

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

**ДРОМАРЕЦЬКИЙ АНДРІЙ ВАЛЕНТИНОВИЧ**

УДК 612.822 : 577.112 : 577.322

**ПОРУШЕННЯ  $\text{Ca}^{2+}$ -ЗАЛЕЖНОЇ СИГНАЛІЗАЦІЇ ГІПОКАЛЬЦИНУ ЯК  
МЕХАНІЗМ ПЕРВИННОЇ АУТОСОМНО-РЕЦЕСИВНОЇ ІЗОЛЬОВАНОЇ  
ДИСТОНІЇ**

03.00.02 – Біофізика

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата  
біологічних наук

**Київ – 2025**

## Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі біофізики сенсорної сигналізації 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 біофізики сенсорної сигналізації

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Жолос Олександр Вікторович**  
Київський національний університет ім. Тараса Шевченка,  
завідувач кафедри біофізики та нейробіології Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини»  
професор кафедри біофізики

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник  
**Шатурський Олег Ярославович**  
Інститут біохімії імені О.В. Паладіна Національної академії наук України  
провідний науковий співробітник відділу нейрохімії

Захист дисертації відбудеться «11» березня 2025 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:  
[https://biph.kiev.ua/en/Specialized\\_Scientific\\_Council](https://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council)

Автореферат розісланий «07» лютого 2025 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

доктор біологічних наук

Ірина Літовка

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Кальцієва сигналізація в нейронах є необхідною для регуляції багатьох клітинних функцій (Jedrzejewska-Szmeke та ін., 2023). Механізми, за допомогою яких зміни внутрішньоклітинної концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  у нейронах можуть регулювати ці функції, в більшості випадків забезпечуються за допомогою невеликих проміжних універсальних або спеціалізованих нейронних  $\text{Ca}^{2+}$  сенсорних білків (Neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  Sensor (NCS) proteins) (Burgoyne та ін., 2015; Burgoyne та ін., 2019). Саме ці білки далі регулюють активність ефекторних білків, таких як канали, насоси та ензими. Стає все більш очевидним, що ці білки можуть бути вирішальними в різних аспектах нейронних дисфункцій та захворювань нервової системи, опосередковано або безпосередньо, як прямий наслідок їх генетичних варіацій або мутацій (Key та ін., 2019; Brunetti та ін., 2022; Thomsen та ін., 2024; Weston та ін., 2024). Таким чином, детальне розуміння фундаментальних аспектів молекулярних і клітинних механізмів регуляції ефекторів за допомогою нейронних  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсорних білків і їх патологічних змін є вкрай важливим для розробки новітніх підходів до лікування різноманітних нервових захворювань (Burgoyne та ін., 2019; Lisek та ін., 2024; Thomsen та ін., 2024).

Первинна дистонія – це неврологічний синдром порушення руху при якому спостерігаються тривалі та повторювані скорочення м'язів, що призводить до скручених та повторюваних неконтрольованих рухів або аномальних болісних поз. У мозку пацієнтів з даним захворюванням немає явних морфологічних аномалій (Tanabe та ін., 2009). Разом з тим, анатомічні та функціональні дослідження показують різні типи відхилень в декількох ділянках мозку і зокрема у гіпокампі, що може бути причиною прояву симптомів дистонії (Edwards, 2003; Smit та ін., 2018).

Нещодавні генетичні дослідження пацієнтів з DYT2 дистонією виявили три точкові мутації в гені HPCA, що кодує нейрональний кальцієвий сенсорний білок (NCS) гіпокальцин (HPCA). Цей ген майже виключно експресується у мозку, особливо з високим рівнем експресії у корі, смугастому тілі, мозочку та гіпокампі (Charlesworth та ін., 2015) – саме в тих областях, що пов'язані з розвитком дистонії (Balint та ін., 2018). HPCA має три EF домени, що здатні приєднувати  $\text{Ca}^{2+}$  (O'Callaghan та ін., 2003; Helassa та ін., 2017). Приєднання  $\text{Ca}^{2+}$  до цих доменів призводить до кальцій-залежної конформаційної зміни білка, що супроводжується виходом його N-термінального кінця, котрий містить залишок жирної кислоти мірістоїлу, з гідрофобної кишені молекули (Ames та ін., 1997). Це дозволяє HPCA переміщуватись (транслокуватись) з цитозолу і вбудовуватись до плазматичної мембрани (Kobayashi та ін., 1993; O'Callaghan та ін., 2003; Markova та ін., 2008; Dovgan та ін., 2010). Раніше було показано, що саме ця  $\text{Ca}^{2+}$ -залежна транслокація HPCA призводить до гальмування коркових та гіпокампульних нейронів шляхом активації струму повільної гіперполяризації (sANP) (Andrade та ін., 2012; Kim та ін., 2012).

Молекулярний субстрат sANP та механізми його регуляції залишається загадкою

понад 30 років з часу його відкриття. За цей час різні типи калієвих каналів були запропоновані як молекулярний субстрат повільної АНР (Andrade та ін., 2012; Sahu та ін., 2021). Спочатку калієві канали типу SK, а потім KCNQ вважалися основними чинниками sАНР у ЦНС (Tzingounis та ін., 2007; Tzingounis та ін., 2008; Andrade та ін., 2012; Kim та ін., 2012; Larsson, 2013; Kim та ін., 2016). Нещодавно було висловлено припущення, що sАНР частково виникає внаслідок тристоронньої взаємодії між кальцієвими каналами L-типу (Cav1.3), ріанодиновими рецепторами та калієвими кальцій-залежними (KCa3.1) каналами на з'єднаннях ендоплазматичного ретикулу та плазматичної мембрани (King та ін., 2015; Sahu та ін., 2019; Sahu та ін., 2021). Останні дослідження sАНР у гіпокампальних та кортикальних нейронах розширили спектр можливих молекулярних субстратів і показують ідентифікований внесок до струму sАНР наступних калієвих каналів: KCa3.1 (Tiwari та ін., 2022), Kv7 і Kir6 (Laker та ін., 2021), KCNQ2/3 (Springer та ін., 2021), KATP (KCNJ11), KNa, KCNT1-2 (Weston та ін., 2024), і  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  насосів (Gulledge та ін., 2013). Ці дослідження надають деякі відповіді та одночасно створюють нові запитання щодо фармакологічних та біофізичних властивостей регуляції sАНР в нормі і патології. Зокрема невідомо, чи можуть зміни в сигналізації гіпокальцина сприяти підвищенню активності нейронів, що спостерігається при багатьох формах дистонії, і чи може це призводити до розвитку дистонії DYT2.

Таким чином, актуальними є проблеми оцінки основних біофізичних властивостей сигналізації гіпокальцина, особливо пов'язаних з його концентрацією всередині клітини та регуляцією sАНР. Мутації HPCA в позиціях T71N та N75K, що проявляються при розвитку дистонії DYT2, знаходяться в другому EF домені білка та можуть порушувати здатність цього домену приєднувати  $\text{Ca}^{2+}$  (Charlesworth та ін., 2015), що у свою чергу може перешкоджати транслокації HPCA та послаблювати гальмування в певних відділах мозку за рахунок зменшення sАНР. Варто зазначити, що за допомогою функціональної мікроскопії та PET було показано, що дистонія пов'язана з порушенням гальмуванням в коркових та підкоркових областях (Ibanez та ін., 1999; Levy та ін., 2002). Тому ми висунули гіпотезу, що DYT2-мутації спричиняють порушення сигнальних функцій HPCA та механізму sАНР, що призводить до надмірної збудливості нейронів. В ході виконання дисертаційної роботи ми перевірили цю гіпотезу з використанням нейронів гіпокампа, які є частиною нейрональної мережі, що спричиняє прояви хвороби (Kuba та ін., 2010; Rasouli та ін., 2018), а також є найбільш дослідженою клітинною моделлю HPCA-залежної регуляції струму sАНР (Tzingounis та ін., 2007; Andrade та ін., 2012).

**Зв'язок роботи з науковими програмами, грантами, планами, темами.** Робота виконана відповідно до загального плану науково-дослідних робіт структурної лабораторії молекулярної біофізики відділу загальної фізіології нервової системи (з 22.05.2017 - відділ молекулярної біофізики, з 05.10.2023 - відділ біофізики сенсорної сигналізації) Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в рамках науково-дослідних проєктів/робіт: «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних меха-

нізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» (2012–2016 рр., державний реєстраційний номер роботи - 0112U001475), «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014-2018 рр., державний реєстраційний номер роботи - 0113U007273), «Сигналізація нейрональних кальцієвих сенсорних білків в нейронах ЦНС в нормі і патології» (2019–2023 рр., державний реєстраційний номер роботи - 0118U007345), «Вплив нейромедіаторів на сигналізацію нейрональних кальцієвих сенсорних білків в нейронах ЦНС в нормі і патології» (2024-2027 рр., державний реєстраційний номер роботи - 0124U001556).

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи – встановити відмінності біофізичних механізмів сигналізації гіпокальцина та його мутантів, що викликають первинну дистонію типу DYT2 та визначити обумовлені цими відмінностями порушення збудливості нейронів, що можуть лежати в основі розвитку цього захворювання.

Для досягнення поставленої мети дослідження було поставлено наступні завдання:

1. Розробити методику вимірювання концентрації екзогенно-експресованих флуоресцентно-мічених білків в живих нейронах та валідувати, що експресія екзогенного гіпокальцина і його DYT2 мутантів є достатньою для впливу на сигналізацію ендогенного гіпокальцина.
2. З використанням клітинної лінії НЕК-293, визначити чи впливають мутації гіпокальцина, T71N та N75K, що присутні при первинній дистонії типу DYT2, на його властивості щодо зв'язування іонів кальцію  $Ca^{2+}$ .
3. Встановити чи змінюють мутації гіпокальцина, T71N та N75K, що виявлені при первинній дистонії типу DYT2, його можливості до  $Ca^{2+}$ -залежної транслокації із цитозолу до плазматичної мембрани у нейронах первинної культури гіпокампа шурів.
4. З'ясувати чи викликають різні патерни розрядів потенціалів дії, які притаманні нейронам гіпокампа, транслокацію дистонічних мутантів T71N та N75K.
5. З'ясувати чи збільшується величина струму повільної постгіперполяризації в нейронах первинної культури гіпокампа шурів при збільшенні рівня експресії гіпокальцина і його дистонічних мутантів T71N та N75K.
6. З використанням методів комп'ютерного моделювання визначити ступінь змін у збудливості нейронів, які можуть виникати при експресії в них дистонічних мутантів T71N та N75K замість гіпокальцина дикого типу.

**Об'єкт дослідження.** Нейронний кальцієвий сенсорний білок гіпокальцин та його дистонічні мутантні варіанти T71N та N75K.

**Предмет дослідження.** Властивості сигналізації гіпокальцина у нейронах гіпокампа та відмінності в сигналізації, які виникають у мутантних варіантів T71N і N75K гіпокальцина та обумовлюють розвиток DYT2 дистонії у людини.

**Методи дослідження.** Для проведення дослідження використані наступні методи. Клітинної біології: культивування лінійних культур клітин НЕК-293, PC-12, отримання нейронів препаратів спинного мозку та сітківки шурів, первинної культура ней-

ронів гіпокампу щурів; Молекулярної біології і генетики: експресія екзогенних білків шляхом трансфекції; Біофізичні: петч-клемп та флуоресцентна мікроскопія різних типів нейронів та лінійних культур; Математичні: обробка інформації в зображеннях матричними операціями з використанням програмного забезпечення «Matlab» та «Python», моделювання роботи нейронів.

**Наукова новизна отриманих результатів.** У даній роботі вперше представлено метод виміру внутрішньоклітинної концентрації флуоресцентно-мічених білків. Метод заснований на використанні опорних барвників з відомою концентрацією та обчисленні спектральних коефіцієнтів передачі обладнання і флуорофорів. Реалізовано кілька підходів для перевірки даного методу для різних типів клітин та барвників. Вперше показано які мутації при первинній дистонії DYT2 призводять до функціональних порушень на рівні окремих нейронів. Виявлено механізм прояву цих порушень через недостатню транслокацію мутантного варіанту білка гіпокальцина до мембрани клітини і як результат недостатню його участь в активації повільної постгіперполяризації для гальмування активності нейронів. Вперше оцінено вплив цих порушень на спроможність нейронів генерувати потенціали дії. Дана робота вперше показує один з можливих механізмів виникнення дистонії типу DYT2, а також суттєво звужує область для пошуку генетичних порушень, що призводять до цієї хвороби.

**Практичне значення отриманих результатів.** Запропонований нами метод визначення внутрішньоклітинної концентрації флуорофорів, може бути використаний у дуже широкому спектрі біофізичних досліджень. Він підходить практично для всіх типів флуоресцентних барвників та конфігурацій експериментального обладнання для реєстрації флуоресценції. Цей метод також дозволяє окремо вимірювати мобільну та нерухому (імобілізовану у внутрішньоклітинних компартментах) фракції флуорофорів. Виявлені механізми, які призводять до порушень гальмування нейронів у випадку мутантного варіанту білка гіпокальцина, можуть бути основою подальших досліджень, в тому числі для усунення симптомів хвороби. Наприклад, миші з нокином гену гіпокальцина (KI N75K) можуть бути ідеальною тваринною моделлю DYT2 дистонії людини. Отримані результати переконливо свідчать про те, що генетичні втручання, які призводять до посилення експресії НРСА дикого типу в аномально збуджених низхідних шляхах, що регулюють скелетні м'язи, можуть відновлювати повільну гіперполяризацію в нейронах цих шляхів і є потенційно ефективним інструментом для лікування пацієнтів з дистонією DYT2. Результати роботи також дозволяють розширити знання щодо фізіологічних процесів, в яких гіпокальцин бере участь, що може спростити інші дослідження, в тому числі клінічні для пошуку методів лікування даного типу дистонії.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувачем були самостійно опрацьовані літературні джерела, сформульовані завдання дослідження, розроблені відповідні експериментальні протоколи. Проведення флуоресцентних експериментів та аналіз флуоресцентних зображень щодо досліджень транслокацій гіпокальцина і його мутантів у клітинах НЕК-293, відпрацювання методики вимірювання концентрацій флуорофо-

рів для набору фільтрів «51017» з різними типами клітин, статистична обробка, узагальнення відповідних отриманих результатів та написання всіх розділів дисертації були проведені здобувачем самостійно. Електрофізіологічні та флуоресцентні експерименти проведені на нейронах гіпокампу і клітинах PC-12 та моделювання сигналізації гіпокальцину та його мутантів були проведені разом зі співавторами опублікованих робіт. Формулювання мети дослідження, обговорення отриманих результатів, формулювання висновків проведено за участі наукового керівника.

**Апробація результатів дисертації.** Дану роботу апробовано на наукових семінарах в Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та у вигляді усних доповідей з публікацією тез на наукових конференціях: 20-ий з'їзд Українського Фізіологічного Товариства з міжнародною участю, 27-30 травня 2019 р., м. Київ; The US Society for Neuroscience Meeting 2018, San Diego, USA; FENS Forum 2024, Vienna, Austria; Тематичний VII з'їзд Українського біофізичного товариства, 2018, Київ.

**Публікації.** За результатами проведених досліджень разом зі співавторами опубліковано 5 статей, 3 з яких в наукових фахових виданнях першого квартилю на момент публікації (по класифікації «Scimago Journal & Country Rank»). Представлено 4 доповіді на конференціях та з'їздах.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається з огляду літератури, розділу матеріалів та методів, результатів, основної частини, списку використаних літературних джерел зі 153 посиланнями, 90 рисунків та 4 таблиць. Основний текст займає 133 сторінки, вся робота викладена на 154 сторінках.

Текст і авторські рисунки публікуються під ліцензією «Creative Commons» «CC-BY».

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Матеріали та методи досліджень

Всі роботи виконано з врахуванням 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.

**Клітинні культури.** В роботі було використано наступні клітинні культури: НЕК-293, PC-12 та нейрони гіпокампу щурів. Нейрони були виділені з новонароджених щурів «Wistar» (0..1 пост-натальних діб; 86 тварин обох статей). Всі виконані процедури в роботі були схвалені комітетом з наукової етики. Всі щури були з віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

**Трансфекція.** Гіпокампальні нейрони були трансфіковані через 13..17 діб після посадки за допомогою реагенту для трансфекції «Lipofectamine 2000» (ThermoFisher, USA) по інструкції виробника. Всі культури клітин використовувались в експерименті на 2..3 день після трансфекції.

**Електрофізіологічні реєстрації.** Записи активності нейронів в режимі як фіксації струму так і фіксації напруги були отримані за допомогою підсилювача з АЦП «EPC-10/2» і програмного забезпечення «НЕКА PatchMaster» (НЕКА, Germany). Реє-

страції трансфікованих нейронів проводились у режимі «ціла клітина», а транслокації гіпокальцина викликались деполяризацією з  $-70$  до  $0$  мВ на різні проміжки часу від  $0,125$  с до  $4$  с. Електроди для петч-клемпу мали опір  $2..4$  МОм.

**Флуоресцентні реєстрації транслокації білків.** Запис зображень з плином часу для клітин НЕК та гіпокампульних нейронів трансфікованих білками з флуоресцентними мітками проводився з використанням системи «TILL Photonics» (Німеччина), встановленої на інвертованих мікроскопах («Olympus» IX70 або IX71). Обробка зображень здійснювалось за допомогою програм (скриптів) написаних у пакетах програмування та обробки даних «Matlab», «TILLvision» та на мові програмування «Python».

**Кероване вивільнення іонів кальцію та реєстрація флуоресценції.** В клітині НЕК-293 було завантажено чутливий до концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  (далі  $[\text{Ca}^{2+}]$ ) барвник «Fura Red» та фотодеструктивний буфер  $\text{Ca}^{2+}$  «NP-EGTA». Концентрації цих речовин при завантаженні були однакові і рівні  $5$  мкмоль/л. При завантаженні клітини витримувались при температурі  $37^\circ\text{C}$  впродовж  $30$  хвилин. Внутрішньоклітинна концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  була керовано-збільшена внаслідок послідовних УФ-спалахів (тривалістю  $500..1000$  мс, з довжиною хвилі  $335$  нм та частотою повторення  $0,1$  Гц) від керованого монохроматичного джерела світла «TILL Photonics Polychrome». Поточна величина  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  вимірювалась з частотою  $0,5..2$  Гц з використанням завантаженого барвника «Fura Red». В експериментах з препаратом спинного мозку нейрони були завантажені  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливим барвником «Fura-2» (Krotov та ін., 2017). Ретроградне завантаження барвника «Fluorogold» до гангліонарних клітин сітківки проводилось шляхом ін'єкцій розчину барвника до верхнього горбика (*superior colliculus*) кожної півкулі (Агашков та ін., 2018).

**Комп'ютерне моделювання.** Моделювання було проведено з використанням моделі пірамідального нейрона, що була розроблена в програмі «NEURON» (Hines та ін., 2001).

## РЕЗУЛЬТАТИ РОБОТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### 1. Оцінка концентрації флуоресцентних молекул в поодиноких живих клітинах

Перебіг фізіологічних процесів залежить від концентрації молекул, що беруть в них участь. Тому для широкого кола як фундаментальних досліджень, так і досліджень механізмів патологічних порушень, необхідно мати можливість оцінювати концентрації взаємодіючих молекул на рівні окремих клітин і їх компартментів. Зокрема, це дуже важливо для кращого розуміння механізмів, що порушуються при різних неврологічних розладах, яким і присвячене дане дослідження (Krotov та ін., 2017; Войтенко та ін., 2017; Cherkas та ін., 2018; Агашков та ін., 2018; Osypenko та ін., 2019). Якщо молекули, концентрацію яких нам потрібно оцінити, мають флуоресцентні властивості або можуть бути помічені флуорофорами, то їх локалізацію і концентрацію в клітині можна оцінити за величиною флуоресценції. Зокрема, при використанні в дослідженні експресії екзогенних білків, мічених флуоресцентним білком, отрима-



них завдяки трансфекції клітин плазмідами, виникає необхідність оцінки концентрації цих екзогенних білків. Це необхідно, щоб впевнитися, що концентрація цих білків не виходить за межі фізіологічних рівнів і одночасно є достатньою для змін роботі відповідних молекулярних систем. В даній роботі  $\text{Ca}^{2+}$ -залежна сигналізація гіпокальцину досліджувалась у нейронах гіпокампу, що ендогенно експресують високі рівні гіпокальцину (до 30 мкмоль/л (Furuta та ін., 1999)) і нам необхідно було знати чи є рівні екзогенної експресії гіпокальцину співмірними. Тому, в даній роботі було поставлено завдання розробити універсальний метод оцінки концентрації флуоресцентних молекул у живих поодиноких клітинах і застосувати його до визначення концентрації екзогенно-експресованих білків.

Найпростіший та швидкий шлях оцінки концентрації флуоресцентних молекул в живій клітині може бути заснований на вимірі інтенсивності їх флуоресценції. Ми вперше запропонували проводити дані оцінки за допомогою диференційних вимірів по відношенню до іншого опорного (контрольного) флуоресцентного барвника з відомою концентрацією, що знаходиться в тій же живій клітині. В якості опорного барвника можна використовувати флуорофор, що у відомій концентрації завантажується до клітин за допомогою методів внутрішньоклітинної перфузії. Метод було відпрацьовано в дослідженнях з використанням різних типів флуорофорів і клітин (Krotov та ін., 2017; Войтенко та ін., 2017; Агашков та ін., 2018) і застосовано для оцінки концентрацій екзогенно-експресованого гіпокальцину в нейронах первинної культури гіпокампу щурів (Cherkas та ін., 2018).

Як було зазначено вище, детальне розуміння фундаментальних аспектів кальцієвої сигналізації в нейронах і їх патологічних змін, а також використання флуоресцентних методів для цих досліджень, є вкрай важливим для розробки новітніх підходів до лікування різноманітних нервових захворювань. Тому в даній роботі новітні експериментальні підходи, засновані на використанні флуоресцентних барвників та кальційметрії, застосовувалися при дослідженні декількох патологічних станів, а саме хронічного болю (Krotov та ін., 2017), глаукоми низького тиску (Войтенко та ін., 2017; Агашков та ін., 2018) та первинній дистонії типу DYT2 (Osypenko та ін., 2019). Хоча основна лінія досліджень була націлена на знаходження молекулярних і клітинних механізмів дистонії типу DYT2, нами також був розроблений підхід, що забезпечує надійний інструмент для дослідження функціональних властивостей нейронів пластинки X спинного мозку, що задіяні в регуляції хронічного вісцерального болю (Krotov та ін., 2017), та проведено оцінку ефективності оптичної методики лікування глаукоми низького тиску за допомогою ретроградного мічення флуорофорами гангліонарних клітин сітківки (Войтенко та ін., 2017; Агашков та ін., 2018).

Вимір концентрації флуорофорів і флуоресцентно-мічених білків за запропонованим новітнім підходом вимагає розрахунку спектральних функцій обладнання (апаратних функцій). Тут здебільшого мається на увазі оптичне обладнання, крім відеокамери (детектора), котра також має спектральну залежність функції передачі оптичного сигналу в електричний. Функція передачі сигналу обладнання складається з двох

основних частин - до збудження флуоресцентно-міченого білка та після емісії флуоресценції цього білка.

Обчислення концентрації  $C$  флуоресцентного барвника (або міченого білка) яка в об'ємі  $V$  призводить до вихідного сигналу відеокамери (детектора)  $E$  можна провести за формулою:

$$C = \frac{E}{K_{зб} \cdot K_{ем} \cdot V} \quad (1)$$

де  $K_{зб}$  та  $K_{ем}$  повні коефіцієнти передачі сигналу обладнанням та флуоресцентним барвником під час збудження флуоресценції цього барвника та під час флуоресцентної емісії його випромінювання відповідно. Вони обчислюються шляхом точкового помноження спектрів обладнання разом з відповідними спектрами барвника наведених вище та інтегрування по довжині хвилі

$$K_{зб} = \int_0^{\infty} P p(\lambda) T_{виб}(\lambda) T_{ф.зб}(\lambda) T_{дихр.зб}(\lambda) T_{об}(\lambda) S_{зб}(\lambda) d\lambda = P k_{зб} \quad (2)$$

$$K_{ем} = \int_0^{\infty} S_{ем}(\lambda) T_{об}(\lambda) T_{дихр.ем}(\lambda) T_{ф.ем}(\lambda) I i_{кам}(\lambda) d\lambda = I k_{ем} \quad (3)$$

де  $P$  невідома, але постійна потужність лампи, як було зазначено вище ця величина не суттєва оскільки однакова для двох барвників і буде скорочена далі;  $p(\lambda)$  нормована спектральна потужність джерела світла без блоку вибірки;  $T_{виб}(\lambda)$  спектральна функція пропускання блоку вибірки в джерелі випромінювання, форма залишається сталою, але спектр зсувається залежно від налаштувань блоку;  $T_{ф.зб}(\lambda)$  спектральна функція пропускання фільтра збудження;  $T_{дихр.зб}(\lambda)$  спектральна функція пропускання сигналу дихроїчного дзеркала для відбивання випромінювання збудження флуоресценції;  $T_{об}(\lambda)$  спектральна функція пропускання об'єктива;  $T_{дихр.ем}(\lambda)$  спектральна функція пропускання сигналу дихроїчного дзеркала для проходження випромінювання емісії;  $T_{ф.ем}(\lambda)$  спектральна функція пропускання фільтра емісії;  $I$  коефіцієнт перетворення оптичного сигналу в сигнал (електричний аналоговий, цифровий або інший) відеокамери (детектора), аналогічно до потужності лампи буде скорочений;  $i_{кам}(\lambda)$  спектральна нормована функція передачі сигналу, з оптичного в інший, у відеокамері (детекторі).

Опираючись на (1), (2), (3) для випадку двох різних флуоресцентних барвників «1» та «2» в одному експерименті при однакових умовах можна записати

$$\frac{C_1}{C_2} = \frac{k_{зб.2} k_{ем.2}}{k_{зб.1} k_{ем.1}} \cdot \frac{E_1}{E_2} = k_{12} \cdot \frac{E_1}{E_2} \quad (4)$$

$$C_1 = C_2 \cdot k_{12} \cdot \frac{E_1}{E_2} \quad (5)$$

Так, опираючись на відомі параметри обладнання, виміряні на цьому обладнанні рівні флуоресценції досліджуваного  $E_1$  та опорного  $E_2$  барвників (в тому числі флуоресцентно-мічених білків) та відому концентрацію опорного барвника  $C_2$  можна визначити невідому концентрацію досліджуваного барвника (або білка)  $C_1$ .

Цей метод після додаткових перевірок та доповнень був застосований для оцінки концентрації екзогенно експресованого білка НРСА з міткою YFP. Його концентрація складала  $3,4 \pm 1,1$  мкмоль/л. Даний підхід був нами запропонований для оцінки внутрішньоклітинної концентрації флуоресцентного кальцієвого барвника «Fura-2», що був завантажений до нейронів спинного мозку щурів у формі ефіру (Krotov та ін., 2017).

Цей метод після додаткових перевірок на ряді різних типів клітин, барвників і конфігурацій обладнання (Krotov та ін., 2017; Войтенко та ін., 2017; Cherkas та ін., 2018; Агашков та ін., 2018) був застосований для оцінки концентрації екзогенно експресованого білка гіпокальцину (рис. 1).

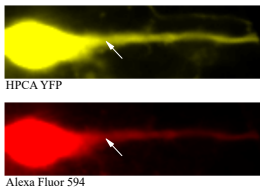


Рис. 1. Одиничний експеримент для виміру концентрації білка гіпокальцину з флуоресцентною міткою «YFP» (жовтий псевдоколір) при центральній довжині хвилі в блоці вибірки джерела світла 505 нм та «Alexa Fluor 594» (червоний псевдоколір) при центральній довжині хвилі в блоці вибірки 575 нм в дендриті гіпокампального нейрона.

З використанням розробленої методики виміру концентрації екзогенно-експресованих флуоресцентно-мічених білків в живих клітинах було визначено, що концентрація експресованого гіпокальцину дикого типу або мутантних варіантів N75K та T71N в наших експериментах сягала майже 10 мкмоль/л (Cherkas та ін., 2018). Ця величина порівняна з експресією ендogenous гіпокальцину що може сягати 30 мкмоль/л (Furuta та ін., 1999). Таким чином, концентрація екзогенних білків була достатньою для того, щоб мати змогу впливати на сигналізацію ендogenous гіпокальцину у культивованих нейронах гіпокампа щурів, що валідувало можливість проведення подальших досліджень з нейронами гіпокампу.

## 2. Вплив мутацій, що викликають дистонію DYT2 на властивості НРСА щодо зв'язування іонів кальцію

НРСА є потужним  $\text{Ca}^{2+}$  буфером, що зв'язує 3 іони кальцію на одну молекулу білка. Ми припустили, що додатковий екзогенний  $\text{Ca}^{2+}$  буфер, введений гетерологічною експресією НРСА, може мати значний вплив на кінетику транзєнтів концентрації кальцію ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) в цитозолі клітин, а мутантні форми, можуть не зв'язувати  $\text{Ca}^{2+}$  і менше на них впливати. Спочатку, було оцінено чи збільшить експресія НРСА цитозольну буферну ємність по  $\text{Ca}^{2+}$  достатньо, щоб це призводило до суттєвих змін в транзєнті спаду  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Для цього, клітини НЕК-293, що не експресують ендogenous гіпокальцин, було трансфіковано НРСА WT (гіпокальцин дикого типу) з флуоресцентною міткою CFP; далі трансфіковані та нетрансфіковані клітини в тих самих зразках культури були завантажені  $\text{Ca}^{2+}$ , що були зв'язані фото-деструктивним буфером NG-EGTA та  $\text{Ca}^{2+}$ -чутливим барвником «Fura Red». Транзєнти збільшення  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  були викликані серією послєдовних спалахів УФ випромінювання і виміряні для трансфікованих НРСА WT та нетрансфікованих клітин в одному полі зору (рис. 2). Транзєнт

спаду  $[Ca^{2+}]_i$ ; був суттєво повільнішим в клітинах трансфікованих НРСА WT в порівнянні з нетрансфікованими клітинами. Що проявляється у вищому залишковому рівні  $[Ca^{2+}]_i$ , а саме  $\Delta F/F = 0,34 \pm 0,02$  проти  $0,17 \pm 0,01$  через 80 с для трансфікованих НРСА WT та нетрансфікованих клітин (далі NT) відповідно,  $p < 0,01$ ,  $n_{WT} = 10$  і  $n_{NT} = 16$ , 4 різні культури клітин. Таким чином, введення екзогенного НРСА явно підвищило буферну ємність по  $Ca^{2+}$  в клітинах НЕК-293, що помітно через збільшену тривалість транзйенту спаду  $[Ca^{2+}]_i$ . Величина цієї зміни була суттєвою, тому, якщо мутантний НРСА справді має відмінності у зв'язуванні  $Ca^{2+}$ , то вони можуть бути помітні в такому експерименті.

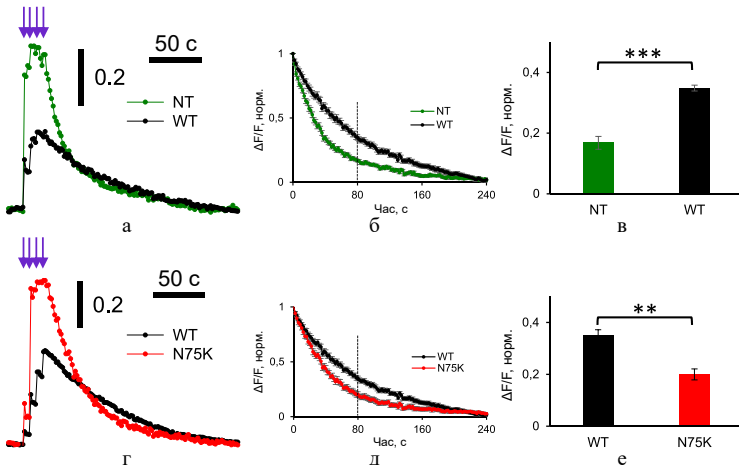


Рис. 2. а-в. Часовий перебіг транзйенту зміни  $[Ca^{2+}]_i$  викликаних керованим вивільненням  $Ca^{2+}$  у клітинах нетрансфікованих (NT, зелена лінія) та трансфікованих НРСА WT (WT, чорна лінія). г-е. Часовий перебіг транзйенту зміни  $[Ca^{2+}]_i$  викликаних керованим вивільненням  $Ca^{2+}$  у клітинах трансфікованих НРСА N75K (N75K, червона лінія) та трансфікованих НРСА WT (WT, чорна лінія). Фіолетові стрілки в а та г вказують моменти керованого вивільнення  $Ca^{2+}$ .

Наступним кроком була перевірка, чи призведе експресія мутантних дистонічних (DYT2) варіантів НРСА до зменшення буферної ємності по  $Ca^{2+}$  в НЕК-293 клітинах у порівнянні з НРСА WT. Культура клітин була по чергово трансфікована НРСА WT міченим флуоресцентною міткою CFP та дистонічними мутантами міченими за допомогою YFP. В результаті такої процедури були отримані клітини трансфіковані НРСА WT або обраним дистонічним мутантом ( $< 5\%$  клітин у кожній групі) в тій самій культурі та в одному полі зору. Було виявлено, що транзйенти спаду  $[Ca^{2+}]_i$  суттєво швидші в клітинах котрі експресують мутант НРСА N75K у порівнянні з НРСА WT (рис. 2г-е). Ці результати вказують на зменшену загальну буферну ємність мутантного НРСА N75K в порівнянні з НРСА WT у межах досліджуваного діапазону  $[Ca^{2+}]_i$ .

Інші експерименти цієї ж серії також вказують на те, що буферна ємність НРСА WT порівняно більша при базальному рівні  $[Ca^{2+}]_i$ , ніж при її високому рівні, на відміну від N75K. Останнє також вказує на більшу спорідненість НРСА WT до  $Ca^{2+}$  ніж

у дистонічного мутантного НРСА N75K.

### 3. Мутація N75K змінює біофізичні властивості НРСА

Отримані результати вказують на те, що дистонічні мутантні білки мають змінені біофізичні властивості в порівнянні з НРСА WT (рис. 2). Тому, ці мутації можуть призводити до змін в  $\text{Ca}^{2+}$ -залежності, величині та часових характеристиках процесу транслокації НРСА з цитозолу до мембрани. Вони також можуть впливати на  $\text{Ca}^{2+}$ -мірістоіловий перемикач (Ames та ін., 1997), що в свою чергу може спричинити повну відсутність транслокації мутантного НРСА. Тому, далі було досліджено чи впливають дистонічні мутації на транслокацію НРСА до мембрани в клітинах НЕК-293. Для цього, клітини НЕК-293 було одночасно трансфіковано НРСА WT міченим флуоресцентною міткою CFP та одним з дистонічних мутантів з міткою YFP. Збільшення в  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  та його вимірювання проводилось як і попередній серії дослідів. В такому експерименті пара білків НРСА WT та обраного мутантного варіанту є об'єктами впливу однакового просторово-часового розподілу зміни  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Що дає можливість прямо порівнювати  $\text{Ca}^{2+}$ -залежність, величину та часові характеристики транслокації цих білків.

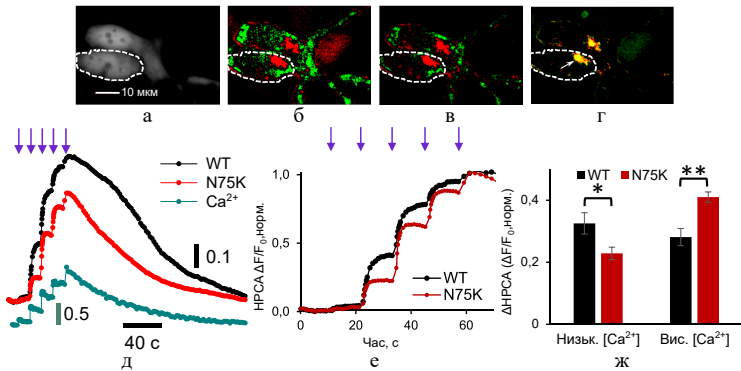


Рис. 3. а. Флуоресцентне зображення клітин НЕК, що спільно експресують WT НРСА-CFP і N75K-YFP, за-реєстроване в каналі випромінювання CFP.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  трансфенти викликані фотовивільненням  $\text{Ca}^{2+}$  (зелена лінія на д), що призводять до транслокації WT НРСА-CFP (б) і N75K-YFP (в) до певних місць у клітинах. Червоні та зелені області, тут і надалі, вказують на місця в яких трансїєнти  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  викликали зменшення та збільшення концентрації білка відповідно, що відображає транслокацію білка з цитозолу до мембран. г. Накладання транслокації WT НРСА-CFP і мутанту N75K-YFP, що показані на (б) і (в). Зверніть увагу на колокалізацію сайтів транслокації для обох білків (жовтий колір). д. Часові зміни  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (зелена крива) і  $\text{Ca}^{2+}$ -залежна транслокація WT НРСА-CFP (чорна крива) і N75K-YFP (червона крива), спричинені по-слідковними вивільненнями  $\text{Ca}^{2+}$ . Результати в (д) та (е) показані для регіону, позначено білою стрілкою на (г). Чорна вертикальна шкала відображає відносні зміни  $\Delta F/F_0$  у флуоресценції білка в цій області. Моменти вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ , спричинені УФ-спалахами, позначені фіолетовими стрілками. е. Нормований часовий перебіг наростання інтенсивності флуоресценції білка в області транслокації, показаної на (д). Вісь Y у (е) представляє зміни  $\Delta F/F_0$ , нормалізовані для кожної кривої у (д) до її максимального значення. ж. Загальні результати, що демонструють протилежні зміни у відносних амплітудах транслокації для WT НРСА-CFP і N75K-YFP у відповідь на перші два (низький Ca) і останні два (високий Ca) вивільнення  $\text{Ca}^{2+}$ .

НРСА WT та обраний мутантний НРСА разом були рівномірно розповсюджені по об'єму та мембрані клітини (Dovgan та ін., 2010). Різде збільшення  $[Ca^{2+}]_i$  відбувалось при керованому вивільненні  $Ca^{2+}$  і призводило до транслокації НРСА WT та його дистонічних мутантних варіантів до плазматичної мембрани та певних внутрішньоклітинних органел (рис. 3). Що вказує на принаймні часткову присутність функціонального  $Ca^{2+}$ -мірістоілового перемикача у обох мутантних варіантах. Транслокація НРСА WT та обраного мутантного варіанту відбувалась до одних і тих самих мембранних локусів, з чого можна зробити висновок, про високу спорідненість усіх досліджених варіантів НРСА до певних клітинних мембран. Однак величини транслокації відрізнялись. Саме мутантний НРСА N75K (рис. 3), а не T71N (не показано), суттєво менше транслокувався порівняно з НРСА WT при концентрації вільного кальцію, що були близькі до базальних. В той же час при дуже високих рівнях  $[Ca^{2+}]_i$  НРСА N75K починав транслокуватися відносно краще ніж НРСА WT (рис. 3ж) хоча загальний рівень його переміщення до мембран був нижчим (рис. 3д).

Такі результати прямо вказують на порушену сигнальну функцію мутантного НРСА N75K, оскільки його транслокація до мембрани при базальному рівні  $[Ca^{2+}]_i$  мала. Загалом ці та інші представлені в роботі результати свідчать про те, що дистонічні мутації DYT2 не мають суттєвого впливу на  $Ca^{2+}$ -мірістоіловий перемикач та селективність транслокації до певних мембран. Однак порушена у мутантного НРСА N75K  $Ca^{2+}$ -чутливість призводить значного достовірного зменшення транслокації до мембран при фізіологічних рівнях  $[Ca^{2+}]_i$ .

#### **4. Короткі серії потенціалів дії не призводять до транслокації N75K**

Попередні експерименти дозволили виявити біофізичні зміни у функціонуванні НРСА, що викликані мутацією N75K в фізіологічному діапазоні  $[Ca^{2+}]_i$ , котрий можна спостерігати в нейронах ЦНС включаючи нейрони гіпокампу. Тому виникає питання, як ці зміни впливають на транслокацію НРСА викликану фізіологічною нейронною активністю. Транслокація НРСА є фільтром низьких частот по  $[Ca^{2+}]_i$  і не відбувається при короткотривалих підвищеннях  $[Ca^{2+}]_i$  навіть зі значною амплітудою. По суті  $[Ca^{2+}]_i$  інтегрується в даному процесі (Markova та ін., 2008; Dovgan та ін., 2010). Тому, доцільно було дослідити різницю в транслокації між НРСА WT та мутантного N75K як відповідь на серію потенціалів дії (5..100 потенціалів дії з частотою 50 Гц). Серія 5..20 потенціалів дії відповідає фізіологічній внутрішній активності нейронів, в той час, як довші серії мають місце при патологічних порушеннях (Madison та ін., 1984; Parrilla-Carrero та ін., 2018). Нами було висунуто гіпотезу, що менша чутливість до  $Ca^{2+}$  має призводити до значних відмінностей в інтегруванні  $Ca^{2+}$ -сигналів. Оскільки потенціали дії призводять до появи sANP через транслокацію НРСА до плазматичної мембрани (Tzingounis та ін., 2007; Andrade та ін., 2012; Kim та ін., 2012), доцільно перевірити, чи транслокується мутантний варіант цього білка при коротких серіях потенціалів дії (ПД). Для цього було проведено експеримент з серіями потенціалів дії у гіпокампульних нейронах, трансфікованих НРСА WT CFP та НРСА N75K YFP. Потенціали дії були викликані деполяризацією (рис. 4). В цих дослідах спосте-

рігались транслокації НРСА WT у відповідь на серію коротких потенціалів дії (5..20 ПД), а у випадку мутантного НРСА N75K транслокація була майже відсутня (амплітуда транслокацій НРСА WT була в 6 разів вища ніж при транслокації N75K,  $p < 0,001$ ,  $n = 11$ , рис. 4).

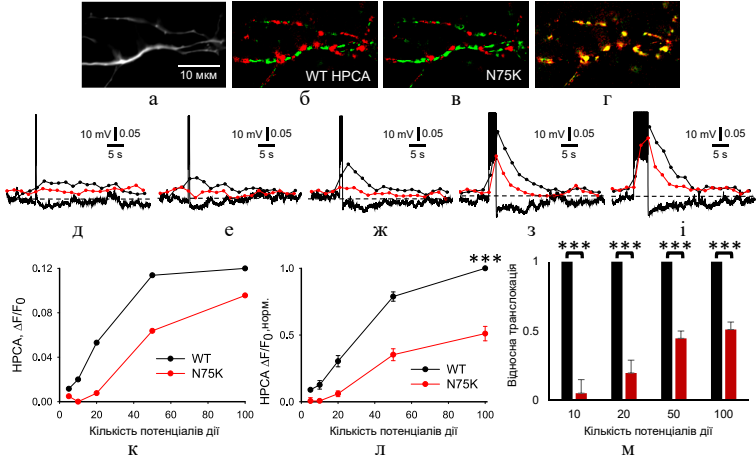


Рис. 4. Короткі серії потенціалів дії не викликають транслокації N75K. а. Флуоресцентне зображення проксимального дендритного дерева репрезентативного нейрона гіпокаampu, що одночасно експресує WT НРСА-CFP і N75K-YFP (канал випромінювання CFP). Транслокація WT НРСА-CFP (б) і N75K-YFP (в) до плазматичної мембрани в нейронному дендритному дереві у відповідь на серію з 50 ПД (50 Гц) показано червоним кольором. г. Накладення місць транслокації WT НРСА-CFP і N75K-YFP показано жовтим кольором, що вказує на подібну просторову структуру транслокації білків. д-і. Транслокації WT НРСА-CFP (чорна крива) і N75K-YFP (червона крива) і мембранного потенціалу (нижня чорна крива), викликаних серіями ПД, що демонструє значно слабшу транслокацію N75K-YFP. Зверніть увагу на повільну післягіперполяризацію, sАНP, спричинену серіями ПД. к. Амплітуди транслокацій в залежності від кількості ПД для нейрону з (а-і). л. Зведені результати для залежності нормалізованої амплітуди транслокації від кількості ПД ( $n = 11$ ). м. Порушена транслокація мутанта N75K. Амплітуди транслокації N75K-YFP, нормалізовані до амплітуд WT НРСА-CFP.

Довгі серії ПД викликали транслокацію як НРСА WT, так і N75K (рис. 4). Амплітуда транслокації НРСА N75K була менша ніж у НРСА WT і складала  $0,51 \pm 0,05$  % від останньої (після 100 потенціалів дії,  $p < 0,001$ ,  $n = 11$ ). Як і в попередніх результатах, НРСА WT та мутантний N75K транслокувались до тих самих місць в дендритній плазматичній мембрані.

Ці результати свідчать про те, що при звичайній нейронній активності у вигляді коротких серій потенціалів дії, мутантний варіант N75K не транслокується до плазматичної мембрани, а це призводить до фільтрації цього типу активності. Оскільки НРСА може діяти як нейронний  $\text{Ca}^{2+}$  сенсор і керувати певними мембранними механізмами (в тому числі провідністю sАНP) тільки після транслокації до плазматичної мембрани, то властивості мутантного варіанту N75K скоріше за все призведуть до порушення його функціонування при такому типі нейронної активності.

## 5. Порушена транслокація НРСА N75K при $\theta$ -стимуляціях

Раніше було показано, що НРСА виконує інтегрування зростання  $[Ca^{2+}]_i$ , яке викликане повторюваними активаціями нейрона або тонічною активністю і результатом є його транслокація цього білка до плазматичної мембрани (Markova та ін., 2008; Dogan та ін., 2010). Оскільки величина провідності sANP пропорційна кількості транслокованого НРСА, то це інтегрування буде робити внесок до sANP викликаній повторюваними активаціями нейрона. Оскільки було виявлено, що мутантний варіант N75K має більшу швидкість виходу з плазматичної мембрани та меншу чутливість до  $Ca^{2+}$  порівняно з НРСА WT, то було висунуто гіпотезу, що мутація N75K порушує інтеграцію повторюваного підвищення  $[Ca^{2+}]_i$ . Було виявлено, що як НРСА WT так і N75K за рахунок транслокації до плазматичної мембрани виконують інтегрування транз'єнтів зміни  $Ca^{2+}$ , які викликані TBS (рис. 5). Площа поверхні в якій відбувався транз'єнт транслокації мутантного варіанту НРСА N75K була суттєво менша порівняно з НРСА WT (в 2-5 разів за різних інтервалів часу між пачками). Для перевірки цієї гіпотези, нейрони було стимульовано  $\theta$ -імпульсами (Widman та ін., 2018). Кожний стимул складався з 5 серій по 5 потенціалів дії (пачка) при 100 Гц та інтервалі 0,2 с.

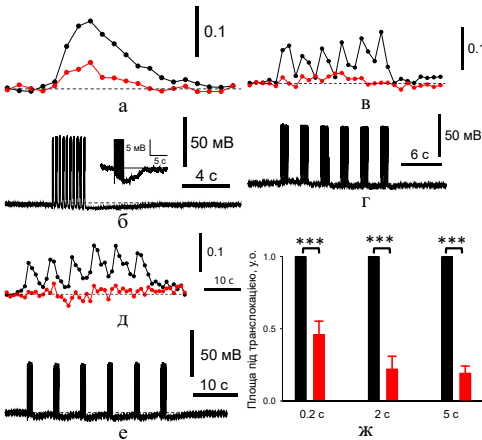


Рис. 5. Порушення транслокації мутанта N75K у відповідь на тета-стимуляцію. а, б. Транслокації WT НРСА-CFP (чорні криві) і N75K-YFP (червоні криві), викликані в спільно трансфікованому нейроні двома тета-стимуляціями, розділеними інтервалом 0,2 с, демонструючи значно слабшу транслокацію N75K-YFP. Чорна вертикальна шкала відображає відносні зміни ( $\Delta F/F_0$ ) флуоресценції білка в місцях транслокації. Вставка демонструє sANP, що спостерігається після тета-сплесків. в, г, д, е. Порушення інтеграції тета-сплесків шляхом транслокації N75K з інтервалом між тета-стимуляціями 2 та 5 с. Нижні чорні криві представляють зміни потенціалу мембрани нейронів. ж. Загальні результати щодо площі під перехідними процесами транслокації N75K-YFP, нормалізовані до відповідних областей для транслокації WT НРСА-CFP.

Отримані результати вказують на те, що хоч N75K також здатний інтегрувати активності нейронів викликані TBS з коротким інтервалом, але цей процес все ж порушений в порівнянні з НРСА WT. Більше того, у випадку мутантного варіанту N75K інтегрування, виміряне як величина транслокації гіпокальцина було майже відсутнє (рис. 5). В той час як НРСА N75K відповідав на кожний TBS відсутнім або незначним транз'єнтом транслокації, НРСА WT був зв'язаний до плазматичної мембрани в інтервалі між імпульсами і поступово накопичувався при TBS, виконуючи інтегрування нейронної активності.



## 6. Мутантний варіант гіпокальцину N75K не викликає струм sANP

Далі, нами було перевірено чи призводить мутація N75K до порушення керування струму sANP. Отримані результати вказують на те, що струм sANP був присутній в нейронах котрі експресували мутантний варіант HPCA N75K (рис. 5а,5б), що свідчить про те, що N75K не заважав ендogenousму HPCA WT викликати цей струм. Оскільки мутантний варіант білку незначним чином транслокувався до плазматичної мембрани (рис. 3, 4), то було висунута гіпотеза, що зменшена транслокація мутантного варіанту має призвести до пропорційного зменшення sANP, якщо HPCA N75K та WT рівно-сильно здатні активувати sANP при транслокації до плазматичної мембрани.

Гіпокампальні нейрони експресують до 30 мкмоль/л ендogenousного HPCA WT (Furuta та ін., 1999), в той час як рівень експресії екзogenousних білків досягає 10..15 мкмоль/л (Cherkas та ін., 2018). Тому, експресія екзogenousного HPCA WT може призводити до підвищення (до 50%) загальної кількості HPCA транслокованого до плазматичної мембрани (ендogenousного та екзogenousного) та пропорційного збільшення sANP. А мутантний HPCA N75K скоріше за все не підвищує sANP, через порушену транслокацію до плазматичної мембрани.

Для перевірки впливу мутації на струм sANP було проведено реєстрацію цього струму в гіпокампальних нейронах трансфікованих HPCA N75K та нативних нейронах. Струм визначався як хвіст, що був присутнім після деполяризації клітини тривалістю 2 с з  $-55$  до  $+30$  мВ. Однак, збільшення струму sANP не спостерігалось в нейронах трансфікованих HPCA N75K в порівнянні з нетрансфікованими (рис. 6а, б;  $p = 0,9$ ,  $n = 7$  для нетрансфікованих та  $n = 5$  для клітин трансфікованих N75K). Це вказує на неспроможність мутантного HPCA N75K викликати додатковий струм sANP. Крім того, цей струм не був також зменшений, що вказує на відсутність впливу HPCA N75K на функціонування ендogenousного HPCA WT, що керує струмом sANP.

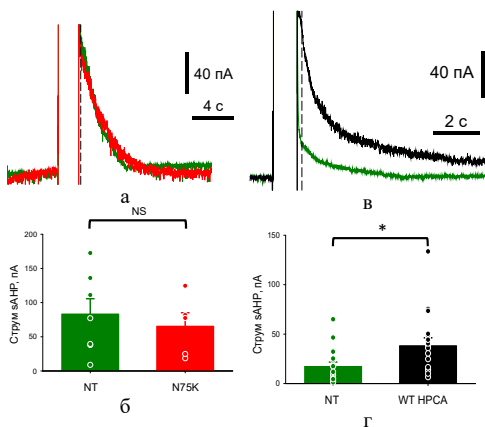


Рис. 6. а, б. Відсутність впливу мутантного варіанту HPCA N75K експресованого в гіпокампальному нейроні на активацію або інгібування струму sANP. Струми sANP, викликані у нейронах нетрансфікованих (зелена крива) та трансфікованих мутантним HPCA N75K (червона крива). в, г. Вплив надмірної експресії HPCA WT на збільшення струму sANP. Струми sANP викликані в нейронах нетрансфікованими (зелена крива) та з надмірною експресією HPCA WT (чорна крива). Вверху приклади струмів; внизу загальний результат.

Можливо, що збільшення струму sANP в нейронах трансфікованих мутантним варіантом HPCA N75K не було помітне оскільки провідність sANP була повністю

активована транслокацією ендogenous sАНР. Для перевірки цієї гіпотези, було проведено експеримент з трансфікуванням нейронів НРСА WT, для виявлення впливу надмірної експресії НРСА WT на збільшення струму sАНР. В нейронах спільно трансфікованих НРСА WT та CFP було проведено реєстрацію струмів. Було показано, що середня амплітуда струму sАНР була суттєво збільшена в клітинах з надмірною експресією НРСА WT (рис. 6в, г;  $p < 0,05$ ,  $n = 17$  для нетрансфікованих та трансфікованих НРСА WT клітин). Таким чином, експресія екзогенного НРСА WT призвела до збільшення струму sАНР, на відміну від експресії його мутанту НРСА N75K.

Загалом з цього розділу було зроблено висновок, що мутантний варіант НРСА N75K не може викликати струм sАНР.

### **7. Мутантний варіант НРСА N75K підвищує збудливість нейронів**

Опираючись на отримані експериментальні результати, було проведено моделювання впливу мутації N75K на збудливість нейронів. Для цього було використано загальновідому модель пірамідального нейрона неокортикального шару 5 (Mainen та ін., 1996), що розроблена в програмному забезпеченні «NEURON» (Hines та ін., 2001). До моделі було додано провідність sАНР, керовану транслокацією НРСА до плазматичної мембрани проксимальної частини апікального дендрита (Power та ін., 2011). В моделі було реалізовано, що мірістоіловий перемикач НРСА спрацьовує після зв'язування трьох  $\text{Ca}^{2+}$  (O'Callaghan та ін., 2003; Raghuram та ін., 2012) після чого білок транслюється до плазматичної мембрани завдяки дифузії (Markova та ін., 2008; Dovgan та ін., 2010). Транслокований НРСА керує провідністю sАНР відповідно до першого порядку реакції між НРСА та калієвими каналами, котрі беруть участь в цій провідності. При високих рівнях  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  як НРСА WT, так і його мутантний варіант N75K транслюються до тих самих локусів мембрани в проксимальній частині дендрита, де мутантний білок може також потенційно керувати калієвою провідністю. В моделі також було визначено, що обидва білки однаково спроможні керувати провідністю sАНР при їх транслокації. Було промодельовано декілька основних станів, що призводять до нейронної активності в ЦНС і було визначено, чи заміна НРСА WT на N75K призводить до підвищеної збудливості нейронів. В першу чергу було промодельовано тонічну активацію іонотропних рецепторів (Shen та ін., 2017), що опосередкована вивільненням глутамату (Rose та ін., 2018). В моделі тонічна активація рецепторів розмішених в сомі викликала регулярну генерацію ПД. Внесення в модель провідності sАНР керованої транслокацією гіпокальцину призвело до суттєвого зменшення частоти ПД, в той час як внесення мутантного НРСА N75K майже не зменшувало частоти ПД. Інші два випадки суттєвого збільшення збудливості нейронів ЦНС спричинені мутацією НРСА N75K представлені на рис. 7.

Результати моделювання вказують на те, що знижена транслокація мутанта N75K до плазматичної мембрани значно підвищує збудливість нейронів у багатьох різних станах, що виникають у мозку. Таким чином, в цій роботі було показано, що мутант N75K, на відміну від ендogenous гіпокальцину, не може транслюватися до плазматичної мембрани дендритних компартментів у відповідь на фізіологічно релевантні

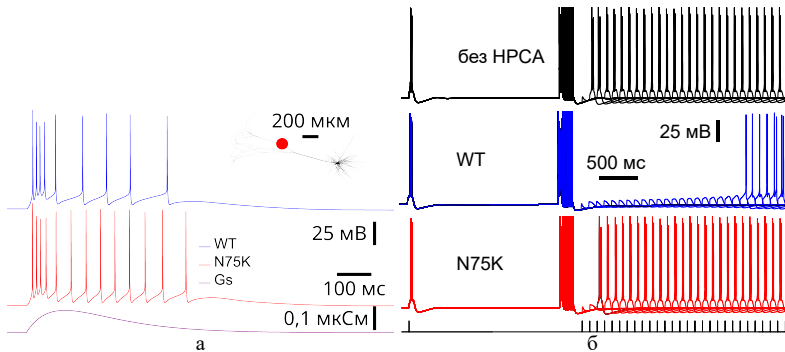


Рис. 7. Мутація N75K підвищує збудливість нейронів. а. Короткочасна активація глутаматергічної провідності (нижня крива) викликала сильніший сплеск соматичних ПД у моделі з мутантом N75K порівняно з моделлю з WT HPCA, що демонструє повільнішу адаптацію та вищу збудливість, викликану мутацією. Провідність була розташована на позначеній червоним ділянці дендритного дерева нейрона, показаного на вставці. б. Струм sANP керований WT HPCA та індукований серією з 10 ПД, значно знижував здатність нейрона досягати порогу ПД у відповідь на коротку синаптичну стимуляцію, що викликала два ПД (синя крива). Затримка значно зменшувалася для нейронів, які експресують мутант N75K замість WT HPCA (червона крива), що вказує на підвищену збудливість клітин, спричинену цією мутацією. Збудливість нейронів, що експресують мутант N75K, була аналогічна збудливості нейронів без гіпокальцину (чорна крива).

стану нейронної активності. Це порушення робить мутант нездатним контролювати повільну пост-гіперполяризацію і, отже, підвищує збудливість нейронів, що, ймовірно, лежить в основі первинної дистонії.

## ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі відповідно до мети та поставлених завдань був розроблений новітній підхід оцінки концентрації широкого кола флуоресцентних барвників в різних типах клітин. За допомогою цього підходу та генетичних, електрофізіологічних і флуоресцентних методів проведено дослідження порушень збудливості клітин, що викликаються мутаціями гена гіпокальцину, які призводять до розвитку первинної дистонії типу DYT2. За результатами проведених експериментів було зроблено наступні висновки.

1. З використанням розробленої методики виміру концентрації флуорофорів в живих клітинах було визначено, що концентрація екзогенно-експресованого в нейронах білка гіпокальцину дикого типу або його мутантних варіантів N75K та T71N є співмірною з експресією ендогенного гіпокальцину. Таким чином, було показано, що концентрація екзогенних білків в проведених дослідах була достатньою для того, щоб вони мали змогу впливати на сигналізацію ендогенного гіпокальцину у культивованих нейронах гіпокампа щурів.
2. Було виявлено, що мутація гіпокальцину N75K, яка спостерігається при первинній дистонії типу DYT2, призводить до зменшення його спорідненості до іонів кальцію при фізіологічних значеннях його внутрішньоклітинної концентрації. Разом з тим інша дистонічна мутація гіпокальцину T71N не призводить до помітних змін

спорідненості білку до іонів кальцію.

3. Встановлено, що мутація N75K суттєво зменшує  $\text{Ca}^{2+}$ -залежну транслокацію гіпокальцина із цитозолу до плазматичної мембрани у нейронах первинної культури гіпокампа шурів. Водночас ця мутація не впливає ні на мірістоїловий перемикач, ні на просторовий розподіл вбудовування білка до цитоплазматичної мембрани якщо воно відбулося. Мутація T71N не призводить до змін у транслокації гіпокальцина.
4. В нейронах первинної культури гіпокампа шурів при додатковій екзогенній експресії гіпокальцина дикого типу збільшується струм повільної постгіперполяризації, sANP, в той час, як екзогенна експресія мутантного гіпокальцина N75K не збільшує цей струм. Нами зроблений висновок, що дистонічний мутант N75K не може викликати струм повільної постгіперполяризації при фізіологічних концентраціях іонів кальцію. У випадку мутації T71N статистично достовірних відмінностей у регуляції sANP не виявлено.
5. Проведені нами симуляційні експерименти показують, що зменшена  $\text{Ca}^{2+}$ -залежна транслокація мутанта N75K до плазматичної мембрани значно підвищує збудливість нейронів у багатьох станах активності, що реалізуються у мозку.
6. Таким чином нами показано, що дистонічний мутант N75K білку гіпокальцина, на відміну від його дикого типу, не може транслокуватись до плазматичної мембрани дендритних компартментів у відповідь на фізіологічно релевантні типи активності нейронів. Це порушення робить мутант нездатним викликати повільну постгіперполяризацію і, як наслідок, підвищує збудливість нейронів, що, ймовірно, і лежить в основі розвитку первинної дистонії типу DYT2.

### **СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

В яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Cherkas V., Grebenyuk S., Osypenko D., Dovgan A. V., Grushevskiy E. O., Yedutenko M., Sheremet Y., Dromaretsky A., Bozhenko A., Agashkov K., Kononenko N. I., Belan P. Measurement of intracellular concentration of fluorescently-labeled targets in living cells. PLOS ONE. 2018. 13(4): e0194031.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0194031  
Особистий внесок здобувача: проведення частини електрофізіологічних і флуоресцентних експериментів; збір та організація експериментальних даних; обробка даних; написання програмного забезпечення для обробки даних; обробка частини даних; підготовка рисунків.
2. Osypenko D., Dovgan A., Kononenko N., Dromaretsky A., Matvieienko M., Rybachuk O., Zhang J., Korogod S., Venkataraman V., Belan P. Perturbed  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent signaling of DYT2 hippocalcin mutant as mechanism of autosomal recessive dystonia. Neurobiology of Disease. 2019. 132: 104529.  
DOI: 10.1016/j.nbd.2019.104529  
Особистий внесок здобувача: проведення частини експериментів з клітинами НЕК-293 та культивованими нейронами гіпокампу; написання програмного забезпечення для обробки даних; обробка частини даних; написання частини

результатів; підготовка рисунків.

3. Krotov V., Tokhtamysh A., Kopach O., Dromaretsky A., Sheremet Y., Belan P., Voitenko N. Functional Characterization of Lamina X Neurons in ex-Vivo Spinal Cord Preparation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017. 11(342): 1—12.

DOI: 10.3389/fncel.2017.00342

Особистий внесок здобувача: встановлення та налаштування бокового інфрачервоного освітлення для відеореєстрації; технічна реалізація експериментів для вимірювання концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  за допомогою флуоресцентного барвника «Fura-2» та оцінки концентрацій та розподілу барвника у нейронах; підготовка рисунків.

4. Войтенко Н. В., Риков С. О., Шаргородська І. В., Агашков К. С., Краснякова М. Є., Ніколайчук Н. С., Рибачук О. А., Забенько Є. Ю., Дромарецький А. В. Кількісний аналіз вітальності гангліонарних клітин сітківки при експериментальній глаукомі низького тиску у щурів: ефект терапії поляризованим світлом. *Архів офтальмології України*. 2017. 5(3): 28—36.

DOI: 10.22141/2309-8147.5.3.2017.172351

Особистий внесок здобувача: проведення експериментів щодо оптимізації забарвлення клітин сітківки ретроградним барвником «Fluorogold». Реєстрації флуоресцентних забарвлень клітин сітківки та оцінки концентрацій та розподілу барвника у нейронах; підготовка рисунків.

5. Агашков К., Краснякова М., Ніколайчук Н., Рибачук О., Забенько Є., Дромарецький А., Шаргородська І., Риков С., Войтенко Н. Вплив поляризованого світла на життєздатність гангліонарних клітин сітківки при глаукомі низького тиску у щурів. *Фізіологічний журнал*. 2018. 64(4): 41—50.

DOI: 10.15407/fz64.04.041

Особистий внесок здобувача: проведення експериментів щодо оптимізації забарвлення клітин сітківки ретроградним барвником «Fluorogold». Реєстрації флуоресцентних забарвлень клітин сітківки та оцінки концентрацій та розподілу барвника у нейронах; підготовка рисунків.

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Osypenko D. S., Dovgan A. V., Kononenko N. I., **Dromaretsky A. V.**, Matveenko M., Rybachuk O. A., Zhang J., Korogod S. M., Venkataraman V., Belan P. Impaired signaling of *dyt2* hippocalcin mutant as mechanism of autosomal recessive dystonia.

20-ий з'їзд Українського Фізіологічного Товариства з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження П.Г. Костюка, 27-30 травня 2019 р., м. Київ.

2. Kononenko N. I., Dovgan A., Viviano J., **Dromaretsky A.**, Zhang J., Venkataraman V., Belan P. V.

Neurocalcin delta translocation is not dependent on its dimerization.

Society for Neuroscience 2018, San Diego, USA, 2018.

3. Duzhyy D., Dovgan A., Kononenko N., **Dromaretsky A.**, Voitenko N., Belan P.

Developing double stranded RNAs to efficiently suppress expression of T-type Ca channels for treating diabetic neuropathy.

Federation of European Neuroscience Societies Forum 2024, pp PS05-28M-382. Vienna, Austria, 2024.

4. Dovgan A.V., Kononenko N.I., Viviano J., **Dromaretsky A.**, Belous I., Marimonchik A., Satretdinova R., Zhang J., Venkataraman V., Belan P.V.

N-terminal domains of neurocalcin  $\delta$  and hippocalcin underlies their distinct signalling.

Тематичний VII з'їзд Українського біофізичного товариства, Київ, 2018.

## АНОТАЦІЯ

Дромарецький А.В. Порушення  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної сигналізації гіпокальцина як механізм первинної аутосомно-рецесивної ізольованої дистонії. – 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, 2024.

Кальцієва сигналізація в нейронах є необхідною для регуляції багатьох клітинних функцій. Механізми, за допомогою яких зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію у нейронах можуть регулювати ці функції, в більшості випадків забезпечуються за допомогою невеликих проміжних універсальних або спеціалізованих нейронних кальцієвих сенсорних білків (Neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  Sensor (NCS) proteins). Саме ці білки в подальшому регулюють активність ефекторних білків, таких як канали, насоси та ензими. Останні дослідження доводять, що ці білки є вкрай важливими в різних аспектах нейронних дисфункцій і що генетичні мутації білків NCS прямо впливають на розвиток неврологічних захворювань. Таким чином, детальне розуміння фундаментальних аспектів молекулярних і клітинних механізмів регуляції ефекторів за допомогою нейронних кальцієвих сенсорних білків і їх патологічних змін є вкрай важливим для розробки новітніх підходів до лікування різноманітних нервових захворювань. Первинна аутосомно-рецесивна ізольована дистонія (DYT2) є неврологічним захворюванням, яке проявляється у вигляді неконтрольованих постійних або повторюваних скороченнях м'язів. Такі скорочення можуть призводити до аномальних рухів кінцівок та болісних поз у пацієнта, що негативним чином впливає на якість їх життя. Нещодавні дослідження вказують на зв'язок даного захворювання з мутаціями гена нейронного кальцієвого сенсорного білка гіпокальцина (HPCA), а саме точковими міссенс-мутаціями N75K та T71N. Цей ген майже виключно експресується у мозку, особливо з високим рівнем експресії у корі, смугастому тілі, мозочку та гіпокампі – саме в тих його ділянках, що змінюються при розвитку дистонії. HPCA має три EF домени, що здатні приєднувати  $\text{Ca}^{2+}$ . Приєднання  $\text{Ca}^{2+}$  до цих доменів призводить до кальцій-залежної конформаційної зміни білка, що супроводжується виходом його N-термінального кінця, котрий містить залишок жирної кислоти мірістоїлу, з гідрофобної кишені молекули. Це дозволяє HPCA переміщуватись (транслокуватись) з цитозолу і вбудовуватися за допомогою мірістоїлу до внутрішнього шару плазматичної мембрани. Раніше було показано, що саме ця -залежна транслокація HPCA призводить до гальмування коркових та гіпокампальних нейронів завдяки активації струму повільної постгіперполяризації (sAHP). Метою роботи було встановити біофізичні механізми сигналізації гіпокальцина, що контролюють струм повільної гіперполяризації, виявити відмінності в біофізичних властивостях мутантних варіантів T71N та N75K білка гіпокальцина від властивостей білка дикого типу, а також обумовлені цими відмінностями порушення молекулярних сигнальних механізмів, в роботі яких цей білок бере участь. Дослідження проводилось з використанням генетичних, електрофізіологічних та флуоресцентних методів. А для оцінки

концентрації експресованих в нейронах різних екзогенних варіантів гіпокальцина було розроблено новітню методику виміру концентрації досліджуваних флуорофорів, що заснована на використанні оптичних спектральних характеристик обладнання та використаних флуоресцентних міток і опорних барвників з відомою концентрацією. В роботі показано, що мутація N75K, виявлена при дистонії типу DYT2, призводить до втрати гіпокальцином його функцій, як сенсора іонів кальцію при фізіологічній нейронній активності. Такий мутований гіпокальцин не може контролювати розвиток повільної постгіперполяризації в нейронах, адже ця мутація змінює можливості гіпокальцина до  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної транслокації із цитозолу до плазматичної мембрани. Транслокація гіпокальцина N75K до плазматичної мембрани апікального дендрита нейрона, який бере участь в генерації струму повільної постгіперполяризації, була помітно та достовірно зменшена порівняно з гіпокальцином дикого типу. Це зменшення супроводжувалось неспроможністю мутантного варіанту гіпокальцина N75K викликати струм повільної постгіперполяризації в додаток до того струму, що був викликаний транслокацією ендогенного гіпокальцина. В той час як експресія гіпокальцина дикого типу призводила до збільшення цього струму. Проте, дана мутація N75K не впливає ні на мірістоїловий перемикач, ні на просторовий розподіл вбудовування білка до плазматичної мембрани. Водночас мутація T71N не призводить до змін у транслокації гіпокальцина. Загалом мутація N75K зумовлює підвищену збудливість нейронів у відповідь на серію пачок потенціалів дії та  $\theta$ -стимуляцію, оскільки даний мутант не викликає гальмівні струми повільної постгіперполяризації. Таким чином, наступні за пачковою активністю нейронів постсинаптичні струми будуть викликати потенціали дії у таких нейронах з більшою імовірністю, що може бути механізмом рухових розладів, які спостерігаються при первинній дистонії типу DYT2. Моделювання нейронної активності підтверджує порушену і надмірну збудливість нейронів з мутантним варіантом гіпокальцина N75K подібно до клітин з відсутнім гіпокальцином. Модель нейрона з урахуванням  $\text{Ca}^{2+}$ -залежної передачі сигналу за допомогою гіпокальцина та викликаного його транслокацією струму повільної постгіперполяризації чітко повторює як експериментально виміряні транслокації гіпокальцина, так і струми повільної постгіперполяризації, що спостерігались в наших експериментах. Дослідження з моделюванням на основі такої моделі показали підвищену збудливість нейронів які експресують мутантний варіант N75K, в порівнянні з диким типом гіпокальцина. Це підвищення було показано в різних умовах, при яких генерація потенціалів дії може виникати у нейронах центральній нервовій системі. Зокрема було показано, що мутація N75K призводить до скорішого початку та збільшеної частоти тонічної нейронної активності, підвищеної генерації потенціалів дії та порушеної адаптації їх частоти в межах серії імпульсів які індуковані синаптичною стимуляцією, а також значного зменшення інтервалу часу затримки до наступного потенціалу дії, що викликається постсинаптичним потенціалом. Отримані результати вказують на те, що генетичні втручання націлені на збільшення експресії гіпокальцина дикого типу у нейронах аномально збуджених низхідних шляхів, котрі регулюють роботи



скелетної мускулатури, може відновити повільну постгіперполяризацію в цих нейронах і нормалізувати тонус мускулатури. Таке втручання могло б бути ефективним інструментом для лікування пацієнтів з даним типом дистонії.

**Ключові слова:** електрофізіологія, петч-клемп, іонні канали, внутрішньоклітинний кальцій, нейрони, постгіперполяризація, збудження, гальмування, комп'ютерне моделювання, синаптична передача

## SUMMARY

Dromaretsky A.V. Perturbed  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent signaling of DYT2 hippocalcin mutant as mechanism of autosomal recessive dystonia. – 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, 2024.

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) signaling plays an essential role in neuronal activity and regulation. Any disruption in this signaling can lead to neurological issues, ranging from minor disorders to severe diseases. The process of interpreting and converting  $\text{Ca}^{2+}$  signals into internal neuronal regulation is managed by various systems, including neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  sensor proteins (NCS), which are key players in this process. The operation of these sensor proteins and their interactions with other systems can be complex, making it challenging to detect dysfunctions, let alone repair them. A deeper understanding of the molecular and cellular mechanisms underlying this proteins operation is essential to address these challenges and advance our ability to manage neurological disorders. Primary autosomal-recessive dystonia (DYT2) is a neurological movement disorder syndrome that results in sustained or repetitive muscle contractions. Such contractions cause twisting and repetitive movements or abnormal painful postures, negatively affecting the quality of life. Recent publications demonstrate the connection between this condition and mutations in the gene of neuronal calcium sensor protein hippocalcin (HPCA), namely missense mutations N75K and T71N. The gene is almost exclusively expressed in the brain with high level of expression in the cortex, striatum, cerebellum and hippocampus, i.e. in brain areas revealing abnormalities in dystonia. HPCA contains three EF-hand domains capable of binding  $\text{Ca}^{2+}$ . The binding results in a  $\text{Ca}^{2+}$ -myristoyl switch, a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent conformation change leading to protrusion of its myristoyl-containing N-terminal region out of a hydrophobic pocket of the molecule. This allows HPCA to translocate from the cytosol to the plasma membrane. It is established that this  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent translocation of HPCA leads to inhibition of cortical and hippocampal neurons by gating a slow afterhyperpolarization (sAHP) current. The research aimed to find differences in biophysical properties of mutant variants N75K and T71N of the hippocalcin protein compared with a wild-type variant and resulting alterations in the function of molecular signaling to which this protein contributes. The research was conducted with the use of genetic, electrophysiological, and fluorescent methods. A special technique was developed to estimate the concentration of the expressed variants of hippocalcin with an attached fluorescent tags. The technique is based on the calculations involving optical spectral properties of the equipment and

used fluorophores as well as other fluorescent dyes that served as references with known concentrations. This research demonstrates that mutation N75K, which was associated with dystonia DYT2, causes HPCA to lose its functions as a calcium ion sensor under conditions of physiological neural activity. Due to the altered capability of the mutated hippocalcin to perform  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent translocation to the plasma membrane, this variant of hippocalcin is unable to control slow after-hyperpolarization in neurons. Translocation of the N75K hippocalcin mutant to the plasma membrane of neuronal apical dendrites that is responsible for the generation of a sAHP current was severely reduced compared to the wild-type hippocalcin variant. This reduction led to the inability of the mutated hippocalcin variant N75K to generate additional sAHP current to one generated by the translocation of the endogenous wild-type hippocalcin. In contrast, the expression of wild-type hippocalcin caused that current to rise. Yet this mutation N75K does not affect the myristoyl switch, nor the spatial distribution of the hippocalcin binding to plasma membrane. Mutated hippocalcin variant T71N did not exhibit any significant changes in the translocation. In general, the hippocalcin mutation N75K causes increased neuronal excitability due to reduced sAHP and its inhibition effect in response to a series of action potentials bursts and  $\theta$ -stimulation. It follows that the postsynaptic currents which occur subsequent to the action potential burst possess an increased likelihood of inducing further action potentials in the affected neurons. This phenomenon may serve as the fundamental cause of the motor symptoms observed in the dystonia DYT2 movement disorder. Simulations of neural activity confirm the presence of a defective and heightened excitability in neurons bearing the mutated hippocalcin variant N75K, a finding consistent with the results observed in experimental studies. A neuronal model that accounts for the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent signaling of hippocalcin and its translocation-induced sAHP current aligns with the experimental trends observed in our studies. These trends include the translocation of hippocalcin as well as the sAHP current in cells expressing either the wild-type or mutated N75K variant of hippocalcin. Simulations based on this model demonstrate an increased excitability in neurons expressing the mutated hippocalcin variant N75K, in contrast to those expressing the wild-type variant. This enhancement in excitability was observed under various conditions, akin to those found within the central nervous system. It was further demonstrated that the N75K mutation accelerates the onset of tonic neural activity, resulting in an increased frequency of firing. This mutation facilitates the generation of action potentials, disrupts the adaptation of their frequency during bursts of pulses induced by synaptic stimulation, and notably reduces the inter-pulse interval within burst firing. The results received suggest that genetic interventions designed to promote the expression of the wild-type hippocalcin variant in the neurons of the abnormally excited descending pathways responsible for skeletal muscle control may, in turn, restore sAHP in these neurons and thereby normalize muscle tone. Such approaches could prove to be an effective means of treating patients afflicted with this form of dystonia.

**Keywords:** electrophysiology, patch-clamp, ion channels, intracellular calcium, neurons, after-hyperpolarization, excitation, inhibition, computer simulation, synaptic transmission

## СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

$\text{Ca}^{2+}$	– іон кальцію
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	– внутрішньоклітинна концентрація іонів кальцію
<b>НРСА</b>	– Hippocalcin – білок гіпокальцин
<b>sАНР</b>	– slow After-HyperPolarization – повільна постгіперполяризація
<b>TBS</b>	– Theta-Burst Stimulation - $\theta$ -стимуляція пачками імпульсів
<b>WT</b>	– Wild Type – дикий тип
<b>ПД</b>	– Потенціал Дії
<b>УФ</b>	– Ультра-фіолет
<b>ЦНС</b>	– Центральна Нервова Система

