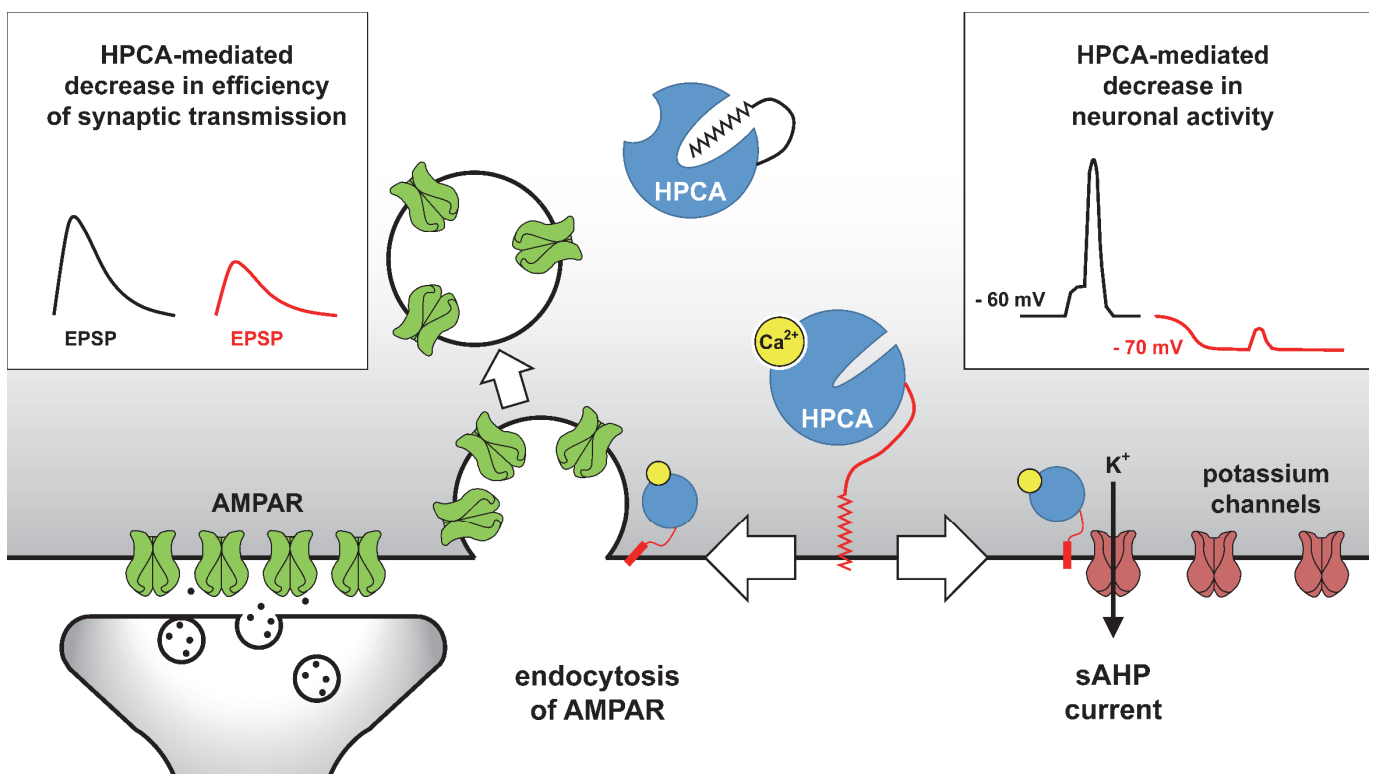


Рис. 6. Схема клітинної сигналізації гіпокальцину. Гіпокальцин зазнає зміни конформації у відповідь на зв'язування Ca^{2+} (кальцій-міристиновий перемикач). Молекули гіпокальцину на мембрані запускають ендоцитоз AMPA-рецепторів, пригнічуючи ЗПСП у відповідь на стандартний викид нейромедіатора (ліва вставка) та викликають струм повільної постгіперполяризації, що знижує мембранний потенціал спокою клітини і робить її менш збудливою (права вставка).

Раніше було показано, що транслокація НРСА на плазматичну мембрану нейронів гіпокампа викликає струм повільної постгіперполяризації (Tzingounis et al. 2007), що є необхідною умовою для розвитку NMDAR-залежної довготривалої депресії синаптичної передачі (Palmer et al. 2005), одного з найпоширеніших видів синаптичної пластичності. Таким чином, якщо достатня кількість НРСА перебуває на плазматичній мембрані даних нейронів при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$, то це може викликати сталу постгіперполяризацію, що призведе до зниження активності цих конкретних нейронів у їхній мережі (рис. 6). Аналогічні міркування також можна застосувати до регуляції щільності AMPA-рецепторів в дендритах гіпокампальних нейронів. Гіпокальцин як Ca^{2+} -сенсор NMDAR-залежного ендоцитозу AMPA-рецепторів (Palmer et al. 2005) може напряму впливати на щільність постсинаптичних AMPA-рецепторів в залежності від рівня $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 6). Звичайно, такий сценарій можливий лише в тому випадку, якщо при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$ достатня кількість НРСА перебуває на плазматичній мембрані.

Таким чином, встановлення того, як NCS білки, здатні до Ca^{2+} -залежної транслокації, розподілені між цитозолом та плазматичною мембраною, є дуже важливим для загального розуміння механізмів сигналізації даних сенсорних білків. Поєднавши молекулярну генетику, конфокальну мікроскопію, FRAP та моделювання, ми виявили, що флуоресцентно мічений гіпокальцин здебільшого перебуває у цитозолі, при чому даний результат стосується як дендритів гіпокампальних нейронів, так і клітин НЕК 293. Оцінка мембранної фракції гіпокальцину не перевищує 8% у популяції протестованих НЕК-клітин, а у деяких клітинах така оцінка становить менше 4%. Подальші експерименти, проведені в тому числі у нашій лабораторії, оцінюють фракцію гіпокальцину на мембрані під час тривалої деполяризації як 40-60%. Це вп'ятеро більше за нашу оцінку в стані спокою. Тому, спираючись на наші результати, ми можемо говорити лише про часткову, помірну активацію гіпокальцин-опосередкованих клітинних процесів у стані спокою.

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 (іммобілізованої у внутрішньоклітинних компартментах) фракцій флуоресцентних білків у дифузійно-компактних клітинах.

3. Встановлено, що концентрація екзогенно експресованого флуоресцентно міченого гіпокальцину в дендритах нейронів гіпокампа втричі нижча за концентрацію ендогенного білка. Це дозволяє використовувати генетичні методи експресії флуоресцентно міченого гіпокальцину для вивчення його біофізичних властивостей без суттєвого впливу на ендогенну сигналізацію гіпокальцину.

4. Параметри дифузії флуоресцентно міченого гіпокальцину у дендритах нейронів гіпокампа свідчать про те, що гіпокальцин при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$ здебільшого перебуває в цитозолі, хоча невелика частина молекул може бути вбудована 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.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Cherkas V, Grebenyuk S, Osypenko D, Dovgan AV, Grushevskiy EO, Yedutenko M, **Sheremet Y**, Dromaretsky A, Bozhenko A, Agashkov K, Kononenko NI, Belan P (2018) Measurement of intracellular concentration of fluorescently-labeled targets in living cells. *PLOS ONE* 13(4): e0194031.

Ye. Sheremet, B. Olifirov, A. Okhrimenko, V. Cherkas, O. Bagatskaya and P. Belan (2020) Hippocalcin Distribution Between the Cytosol and Plasma Membrane of Living Cells. *Neurophysiology* 52(1), 2–13.

Б. О. Оліфіров, **Є. Ю. Шеремет**, П. В. 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.

А. О. Охріменко, **Є. Ю. Шеремет**, П. В. Білан. Оцінка розподілу білків між цитоплазмою та клітинною мембраною у живих клітинах, XVII Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Теоретичні і прикладні проблеми фізики, математики та інформатики», 25-26 квітня 2019 року, Київ, Україна.

Sheremet Y. Y., Cherkas V. P., Dovgan A. V., Kononenko N. I., Tsugorka T. N., Belan P. V. Biophysical properties of hippocalcin signaling in rat hippocampal neurons, VI з'їзд Українського біофізичного товариства, 26-29 травня 2015 року, Луцьк – Світязь, Україна.

Y.Y. Sheremet, V. P. Cherkas, A. V. Dovgan, N. I. Kononenko, T.M. Tsugorka, P. V. Belan. Hippocalcin translocation in dendrites and dendritic spines of rat hippocampal neurons, XIX з'їзд Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю, присвяченого 90-річчю від дня народження академіка П.Г.Костюка, 24-26 травня 2015 року, Львів, Україна.

АНОТАЦІЯ

Шеремет Є. Ю. Експресія та просторовий розподіл нейронного кальцієвого сенсорного білка гіпокальцину в субклітинних компартментах. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2020.

Гіпокальцин – нейронний Ca^{2+} -сенсорний білок (NCS), який опосередковує внутрішньоклітинні сигнальні шляхи завдяки своїй здатності до Ca^{2+} -залежної транслокації з цитозолу на плазматичну мембрану. Не зважаючи на те, що подібна транслокація гіпокальцину та інших NCS-білків досить добре вивчена, жодних кількісних оцінок розподілу гіпокальцину між цитозолем та плазматичною мембраною на базальному рівні внутрішньоклітинної концентрації вільних йонів кальцію ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) отримано не було. У цій роботі ми запропонували прості та універсальні підходи для таких оцінок. Ми продемонстрували, що рівень експресії екзогенного гіпокальцину (10 мкМ) у досліджуваних нейронах гіпокампа принаймні втричі нижчий порівняно з концентрацією ендогенного. Таким чином, екзогенний білок можна використовувати в якості інструменту візуалізації розподілу, транслокації та взаємодії гіпокальцину з білками-мішенями без суттєвого впливу на ендогенну сигналізацію гіпокальцину. Використовуючи метод відновлення флуоресценції після фотознебарвлення (FRAP), ми показали, що коефіцієнт дифузії флуоресцентно міченого гіпокальцину у дендритах нейронів гіпокампа (~ 40 мкм/с) знаходиться в межах діапазону значень, характерних для цитозольних білків, при чому коефіцієнт був приблизно в 10 разів більший, ніж для суто мембранного білка. Обидва ці результати свідчать про те, що гіпокальцин перебуває здебільшого в цитозолі дендритів нейронів гіпокампа. Пряме обчислення фракційного розподілу гіпокальцину на базальному рівні $[\text{Ca}^{2+}]_i$ показали, що мембранна фракція гіпокальцину не перевищує 8%. Загалом, наші результати говорять про те, що будучи переважно цитозольним, гіпокальцин може помірно активувати свої мембранні білки-мішені навіть в умовах спокою.

Ключові слова: нейронні кальцієві сенсорні білки, флуоресцентно мічені білки, флуоресцентна мікроскопія, нейрони гіпокампа, FRAP

АННОТАЦИЯ

Шеремет Е. Ю. Экспрессия и пространственное распределение нейронного кальциевого сенсорного белка гиппокальцина в субклеточных компартментах. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. – Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2020.

Гиппокальцин – нейронный Ca^{2+} -сенсорный белок (NCS), который опосредует внутриклеточные сигнальные пути благодаря своей способности к Ca^{2+} -зависимой

транслокации из цитозоля на плазматическую мембрану. Несмотря на то, что подобная транслокация гиппокальцина и других NCS-белков достаточно хорошо изучена, никаких количественных оценок распределения гиппокальцина между цитозолем и плазматической мембраной при базальном уровне внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) получено не было. В этой работе мы предложили простые и универсальные подходы для таких оценок. Мы показали, что уровень экспрессии экзогенного гиппокальцина (10 мкМ) в исследуемых нейронах гиппокампа по крайней мере втрое ниже по сравнению с концентрацией эндогенного. Таким образом, экзогенный белок можно использовать в качестве инструмента визуализации распределения, транслокации и взаимодействия гиппокальцина с белками-мишенями без существенного влияния на эндогенную сигнализацию гиппокальцина. Используя метод восстановления флуоресценции после фотовыцветания (FRAP), мы показали, что коэффициент диффузии флуоресцентно меченого гиппокальцина в дендритах нейронов гиппокампа (~40 мкм/с) находится в пределах диапазона значений, характерных для цитозольных белков, причем коэффициент был примерно в 10 раз больше, чем для чисто мембранного белка. Оба эти результаты свидетельствуют о том, что гиппокальцин находится в основном в цитозоле дендритов нейронов гиппокампа. Прямое вычисление фракционного распределения гиппокальцина на базальном уровне $[Ca^{2+}]_i$ показали, что мембранная фракция гиппокальцина не превышает 8%. В целом, наши результаты говорят о том, что, будучи преимущественно цитозольным, гиппокальцин может умеренно активировать свои мембранные белки-мишени даже в условиях покоя.

Ключевые слова: нейронные кальциевые сенсорные белки, флуоресцентно меченые белки, флуоресцентная микроскопия, нейроны гиппокампа, FRAP

SUMMARY

Sheremet Y. Y. Expression and Spatial Distribution of the Neuronal Calcium Sensor Protein Hippocalcin in Subcellular Compartments. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

A dissertation submitted to acquire the degree of Candidate of Science in Biology (PhD), specialty – 03.00.02 – Biophysics – Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, 2020.

Hippocalcin (HPCA) is a neuronal calcium sensor (NCS) protein that provides intracellular signaling via its Ca^{2+} -dependent translocation from the cytosol to the plasma membrane. Although such translocation of HPCA and some NCS proteins is well-established, no quantitative estimates of HPCA distribution between the cytosol and plasma membrane at a basal level of free intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) have been obtained. Thus, it is still unknown whether HPCA regulates its plasma membrane targets under resting conditions. Moreover, exogenously expressed fluorescently-labeled proteins, widely used for biophysical studies, could probably shift endogenous proteins signaling. That's why the main issues in this study is the estimation of the expression level of the

exogenous HPCA construct, compared to that of the corresponding endogenous one, and quantitative estimates of HPCA distribution between the cytosol and plasma membrane at a basal level $[Ca^{2+}]_i$. In this work, we propose a simple and universal approaches for such estimations. The approach for measurement of expression level is based upon common knowledge that the dye fluorescence is directly proportional to its quantum yield and the number of its molecules and that a coefficient of proportionality is determined by spectral properties of the dye and optical equipment used to record fluorescent signals. If two fluorescent dyes are present in the same volume, then a ratio of their concentrations is equal to a ratio of their fluorescence multiplied by some dye- and equipment-dependent coefficient. Thus, if the coefficient and concentration of one dye is known then the concentration of another dye can be determined. Here we have demonstrated how to calculate this coefficient (called a ratio factor) and how to use it for concentration measurements of fluorescently tagged molecules. Using this approach, we estimated a concentration of exogenously expressed HPCA, tagged by a fluorescent protein in a dendritic tree of rat hippocampal neurons loaded via a patch pipette with Alexa Fluor dye of known concentration. We have demonstrated that HPCA expression level (10 μ M) in the hippocampal neurons under study is at least 3 times lower compared to the concentration of endogenous one. Thus, the exogenous protein may be used as a tool to visualize HPCA distribution, translocation and target interaction without substantial perturbation of endogenous HPCA signaling. Next, we have evaluated HPCA spatial distribution in living cells at a basal level of $[Ca^{2+}]_i$ comparing this distribution with one of exogenously expressed membrane protein, EYFP-Mem. Using fluorescence recovery after photobleaching, we showed that the diffusion coefficient of fluorescently tagged HPCA in the dendrites of the hippocampal neurons ($\sim 40 \mu\text{m}^2/\text{s}$) is within a range of values typical for cytosolic proteins. The coefficient was about 10-fold higher than that for EYFP-Mem. Both results indicate that HPCA is mainly localized in the cytosol of the dendrites of hippocampal neurons. Subsequent direct calculations for HPCA fractions in the cytosol and plasma membrane at a basal level of $[Ca^{2+}]_i$ demonstrated that the plasma membrane fraction of HPCA does not exceed 8%. Altogether, our results suggest that although being mainly cytosolic, HPCA may potentially signal to its plasma membrane targets under resting conditions. New approaches, used for obtaining such estimates, can be applied for quantitative evaluation expression level of NCS protein and its spatial distribution in living cells under different experimental conditions and for development of precise biophysical models of their signaling.

Keywords: neuronal Ca^{2+} -sensor proteins, fluorescently tagged proteins, fluorescent microscopy, hippocampal neurons, FRAP

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

- AMPA – α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DYT2 – аутосомно-рецесивна первинна ізольована дистонія
[Ca²⁺]_i – внутрішньоклітинна концентрація вільних йонів Ca²⁺
ECFP – посилений ціановий флуоресцентний білок
EYFP – посилений жовтий флуоресцентний білок
EYFP-Mem – мембранний білок, мічений посиленим жовтим флуоресцентним білком
FRAP – відновлення флуоресценції після фотознебарвлення
FRET – флуоресцентне резонансне перенесення енергії
НЕК – human embryonic kidney, клітини людської ембріональної нирки
HPCA – гіпокальцин
MEM – Minimal Essential Medium
NCS – нейронний кальцієвий сенсор
NMDA – N-метил-D-аспартат
NMDAR – рецептор N-метил-D-аспартату
ROI – region of interest, область інтересу
TFP – тіаловий флуоресцентний білок
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
ЗПСП – збуджуючий постсинаптичний потенціал
ЦНС – центральна нервова система