

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ШЕРЕМЕТ ЄВГЕНІЙ ЮРІЙОВИЧ

УДК 612.822: 577.112: 577.322

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

03.00.02 – біофізика

Біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

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

Науковий керівник: Білан Павло Володимирович, доктор біологічних наук, професор.

Київ – 2020

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. Таким чином, достеменно невідомо, чи регулює гіпокальцин роботу своїх мембранних білків-мішеней у стані спокою. Більше того, екзогенно експресовані флуоресцентно мічені білки, які широко використовуються у подібних біофізичних дослідженнях, ймовірно, можуть змістити ендогенну сигналізацію досліджуваних білків. Саме тому основною метою даного дослідження є оцінка рівня експресії екзогенно експресованого гіпокальцину порівняно з ендогенним, а також кількісні оцінки просторового розподілу даного білка між цитозолем та плазматичною мембраною на базальному рівні $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клітинах та субклітинних компартментах. У цій роботі ми запропонували прості та універсальні підходи для таких оцінок. Підхід до вимірювання рівня експресії екзогенних білків базується на тому, що інтенсивність флуоресценції барвника або мітки прямо пропорційна його квантовому виходу та кількості його молекул, а коефіцієнт пропорційності визначається спектральними властивостями барвника та оптичного обладнання, що використовується для реєстрації флуоресцентного

сигналу. Якщо два флуоресцентні барвники займають однаковий об'єм, то співвідношення їх концентрацій дорівнює відношенню інтенсивностей їх флуоресценції, помноженому на деякий коефіцієнт, що залежить від барвників та обладнання. Отже, знаючи концентрацію одного барвника та коефіцієнт пропорційності, то можна визначити концентрацію другого барвника. В цій роботі ми показали, як обчислювати коефіцієнт пропорційності, і як з його допомогою вимірювати концентрацію флуоресцентно мічених молекул. Використовуючи цей підхід, ми оцінили концентрацію екзогенно експресованого гіпокальцину, міченого флуоресцентним білком, в дендритах нейронів гіпокампа щурів, завантажених через петч-піпетку барвником Alexa Fluor відомої концентрації. 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. Далі ми оцінили просторовий розподіл гіпокальцину в живих клітинах на базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$, порівнявши його з розподілом екзогенно експресованого мембранного білка, EYFP-Mem. 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 EYFP-Mem. Обидва ці результати свідчать про те, що гіпокальцин перебуває здебільшого в цитозолі дендритів нейронів гіпокампа. Пряме обчислення фракційного розподілу гіпокальцину на базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$ показали, що мембранна фракція гіпокальцину не перевищує 8%. Загалом, наші результати говорять про те, що будучи переважно цитозольним, гіпокальцин потенційно може активувати свої мембранні білки-мішені навіть в умовах спокою. Нові підходи, запропоновані у роботі, можуть бути застосовані для кількісної оцінки

рівня експресії гіпокальцину та інших NCS-білків, а також їх просторового розподілу в живих клітинах в різних експериментальних конфігураціях для розробки точних біофізичних моделей їх сигналізації.

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

ANNOTATION

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 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$. 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 μM) 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

За матеріалами дисертації опубліковано 6 друкованих робіт: 2 статті у міжнародних наукових журналах (одна з яких входить до першого квартилю (Q1) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank) та 4 тези доповідей на наукових конференціях.

В яких опубліковані основні наукові результати 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).

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

Б. О. Оліфіров, **Є. Ю. Шерemet**, 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. Шерemet**, 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.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ЗМІСТ	9
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	12
ВСТУП.....	13
Обґрунтування вибору теми дослідження	13
Зв'язок роботи з науковими програмами, грантами, планами, темами	15
Мета дослідження	16
Методи дослідження	17
Наукова новизна отриманих результатів	17
Практичне значення отриманих результатів	18
Особистий внесок здобувача.....	19
Апробація матеріалів дисертації	19
Публікації	20
Структура та обсяг дисертації.....	20
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	22
1.1 Вільні йони Ca^{2+} як універсальний вторинний посередник	22
1.2 Кальмодулінове суперсімейство білків	24
1.2.1 Нейронні Ca^{2+}-зв'язувальні білки (nCaBP)	25
1.2.2 Нейронні Ca^{2+}-сенсори (NCS)	25
1.3 Клітинна сигналізація білка гіпокальцину	28
1.4 Роль гіпокальцину в механізмі повільної постгіперполяризації.	30
1.5 Сигналізація гіпокальцину при первинній дистонії та інших неврологічних захворюваннях	33
1.5.1 Біофізичні властивості мутантних форм гіпокальцину	33
1.5.2 Функціональні наслідки мутацій гіпокальцину	37

	10
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	43
2.1 Культура нейронів гіпокампа	43
2.2 Культура клітин PC12	43
2.3 Культура клітин НЕК 293	44
2.4 Транз'єнтна трансфекція.....	44
2.5 Флуоресцентні білки	45
2.6 Плазмідни	46
2.7 Параметри флуорофорів.....	47
2.8 Електрофізіологічні реєстрації.....	49
2.9 Флуоресцентна мікроскопія	50
2.10 Конфокальна мікроскопія	51
2.11 Відновлення флуоресценції після фотознебарвлення (FRAP)....	52
2.12 Оцінка рухомих та нерухомих фракцій цитоплазматичних флуоресцентних білків.....	53
2.13 Статистика	54
2.14 Хімічні речовини.....	54
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	55
3.1 Вимірювання концентрації флуоресцентно мічених молекул	55
3.2 Валідація методу та оцінка можливих помилок.....	58
3.2.1 Валідація методу за допомогою тандемного флуоресцентного конструкту	58
3.2.2 Валідація методу за допомогою двох органічних барвників	67
3.3 Вимірювання внутрішньоклітинної концентрації флуоресцентних білків у дифузійно-компактних клітинах	69
3.4 Вимірювання внутрішньоклітинної концентрації екзогенно експресованого білка гіпокальцину в нейронах	74
3.5 Оцінка розподілу НРСА всередині клітин на основі його одновимірного коефіцієнту дифузії	79

3.6 Оцінка розподілу НРСА на основі визначення його локалізації в плазматичній мембрані	86
3.6.1 Розподіл EYFP-Mem в сомах клітин з простою геометрією	87
3.6.2 Оцінка розподілу НРСА за допомогою методики січних ліній	91
РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	97
4.1 Підхід до вимірювання внутрішньоклітинної концентрації флуоресцентно мічених молекул	97
4.1.1 Порівняння нового та раніше розроблених підходів.....	97
4.1.2 Технічна реалізація запропонованого підходу	101
4.2 Оцінка концентрації екзогенно експресованого гіпокальцину в нейронах гіпокампа	104
4.3 Оцінка розподілу білка гіпокальцину між цитозолем та плазматичною мембраною	105
ВИСНОВКИ	108
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	110
ДОДАТОК 1	124

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AMPA – α -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота

CTV – тандемний конструкт Cerulean-Venus

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DYT2 – аутосомно-рецесивна первинна ізольована дистонія

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

HEK – human embryonic kidney, клітини людської ембріональної нирки

HPCA – гіпокальцин

KChIP – potassium voltage-gated channel interacting protein

MEM – Minimal Essential Medium

nCaBP – нейронний кальцій-зв'язувальний білок

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

VILIP – visinin-like protein, білок, подібний до візініну

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ФБ – флуоресцентний білок

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Складні просторово-часові зміни вільної внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} 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 (Ikura and Ames 2006; Burgoyne and Haynes 2015). 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 гена, що кодує білок гіпокальцин, продемонстрували важливість HPCA для функціонування просторової та асоціативної пам'яті (M. 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, 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, Terpikin, and Burgoyne 2003). Завдяки цим особливостям будови, HPCA здатен до швидкої та оборотної Ca^{2+} -залежної зміни конформації (J B Ames et al. 1997), що призводить до його подальшого переміщення (або транслокації) на плазматичну мембрану у відповідь на нейронну активність (Markova et al. 2008; Dovgan et al. 2010). Перебуваючи

безпосередньо на внутрішній поверхні плазматичної мембрани, НРСА може взаємодіяти, активувати та регулювати свої мембранні молекулярні мішені (Tzingounis et al. 2007; Palmer et al. 2005).

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

Більше того, для візуалізації розподілу та переміщення білків у живих клітинах як правило використовуються методи флуоресцентної мікроскопії у поєднанні з генетичними методами екзогенної експресії флуоресцентно мічених білків (Chalfie et al. 1994; Zlokarnik et al. 1998; Phair and Misteli 2001). Одним з основних питань у дослідженнях, що використовують генетично кодовані білки, є оцінка рівня експресії екзогенного білка порівняно з рівнем відповідного ендогенного. Вирішення цієї проблеми є необхідною умовою для правильної інтерпретації експериментальних результатів, оскільки надмірна експресія екзогенних білків може призвести до модифікації внутрішньоклітинних сигнальних шляхів за участі досліджуваних білків. Для оцінки концентрації флуоресцентних білків на рівні однієї клітини було запропоновано кілька підходів (Furtado and Henry 2002; Dundr et al. 2002). Дані підходи переважно засновані на використанні рекомбінантних бактеріально експресованих білків, які зазвичай відсутні для кожного конкретного дослідження. Для оцінки концентрації екзогенного білка, експресованого в клітині, його інтенсивність флуоресценції порівнюють з аналогічною величиною рекомбінантного білка, що перебуває в штучному об'єкті, геометрично подібному до клітинної соми. Оцінки, отримані таким шляхом, спираються на думку про те, що флуоресцентні властивості та просторовий розподіл рекомбінантних (локалізованих у штучному об'єкті) та екзогенних (локалізованих у клітинній сомі) білків співпадають. У більшості випадків ці припущення недостатньо обґрунтовані через відмінності в рН та концентрації йонів, посттрансляційної модифікації, а

також гомогенного та гетерогенного розподілу флуоресцентних білків в досліджуваному об'єкті та клітині. Тому в оцінках можна очікувати істотних помилок. Крім того, ці підходи вимагають додаткових зусиль для отримання об'єктів, наповнених молекулами рекомбінантних флуоресцентних білків, і не дозволяють отримувати оцінки концентрацій в субклітинних компартментах. Тож незважаючи на стрімкий прогрес методів візуалізації білків у живих клітинах, засоби для кількісного аналізу концентрації білків на рівні окремих клітин та субклітинних компартментів залишаються недостатньо розвиненими, і оцінка внутрішньоклітинної концентрації гіпокальцину в живих клітинах потребує розробки нового, більш точного та простого підходу.

Таким чином, актуальною є проблема оцінки основних біофізичних властивостей білку гіпокальцину, особливо пов'язаних з концентрацією НРСА всередині клітини та субклітинних компартментів, а також з його розподілом між цитозолем та плазматичною мембраною. Вирішення даної проблеми потребує розробки нових підходів у вимірюваннях й оцінках біофізичних параметрів, їх валідації та реалізації даних підходів на практиці.

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) та «Розробка новітніх знеболюючих засобів на основі інгібіторів кальцій-проникних AMPA рецепторів» (2015-2019; номер державної реєстрації – 0115U003632).

Мета дослідження

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

Завдання дослідження

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 (іммобілізованої 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

Для виконання поставлених завдань були використані 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 йонів Ca^{2+} .

Практичне значення отриманих результатів

Підхід до вимірювання внутрішньоклітинної концентрації флуоресцентно мічених білків може бути застосований в надзвичайно широкому спектрі біофізичних застосувань, адже його можна реалізувати практично для будь-яких флуоресцентних барвників та конфігурацій експериментального обладнання для реєстрації флуоресценції. Більше того, якщо один раз зібрати усю необхідну інформацію, то результати проміжних обчислень можна застосовувати для десятків 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 білку 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 супервайзером та відповідальним автором усіх наукових праць, в яких опубліковані основні результати роботи.

Апробація матеріалів 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, 1 додатку, 17 рисунків та 1 таблиці. Список використаних джерел містить 86 посилань. Основний текст роботи викладено на 109 сторінках. Загальний обсяг роботи становить 129 сторінок.

Текст та авторські рисунки публікуються під ліцензією Creative Commons CC BY-SA 4.0: вільне поширення, використання та модифікація, включно з

комерційною метою, за умови посилання на автора і збереження даної ліцензії у похідних творах.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Вільні йони Ca^{2+} як універсальний вторинний посередник

Зміни концентрації вільних йонів Ca^{2+} регулюють велику кількість фізіологічних процесів у багатьох типах клітин, особливо у нейронах (Augustine, Santamaria, and Tanaka 2003). Шляхом впливу на іонні канали та нейропередачу кальцієві сигнали можуть призводити до функціональних змін в нейронах, тривалістю від десятків секунд до кількох діб. Кальцієвий сигнал може регулювати експресію генів (Greer and Greenberg 2008), ріст, розвиток, виживання і загибель нейронів (Mercer et al. 2000). Роль Ca^{2+} як універсального вторинного посередника і велика кількість Ca^{2+} -транспортних систем, що беруть участь в регуляції рівня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клітині, дозволяють виділити кальцієву сигналізацію як окрему область внутрішньоклітинної сигналізації.

Той факт, що зміни концентрації вільних йонів кальцію в цитозолі є універсальним внутрішньоклітинним сигналом для контролю численних клітинних процесів, наводить на думку про існування великої кількості різноманітних механізмів кальцієвої сигналізації, призначених декодувати кальцієві сигнали різної швидкості, амплітуди і просторово-часової структури. Таке різноманіття забезпечується за рахунок молекулярних сигнальних компонентів із різними біофізичними параметрами функціонування, вони і складають інструментарій Ca^{2+} -сигналізації. Комбінація та взаємодія даних компонентів може використовуватися для створення кальцієвих сигналів з у край складними просторово-часовими патернами.

У спокої концентрація вільних йонів Ca^{2+} в нейроні підтримується на рівні 50–100 нМ, в той час як у позаклітинному середовищі така концентрація становить кілька мМ. Тому при відкритті Ca^{2+} -проникних каналів концентрація вільних йонів кальцію в цитозолі може досягати декількох мМ, що запускає

різноманітні Ca^{2+} -чутливі процеси, які перетворюють кальцієвий сигнал в клітинну відповідь (рис. 1.1).

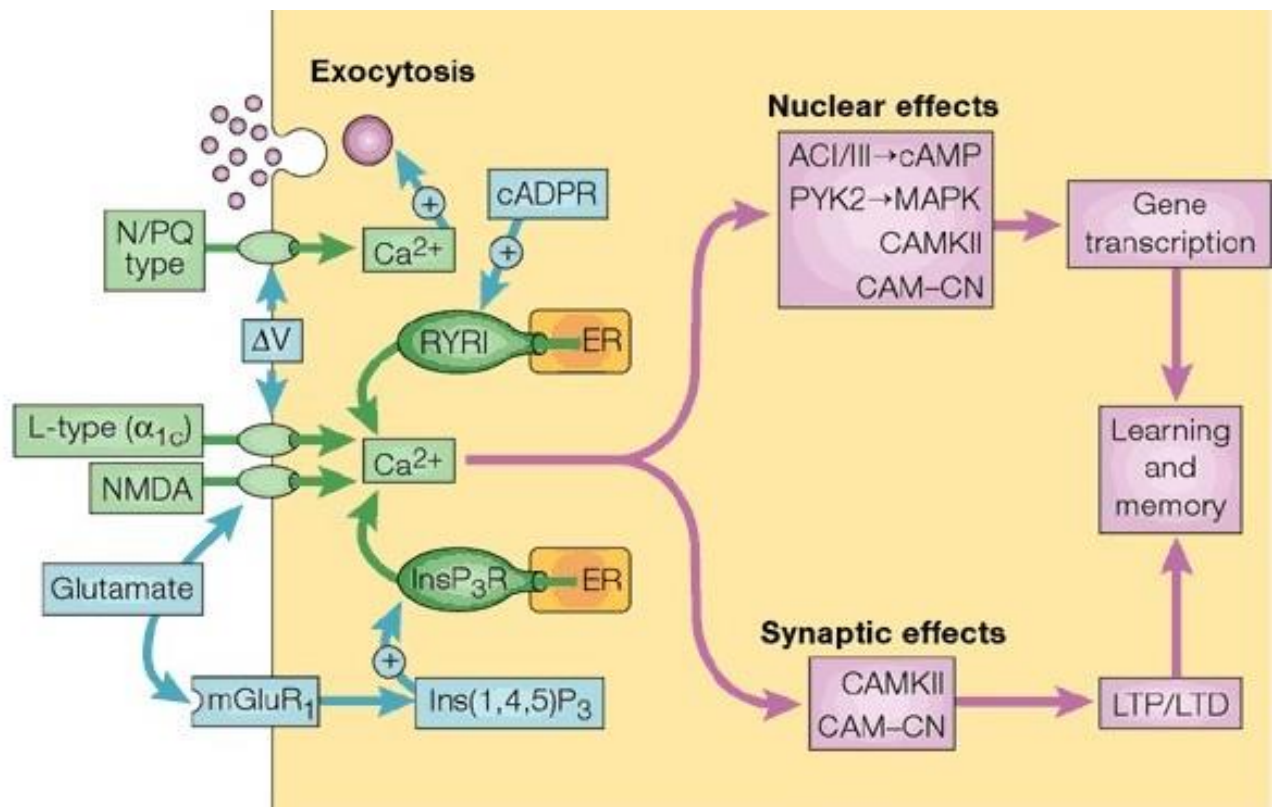


Рисунок 1.1. Зв'язок між різними компонентами Ca^{2+} -сигнальних систем в процесі формування клітинної відповіді в нейронах (Berridge, Lipp, and Bootman 2000).

Універсальність Ca^{2+} найкраще ілюструє той факт, що кальцієва сигналізація використовується протягом усього періоду життя організму. Життя починається із хвилі Ca^{2+} при заплідненні яйцеклітини (Miyazaki et al. 1993), і потім ця універсальна система сигналізації постійно використовується для контролю багатьох процесів під час росту, розвитку організму та у дорослому житті. Одним із захоплюючих явищ є те, що Ca^{2+} відіграє пряму роль у регуляції транскрипції в ході диференціації нейронів, тим самим обираючи саме ті Ca^{2+} -сигнальні системи, які необхідні для даного типу клітин (Gu and Spitzer 1996). Тому зараз актуальним є питання, за рахунок чого така універсальна система сигналізації по-різному експресується та функціонує в різних типах клітин.

1.2 Кальмодулінове суперсімейство білків

До молекулярного інструментарію Ca^{2+} -сигналізації входять численні EF-hand-вмісні білки кальмодулінового суперсімейства. Кальмодулін експресується клітинами майже усіх тканин організму і відіграє ключову роль в скороченні гладеньких м'язів, транскрипції генів, модуляції йонних каналів і багатьох метаболічних процесів, в той час як більшість EF-hand-вмісних білків експресується виключно в ЦНС та сітківці. Подібно до кальмодуліну, представники даного суперсімейства містять 4 субмолекулярні домени, здатні зв'язувати йони Ca^{2+} (так звані EF-hand-домени). Розрізняють нейронні Ca^{2+} -сенсори (англ. neuronal calcium sensor, NCS) та нейронні Ca^{2+} -зв'язувальні білки (англ. neuronal calcium-binding protein, nCaBP). Білки відносять до тієї чи іншої групи здебільшого за їх здатністю до Ca^{2+} -залежної зміни конформації (наявністю Ca^{2+} -міристинового перемикача) (рис. 1.2).

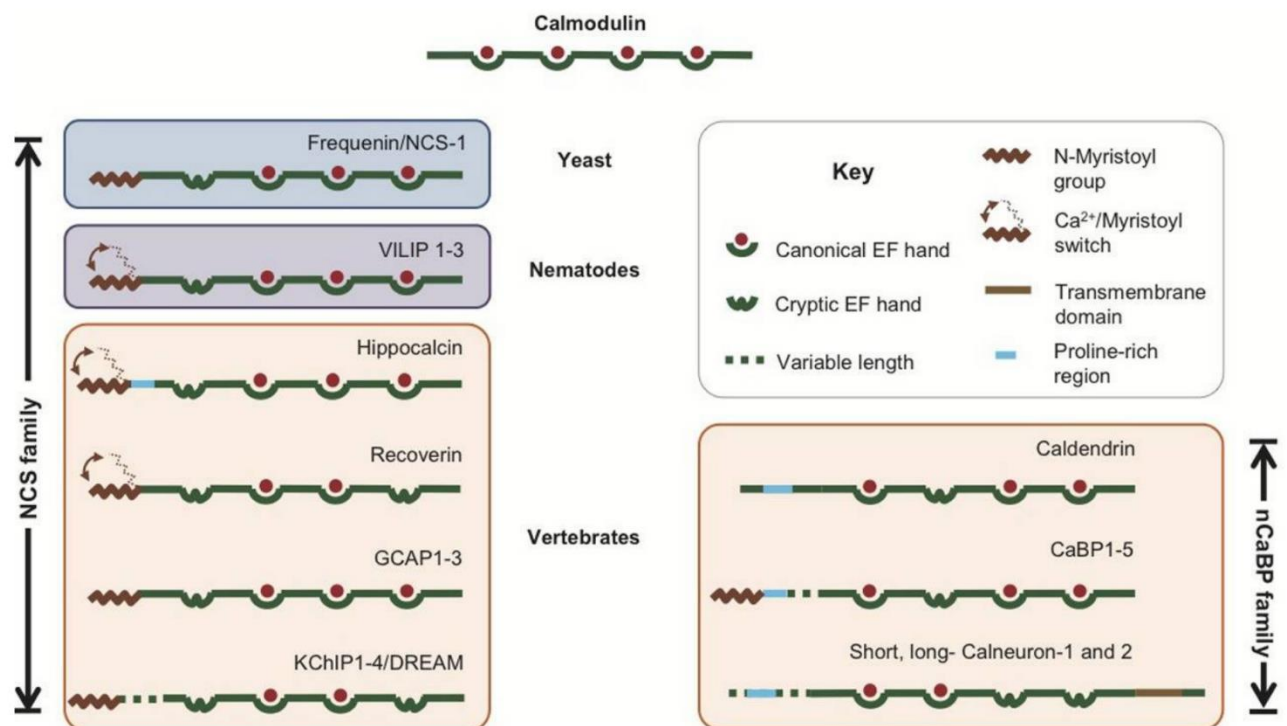


Рисунок 1.2. Схематичне зображення представників сімейств нейронних Ca^{2+} -сенсорних білків та нейронних Ca^{2+} -зв'язувальних білків. Для порівняння зверху наведено схематичне зображення звичайного кальмодуліну. Білки згруповані за організмами, в яких були вперше виявлені (Raghuram, Sharma, and Kreutz 2012).

1.2.1 Нейронні Ca^{2+} -зв'язувальні білки (nCaBP)

Сімейство білків nCaBP виникло під час еволюції організмів досить пізно, адже представники даного сімейства зустрічаються тільки у хребетних (рис. 1.2). За амінокислотною послідовністю та структурною організацією EF-hand-доменів nCaBP-білки надзвичайно схожі до кальмодуліну. Тому вважається, що усі представники даного сімейства напряду еволюціонували з кальмодуліну чи його попередників (Mikhaylova et al. 2006; McCue, Haynes, and Burgoyne 2010a). Що стосується їх EF-hand-доменів, то лише 2–3 з 4 наявних доменів є функціональними, тобто здатними зв'язувати Ca^{2+} . Характерною рисою амінокислотної послідовності nCaBP-білків є додаткові (порівняно з кальмодуліном) 4 залишки в лінкерній ділянці між двома парами EF-hand-доменів (Haeseleer et al. 2000). Не зважаючи на ексклюзивність експресії nCaBP-білків у нервових клітинах, їх приблизна оціночна концентрація становить ~10 мкМ (Wingard et al. 2005), в той час як концентрація кальмодуліну в нейронах перевищує 100 мкМ (Faas et al. 2011). Зважаючи на високу гомологічність nCaBP-білків з кальмодуліном, відкритим залишається питання, для чого обидві ці Ca^{2+} -сигнальні системи експресуються та співіснують в нейронах? Молекулярні мішені та функції окремих представників сімейства nCaBP також досі є недостатньо вивченими.

1.2.2 Нейронні Ca^{2+} -сенсори (NCS)

NCS та nCaBP є надзвичайно гомологічними і, в певному розумінні, можуть виконувати аналогічні функції, тому поділ білків на ці дві групи є досить умовним і багато в чому ґрунтується на історії їх відкриття. Вперше термін «нейронні кальцієві сенсори» було введено у 1995 році (Decastro et al. 1995) для позначення групи EF-hand-вмісних білків (S-модулін, візінін, рековерін, фріквенін/NCS-1, VILIP1 та гіпокальцин). Патрік Неф зі співавторами у своїй роботі зазначили: «Ця сім'я отримала назву сімейства генів нейронних кальцієвих сенсорів (NCS), оскільки вона представляє специфічні для нейронів

білки, які зв'язують кальцій та мають 3–4 потенційних EF-hand-домени» (Decastro et al. 1995).

NCS-білки походять від фріквеніну/NCS-1, еволюційно найбільш раннього представника цієї групи білків (Braunewell and Gundelfinger 1999). В ході подальшої еволюції організмів сімейство NCS-білків розрослося до п'яти підродин (Burgoyne et al. 2004; Burgoyne 2007; McCue, Haynes, and Burgoyne 2010b):

- 1) фріквенін/NCS-1;
- 2) рековерін;
- 3) VILIP1, VILIP2, VILIP3, гіпокальцин, нейрокальцин дельта;
- 4) білки, що активують гуанілатциклазу (GCAP1, GCAP2, GCAP3);
- 5) білки, що взаємодіють з потенціал-керованими K^+ -каналами (KChIP1, KChIP2, KChIP3/DREAM, KChIP4).

Рековерін – історично перший виявлений представник сімейства NCS-білків, експресується тільки в сітківці, де виконує роль інгібітору родопсин-кінази, що запобігає інактивації родопсину. Рековерін не єдиний білок NCS-сімейства, який опосередковує роботу зорового аналізатора. GCAP1..3 також експресуються в сітківці і беруть участь у передачі зорової інформації.

Більшість NCS-білків є тканино-специфічними і зустрічаються тільки в нервових клітинах, хоча KChIP2, наприклад, представлений також і в кардіоміоцитах. Також важливо відмітити, що NCS-білки можуть бути представлені як у багатьох типах нервових клітин, так і бути специфічними для певного типу нейронів. Так, гіпокальцин ексклюзивно експресується пірамідними нейронами гіпокампа (Masaaki Kobayashi et al. 1992), а VILIP3 – клітинами Пуркінє мозочка (Paterlini et al. 2000).

Деякі NCS-білки можуть взаємодіяти з декількома білками-мішенями, що робить їх Ca^{2+} -сенсорами одразу декількох клітинних процесів. Більше того, в таких наборах мішеней можуть бути одночасно мембранні та цитозольні білки.

Наприклад, фріквенін/NCS-1 має принаймні 5 білків-мішеней, з якими взаємодіє як Ca^{2+} -залежним чином, так і незалежно від $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (McFerran, Graham, and Burgoyne 1998).

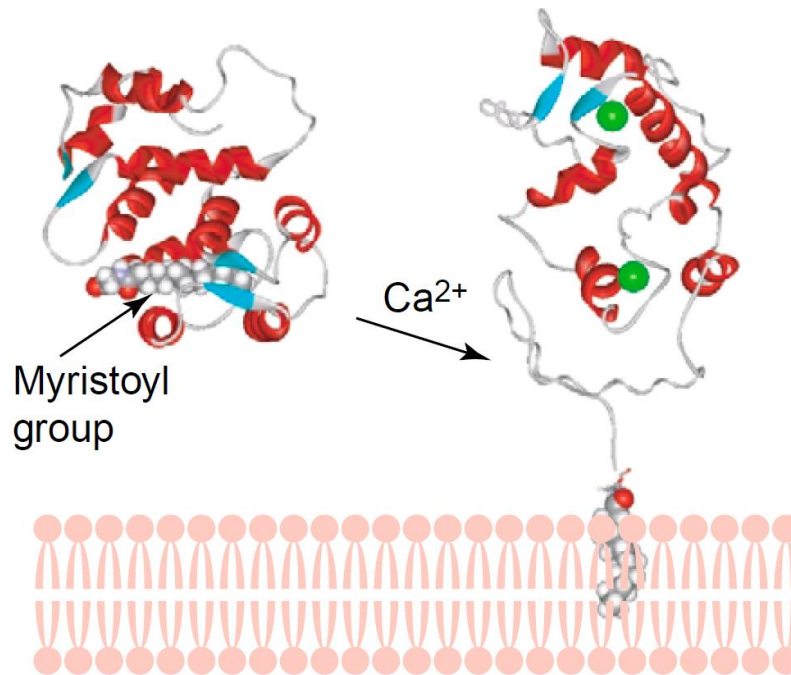


Рисунок 1.3. Схема роботи Ca^{2+} -міристинового перемикача в молекулі рековеріну. Глобула рековеріну (ліворуч) зазнає конформаційної зміни внаслідок зв'язування двох йонів Ca^{2+} (зелені кульки праворуч): вивільнення залишку міристинової кислоти з гідрофобної кишені дозволяє рековеріну вбудовуватися в плазматичну мембрану шляхом інтеграції жирної кислоти з внутрішньоклітинною поверхнею ліпідного бішару (Burgoyne et al. 2004).

Під час посттрансляційної модифікації до N-кінця усіх NCS-білків (за винятком KChIP2, KChIP3 та KChIP4) приєднується залишок міристинової кислоти, внаслідок чого вони можуть вбудовуватися в клітинні мембрани. Вбудовування більшості NCS-білків в мембрану відбувається Ca^{2+} -залежним чином – біохімічний і структурний аналіз цих білків дозволяє говорити про наявність у них так званого Ca^{2+} -міристинового перемикача (J B Ames et al. 1997). Роботу цього перемикача вперше було проілюстровано на прикладі Ca^{2+} -сенсорного білка рековеріну (Tanaka et al. 1995). У незв'язаній з кальцієм формі,

залишок міристинової кислоти захований всередині гідрофобної кишені глобули рековеріну. Таким чином при малих значеннях $[Ca^{2+}]_i$ рековерін не вбудований в мембрану. При зв'язуванні рековеріна з Ca^{2+} , молекула зазнає конформаційних змін, що призводить до вивільнення ліпофільної міристинової групи. Це дозволяє рековеріну оборотно зв'язуватися з плазматичною мембраною (рис. 1.3). Свого часу на наявність Ca^{2+} -міристинового перемикача протестували всі NCS-білки. Гіпокальцин, нейрокальцин дельта, VILIP-1 і VILIP-3 мають функціональний Ca^{2+} -міристиновий перемикач, в той час як NCS-1 і KChIP1 були вбудовані в мембрану і при низьких значеннях $[Ca^{2+}]_i$ (O'Callaghan et al. 2002; Ivings et al. 2002; Spilker, Dresbach, and Braunewell 2002).

Завдяки відмінностям у роботі й функціоналі Ca^{2+} -міристинового перемикача різні NCS-білки можуть по-різному реагувати на кальцієвий сигнал. NCS-1 і KChIP1, які не мають Ca^{2+} -міристинового перемикача, можуть досить швидко реагувати на локальне підвищення $[Ca^{2+}]_i$ поряд із місцем, куди вони в даний момент вбудовані. Білки з Ca^{2+} -міристиновим перемикачем (гіпокальцин, нейрокальцин дельта, VILIP) потребують трохи більше часу, натомість вони можуть реагувати на тривалі глобальні зміни $[Ca^{2+}]_i$.

1.3 Клітинна сигналізація білка гіпокальцину

Білок гіпокальцин (англ. *Hippocalcin*, *HRCA*) – це представник третьої підродини нейронних кальцієвих сенсорів, який має 3 функціональні EF-hand-домени (рис. 1.4), вперше був ідентифікований в зоні CA1 пірамідних нейронів гіпокампа. Повна амінокислотна послідовність гіпокальцину налічує 195 залишків із розрахунковою молекулярною масою 22574 дальтон (Takamatsu and Noguchi 1993). Гіпокальцин надзвичайно гомологічний до інших NCS-білків, і подібно до рековеріну, нейрокальцину дельта, VILIP1..3 містить сигнал до посттрансляційної міристинізації N-кінця. Гіпокальцин демонструє роботу кальцій-міристинового перемикача як в нейронах, так і у клітинах лінійних культур (O'Callaghan et al. 2002).

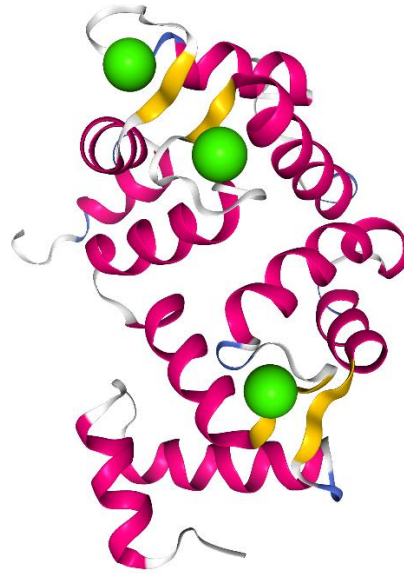


Рисунок 1.4. Кристалічна структура гіпокальцину, одержана за допомогою рентгеноструктурного аналізу із роздільною здатністю 2.42 Å (“RCSB PDB - 5G4P: Crystal Structure of Human Hippocalcin at 2.4 Å Resolution” n.d.). Області можливого зв’язування йонів Ca^{2+} позначено кульками.

В пірамідних нейронах гіпокампа гіпокальцин за рівнем експресії посідає 2 місце серед усіх EF-hand-вмісних білків, поступаючись лише кальмодуліну (Raghuram, Sharma, and Kreutz 2012). Та завдяки значно вищій афінності до Ca^{2+} , гіпокальцин сумарно здатен зв’язати більше йонів кальцію, ніж кальмодулін. Більше того, в ході Ca^{2+} -залежної транслокації, гіпокальцин здатен концентруватися в окремих ділянках дендритів, тим самим підвищуючи свою локальну концентрацію в десятки разів. Таким чином, гіпокальцин претендує на роль головного гравця в Ca^{2+} -сигналізації нейронів гіпокампа.

Довгий час єдиною підтвердженою функцією гіпокальцину була його роль в регуляції Ca^{2+} -індукованого апоптозу – запрограмованої смерті клітин (Mercer et al. 2000). Зв’язуючись з BIR3 доменом нейронного білка-інгібітора апоптозу (англ. neuronal apoptosis inhibitory protein, NAIP), гіпокальцин здійснював нейропротекторний вплив на культуру мотонейрон-подібних клітин (NSC-34).

Згодом було показано, що транслокація гіпокальцину на плазматичну мембрану нейронів гіпокампа викликає струм повільної постгіперполяризації (Tzingounis et al. 2007). Крім того, існує специфічний зв'язок між входом кальцію через NMDA-рецептори (а не через інші Ca^{2+} -проникні канали) та транслокацією гіпокальцину у постсинаптичну мембрану (Dovgan et al. 2010). Тому не дивно, що гіпокальцин вважають одним з ключових білків у механізмі NMDAR-залежної синаптичної пластичності (Palmer et al. 2005) – клітинного кореляту пам'яті. Особливий інтерес викликає той факт, що миші, яким було виконано процедуру нокауту гена гіпокальцину, мали проблеми з просторовою та асоціативною пам'яттю (M. Kobayashi et al. 2005).

Аномалії в експресії або у функціонуванні гіпокальцину можуть бути 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) в людей може бути пов'язана з певними точковими мутаціями в гені, який кодує гіпокальцин (Charlesworth et al. 2015; Osypenko et al. 2019).

1.4 Роль гіпокальцину в механізмі повільної постгіперполяризації

У відповідь на зовнішній стимул, який викликає в клітинах ЦНС пачки потенціалів дії, в нейронах різних типів розвивається повільна, тривала слідова гіперполяризація (slow afterhyperpolarization або sAHP). Повільна постгіперполяризація називається «повільною» на противагу швидкій та середній постгіперполяризації, які мають менші характерні часові періоди, ніж sAHP (рис. 1.5A).

Негативний мембранний потенціал і підвищена провідність мембрани при sAHP запобігає генерації подальших потенціалів дії, поки триває sAHP. Це запобігає перезбудженню нейрона у відповідь на повторювані або тривалі вхідні стимули (Hille 2001). Дійсно, порушення роботи sAHP можуть бути причетні до виникнення епілепсії (McCormick and Contreras 2001). sAHP несе в собі

інформацію про нещодавню клітинну активність, яка, як вважають, має важливе значення для синаптичної пластичності та пам'яті (Disterhoft, Wu, and Ohno 2004). Струм sANP вперше був описаний у нейронах більше 30 років тому (Alger and Nicoll 1980; Hotson and Prince 1980; Schwartzkroin and Stafstrom 1980), проте точні молекулярні механізми його генерації досі невідомі.

Давно встановлено, що підвищення $[Ca^{2+}]_i$ протягом пачки потенціалів дії є необхідною умовою для розвитку sANP (Alger and Nicoll 1980; Hotson and Prince 1980; Schwartzkroin and Stafstrom 1980). Було висунуто гіпотезу, що саме накопичення внутрішньоклітинного кальцію під час пачки потенціалів дії спричиняє sANP. Також рано було показано, що дана повільна гіперполяризація зумовлена відкриттям калієвих каналів (Alger and Nicoll 1980). Однак ідентифікувати калієві канали, відповідальні за sANP, не вдається вже чимало років. Механізм того, як кальцій відкриває ці калієві канали, також є загадкою. Зовсім недавно на деякі з цих питань почали давати відповіді.

Початкова ідея того, як підвищення внутрішньоклітинного кальцію активує sANP, полягала в тому, що внутрішньоклітинний кальцій напряду зв'язується з калієвими каналами, і активує їх. Пошук цих кальцій-активованих каналів тривав досить довго, і було запропоновано чимало різних варіантів. Зокрема ВК (Barrett, Magleby, and Pallotta 1982) та SK (Bond et al. 2004), калієві канали, які безпосередньо модулюються кальцієм. Однак подальші дослідження показали, що ці канали не лежать в основі sANP.

Tzingounis et al. (Tzingounis et al. 2007) показали, що нокаут гена, що кодує нейронний кальцієвий сенсорний білок гіпокальцин, різко знижує sANP, а екзогенна експресія гіпокальцину дикого типу (WT HPCA) очікувано збільшує sANP. Вони також показали, що після зв'язування кальцію гіпокальцин експонує залишок міристинової кислоти і транслокується на плазматичну мембрану, ймовірно для того, аби активувати калієві канали, відповідальні за sANP (рис. 1.5B). Хоча нокаут гена гіпокальцину різко знижував sANP, це не повністю

блокувало генерацію sAHP (Tzingounis et al. 2007). Це свідчить про те, що в даних клітинах є також інші NCS білки, які сприяють появі sAHP.

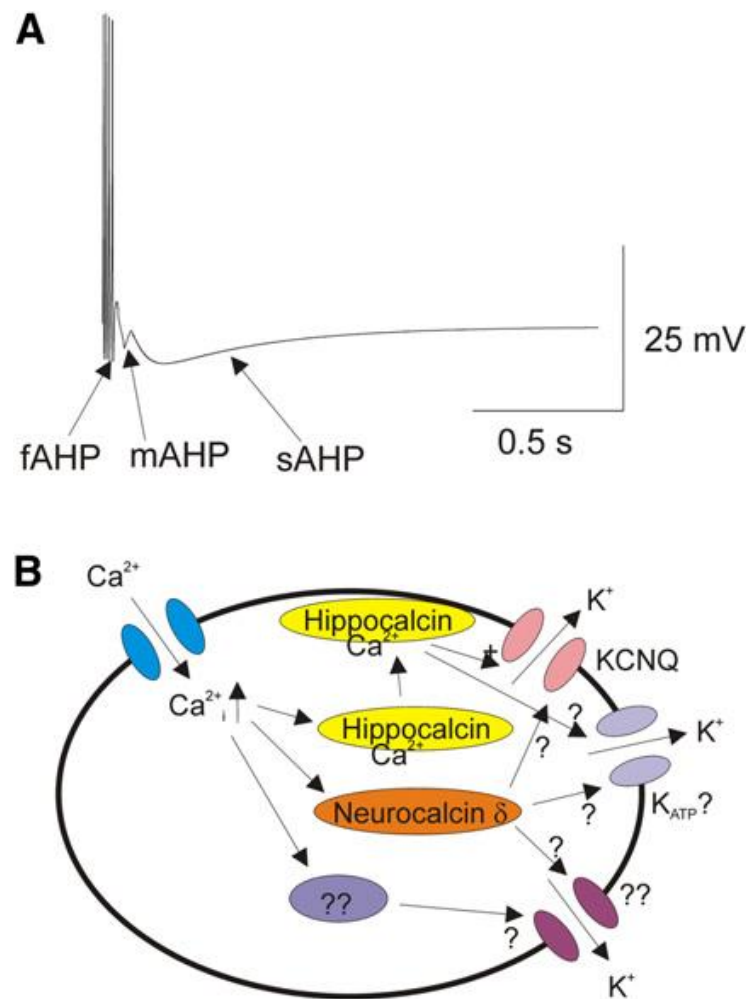


Рисунок 1.5. Часовий профіль і сигнальний каскад sAHP (Larsson 2013). А) Моделювання пачки потенціалів дії в нейроні з швидкою, середньою та повільною постгіперполяризацією (fAHP, mAHP та sAHP відповідно). В) Вхід кальцію через потенціал-керовані кальцієві канали (блакитний) у відповідь на пачку потенціалів дії призводить до підвищення $[Ca^{2+}]_i$. Кальцій зв'язується з NCS білками: гіпокальцином (жовтий) та нейрокальцином дельта (помаранчевий). Після зв'язування кальцію гіпокальцин транслокується на плазматичну мембрану, де активує калієві канали, відповідальні за sAHP: KCNQ (рожевий), і K_{ATP} (сірий). Інші NCS білки (фіолетовий) та інші калієві канали (пурпуровий) також можуть сприяти sAHP.

1.5 Сигналізація гіпокальцину при первинній дистонії та інших неврологічних захворюваннях

Попередні дослідження продемонстрували, що точкові мутації HPCA спричиняють аутосомно-рецесивну первинну ізольовану дистонію (Charlesworth et al. 2015) та призводять до аномальних біофізичних та функціональних властивостей деяких мутантів HPCA (Helassa et al. 2017). Однак молекулярні та клітинні механізми, що пов'язують ці точкові мутації з аберрантною підвищеною збудливістю нейронів, що спостерігається під час дистонії (Ibáñez et al. 1999; Levy and Hallett 2002), все ще залишаються нез'ясованими. Поєднавши молекулярну генетику, електрофізіологію, мікроскопію та моделювання, наша лабораторія нещодавно показала (Osypenko et al. 2019), що дистонічний мутант HPCA N75K має аномальну буферизацію Ca^{2+} , погіршує Ca^{2+} -залежну сигналізацію і не контролює повільну постгіперполяризацію, яка зазвичай виникає завдяки транслокації HPCA на плазматичну мембрану. Це призводить до підвищеної збудливості нейронів, що, ймовірно, лежить в основі прояву дистонічних симптомів. Автори також зробили висновок, що будь-яка мутація, що веде до втрати транслокації HPCA у нейронах низхідних шляхів, що контролюють скорочення скелетних м'язів, може призвести до різних рухових розладів (Osypenko et al. 2019).

1.5.1 Біофізичні властивості мутантних форм гіпокальцину

У багатьох випадках мутації NCS білків, що викликають хвороби, можуть впливати на стабільність або синтез білка, що призводить до зміни рівня експресії білка або перешкоджання експресії як такої (Atasu et al. 2018). Це не стосувалося мутацій гіпокальцину T71N та N75K, що знайдені у пацієнтів з первинною дистонією. Попередні експерименти показали, що обидва мутанти HPCA мали рівні експресії, подібні до експресії WT HPCA, коли вони екзогенно експресувались в одних і тих же клітинах НЕК та нейронах гіпокампа (Osypenko et al. 2019). Цей результат добре узгоджується з останніми даними, які

демонструють, що мутація T71N не впливає на згортання білка, його стабільність та функціонування в клітинах SH-SY5Y (Helassa et al. 2017). Таким чином, обидва мутанти експресувались у досліджуваних клітинах, а зміни в їх передачі сигналів, якщо такі були, ймовірно зумовлені різницею в їх біофізичних властивостях.

У цій же роботі (Osypenko et al. 2019) було показано, що мутант N75K має нижчу загальну кальцієву буферну ємність, ніж WT НРСА, у фізіологічному діапазоні вільних внутрішньоклітинних концентрацій кальцію. Крім того, цей мутант також був відносно слабшим, ніж WT НРСА, у зв'язуванні Ca^{2+} поблизу базального рівня $[\text{Ca}^{2+}]_i$ та відносно більш міцне зв'язування Ca^{2+} у верхньому фізіологічному діапазоні $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Таким чином, ця мутація змінювала кальцій-залежність буферної ємності N75K. Кальцій-залежність буферизації Ca^{2+} T71N також була модифікована порівняно з WT НРСА, хоча ця модифікація не була настільки помітною, як спостерігається у N75K.

Мутації N75K і T71N розташовані в другому EF-hand домені гіпокальцину, і вони мають вирішальне значення для властивостей зв'язування Ca^{2+} . Мутація N75K призводить до заміщення другого Ca^{2+} -координуючого залишку послідовності зв'язування в домені EF-hand 2 (Charlesworth et al. 2015). Крім того, у цій мутації нейтральний аспарагін обмінюється на позитивно заряджений лізин, що, безумовно, може створити перешкоду для зв'язування так само зарядженого йона кальцію. За таких умов Ca^{2+} навряд чи буде зв'язуватися з другим EF-hand доменом мутанта N75K, або його зв'язування буде суттєво порушено, що призводить до нижчої спорідненості до Ca^{2+} . В обох випадках ємність кальцієвого буфера N75K буде зменшена порівняно з WT НРСА і кальцієва залежність його буферної ємності буде зміщуватися у бік вищих значень $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Хоча треонін у положенні 71 не є обов'язковим координатором Ca^{2+} , мутація T71N, як передбачається, пошкоджує зв'язування, з майже максимальними оцінками ймовірності, у чотирьох програмах прогнозування *in*

silico (Charlesworth et al. 2015). Незважаючи на такий теоретичний прогноз, ця мутація суттєво не впливає на загальну буферизацію Ca^{2+} , хоча Ca^{2+} -залежність буферизації є зміненою, що вказує на деяку незначну модифікацію Ca^{2+} -зв'язування EF-hand домену 2 цього мутанта (Osypenko et al. 2019). Ці зміни співпадають із тими, що спостерігалися Helassa et al., які продемонстрували, що мутація T71N не змінювала загального рівня спорідненості до зв'язування з кальцієм, але суттєво знижувала кооперативність зв'язування кальцію (Helassa et al. 2017).

Гіпокальцин відіграє значну роль як кальцієвий буфер у центральних нейронах (Raghuram, Sharma, and Kreutz 2012). Повідомлялося про високий рівень експресії НРСА у кортикальних та підкіркових нейронах (Furuta et al. 1999; Charlesworth et al. 2015). В середньому НРСА експресується в гіпокампі у концентрації 30 мкМ (Furuta et al. 1999), а його концентрація в смугастому тілі, області, пов'язаній з порушеннями руху, може бути ще вищою (Charlesworth et al. 2015). Аналіз закономірностей експресії генів різних нейронних кальцієвих сенсорних білків, до яких належить НРСА, на клітинному рівні виявив, що існує суттєва неоднорідність рівнів експресії білка між різними популяціями клітин в одних і тих же областях мозку (Girard et al. 2015). Таким чином, у деяких субпопуляціях нейронів, ймовірно, може спостерігатися значно вищий рівень експресії НРСА порівняно з його середнім значенням в 30 мкМ (Furuta et al. 1999). Тим не менш, навіть при 30 мкМ НРСА є найсильнішим буфером Ca^{2+} , принаймні в нейронах гіпокампа (Raghuram, Sharma, and Kreutz 2012). Беручи до уваги, що кожна молекула НРСА може зв'язувати йони кальцію в EF-hand доменах 2, 3 і 4 (Helassa et al. 2017; Raghuram, Sharma, and Kreutz 2012), загальна ємність гіпокальцинового кальцієвого буфера може перевищувати 100 мкМ. Висока спорідненість до Ca^{2+} цих доменів (O'Callaghan, Terikkin, and Burgoyne 2003; Helassa et al. 2017) вказує на те, що НРСА відіграє важливу роль у нейронах як буфер Ca^{2+} при базальному рівні $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Перешкода для зв'язування Ca^{2+} у EF-hand домені 2 мутанта N75K, ймовірно, призводить до зв'язування Ca^{2+} лише у домені EF-hand 3, принаймні на базальному рівні $[\text{Ca}^{2+}]_i$, зменшуючи тим самим

буферизацію кальцію за участі НРСА вдвічі (Li et al. 2011; James B. Ames, Namasaki, and Molchanova 2002). Ця потужна регуляція основного кальцій-зв'язуючого білка може серйозно вплинути на клітинні кальцій-залежні сигнали у нейронах низхідних шляхів, що контролюють скорочення скелетних м'язів. Такі зміни в кальцієвій буферній ємності призводять до більш швидких та високоамплітудних транзієнтів $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах, що експресують мутант N75K, викликаних у відповідь на ту саму мобілізацію Ca^{2+} в цитозоль. Оскільки НРСА майже однорідно розподіляється в цитозолі (Markova et al. 2008; Dovgan et al. 2010; Cherkas et al. 2018), зміни буферизації кальцію, ймовірно, призводять до аномальних кальцієвих сигналів у сомах, дендритах та аксонах, що в свою чергу призводить до важливих фізіологічних наслідків, які можуть сприяти проявам дистонії. Оскільки НРСА відіграє подвійну роль у регуляції нейронів і як буфер, і як сенсор, порушення буферизації кальцію у мутанта N75K НРСА, ймовірно, впливає на його кальцій-залежну сигналізацію, навіть якщо інші його молекулярні властивості не змінені цією мутацією.

У НРСА зв'язування Ca^{2+} з функціональними EF-hand доменами управляється Ca^{2+} -міристиновим перемикачем, конфірмаційною зміною в молекулі, що призводить до виходу гідрофобної міристинової групи з гідрофобної кишені молекули (J B Ames et al. 1997). Ця конфірмаційна зміна контролює здатність НРСА транслокуватись до мембран та взаємодіяти з білками-мішенями (O'Callaghan, Teripkin, and Burgoyne 2003; Dovgan et al. 2010). Нещодавні дослідження виявили, що, незважаючи на порушене зв'язування Ca^{2+} у EF-hand домені 2, обидва мутанти транслокуються до мембран при високому рівні $[Ca^{2+}]_i$, демонструючи, що мутації не порушують механізм роботи Ca^{2+} -міристинового перемикача. Більше того, високі та тривалі підвищення рівня $[Ca^{2+}]_i$ призводили до рівномірних та однаково розподілених транслокацій як N75K, так і WT НРСА до плазматичної мембрани нейронів гіпокампа (Osypenko et al. 2019). Ці результати показують, що при високих рівнях $[Ca^{2+}]_i$, як механізм перемикання, так і здатність N75K вбудовуватися в конкретні мембранні локуси не змінюються. Попередні дослідження інших подібних NCS білків показали, що

два йони кальцію зв'язуються з білком послідовно – спочатку у високоафінному EF-hand домені 3, що призводить до полегшення зв'язування Ca^{2+} у EF-hand домені 2, що має меншу спорідненість (Li et al. 2011; James B. Ames, Hamasaki, and Molchanova 2002); і зв'язування Ca^{2+} в обох місцях є необхідним для транслокації НРСА (O'Callaghan, Terikín, and Burgoyne 2003). Таким чином, цілком ймовірно, що Ca^{2+} зв'язується з EF-hand 2 мутанта N75K при вищих рівнях $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ніж це відбувається з WT НРСА. Зрештою, що б не підтримувало механізм Ca^{2+} -міристинового перемикача в мутанті N75K при високих рівнях $[\text{Ca}^{2+}]_i$, важливо, що функціонування перемикача погіршується при нижчих рівнях $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (в N75K порівняно з WT НРСА), що в свою чергу призводить до стійкого зменшення транслокації за цих умов (Osypenko et al. 2019).

1.5.2 Функціональні наслідки мутацій гіпокальцину

Порушене зв'язування Ca^{2+} у EF-hand домені 2 N75K перешкоджає декодуванню фізіологічно значущих $[\text{Ca}^{2+}]_i$ транз'єнтів в транслокацію НРСА на плазматичну мембрану для активації його мембранних мішеней (Osypenko et al. 2019). Основні типи нейронної активності, такі як короткі пачки потенціалів дії (до 20 ПД) та поодинокі тета-спалахи не призводять до значної транслокації N75K до плазматичної мембрани. Більше того, декодування тета-спалахів шляхом транслокації НРСА також суттєво пригнічується мутацією N75K. Загальновизнано, що взаємодія НРСА з мембранами є необхідним етапом у його механізмі трансдукції (Tzingounis et al. 2007; Palmer et al. 2005; Andrade, Foehring, and Tzingounis 2012). Оскільки мутація N75K запобігає кальцій-залежній транслокації НРСА у сомах та дендритах нейронів під час основних видів нейронної активності, то ця мутація, ймовірно, призводить до втрати функції передачі сигналів молекулами НРСА (Osypenko et al. 2019).

Спочатку припускали, що дефект у функціонуванні НРСА, індукований мутаціями T71N та N75K, може послабити регуляцію потенціал-залежних кальцієвих каналів, тим самим змінюючи клітинну реакцію у відповідь на

деполяризацію мембрани (Charlesworth et al. 2015). Ця початкова гіпотеза, схоже, підтверджується нещодавніми результатами, які також демонструють ненормальну регуляцію цих каналів у клітинах, що експресують дистонічні мутанти HPCA (Helassa et al. 2017). Однак в цій роботі було показано, що HPCA кальцій-залежно олігомеризується і зв'язується з потенціал-залежними кальцієвими каналами. Більше того, мутанти T71N і A190T також виявили дефект олігомеризації, що призводив до збільшення кальцієвого струму, зумовленого кальцієвими каналами N типу (Helassa et al. 2017), безпосередньо демонструючи посилення роботи кальцієвих каналів. У той же час, інші дані вказують на те, що транслокація WT HPCA, індукована активацією потенціал-залежних кальцієвих каналів у присутності (Osypenko et al. 2019) або відсутності (Markova et al. 2008; Dovgan et al. 2010) N75K, була однаковою, що означає, що N75K навряд чи модулює кальцієві канали в дендритах нейронів гіпокампа. Таким чином, виглядає так, що різні мутації (N75K на відміну від T71N та A190T) вносять диференціальні зміни до сигналізації HPCA, посилюючи роботу кальцієвих каналів (що спостерігається для мутантів T71N та A190T) або порушуючи транслокацію гіпокальцину (що показано для мутанта N75K). Іншим поясненням даної диференціації є те, що L-, T- та R- (Higley and Sabatini 2008), а не N-типи кальцієвих каналів сприяють виникненню кальцієвих сигналів в дендритах нейронів. Отже, дендритна кальцієва сигналізація навряд чи може бути модифікована мутантами T71N та A190T. Швидше можна очікувати збільшення вивільнення синаптичних пухирців, як функціональний наслідок цих мутацій, оскільки кальцієві канали N-типу саме і експресуються в пресинаптичних терміналах, де вони контролюють вивільнення нейромедіатора (Simms and Zamponi 2014).

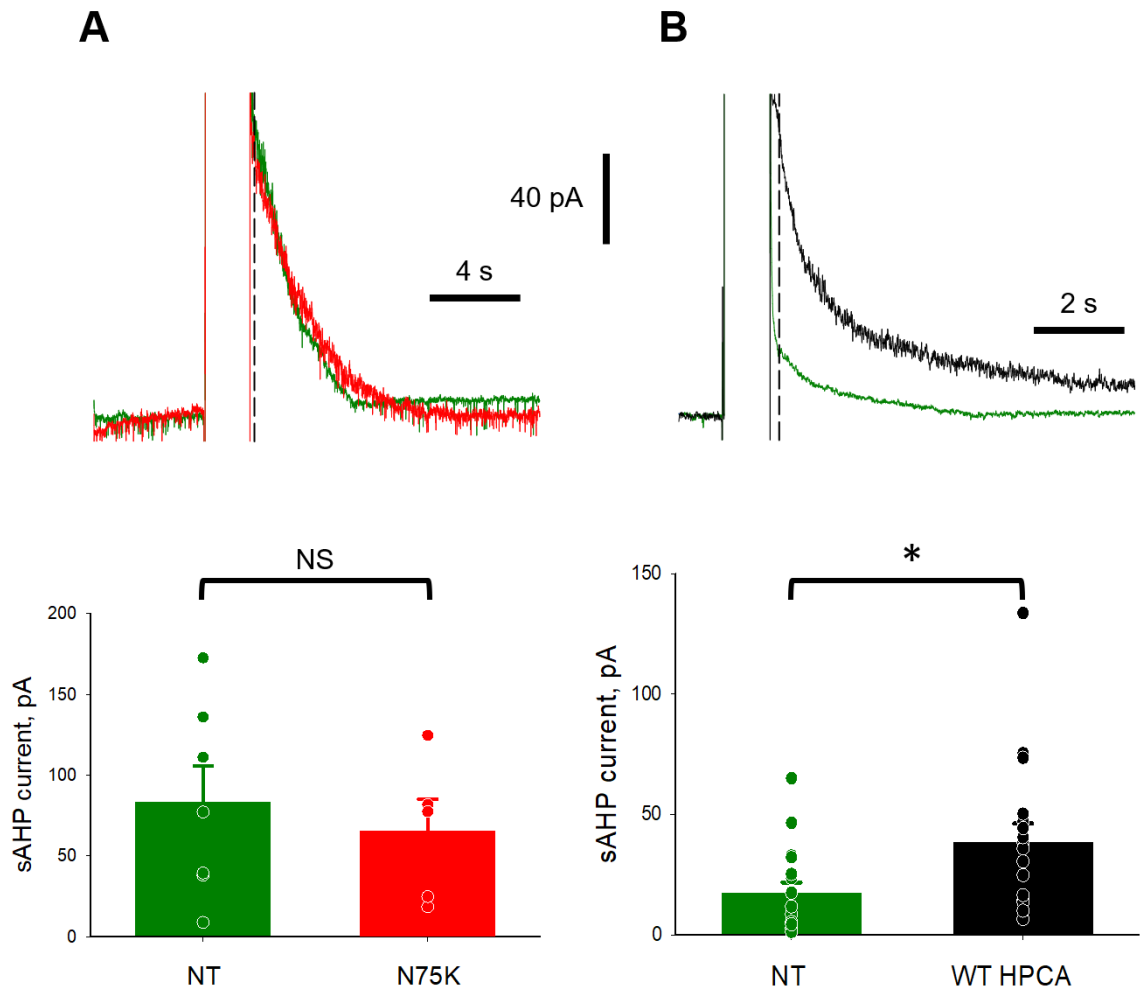


Рисунок 1.6. Мутант гіпокальцину N75K ні пригнічує, ні активізує струм повільної постгіперполяризації (sAHP) (Osypenko et al. 2019). А) Експресія мутанта N75K не впливала на струм sAHP. Записи струмів, індукованих імпульсом деполяризації у нетрансфікованих нейронах (зелений) та нейронах, що експресують мутант N75K (червоний) (зверху). В) Надмірна експресія WT HPCA збільшила струм sAHP. Записи струмів, індукованих імпульсом деполяризації 1 с у нетрансфікованих нейронах (зелений) та нейронах, що надмірно експресують WT HPCA (чорний) (зверху).

Однією з основних відомих функцій HPCA є контроль повільної постгіперполяризації (sAHP) після його транслокації на плазматичну мембрану (Tzingounis et al. 2007). Було показано, що транслокація мутанта гіпокальцину N75K на плазматичну мембрану апікального дендрита, частини нейрона, що бере

участь у генерації струму sAHP (Power et al. 2011), була суттєво пригнічена порівняно з WT HPCA (Osypenko et al. 2019). Це пригнічення супроводжувалося нездатністю N75K додатково збільшувати sAHP струм, що викликався транслокацією ендогенного HPCA, тоді як експресія екзогенного WT HPCA справді збільшувала цей струм (рис. 1.6).

sAHP Activation Hypothesis

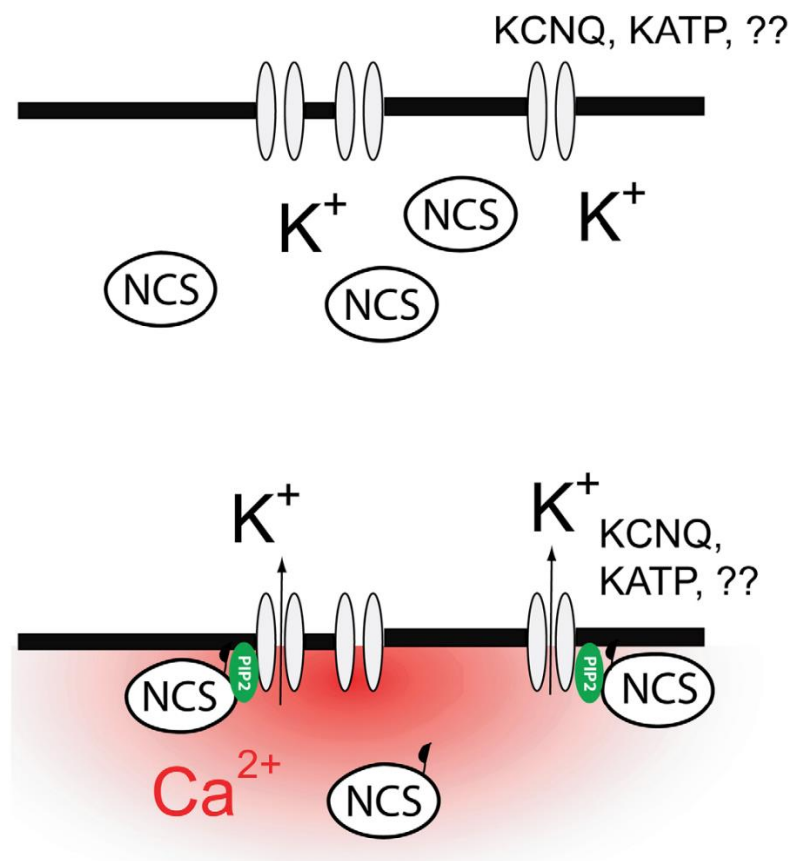


Рисунок 1.7. Ймовірний механізм активації струму sAHP (Andrade, Foehring, and Tzingounis 2012). Тотальне підвищення рівня $[Ca^{2+}]_i$ активує ряд NCS білків (гіпокальцин, нейрокальцин дельта). Зв'язування Ca^{2+} NCS білками призводить до вивільнення міристинової групи та подальшої транслокації білків на плазматичну мембрану. Інтеграція NCS білків у плазматичну мембрану призводить до різкого підвищення щільності фосфоліпідів PI(4,5)P₂. Це, вочевидь, впливає на роботу калієвих каналів (KCNQ, KATP чи якогось іншого, поки невідомо), які починають пропускати струм sAHP.

На основі цих результатів та попередніх досліджень (Villalobos and Andrade 2010; Tzingounis et al. 2007; Andrade, Foehring, and Tzingounis 2012) було висунуто припущення, що sАНР провідність опосередковується реакцією першого порядку між НРСА на мембрані, та все ще невідомим калієвим каналом (рис. 1.7), що лежить в основі струму sАНР (Osypenko et al. 2019).

Модель кортикального нейрона, що включає Ca^{2+} -залежну сигналізацію НРСА та контроль sАНР за допомогою мембран-вбудованого НРСА, досить точно відтворює як транслокацію НРСА, так і струм sАНР, що спостерігається в клітинах, що експресують WT НРСА або його мутант N75K (Osypenko et al. 2019). Симуляційні дослідження, засновані на цій моделі, безсумнівно, продемонстрували підвищену збудливість нейронів кортикального нейрона, що експресує N75K замість WT НРСА. Збільшення було продемонстровано в умовах, що відтворюють добре відомі механізми генерації потенціалів дії в центральних нейронах. Зокрема, було показано, що мутація N75K спричиняє збільшення частоти тонічної активності нейронів, посилення генерації потенціалів дії та порушення адаптації їх частоти (Osypenko et al. 2019). Таким чином показано, що мутант N75K, на відміну від WT НРСА, не може транслокуватися в плазматичну мембрану дендритних компартментів у відповідь на фізіологічно викликані патерни нейронної активності. Це порушення робить даний мутант нездатним контролювати повільну постгіперполяризацію і, отже, підвищує збудливість нейронів, що, ймовірно, і лежить в основі розвитку первинної дистонії.

Функціональні дослідження показують, що аномально підвищена збудливість як в кортикальній, так і в підкірковій зонах низхідних шляхів, що регулюють скорочення скелетних м'язів, є ключовим патофізіологічним механізмом дистонії (Ibáñez et al. 1999; Levy and Hallett 2002). Оскільки НРСА експресується в нейронах усіх цих шляхів ("Hippocalcin Expression Pattern in Cortex GENSAT Project at Rockefeller University, Mouse Brain Atlas, Image Navigator" n.d.; Charlesworth et al. 2015; "Hippocalcin Expression Pattern in Cortex GENSAT Project at Rockefeller University, Mouse Brain Atlas, Image Navigator"

n.d.), підвищена збудливість нейронів, спричинена його мутацією N75K, швидше за все, є основним клітинним механізмом, що призводить до скручування, повторюваних рухів та ненормальних поз у пацієнтів з дистонією.

Нещодавно було виявлено дві гомозиготні мутації гена HPCA у двох неспоріднених турецьких родинах, що хворіють на первинну дистонію (Atasu et al. 2018). Результати цих досліджень, а також робота Charlesworth et al (Charlesworth et al. 2015) разом з висновками роботи Osypenko et al (Osypenko et al. 2019) свідчать про те, що будь-яка мутація HPCA, що призводить до втрати його функції, ймовірно, призводить до розвитку первинної дистонії. Швидше за все, цей розвиток зумовлений пригніченням гальмування в мозку, пов'язаним із зменшенням або повною втратою sАНР. Нещодавно було показано прискорення частоти пейсмейкерної активності та зменшення sАНР, пов'язане з порушенням регуляції убіквітування HPCA у норадренергічних нейронах в моделі хвороби Паркінсона миші (Key et al. 2019). Таким чином, подальший генетичний скринінг пацієнтів з первинною дистонією чи іншими неврологічними руховими розладами на мутації генів HPCA та інших NCS білків, що беруть участь у контролі sАНР (Villalobos and Andrade 2010), є необхідним для виявлення як генетичної причини, так і молекулярних та клітинних механізмів цих захворювань.

Таким чином, результати нещодавніх досліджень вказують на те, що генетичні втручання, які призводять до підвищення експресії гіпокальцину в аномально збуджених низхідних шляхах, що регулюють скелетну мускулатуру, зможуть відновити повільну постгіперполяризацію в нейронах цих шляхів. Це потенційно може стати ефективним інструментом лікування пацієнтів, хворих на дистонію DYT2 та інші аналогічні патології.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Культура нейронів гіпокампа

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. 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 cm^2 наносили на покривне скло, покрите ламініном та полі-D-лізином. Клітини витримували в 12-лункових чашках у 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).

2.2 Культура клітин PC12

Недиференційовані клітини PC12 (клітинна лінія, отримана від феохромоцитом надниркових залоз щурів) були отримані з Банку клітинних культур Національної академії наук України (Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна). Клітини PC12 культивували на круглих скляних покривних скельцях у Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки, 5% кінської сироватки та 0.25% гентаміцину. Клітини вирощували в культуральних 12-лункових чашках при 37°C , у вологій атмосфері, що містила 5% CO_2 . Культуральне середовище

змінювали кожні 3–5 днів, і розщеплювали клітини, якщо їх густина суттєво перевищувала оптимальну та могла призводити до загибелі значної частини клітин через низьку трофіку. Клітини трансфікували плазмідами із розрахунку 0.3–0.5 мкг ДНК на лунку, використовуючи Lipofectamine 2000 (Thermo Scientific, США). Ефективність трансфекції становила 5–10%. Трансфіковані клітини культивували за аналогічних умов протягом 1–3 днів, поки вони не були використані в експериментах.

2.3 Культура клітин НЕК 293

Клітини людської ембріональної нирки (англ. human embryonic kidney, НЕК 293) були отримані з Банку клітинних клітин Національної академії наук України (Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна). Клітини НЕК 293 культивували в пластикових вентильованих посудинах з фільтром при 37°C і 5% CO₂. Клітини вирощували в Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), доповненому 10% фетальної бичачої сироватки та 0.25% гентаміцину. Культуральне середовище змінювали кожні 3–5 днів, і клітини розщеплювали за необхідності. Клітини дисоціювали трипсином перед нанесенням на круглі покривні скельця діаметром 18 мм, трансфікували через 1–2 дні після нанесення на скельця, а в експериментах використовували через 1–3 дні після трансфекції.

2.4 Транз'єнтна трансфекція

Ліпофектамінову трансфекцію (рис. 2.1) проводили 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 НЕК 293, та 0.5–1.0 мкг для культуральних нейронів гіпокампа відповідно. Ефективність трансфекції становила ~75% для клітин PC12 та НЕК 293, та ~1–5% для нейронів

гіпокампа відповідно. Клітини після трансфекції культивували за аналогічних умов і використовували в експериментах через 2–3 дні після трансфекції.

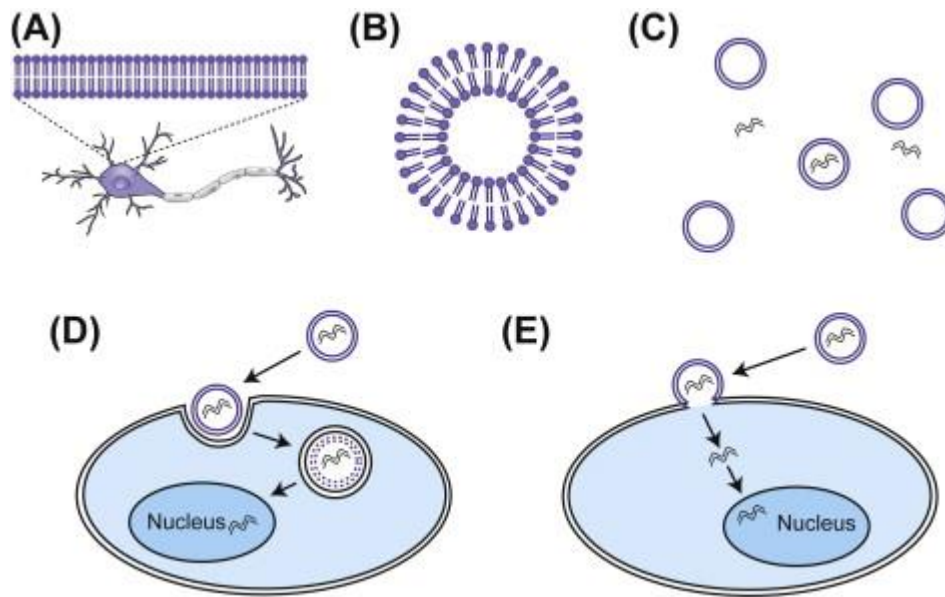


Рисунок 2.1. Ліпофектамінова трансфекція (Carter and Shieh 2015). А) Клітинна мембрана нейрона складається з ліпідного бішару, з гідрофобною внутрішньою частиною та гідрофільною зовнішньою. В) Ліпосоми також складаються з ліпідного бішару, сформованого у вигляді сферичної оболонки. С) На підготовчому етапі проводиться коротка хімічна реакція, в ході якої ліпосоми формуються навколо плазмід. ДНК з ліпосом потрапляє всередину клітин шляхом ендоцитозу (D) або безпосереднього злиття ліпосоми з плазматичною мембраною (E).

2.5 Флуоресцентні білки

Відкриття, генетичне клонування і гетерологічна експресія зеленого флуоресцентного білка (Green Fluorescent Protein або GFP) медузи *Aequorea victoria* є відправною точкою справжньої революції методів візуалізації в клітинній біології. Експресія GFP та багатьох його химер з іншими білками дозволяє візуалізувати флуоресценцію у видимому діапазоні при опроміненні досліджуваного зразка ультрафіолетом. Зелений флуоресцентний білок – це тільки один з представників цілого сімейства гомологічних флуоресцентних

білків. Дані білки виділяють переважно з морських коників і медуз. Завдяки різноманіттю хромофорної структури дані білки мають різні кольори, повністю покриваючи видимий діапазон довжин хвиль. Підходи лабораторного мутагенезу дозволили ще більше урізноманітнити спектри флуоресцентних білків, збільшити їх яскравість, а також зменшити олігомеризацію. Мутація може як збільшити фотостабільність для стандартного спостереження флуоресценції, так і генерувати флуоресцентні білки, здатні до оборотної фотоконверсії. Такі молекули можуть виконувати функцію внутрішньоклітинного «фотореле», переходячи з «темного» стану до флуоресцентного і назад, від одного кольору емісії до іншого. Ефект фотореле може бути корисним для відстеження білкової дифузії, трафіку і віку білка. Є можливість викликати мутацію флуоресцентного білка таким чином, щоб він викликав фотодеструкцію клітини. Рівень флуоресценції GFP та інших флуоресцентних білків досить високий порівнянно з флуоресценцією середовища, в якому вони перебувають (так званою автофлуоресценцією). Флуоресценція зникає в кислому середовищі ($\text{pH} < 7$) і при денатурації. Існують флуоресцентні білки, спроектовані для підвищеної чутливості до рівня pH, чутливі до металів та йонів галогенів.

В даній роботі використовувався жовтий флуоресцентний білок (Yellow Fluorescent protein, YFP), бірюзовий флуоресцентний білок (Teal Fluorescent protein, TFP) та ціановий флуоресцентний білок (Cyan Fluorescent Protein, CFP).

2.6 Плазмід

Плазмід, що кодуєть тандемний конструкт Cerulean-Venus (CTV), посилений ціановий флуоресцентний білок (ECFP) та гіпокальцин, мічений посиленим жовтим флуоресцентним білком (HPCA-EYFP), були ампліфіковані з конструктів, описаних раніше (Thaler et al. 2005; O'Callaghan et al. 2002).

Плазміда pEYFP-Mem кодує химерний білок, що складається з короткої ділянки N-кінця білка нейромодуліну (також відомого як GAP-43), довжиною 20 амінокислот нейромодуліну, та жовто-зеленого флуоресцентного варіанту

посиленого зеленого флуоресцентного білка, EYFP. Ген EYFP містить чотири точкові амінокислотні заміни порівняно з геном зеленого флуоресцентного білка (Ormö et al. 1996). Максимум спектру збудження флуоресценції EYFP – 513 нм, максимум емісії – 527 нм (жовто-зелена область). Фрагмент N-терміналі нейромодуліну містить сигнал до пострансляційного пальмітилювання 3-ї та 4-ї амінокислот. Таким чином, білок EYFP-Mem завдяки наявності залишків пальмітинової кислоти характеризується високою спорідненістю до біологічних мембран, а завдяки наявності флуоресцентної мітки може бути візуалізований. Дану плазмиду було ампліфіковано з конструкту, наданого компанією BD Biosciences Clontech (Becton, Dickinson and Company, США).

Плазміда, що кодує гіпокальцин, мічений тіловим флуоресцентним білком (HPCA-TFP), була субклонована з конструкту HPCA-YFP, описаної раніше (O’Callaghan et al. 2002).

2.7 Параметри флуорофорів

Квантовий вихід - це параметр флуорофору, який визначається в умовах, коли молекули флуорофору не взаємодіють між собою або з іншими флуорофорами. Якщо такі умови зберігаються в експерименті, то квантові виходи конкретних флуорофорів, взятих з літератури, можуть бути використані для розрахунку концентрацій флуорофорів відповідно до рівняння 3.5. У конструкті CTV домен ціанового флуоресцентного білка (Cerulean) відокремлений від домену жовтого флуоресцентного білка (Venus) лінкером, довжиною в 229 амінокислот, що кодує домен TRAF білка людини TRAF2 (Sondek et al. 1996). Враховуючи кристалічну структуру домену TRAF, що була встановлена раніше, відстань між доменами Cerulean та Venus в тандемі CTV складає, щонайменше, 8 нм (Sondek et al. 1996). Взаємодія між Cerulean та Venus на такій відстані повинна бути мінімальною (Wlodarczyk et al. 2008; Leavesley et al. 2013), і призводити до низького флуоресцентного резонансного переносу енергії (FRET) в межах кожної пари Cerulean-Venus. Та з іншого боку,

кристалічна структура білка TRAF2, що використовується в CTV, показує, що даний тандемний білок являє собою грибоподібний гомотример (Sondek et al. 1996; Koushik and Vogel 2008), в якому збуджений флуорофор Cerulean може передавати енергію не одному, а трьом потенційним акцепторам. Як наслідок, оцінка величини FRET для CTV становить $8 \pm 5\%$ (Koushik and Vogel 2008). Наявність додаткового переносу енергії до Venus призводить до ефективного збільшення квантового виходу даного флуорофору з 0.57 до 0.62 ($0.57 \cdot 1.08$). Більше того, три донори Cerulean в межах одного гомотримеру CTV перебувають в безпосередній близькості, що призводить до значного гомо-флуоресцентного резонансного переносу енергії (homo-FRET) з міграцією енергії $19 \pm 5\%$ (Koushik and Vogel 2008), що призводить до зниження квантового виходу Cerulean на ту саму величину. Як наслідок, квантовий вихід для флуорофору Cerulean в CTV знижується з 0.57 (“Introduction to Fluorescent Proteins | MicroscopyU (En-US)” n.d.) до $0.50 (0.57 \cdot (1 - 0.19))$. Таким чином, для наступних обчислень використовувалися значення квантових виходів 0.50 для Cerulean та 0.62 для Venus.

Відносна яскравість Venus (добуток коефіцієнту екстинкції та квантового виходу) є рН-залежною, і її значення було раніше отримане при рН 7.0 (Nagai et al. 2002). У цій роботі значення відносної яскравості було скориговане з урахуванням того, що pK_a (логарифм константи дисоціації для H^+ , K_d) для Venus становить 6.0, а рН внутрішньоклітинного розчину, що використовувався в даних експериментах, становив 7.3. Таким чином, частина молекул флуорофору Venus у депротонованому стані при рН 7.3 була більшою порівняно з рН 7.0. Це збільшення можна обчислити, виходячи із закону діючих мас:

$$\frac{[V]}{[V_0]} = \frac{K_d}{K_d + [H]}, \quad (2.1)$$

де $[V]$ – концентрація депротонованого флуорофору Venus, $[V_0]$ – загальна концентрація флуорофору Venus, $[H]$ – концентрація водню.

Обчислення за формулою (2.1) демонструють збільшення депротонованої частини Venus на 5% при pH 7.3 у порівнянні з pH 7.0. Це призводить до підвищення квантового виходу флуорофору Venus приблизно на 5%. Таким чином, кінцеве значення квантового виходу було встановлено на рівні 0.65 (0.62·1.05).

Коефіцієнти поглинання та квантові виходи для інших флуоресцентних білків та барвників, що використовувалися в роботі, були отримані безпосередньо з онлайн-сервісів, розміщених на офіційних веб-сайтах Nikon (“Introduction to Fluorescent Proteins | MicroscopyU (En-US)” n.d.) та Thermo Fisher Scientific (“Alexa Fluor® Dyes Spanning the Visible and Infrared Spectrum—Section 1.3 - UA,” n.d.).

2.8 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 mM): 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).

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 КОН, осмолярність складала 290 мОсм). У деяких експериментах

внутрішньоклітинний розчин був доповнений барвниками Oregon Green 488 та Alexa Fluor 594.

Скляні мікроелектроди 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 instrument (США). Мікроелектроди мали діаметр кінчика 1–2 мкм, а їх опір складав 3–5 МОм. Реєстрації мембранних потенціалів або трансмембранних струмів були оброблені фільтром низьких частот (3 кГц). Реєстрації зі струмом витоку >200 пА та опором доступу >25 МОм були відкинуті. Значення електричного опору доступу вимірювали протягом усіх електрофізіологічних протоколів з метою контролю клітинного діалізу та забезпечення повного, а не часткового промивання клітини методом внутрішньоклітинної перфузії.

Всі експерименти проводили за кімнатної температури.

2.9 Флуоресцентна мікроскопія

Клітини PC12 та культуральні нейрони гіпокампа, транзійтно трансфіковані плазмідами, які кодують флуоресцентні білки, або клітини, заповнені флуоресцентними барвниками, візуалізували на епіфлуоресцентній системі TILL Photonics (TILL Photonics, Gräfelfing, Німеччина), що контролюється програмним забезпеченням TILLvision. Епіфлуоресцентна система була встановлена на інвертованих мікроскопах (IX70 або IX71, Olympus, Японія), обладнаних об'єктивами з масляною імерсією (40×1.35 або 60×1.25 ; Olympus, Японія). Збудження флуоресценції ксеноновою лампою з монохроматором дозволило зареєструвати флуоресценцію міток та барвників, що використовувалися в більшості експериментів, розділивши сигнали за збудженням та емісією. У разі значних перекривань спектрів емісії флуорофорів (наприклад, флуоресценція Alexa Fluor 594 в каналі EYFP), зображення в каналі емісії EYFP були отримані перш, ніж нейрони заповнювалися барвником Alexa

Fluor 594. При подальшому збудженні флуоресценції Alexa Fluor 594 жодних паразитних сигналів від EYFP не надходило, адже EYFP не збуджується на довжині хвилі 594 нм.

В експериментах з CTV було отримано 5 пар зображень (у каналах Cerulean та Venus відповідно) для кожної клітини. 5 зображень для кожного флуорофору було усереднено. Ці усереднені зображення використовувались для валідації запропонованого підходу вимірювання внутрішньоклітинної концентрації флуоресцентно мічених білків.

В експериментах з електрофізіологічними реєстраціями, покадрова зйомка флуоресцентних зображень розпочинали за 1–3 хвилини до розриву мембрани. З метою мінімізації вицвітання флуорофорів, флуоресцентні зображення реєструвалися з низькою частотою в діапазоні 0.03–0.1 Гц.

2.10 Конфокальна мікроскопія

Флуоресцентні реєстрації, пов'язані з оцінкою фракційного розподілу білка гіпокальцину, а також з оцінкою одновимірного коефіцієнту дифузії НРСА, 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). Зображення були отримані за допомогою високоапертурного водо-імерсійного об'єктиву (60 x 1.00, Olympus, Японія). Управління мікроскопом здійснювалося через пакет FV10-ASW, наданий виробником обладнання. Типовий параметр конфокальності становив 150–300 мкм. Флуоресцентні зображення реєструвалися з частотою 5–15 Гц. Для збудження флуоресценції НРСА-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) здійснювалася в середовищі Matlab (Mathworks, США).

2.11 Відновлення флуоресценції після фотознебарвлення (FRAP)

Фотознебарвлення проводилося в прямокутній області поля зору за допомогою ліній 458 нм та 514.5 нм аргонного лазера на 100% потужності випромінювання з експозицією 1–2 с/мкм² в залежності від рівня експресії флуоресцентних білків. Відновлення флуоресценції після фотознебарвлення реєструвалося на низькій потужності лазера (2–5% потужності 40 мВт-го лазера) з частотою 5–15 Гц.

Криву відновлення середньої інтенсивності флуоресценції після фотознебарвлення $I(x, t)$ було побудовано та інтерпретовано в середовищі MATLAB (MathWorks, США). Результатом розв’язання системи рівнянь (3.13) числовими методами нелінійна теоретична функція, 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. Розв’язання системи рівнянь числовими методами, а також варіація коефіцієнту дифузії виконувалися за допомогою вбудованих функцій пакету MATLAB (MathWorks, США).

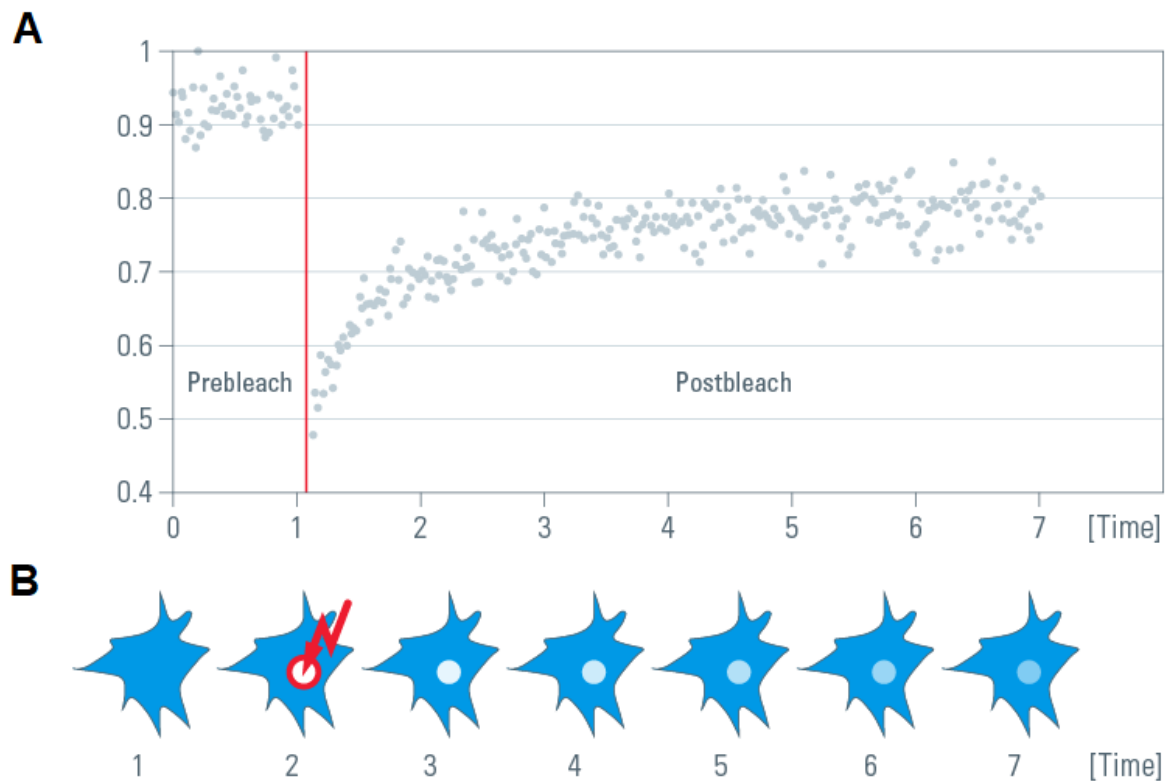


Рисунок 2.2. Відновлення флуоресценції після фотознебарвлення (“Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) and Its Offspring | Learn & Share | Leica Microsystems” n.d.). А) Часовий профіль середньої інтенсивності флуоресценції всередині знебарвленої області, позначеної червоним колом на В). Момент фотознебарвлення позначений червоною вертикальною лінією на А) та червоною блискавкою на В). В) схематичне зображення досліджуваної клітини, заповненої розчином флуоресцентної мітки. З часом відбувається відновлення флуоресценції за рахунок дифузії флуоресцентних молекул з сусідніх, не знебарвлених областей.

2.12 Оцінка рухомих та нерухомих фракцій цитоплазматичних флуоресцентних білків

Для оцінки нерухомої фракції цитоплазматичного флуоресцентного білка, спершу отримувалося зображення інтактної клітини (у каналі емісії відповідного флуорофору). Далі, за допомогою скляного мікроелектроду здійснювали фіксацію клітини в конфігурації «ціла клітина» і проводили внутрішньоклітинну

перфузію протягом декількох хвилин. За цей час вся мобільна фракція флуоресцентного білка вимивалася і флуоресцентний сигнал, який можна було спостерігати в такий момент, очевидно був пов'язаний виключно з молекулами нерухомої фракції. Для оцінки цитозольної концентрації досліджуваного флуорофору, зображення, отримане після перфузії, віднімалося від зображення, отриманого безпосередньо перед розривом мембрани. Отримане зображення відповідає мобільній (тобто цитозольній) фракції флуорофору і може бути використане для кількісного визначення цитозольної концентрації флуоресцентного білка за допомогою рівняння 3.5. Цей підхід також дозволяє кількісно оцінити нерухому частину досліджуваного флуоресцентного білка, яка зосереджена в субклітинних компартментах.

2.13 Статистика

Кількісні результати подаються як середні значення чи медіана вибірки. Похибки визначалися як середньоквадратичні відхилення.

2.14 Хімічні речовини

Усі хімічні речовини, що використовуються для культивування клітин, були придбані у представництва компанії Thermo Fisher Scientific в Україні. Всі інші хімічні речовини були придбані у Sigma (Німеччина), за винятком Alexa Fluor 594, придбаної у Life Technologies (США).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Вимірювання концентрації флуоресцентно мічених молекул

Інтенсивність флуоресценції, що надходить від флуоресцентної мітки, прямо пропорційна концентрації даної мітки (Lakowicz 2006). Зв'язок значення інтенсивності флуоресценції з концентрацією флуорофору в загальному вигляді можна представити у вигляді рівняння (Lakowicz 2006):

$$F = E_{ex}E_{em}V[L], \quad (3.1)$$

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 (мікроскопи Olympus IX70/71), а також власні спектральні властивості флуоресцентної мітки в процесах поглинання збуджуючого світла та емісії флуоресцентного випромінювання (Gell, Brockwell, and Smith 2006). Тоді ефективність збудження флуоресценції можна представити у вигляді інтегралу-згортки (Lakowicz 2006):

$$E_{ex} = I\varepsilon \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} S_{src}(\lambda)S_{slit}(\lambda)S_{ex}(\lambda)(1 - S_{dichr}(\lambda))S_{obj}(\lambda)S_{abs}^L(\lambda)d\lambda, \quad (3.2)$$

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 фільтру 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. Як буде показано

нижче, I скорочується в подальших обчисленнях, тому визначати його не потрібно.

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

$$E_{em} = Q \int_{\lambda_3}^{\lambda_4} S_{em}^L(\lambda) S_{obj}(\lambda) S_{dichr}(\lambda) S_{em}(\lambda) S_{det} d\lambda, \quad (3.3)$$

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. $S_{em}^L(\lambda)$ необхідно нормалізувати так, щоб площа під кривою $S_{em}^L(\lambda)$ дорівнювала 1. У такому випадку згортка квантового виходу Q зі спектром випромінювання флуоресцентної мітки $S_{em}^L(\lambda)$ у відповідному діапазоні довжин хвиль дає величину квантового виходу флуорофору: $\int_{\lambda_3}^{\lambda_4} Q S_{em}^L(\lambda) d\lambda = Q$.

Розділивши інтенсивність флуоресценції досліджуваної мітки F^{tar} (концентрація якої невідома) на інтенсивність флуоресценції контрольної мітки F^{ref} (концентрація якої точно відома), розташованої в тому ж об'ємі V , та скориставшись рівнянням 3.1, отримуємо:

$$\frac{F^{tar}}{F^{ref}} = A \frac{[L^{tar}]}{[L^{ref}]}, \quad A = \frac{E_{ex}^{tar} E_{em}^{tar}}{E_{ex}^{ref} E_{em}^{ref}}, \quad (3.4)$$

де $[L^{tar}]$ та $[L^{ref}]$ – концентрації досліджуваної та контрольної 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.

Таким чином, концентрацію досліджуваного білка можна оцінити як:

$$[L^{tar}] = \frac{1}{A} \frac{F^{tar}}{F^{ref}} [L^{ref}] \quad (3.5)$$

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'єктивів. Спектри пропускання об'єктивів були надані виробником (Olympus, Німеччина) в особистому листуванні. Як правило, приблизні спектральні властивості будь-якого оптичного обладнання можна знайти як на офіційних веб-сайтах виробників, так і безпосередньо під час особистої комунікації з представниками компаній-виробників або постачальників оптичного обладнання. Таким чином, коефіцієнт пропорційності A може бути обчислений для конкретної епіфлуоресцентної системи та конкретної пари флуоресцентних міток, використовуючи порівняно прості обчислення (рівняння 3.4) і може бути додатково використаний для оцінки концентрації цільової мітки, якщо концентрація еталонної мітки відома (рівняння 3.5).

Важливим наслідком рівняння 3.5 є той факт, що за відомого значення відношення концентрацій флуорофорів, коефіцієнт пропорційності A можна відразу виміряти в експерименті: достатньо отримати відношення інтенсивностей флуоресценції та підставити усі значення у формулу. Це можливо, наприклад, якщо у клітині експресований тандемний флуоресцентний білок, або клітина завантажена двома флуоресцентними барвниками рівної концентрації (наприклад, морфологічний індикатор у поєднанні з Ca^{2+} -барвником). Тоді відношення концентрацій флуорофорів дорівнює 1, а коефіцієнт пропорційності A можна отримати, обчисливши співвідношення інтенсивностей флуоресценції:

$$A = \frac{F^{tar}}{F^{ref}}, \quad (3.6)$$

безпосередньо з експериментальних даних.

3.2 Валідація методу та оцінка можливих помилок

3.2.1 Валідація методу за допомогою тандемного флуоресцентного конструктору

Для того, щоб експериментально підтвердити, що коефіцієнт пропорційності A можна коректно отримати з рівняння 3.4, використовуючи спектральні властивості оптичного обладнання та флуоресцентні мітки, і щоб оцінити точність методу, ми використовували тандемний флуоресцентний конструктор Cerulean-Venus tandem (CTV).

CTV складається з двох флуоресцентних міток, а саме двох флуоресцентних білків, Cerulean і Venus, з'єднаних довгим лінкером, щоб уникнути флуоресцентного резонансного переносу енергії між мітками (Thaler et al. 2005). При використанні тандемного конструктору очікуване співвідношення концентрацій флуоресцентних міток складає 1. Тому, якщо наша експериментальна схема та загальні міркування є правильними, а спектральні дані, надані виробниками, є досить точними, то (відповідно до рівнянь 3.5 та 3.6) емпіричне співвідношення концентрацій, ξ , відповідно до рівняння 3.4,

$$\xi = \frac{[L_V^{tand}]}{[L_C^{tand}]} = \frac{1}{A} \frac{F_V^{tand}}{F_C^{tand}}, \quad (3.7)$$

має дорівнювати 1. Тут F_C^{tand} і F_V^{tand} – інтенсивність флуоресценції, виміряна в каналах Cerulean та Venus відповідно.

З метою порівняння очікуваного та емпіричного співвідношення концентрацій для Cerulean та Venus було зареєстровано флуоресценцію обох міток, F_C^{tand} та F_V^{tand} , від сом клітин PC12, попередньо трансфікованих плазмідною, що кодує CTV.

Обчислення коефіцієнта пропорційності A проводили в 2 етапи. Спершу проводили точкове перемноження спектральних характеристик усіх оптичних

елементів, що використовувалися в епіфлуоресцентній системі на мікроскопі IX71 (Olympus, Японія).

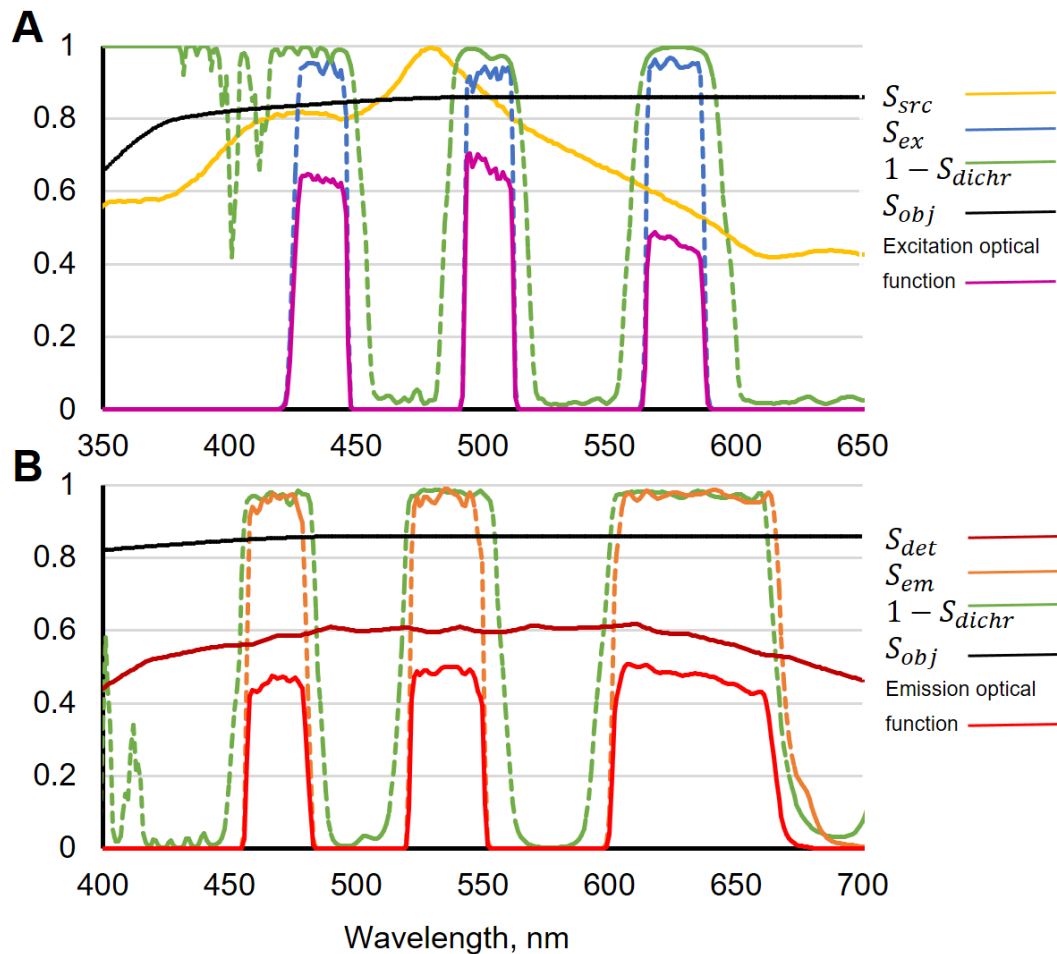


Рисунок 3.1. Точкове множення спектрів усіх елементів оптичних шляхів збудження та емісії флуоресценції. А) Спектри оптичних компонентів на шляху збудження флуоресценції. Тут $S_{src}(\lambda)$, $S_{ex}(\lambda)$, $S_{dichr}(\lambda)$, $S_{obj}(\lambda)$ – це спектри джерела світла (жовта штрихова), фільтру збудження (синя штрихова), дихроїчного дзеркала (зелена штрихова) та об'єктива (чорний пунктир) відповідно. Жирною фіолетовою лінією позначено результат точкового перемноження даних спектрів. В) Спектри оптичних компонентів на шляху емісії флуоресценції. Тут $S_{obj}(\lambda)$, $S_{dichr}(\lambda)$, $S_{em}(\lambda)$, $S_{det}(\lambda)$ – це спектри пропускання об'єктива (чорний пунктир), дихроїчного дзеркала (зелена штрихова), фільтра емісії (червоний пунктир), відповідно, та чутливість детектора (коричнева штрихова). Жирною червоною лінією позначено результат точкового перемноження даних спектрів.

Точкове множення спектрів кожного з оптичних елементів на шляхах збудження та реєстрації емісії флуоресценції дає оптичні функції світлових шляхів збудження (рис. 3.1A) та емісії (рис. 3.1B) відповідно для даного мікроскопа. Варто зауважити, що дані оптичні функції включають в себе виключно параметри експериментального обладнання, і тому є універсальними для даної конфігурації мікроскопа, і можуть бути використані для обчислення коефіцієнта пропорційності A для широкого діапазону різних флуоресцентних міток.

На другому етапі обчислень оптичні функції шляхів збудження та емісії (що несуть в собі інформацію виключно про оптичне обладнання, встановлене на мікроскопі) точково множили на квантові виходи, коефіцієнти екстинкції (див. підрозділ 2.6 Параметри флуорофорів) та спектри збудження й емісії (“Spectra Viewer | Chroma Technology Corp” n.d.) флуоресцентних білків Cerulean та Venus. Приклад такого множення для Cerulean наведено на рис. 3.2. Нарешті, обчислення площі під результуючими кривими, відповідно до рівнянь 3.2 та 3.3, дозволило отримати значення E_{ex} та E_{em} для кожного з флуорофорів, необхідні для знаходження коефіцієнта пропорційності A за формулою 3.4.

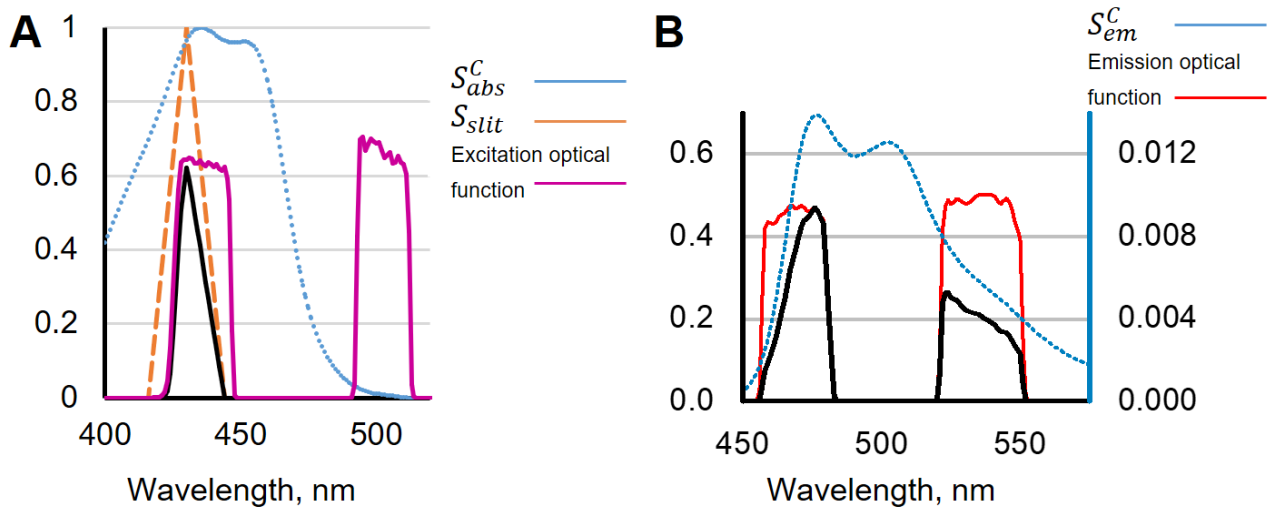


Рисунок 3.2. Обчислення ефективностей збудження та емісії флуоресценції на прикладі Cerulean. А) Точкове множення оптичної функції збудження флуоресценції (фіолетова суцільна) на нормалізований спектр поглинання Cerulean ($S_{abs}^C(\lambda)$) (синя суцільна) та спектр пропускання монохроматора для даного експерименту (помаранчева штрихова). Інтегрування результуючої функції (чорна суцільна) та множення на коефіцієнт екстинкції Cerulean дає E_{ex}^C , ефективність збудження Cerulean. В) Точкове множення оптичної функції емісії флуоресценції (червона пунктирна, відкладена по лівій осі Y) та нормованого спектру випромінювання Cerulean ($S_{em}^C(\lambda)$) (синя пунктирна, відкладена по правій осі Y). Інтегрування результуючої функції (чорна суцільна, відкладена по лівій осі Y) та множення її на квантовий вихід Cerulean дає E_{em}^C , ефективність емісії Cerulean.

Усі оптичні елементи, які стоять на шляху проходження світла епіфлуоресцентної системи, що використовувалась в поточній серії експериментів, наведені в таблиці 3.1. Навпроти кожного з елементів наведено опис того, як можна отримати спектральні характеристики компонентів, якщо вони з якихось причин відсутні в лабораторії. Спектри флуоресценції для Cerulean та Venus, а також їх та квантові виходи та коефіцієнти екстинкції є загальнодоступними та розміщені на багатьох веб-сайтах (“Introduction to

Fluorescent Proteins | MicroscopyU (En-US)” n.d.; “Spectra Viewer | Chroma Technology Corp” n.d.; “Fluorescence SpectraViewer | Thermo Fisher Scientific - UA” n.d.); необхідні дані про ці та інші флуоресцентні білки та барвники також можна отримати у їх виробників чи постачальників.

Таблиця 3.1. Довідкові дані про оптичні елементи епіфлуоресцентної системи.

Елементи	Модель	Посилання на спектр
Джерело світла	FEI Polychrome V	на замовлення у FEI-Munich
Фільтр збудження	Chroma 69008x	www.chroma.com
Дихроїчне дзеркало	Chroma 69008bs	www.chroma.com
Детектор	PCO Sensicam VGA	www.pco.de
Фільтр емісії	Chroma 69008m	www.chroma.com
Об’єктив	Olympus UAPO 40XOI3/340	на замовлення у Olympus

Таким чином, згідно рівняння 3.4, коефіцієнт пропорційності A можна обчислити як:

$$A = \frac{E_{ex}^C E_{em}^C}{E_{ex}^V E_{em}^V}. \quad (3.8)$$

Тут варто звернути увагу на те, що в ході отримання значень E_{ex} та E_{em} ми кілька разів здійснювали процедуру точкового множення спектрів. Для тих довжин хвиль, де певні спектри були невизначені, дані було доповнено нулями, щоб усі спектри мали однакову кількість точок. Після остаточного підрахунку за формулою 3.8 було встановлено, що коефіцієнт пропорційності A для конкретного мікроскопа Olympus IX71 з оптичними елементами, наведеними в таблиці 3.1, та флуоресцентних міток Cerulean та Venus складає 2.77.

Для того, щоб оцінити емпіричне співвідношення концентрацій ξ на основі коефіцієнта пропорційності A , необхідно також виміряти відношення інтенсивностей флуоресценції (рівняння 3.6). Cerulean та Venus. Ця пара флуоресцентних білків чудово підходить для поточного дослідження, оскільки їх спектри збудження та емісії флуоресценції практично не перекриваються (“Introduction to Fluorescent Proteins | MicroscopyU (En-US)” n.d.). Якщо спектри флуоресцентних міток істотно перекриваються, то їх істинні інтенсивності флуоресценції, необхідні для обчислення коефіцієнта пропорційності A , можна виокремити методами лінійної алгебри (Wlodarczyk et al. 2008; Leavesley et al. 2013; Dinant et al. 2008).

Відношення інтенсивностей флуоресценції Cerulean та Venus можна обчислити напрямку, отримавши зображення клітин PC12, трансфікованих плазмідною, що кодує CTV, у відповідних каналах (рис. 3.3А, рис. 3.3В). Збудження флуоресценції здійснювали за допомогою монохроматора, почергово налаштовуючи його на максимуми спектрів збудження флуорофорів (433 нм для Cerulean та 515 нм для Venus).

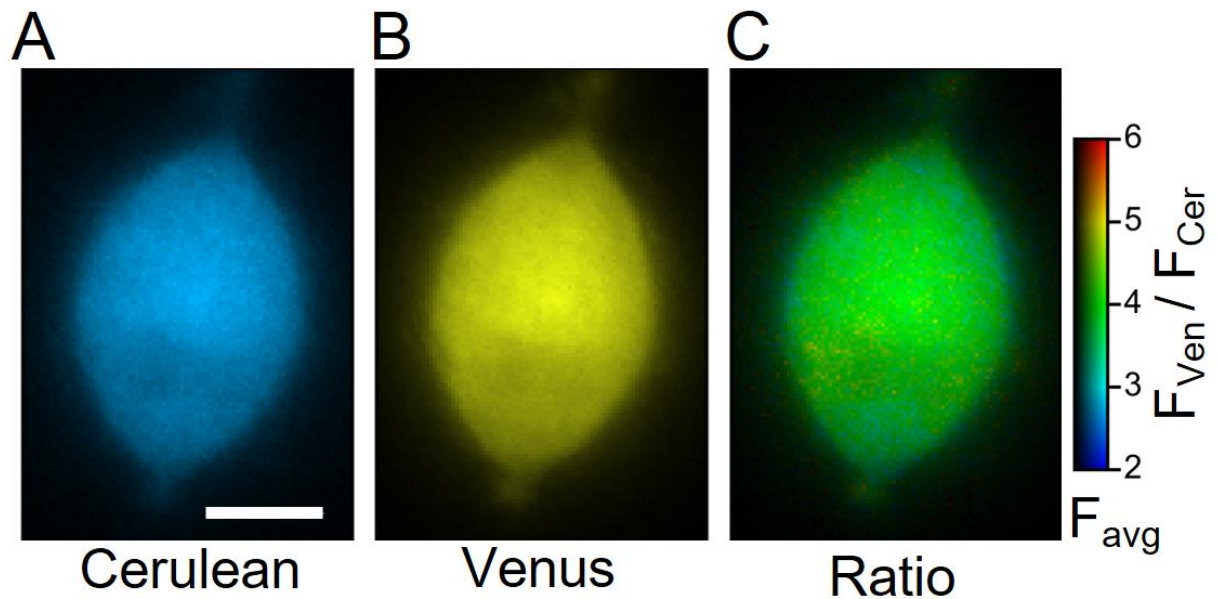


Рисунок 3.3. Флуоресцентні зображення типової клітини PC12, трансфікованої плазмідною, що кодує CTV. А), В) флуоресцентні зображення клітини Cerulean (А) та Venus (В). Мірна паличка на (А) 5 мкм. С) зображення, в якому представлене попіксельне відношення флуоресценцій Venus до Cerulean. Колір та яскравість кожного пікселя в (С) відображають відношення флуоресценції Venus/Cerulean та усереднену інтенсивність відповідних пікселів на зображеннях (А) та (В) ($F_{avg} = (F_C + F_V)/2$) відповідно. Праворуч від (С) також розміщено псевдокольорову палітру, застосовану до даного зображення.

Як і очікували, просторовий розподіл Cerulean та Venus в клітинах PC12 практично повністю співпадає. Відношення інтенсивностей флуоресценції Venus до Cerulean суттєво не відрізняється від пікселя до пікселя (рис. 3.3С). Спостерігається сильна кореляція між інтенсивностями флуоресценції в кожному пікселі (рис. 3.4А), при чому вона не залежить від рівня експресії CTV. Регресійний аналіз значень інтенсивності флуоресценції в кожному пікселі в межах соми клітини показує, що співвідношення інтенсивностей флуоресценції Cerulean до Venus, майже однакове для різних клітин PC12 (рис. 3.4В) і становить 3.69 ± 0.22 (середнє \pm стандартне відхилення, $n = 5$). Це підтверджує гіпотезу про

те, що відношення інтенсивностей флуоресценції відображає співвідношення концентрацій для Cerulean та Venus. Важливо також відмітити, що сильна просторова лінійна кореляція відображає сильну спільну локалізацію флуоресцентних міток.

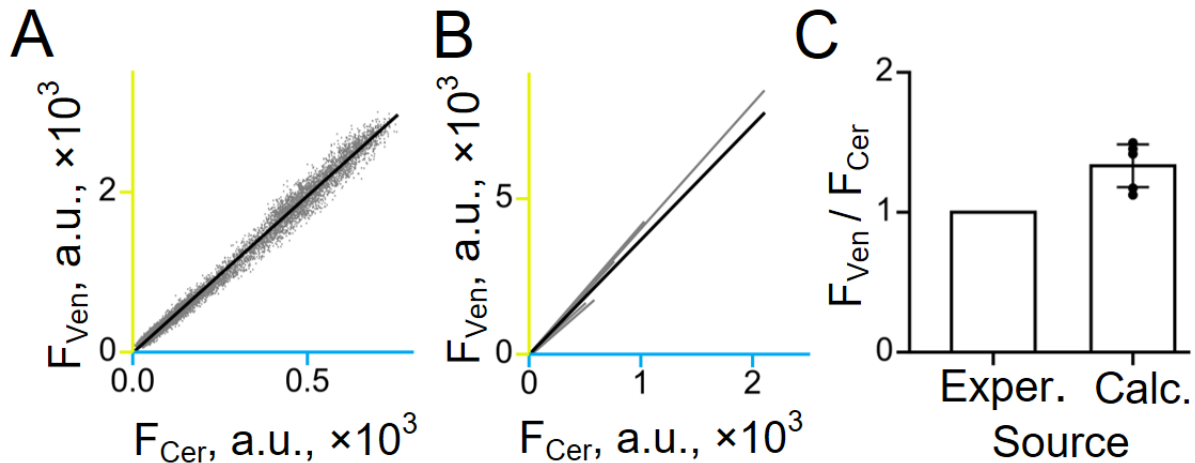


Рисунок 3.4. А) Лінійна регресія кореляційного графіку між інтенсивностями флуоресценції Cerulean та Venus для кожного пікселя в репрезентативній клітині PC12. Сильна лінійна кореляція між інтенсивностями (нахил 3.922 ± 0.004 , перетин 11.1 ± 0.01 , $R^2 = 0.99$) демонструє спільну локалізацію флуоресцентних білків. В) Лінійні регресії кореляційних графіків, подібні до А) для п'яти клітин PC12 з різними рівнями експресії CTV. С) Очікувані та істинні співвідношення концентрацій Cerulean та Venus в тандемі ($[L_V]/[L_C]$). Гістограма демонструє, що емпіричне відношення концентрації Venus до Cerulean, оцінене на основі коефіцієнта пропорційності A (1.33 ± 0.06 , середнє \pm стандартне відхилення, $n = 5$), близьке до очікуваного співвідношення, яке дорівнює 1. Це вказує на те, що помилка визначення спектральних властивостей оптичного обладнання та флуоресцентних міток становить близько 30%.

Емпіричне співвідношення концентрацій ξ розраховували, виходячи з отриманого коефіцієнта пропорційності A та відношення інтенсивностей флуоресценції білків Cerulean та Venus:

$$\xi = \frac{[L_V^{tand}]}{[L_C^{tand}]} = \frac{1}{A} \frac{F_V^{tand}}{F_C^{tand}} = \frac{1}{2.77} 3.69 = 1.33. \quad (3.9)$$

Отримане емпіричне співвідношення концентрацій дещо відрізняється від 1, що вказує на певну (~30%) неточність методу (рис. 3.4С). Ця неточність, швидше за все, виникає через різницю між флуоресцентними параметрами та спектрами Cerulean та Venus у внутрішньоклітинному середовищі та калібрувальних розчинах. Зокрема, залежні від навколишнього середовища і концентрації зміни в квантовому виході, правильність згортання та посттрансляційної модифікації флуоресцентних білків, зсуви спектрів та флуоресцентний резонансний перенос енергії можуть змінювати як параметри флуорофорів, так і їх спектри. Незважаючи на це, продемонстрована точність підходу ~30% для двох використаних флуоресцентних білків може вважатися достатньою для більшості біологічних застосувань. По-перше, описаний підхід дозволяє вимірювати та порівнювати рівні експресії білків у сусідніх клітинах в межах одного препарату, а також динаміку експресії або транслокації білків на клітинному та субклітинному рівнях. По-друге, незважаючи на похибку 30% в оцінці концентрації білка, отримані оцінки все ж дозволять передбачити процеси сигналізації білка, оскільки не очікується, що поведінка клітинних сигнальних шляхів буде суттєво змінена 30%-ми змінами рівня експресії білка. Крім того, точність оцінок може бути істотно поліпшена за допомогою 1) органічних барвників та/або 2) точних спектрів флуоресцентних білків, виміряних всередині клітин, замість того, щоб покладатися на отримані спектри від постачальників. В останньому випадку будь-які модифікації спектрів флуоресцентної мітки, що залежать від середовища, можуть бути усунуті.

З іншого боку, емпіричне відношення концентрацій ξ , отримане для двох конкретних флуоресцентних міток, може бути використане як поправка до коефіцієнта пропорційності A в даній експериментальній схемі, що включає в себе вибрані флуоресцентні мітки:

$$[L^{tar}] = \frac{1}{\xi_A} \frac{F^{tar}}{F^{ref}} [L^{ref}], \quad (3.10)$$

даючи, в даному випадку, практично точну оцінку концентрації досліджуваного флуоресцентного білка.

3.2.2 Валідація методу за допомогою двох органічних барвників

Обчислення для тандемного флуоресцентного конструкту, наведені вище, спираються на певні теоретичні припущення, як от оцінка резонансного переносу енергії між флуорофорами одного типу (homo-FRET), прямого резонансного переносу енергії (direct FRET), можливої кількості субодиниць у CTV-гомері тощо, які не є повністю доведеними в даних експериментальних умовах. Для того, щоб забезпечити валідацію методу та повторно оцінити його похибку, ми провели низку подібних експериментів, на цей раз із двома органічними барвниками рівних концентрацій, поміщеними в клітину за допомогою скляного мікроелектроду. Спектри емісії барвників Oregon Green 488 та Alexa Fluor 594, які використовуються в цих експериментах, практично не перекриваються, і їх флуоресценцію можна розділити за збудженням. Oregon Green 488 не збуджується на довжині хвилі 582 нм, а Alexa Fluor 594 на довжині хвилі 498 нм збуджується лише 7% (порівняно з максимумом). Дану серію експериментів проводили на культурі нейронів гіпокампа, щоб додатково продемонструвати можливість застосування запропонованого підходу до різних типів клітин.

Для завантаження барвників у клітини ми використовували стандартний метод петч-клемп у конфігурації «ціла клітина». Загальноприйнято вважати, що цитозоль клітинної соми повністю замінюється внутрішньопіпетним розчином протягом декількох хвилин після встановлення конфігурації «ціла клітина». Суть цієї методики, яку ще називають технікою внутрішньоклітинної перфузії, полягає в тому, що склад внутрішньоклітинного середовища та розчину всередині петч-піпетки є однаковим (Hamill et al. 1981; Molleman 2002). Тому очікується, що контрольний барвник та інші розчинені молекули протягом відведеного часу досягнуть рівномірного розподілу всередині клітини та петч-

піпетки. Оскільки об'єм скляної петч-піпетки на багато порядків більший за об'єм клітинної соми, то передбачається, що рівноважна концентрація барвників у цитозолі буде ідентичною їх початковій концентрації в розчині, яким була заповнена петч-піпетка.

Спершу до клітин ($n = 8$) підводили петч-піпетки, заповнені розчином, що містив 100 мкМ кожного барвника, у конфігурації «cell-attached» (без розриву плазматичної мембрани). Клітини візуалізували в каналах флуоресценції Oregon Green 488 та Alexa Fluor 594 зі швидкістю один кадр в 15 с одразу після досягнення високоомного контакту (англ. *gigaseal*). Після отримання перших трьох кадрів мембрану клітини проривали, встановлюючи конфігурацію «ціла клітина». Це дозволяло барвникам дифундувати в цитозоль клітини. Через 5–10 хв після прориву мембрани інтенсивність флуоресценції Oregon Green 488 та Alexa Fluor 594 досягли стаціонарного рівня, що вказує на те, що концентрації барвників в піпетці та цитозолі вирівнялися. Після цього фокальну площину піднімали на 50 мкм вгору, щоб отримати флуоресцентні зображення обох барвників всередині петч-піпетки, далеко від клітинної соми.

Спершу ми перевірили якість перфузії барвників в соми нейронів гіпокампа, та чи не змінювалися квантові виходи барвників при переході з петч-піпетки у внутрішньоклітинне середовище. Для цього ми обчислили відношення інтенсивностей флуоресценції барвників у сомі (по всій сомі одразу) та в піпетці (частина внутрішньої ємності петч-піпетки у фокальній площині на 50 мкм вище від клітини). З'ясувалося, що ці співвідношення суттєво не відрізнялися (1.45 ± 0.03 та 1.47 ± 0.03 (середнє \pm стандартне відхилення) для клітинних сом та піпеток відповідно ($P = 0.71$, парний *t*-тест Ст'юдента, $n = 8$). Такий результат демонстрував гарну якість перфузії барвників та стабільність квантового виходу барвників при вмиванні в нейрони.

Далі, ми розраховували коефіцієнт пропорційності *A* (який відображає спектральні характеристики оптичного обладнання та флуорофорів) для пари Oregon Green 488 та Alexa Fluor 594, виконавши усі ті ж самі процедури, як і у

випадку CTV в пункті 3.2.1. В результаті обчислень ми одержали значення 1.32. Розділивши відношення інтенсивностей флуоресценції барвників у сомі нейронів гіпокампа на коефіцієнт пропорційності ($1.45 / 1.32$), отримали значення 1.10 ± 0.03 , що, згідно рівняння 3.5, є оцінкою співвідношення концентрацій Oregon Green 488 та Alexa Fluor 594. Це значення досить близьке до 1, істинного співвідношення концентрацій барвників у сомі.

Таким чином, оцінка помилки підходу, отримана в даній серії експериментів, становить 10% в порівнянні з 30% в попередніх експериментах із тандемом CTV.

Слід зазначити, що точність, оцінену в експериментах Oregon/Alexa, можна додатково покращити. Оскільки деяка частина флуоресценції Alexa Fluor 594 все ж потрапляє в канал реєстрації флуоресценції Oregon Green 488, можна зробити на це поправку, в результаті чого оцінка відношення концентрацій барвника становитиме 1.04 ± 0.03 .

У той же час, ми не вважаємо, що таку поправку обов'язково проводити на практиці, адже через малі маси речовин та об'єми розчинів, що використовуються для приготування барвників, технічно складно домогтися концентрації флуорофору в петч-піпетці та сомі перфузованої клітини з точністю понад $\sim 10\%$. Натомість оцінка частки флуоресценції однієї мітки, що потрапляє в канал другої мітки, в кожній конкретній експериментальній конфігурації вимагає чималих методичних та математичних зусиль.

3.3 Вимірювання внутрішньоклітинної концентрації флуоресцентних білків у дифузійно-компактних клітинах

Для того, аби продемонструвати можливість застосування даного підходу для оцінки концентрацій мобільної та нерухомої (розміщеної у внутрішньоклітинних компартментах) фракцій флуоресцентного білка, ми вирішили виміряти концентрацію посиленого ціанового флуоресцентного білка

(ECFP) у клітинах PC12, попередньо трансфікованих відповідною плазмідною. В якості контрольної флуоресцентної мітки ми обрали Alexa Fluor 594, оскільки вона має незначне спектральне перекриття з ECFP, і тому флуоресценцію міток можна розділити апаратно без додаткових математичних маніпуляцій з експериментальними даними. Для завантаження клітин барвником Alexa Fluor 594 (з концентрацією 200 мкМ), ми застосували стандартну техніку 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. 3.5Aa). Ліва клітина залишалася інтактною упродовж усього експерименту та використовувалась для моніторингу фотовицвітання флуоресцентного білка (блакитна пунктирна на рис. 3.5C) та фонового шуму для контрольного барвника (червона пунктирна на рис. 3.5C).

До правої клітини спершу підвели петч-піпетку, що містить відому концентрацію Alexa Fluor 594 (контрольна флуоресцентна мітка) та встановили конфігурацію «cell-attached» (без прориву плазматичної мембрани. Клітини візуалізували в каналах флуоресценції ECFP (рис. 3.5Aa) та Alexa Fluor 594 (рис. 3.5Ac) 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 цитозоллю клітини. Важливо відмітити, що динаміка процесів врівноваження інтенсивностей флуоресценції співпадала для усіх клітин в даній серії експериментів (усереднені криві з середньоквадратичними відхиленнями показано на рис. 3.5D).

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 3.5. Для цього значення інтенсивності в результуючих зображеннях усереднювали всередині овальних областей (англ. region of interest або ROI), що відповідають цитозолу клітини, і контури яких показані на рис. 3.5А суцільними блакитною та червоною лініями.

Оцінку відношення інтенсивностей флуоресценції міток можна також отримати з лінійної регресії кореляційного графіка, побудованого по всіх пікселях ROI всередині цитоплазми, як це показано на рис. 3.5В. Добре видно, що попиксельний кореляційний графік гарно апроксимується лінійним рівнянням без вільного члена ($R^2 = 0.67$, нахил $\frac{F_{ECFP}}{F_{Alexa}} = 0.33$). Якщо ж для даного ROI поділити середнє значення флуоресценції ECFP-контролю на середнє значення Alexa-плато, отримаємо $\frac{F_{ECFP}}{F_{Alexa}} = 0.33$. Таким чином, обидва типи простих обчислень (лінійна регресія кореляційного графіка та відношення середніх інтенсивностей флуоресценції в ROI) можуть бути використані для оцінки відношення інтенсивностей флуоресценції досліджуваної та контрольної міток.

Далі ми обчислили коефіцієнт пропорційності A , специфічний для пари міток ECFP та Alexa Fluor 594, застосувавши підхід, який було продемонстровано вище для міток Cerulean та Venus (див. пункт 3.2.1). Його значення становить 18.6. Тоді ефективна цитоплазматична концентрація ECFP, оцінена для репрезентативної клітини за формулою 3.5, становила

$$[L_{ECFP}] = \frac{1}{A} \frac{F_{ECFP}}{F_{Alexa}} [L_{Alexa}] = \frac{1}{18.6} \cdot 0.33 \cdot 200 \text{ мкМ} = 3.51 \text{ мкМ}. \quad (3.11)$$

Концентрація ECFP в цитоплазмі всіх протестованих клітин PC12 складала $4.01 \pm 1.68 \text{ мкМ}$ (медіана з міжквартильним розмахом, $n = 5$).

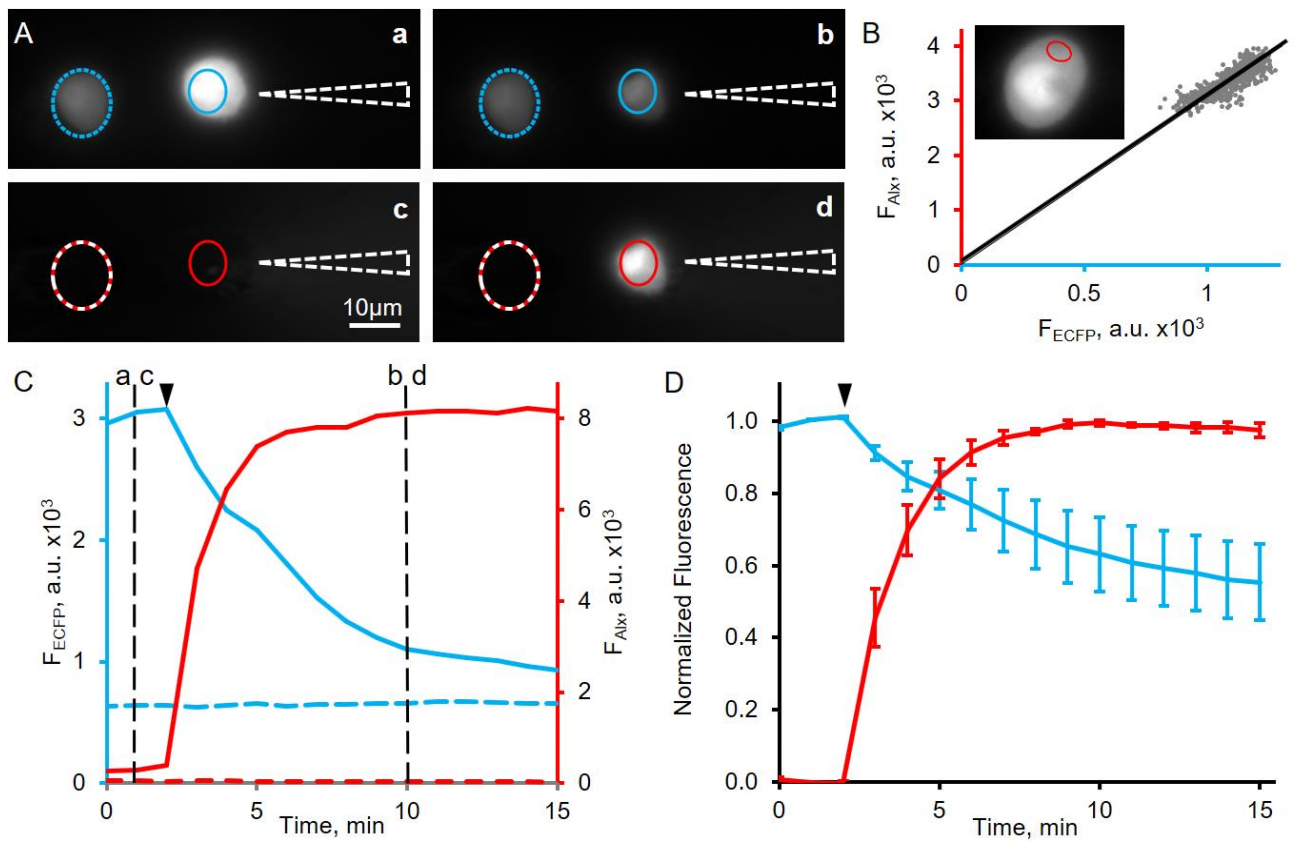


Рисунок 3.5. Оцінка концентрації ECFP у клітинах PC12. А) Зображення двох клітин PC12, отриманих у каналах ECFP (a, b) та Alexa Fluor 594 (c, d), безпосередньо перед проривом клітинної мембрани (a, c) та через 10 хв після прориву (b, d). Відповідні моменти часу позначені чорними пунктирними лініями в (C). Положення петч-піпетки зображено на (A) білими пунктирними трикутниками. Мірна паличка 10 мкм. В) кореляційний графік флуоресценції ECFP і Alexa Fluor 594 для кожного пікселя, розташованого у червоному овалі, всередині клітини. С) часові залежності вимивання Alexa Fluor 594 (червона лінія) та вимивання ECFP (синя лінія) та аналогічні криві для інтактної контрольної клітини (пунктирні лінії). Момент прориву мембрани позначено чорними стрілками на (C) та (D). D) нормалізовані та усереднені часові залежності вимивання Alexa Fluor 594 та вимивання ECFP, аналогічні тим, що в (C) ($n = 5$).

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). В середньому інтенсивність флуоресценції ECFP при вимиванні зменшувалася на $44 \pm 7\%$ ($n = 5$) порівняно з початковим рівнем (синя крива на рис. 3.5D). З іншого боку, молекула Alexa Fluor 594 є сильно зарядженою, і не може проникати у внутрішньоклітинні компартаменти. Тому при досягненні рівноважного рівня флуоресценції, Alexa Fluor 594 набуває повністю цитозольного розподілу. Таким чином, для отримання оцінки цитозольної (а не ефективної цитоплазматичної) концентрації ECFP, слід враховувати лише цитозольну частину ECFP. Це робиться шляхом віднімання зображення ECFP-плато (зробленого при стаціонарному значенні інтенсивності флуоресценції) від початкового зображення ECFP-контролю, зробленого перед проривом плазматичної мембрани. Таке диференціальне зображення представляє локалізацію цитозольної фракції ECFP, тоді як зображення Alexa-плато представляє цитозольну локалізацію Alexa Fluor 594 в тому ж об'ємі. В репрезентативній клітині співвідношення, отримане для того ж ROI (овальна область, обмежена суцільною червоною лінією у вставці на рис. 3.5B) шляхом ділення диференціального зображення ECFP на зображення Alexa-плато становить $\frac{F_{ECFP}}{F_{Alexa}} = 0.20$. Звідси оцінка цитозольної концентрації ECFP становить 2.14 мкМ (порівняно з ефективною цитоплазматичною концентрацією 3.51 мкМ, оціненою вище).

Ми оцінили концентрації мобільних (швидше за все цитозольних) та нерухомих (переважно всередині внутрішньоклітинних компартаментів) фракцій ECFP для всіх клітин в даній серії експериментів (44% та 56% відповідно). Звідси оцінка цитозольної (мобільної) концентрації ECFP становить 1.76 ± 0.87 мкМ (медіана з міжквартильним розмахом, $n = 5$).

Отримані результати демонструють, що повне завантаження дифузійно-компактних клітин з контрольною міткою та вимивання цитозольної фракції досліджуваної мітки за допомогою скляного мікроелектроду може бути

здійснено приблизно за 5 хв. Таким чином, реєстрація флуоресцентних зображень у каналах контрольної та досліджуваної міток до та через 5 хв після прориву клітинної мембрани дозволяє оцінити ефективну цитоплазматичну та мобільну (цитозольну) концентрацію досліджуваного флуорофору, та кількісно проаналізувати його фракційний розподіл між цитозолем та внутрішньоклітинними компартаментами.

3.4 Вимірювання внутрішньоклітинної концентрації екзогенно експресованого білка гіпокальцину в нейронах

Ми застосували підхід, описаний у розділі 3.1 для оцінки концентрації нейронного Ca^{2+} -сенсорного білка гіпокальцину, міченого посиленням жовтим флуоресцентним білком, HPCA-EYFP, у дендритному дереві нейронів гіпокампа, попередньо трансфікованих відповідною плазмідною для екзогенної експресії цього білка. Гіпокальцин бере участь у Ca^{2+} -залежній сигналізації в дендритах (Dovgan et al. 2010; Markova et al. 2008). Тому важливо переконатися, що клітинна сигналізація гіпокальцину в нейронах гіпокампа істотно не порушується через наявність додаткового, екзогенно експресованого HPCA-EYFP. Ми припускаємо, що вплив екзогенного HPCA-EYFP на роботу ендогенного гіпокальцину є незначною, якщо концентрація HPCA-EYFP не перевищує половини концентрації ендогенного гіпокальцину, яка, як відомо, становить близько 30 мкМ (Furuta et al. 1999; O'Callaghan, Terpikin, and Burgoyne 2003). Тому нашою метою було оцінити дендритну концентрацію HPCA-EYFP і порівняти її з концентрацією ендогенного гіпокальцину, щоб у майбутніх експериментах відбирати ті нейрони, які експресують відповідний рівень HPCA-EYFP. 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. 3.6Aa). Після цього ми підвели петч-піпетку до соми даного нейрона та прорвали клітинну 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 нейрона, в тому числі у візуалізований раніше апікальний дендрит (рис. 3.6Ab).

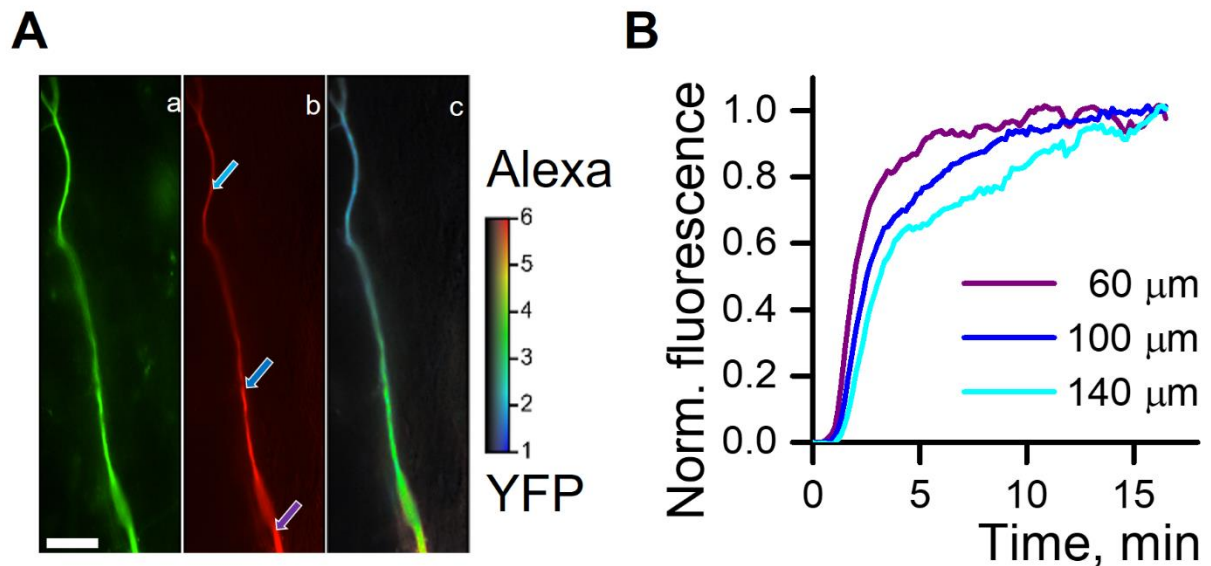


Рисунок 3.6. Динаміка вмивання Alexa Fluor 594 в апікальний дендрит. Аа) Флуоресцентне зображення дендрита в каналі HPCA-EYFP, отримане до прориву мембрани. (Ab) Зображення тієї ж області в каналі Alexa Fluor 594, отримане через 15 хв після прориву мембрани. Стрілками позначено ROI, де вимірювали середні інтенсивності флуоресценції як функцію часу, показані в (B). (Ac) Попіксельне відношення флуоресценції Alexa Fluor 594 до HPCA-EYFP в псевдокольоровій палітрі, що наведена поруч. Мірна паличка 10 мкм. B) Профілі інтенсивності флуоресценції Alexa Fluor 594 в трьох ділянках дендрита, (на відстані 60, 100 та 140 мкм від соми), нормовані на максимальні значення. Профіль відображає процес вмивання Alexa Fluor 594 в даний дендрит з плином часу до встановлення рівноважної концентрації барвника. Кольори ліній відповідають кольорам стрілок в (Ab).

Практика показує, що перфузія розгалужених клітин може тривати чималий час, перш ніж будуть досягнені рівноважні концентрації барвників. Для того, аби використовувати Alexa Fluor 594 в якості контрольної мітки, необхідно дочекатися стабілізації рівня флуоресценції даної мітки в досліджуваній ділянці дендритного дерева. Ми оцінили характерний час, необхідний для врівноваження концентрації Alexa Fluor 594 в проксимальній та дистальній частинах апікального дендрита нейрона гіпокампа при застосуванні конфігурації «ціла клітина». В даній серії експериментів (електричний опір доступу складав ~ 15 МОм) просторовий розподіл інтенсивності флуоресценції Alexa Fluor 594 у довгому апікальному дендриті на відстані до 100 мкм від соми досягав стаціонарного рівня приблизно за 15 хв після прориву мембрани (рис. 3.6В). Відношення інтенсивностей флуоресценції Alexa Fluor 594 та HPCA-EYFP в кожному пікселі (рис. 3.6Ас) та лінійний профіль усередненого відношення інтенсивностей флуоресценції уздовж усього дендрита (рис. 3.7А) демонструють, що концентрація Alexa Fluor 594 у дендритному сегменті на відстані 60–100 мкм від соми була врівноважена з концентрацією Alexa Fluor 594 в петч-піпетці.

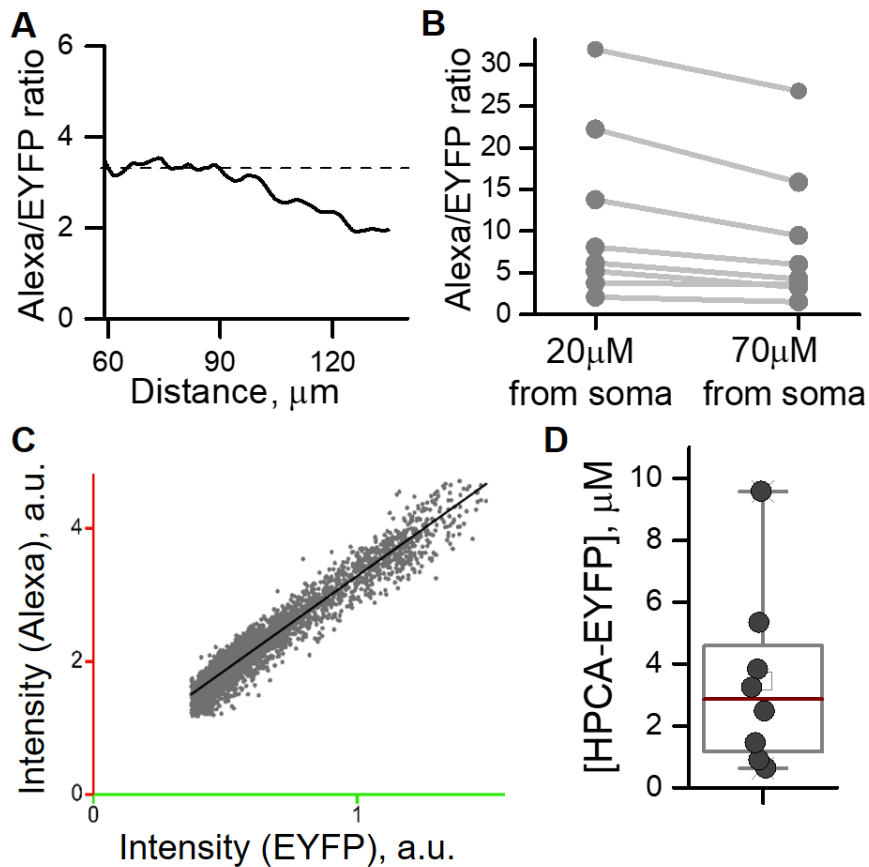


Рисунок 3.7. Оцінка концентрації екзогенного гіпокальцину в дендритах нейронів гіпокампа. А) Профіль відношення середньої інтенсивності флуоресценції Alexa Fluor 594 до НРСА-YFP уздовж дендрита. Графік має область плато в інтервалі 60–100 мкм, що вказує на діапазон відстаней від соми, де концентрація НРСА-EYFP може бути оцінена точно. В) Відношення інтенсивності флуоресценції Alexa Fluor 594 до НРСА-EYFP у проксимальній (20 мкм) та дистальній (70 мкм) частинах апікальних дендритів через 15 хв після прориву мембрани ($n = 8$ нейронів). С) Кореляційний графік інтенсивностей флуоресценції НРСА-EYFP та Alexa Fluor 594 для всіх пікселів дендритного сегмента, що відповідає області плато в (А). Лінійна регресія графіку демонструє значну лінійну кореляцію між флуоресценціями міток ($R^2 = 0.87$). D) Оцінка дендритної концентрації гіпокальцину в усіх восьми протестованих нейронах.

Тим не менш, у дистальній частині апікального дендрита (блакитна область на рис. 3.6Ас) вмивання Alexa Fluor 594 не було повним. Результати

обчислень демонструють (рис. 3.7B), що відношення інтенсивностей флуоресценції Alexa до HPCA-EYFP у проксимальній та дистальній частинах апікальних дендритів через 15 хв після розриву мембрани відрізняється у 0.75 ± 0.04 разів ($n = 8$ нейронів), що досить близько до 1. Більше того, в експериментах, в яких електричний опір доступу був менший за 18 МОм дане значення складало 0.83 ± 0.05 ($n = 4$). Це вказує на те, що супутня помилка розрахунку співвідношення інтенсивностей флуоресценції міток на відстані 70 мкм від соми нейронів, пов'язана з неповним вмиванням Alexa Fluor 594, в короткочасних (менше 15 хв.) експериментах не перевищуватиме 25%. Більше того, дану помилку можна зменшити шляхом подовження тривалості перфузії та/або зменшенням електричного опору доступу. Таким чином, концентрація гіпокальцину в дистальних частинах дендритів все ж може бути оцінена з достатньою точністю у швидких експериментах. Як правило, електрофізіологічні експерименти тривають довше 15 хв, що створює природні умови для повного вмивання контрольної мітки та подальшого покращення точності методу в дистальних дендритах та аксонах.

Як було показано в підрозділі 3.3, існує два підходи для обчислення відношення інтенсивностей флуоресценції контрольної та досліджуваної мітки. Можна провести лінійну регресію попиксельного кореляційного графіку, побудованого на основі флуоресцентних зображень дендритного сегменту, в якому Alexa Fluor 594 дифузійно врівноважена (зелена ділянка на рис. 3.6Ac). Результатом є сильна лінійна кореляція (рис. 3.7C, $R^2 = 0.87$, нахил $\frac{F_{HPCA-YFP}}{F_{Alexa}} = 0.35$). В якості альтернативи, хороша лінійна кореляція між інтенсивностями флуоресцентних міток спонукає оцінити співвідношення через відношення середніх значень інтенсивностей флуоресценції в ROI, що охоплює відповідний дендритний сегмент. В такому випадку одразу отримуємо значення ($\frac{F_{HPCA-YFP}}{F_{Alexa}} = 0.28$), тим самим значно спрощуючи завдання. В усіх наступних розрахунках застосовувався саме другий, більш простий підхід.

Далі ми обчислили коефіцієнт пропорційності A для пари міток Alexa Fluor 594 та EYFP. Для цього ми виконавши усі ті ж самі процедури, як і у підрозділі 3.3, замінивши оптичні спектри, коефіцієнт екстинкції та квантовий вихід ECFP на параметри EYFP. В результаті обчислень коефіцієнт пропорційності A для даної пари міток становив 1.02.

Нарешті, концентрацію екзогенно експресованого НРСА-EYFP у дендриті можна було обчислити за формулою 3.5 і вона склала:

$$[L_{\text{НРСА-EYFP}}] = \frac{1}{A} \frac{F_{\text{НРСА-EYFP}}}{F_{\text{Alexa}}} [L_{\text{Alexa}}] = \frac{1}{1.02} * 0.28 * 20 \mu\text{M} = 5.5 \text{ мкМ}, \quad (3.12)$$

для репрезентативного нейрона, та $3.4 \pm 1.1 \text{ мкМ}$ (медіана з міжквартильним розмахом, $n = 8$, рис. 3.7D) для усіх нейронів в даній серії експериментів.

3.5 Оцінка розподілу НРСА всередині клітин на основі його одновимірного коефіцієнту дифузії

Спершу ми вирішили з'ясувати, чи перебуває гіпокальцин переважно у цитозолі, або ж він повністю вбудований у плазматичну мембрану при базальному рівні внутрішньоклітинної концентрації йонів Ca^{2+} , спираючись на здатність цього білка до дифузії. Добре відомо, що коефіцієнти дифузії цитозольних водорозчинних білків, що мають молекулярну масу, аналогічну НРСА, знаходяться в межах $15\text{--}40 \text{ мкм}^2/\text{с}$ у клітинах різних типів (Swaminathan, Hoang, and Verkman 1997; Arrio-Dupont et al. 2000; Coscoy et al. 2002). 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 НРСА з коефіцієнтом дифузії суто мембранного білка, в одних і тих же живих клітинах. Якщо НРСА в основному перебуває на плазматичній мембрані, то даний підхід мав показати, що коефіцієнт дифузії гіпокальцину близький або співпадає з коефіцієнтом дифузії мембранного білка. З іншого боку, якщо НРСА

знаходиться переважно в цитозолі, то ми мали б спостерігати різницю значень коефіцієнтів дифузії білків у 30–80 разів. Для того, щоб візуалізувати процес дифузії НРСА та мембранного білка в живих клітинах, досліджувані молекули мітили тіаловим (TFP) та жовтим (EYFP) флуоресцентними білками. Таким чином, дану серію експериментів проводили на культурі нейронів гіпокампа, котрансфікованих плазмідами, що містять гени НРСА-TFP та мембранного білка EYFP-Mem.

НРСА в ході посттрансляційної модифікації ковалентно зв'язується із залишком міристинової кислоти на N-кінці амінокислотної послідовності, що дозволяє даній молекулі демонструвати роботу кальцій-міристинового перемикача. Було показано, що при зв'язуванні гіпокальцину з йонами Ca^{2+} залишок міристинової кислоти в структурі НРСА дозволяє цій молекулі вбудовуватися у плазматичну мембрану. У той же час, якщо НРСА не зв'язаний з Ca^{2+} , залишок міристинової кислоти прихований у гідрофобній кишені глобули НРСА, що перешкоджає вбудовуванню в плазматичну мембрану і призводить до цитозольної локалізації НРСА (J B Ames et al. 1997; O'Callaghan, Terikín, and Burgoyne 2003). Таким чином, розподіл НРСА між цитозолом та плазматичною мембраною при базальному рівні $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ще не встановлено, оскільки спорідненість гіпокальцину до Ca^{2+} у внутрішньоклітинному середовищі нейронів гіпокампа поки не відома. EYFP-Mem складається з жовтого флуоресцентного білка та залишків пальмітинової кислоти, з'єднаних коротким лінкером довжиною 20 амінокислот. На відміну від НРСА, залишки пальмітинової кислоти в EYFP-Mem перманентно експоновані, незалежно від $[\text{Ca}^{2+}]_i$, в результаті чого EYFP-Mem постійно вбудований в клітинні мембрани. Виходячи з молекулярної структури та Ca^{2+} -залежності вбудовування в мембрану НРСА-TFP та EYFP-Mem, ми очікували, що ці молекули матимуть принципово різний розподіл у живих нейронах при базальному рівні $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Переважна більшість молекул EYFP-Mem перебуватиме на плазматичній мембрані, тоді як молекули НРСА-TFP будуть розподілені між цитозолом і плазматичною мембраною в залежності від $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

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. Оскільки обидва білки одночасно знебарвлюються і синхронно дифундують в одному й тому ж дендритному сегменті, коефіцієнти дифузії обох білків, отримані в результаті аналізу експериментальних кривих, можна легко порівняти. Тому ми вирішили зупинитися на такому «парному дизайні» експериментів.

За допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопа ми отримали флуоресцентні зображення дендритного сегмента нейрона гіпокампа, що експресує білки HPCA-TFP (рис. 3.8Aa1) та EYFP-Mem (рис. 3.8Ab1). Коротка експозиція та невелике поле зору (20 x 3 мкм) дозволили нам реєструвати зображення зі швидкістю 12 кадрів/сек без серйозної фотодеструкції флуоресцентних міток. 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. 3.8Aa2). Відновлення флуоресценції після фотознебарвлення реєстрували в обох каналах з однаковою частотою кадрів, 12 Гц (рис. 3.8Aa3–4).

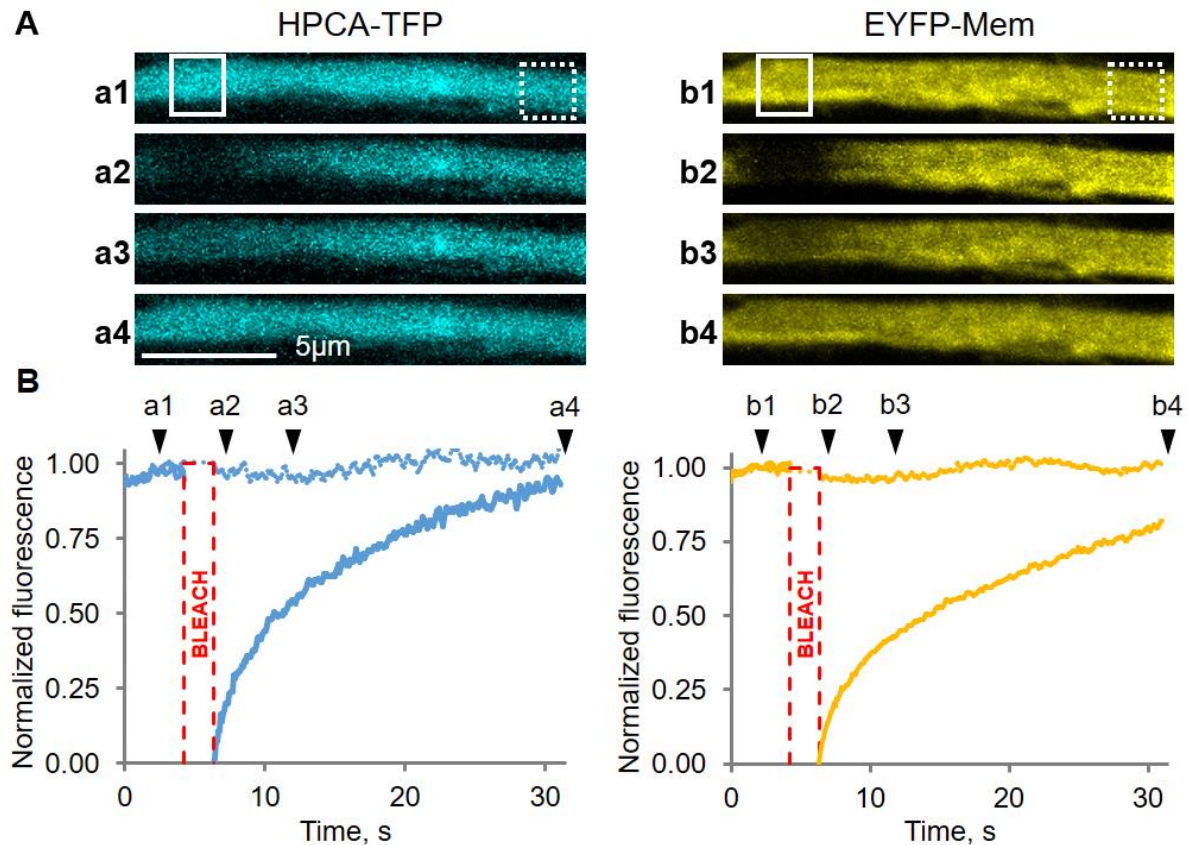


Рисунок 3.8. Відновлення флуоресценції після фотознебарвлення (FRAP) HPCA-TFP та EYFP-Mem у дендритах гіпокампальних нейронів. А) Флуоресцентні зображення дендритного сегмента культури нейронів гіпокампа, котрансфікованих плазмідами з генами HPCA-TFP та EYFP-Mem. Зображення реєстрували у каналах TFP та EYFP безпосередньо до (a1, b1) та 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 HPCA-TFP (синя крива) та EYFP-Mem (жовта крива) у фотознебарвленій області, а пунктирними – аналогічні профілі в межах області, позначеної білим пунктирним контуром в a1 та b1 (на віддалі 20 мкм).

Часовий профіль змін середньої інтенсивності флуоресценції в межах області, де проводили фотознебарвлення білків, показано суцільними кривими

на рис. 3.8В. Ми виходили з припущення, що відновлення інтенсивності флуоресценції в даній області відбувається виключно за рахунок дифузії обох білків із сусідніх областей дендрита (що граничать праворуч і ліворуч із знебарвленою областю). 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:

$$\begin{cases} \frac{\partial I}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 I}{\partial x^2} \\ I_{(t,x=20\mu m)} = 1; I_{(t,x=-20\mu m)} = 1, \\ I_{(t=0)} = H(|x| - 1\mu m) \end{cases} \quad (3.13)$$

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

Друге рівняння в системі (3.13) є граничною умовою, яка передбачає, що інтенсивність флуоресценції на відстані 20 мкм практично не змінюється протягом усього експерименту. Для підтвердження граничної умови ми додатково вимірювали інтенсивність флуоресценції як функцію часу на відстані 20 мкм від фотознебарвленої ділянки (прямокутник, обмежений білою пунктирною лінією на рис. 3.8Аа1, пунктирні лінії на рис. 3.8В). Третє рівняння системи (3.13) відображає початкову умову. У момент часу $t = 0$ (одразу після фотознебарвлення) інтенсивність флуоресценції у межах фотознебарвленої ділянки (прямокутник, обмежений суцільною білою лінією на рис. 3.8Аа1) дорівнює нулю, тоді як інтенсивність флуоресценції в інших ділянках дендритного сегмента дорівнює початковій величині (рис. 3.8Аа2). Розв'язавши систему рівнянь (3.13) 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 (гладенькі криві на рис. 3.9А), ми отримали значення коефіцієнтів дифузії, 41 ± 8 мкм²/с для НРСА-ТФР та 4.7 ± 1.7 мкм²/с для ЕУФР-Мем відповідно (рис. 3.9В). Таким чином, коефіцієнти дифузії НРСА-ТФР та ЕУФР-Мем у дендритах нейронів гіпокампа значно відрізняються один від одного, що свідчить про різницю між їх розподілом у цитозолі та плазматичній мембрані.

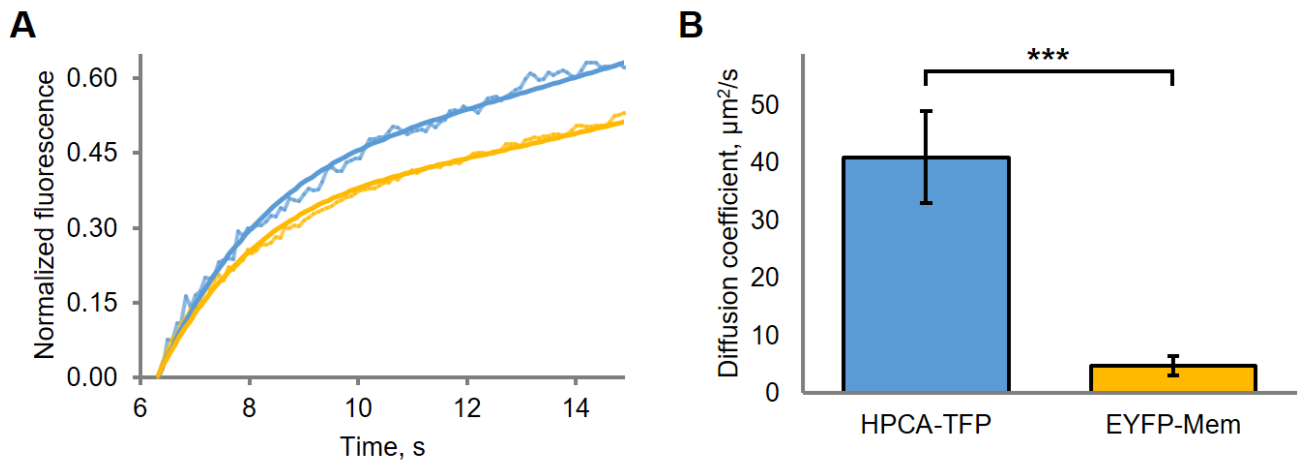


Рисунок 3.9. Вимірювання одновимірних коефіцієнтів дифузії НРСА-ТФР і ЕУФР-Мем в дендритах нейронів гіпокампа. А) Криві відновлення флуоресценції після фотознебарвлення в каналах НРСА-ТФР (синя зашумлена крива) та ЕУФР-Мем (жовта зашумлена крива) в дендритному сегменті нейрона гіпокампа, котрансфікованого плазмідами, що містять відповідні гени. Шляхом апроксимації експериментальних даних рішенням одновимірного рівняння дифузії (перше рівняння в системі (3.13)) методом найменших квадратів, було отримано криві нелінійної регресії (гладенькі суцільні криві синього та жовтого кольору на (А)), . D) Усереднене значення коефіцієнтів дифузії НРСА-ТФР (41 ± 8 мкм²/с) і ЕУФР-Мем (4.7 ± 1.7 мкм²/с) у всіх протестованих клітинах ($n = 6$ нейронів, *** $P < 0.001$).

Важливо відмітити, що відношення коефіцієнтів дифузії НРСА-ТФР і ЕУФР-Мем становить близько 10, що не зовсім відповідає співвідношенню (~30–80) між суто мембранними та цитозольними білками (Swaminathan, Hoang, and

Verkman 1997; Arrio-Dupont et al. 2000; Coscoy et al. 2002; Marguet et al. 1999; Oyola-Cintrón et al. 2015). Цей результат говорить про те, що НРСА-TFR і EYFP-Mem ймовірно присутні як в цитозолі, так і в плазматичній мембрані. Однак варто зауважити, що наша оцінка коефіцієнта дифузії НРСА-TFR (41 ± 8 мкм²/с) близька до значень, отриманих для малих цитозольних білків (15–40 мкм²/с) (Swaminathan, Hoang, and Verkman 1997; Arrio-Dupont et al. 2000; Coscoy et al. 2002). Тому, НРСА-TFR, швидше за все, при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$, перебуває в цитозолі, хоча невелика фракція білка може потенційно бути присутня і у плазматичній мембрані.

Відносно високе значення коефіцієнта дифузії EYFP-Mem (4.7 ± 1.7 мкм²/с) порівняно з мембрано-асоційованими білками (0.5 мкм²/с) (Marguet et al. 1999; Oyola-Cintrón et al. 2015) говорить про те, що EYFP-Mem може бути присутнім у цитозолі дендритів нейронів гіпокампа. Крім того, зображення EYFP-Mem у дендритах (рис. 3.8Ab1) та сомах (дані не показано) культури нейронів гіпокампа виявили значний рівень флуоресценції цього білка далеко від плазматичної мембрани. Цей факт додатково підтверджує присутність EYFP-Mem в цитоплазмі. Цитозольна частка молекул EYFP-Mem з їх швидкими константами вибудовування-вбудовування в плазматичну мембрану забезпечують швидке відновлення флуоресценції даного білка після фотознебарвлення порівняно з суто мембранними білками (Marguet et al. 1999; Oyola-Cintrón et al. 2015). Проте, незважаючи на його присутність в цитозолі, більша частина молекул білка EYFP-Mem локалізується в мембрані дендритів, про що говорить коефіцієнт дифузії, в 10 разів нижчий порівняно з НРСА-TFR.

Можливо, оборотна фотоконверсія EYFP (McAnaney et al. 2005) могла прискорити відновлення FRAP-кривої в наших експериментах, тим самим призводячи до завищення коефіцієнта дифузії для EYFP-Mem. Це частково пояснює значну різницю між експериментальним (4.7 ± 1.7 мкм²/с) та очікуваним (~ 0.5 мкм²/с) значенням. Явище оборотної фотоконверсії також може призвести до незначного завищення коефіцієнта дифузії НРСА-TFR (порівняно з EYFP-Mem). Тим не менш, вносячи певні помилки в оцінки,

оборотна фотоконверсія не впливає на основні результати експериментів FRAP, які демонструють переважно цитозольну локалізацію гіпокальцину в дендритах нейронів гіпокампа.

Виходячи з оцінки коефіцієнтів дифузії для НРСА-TFR та EYFP-Mem ми зробили висновок, що НРСА при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$ здебільшого перебуває в цитозолі дендритів гіпокампальних нейронів. Однак наявність цитозольної фракції EYFP-Mem внесла похибку в точність проведеної оцінки розподілу НРСА. Це завадило нам із впевненістю говорити про точну кількісну оцінку мембранної фракції НРСА при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$. Саме тому, у наступній частині дослідження ми вирішили застосувати більш точний підхід до оцінки розподілу НРСА між цитозолом і плазматичною мембраною.

3.6 Оцінка розподілу НРСА на основі визначення його локалізації в плазматичній мембрані

Результати наших FRAP-експериментів демонструють, що EYFP-Mem здебільшого перебуває на мембрані. Тому ми вирішили встановити точне положення плазматичної мембрани у просторі, підсвітивши мембрану флуоресценцією EYFP-Mem в конфокальних зображеннях живих клітин, трансфікованих плазмідами, що кодують EYFP-Mem та НРСА-TFR. Отримавши флуоресцентні зображення в каналах EYFP та TFR, та підрахувавши загальну інтенсивність флуоресценції НРСА-TFR у тих пікселях зображення, що відповідають положенню плазматичної мембрани (на основі аналізу зображення EYFP-Mem), ми мали б отримати значення, пропорційне загальній кількості молекул НРСА-TFR, вбудованих у плазматичну мембрану. Загальну флуоресценцію цитозольної фракції НРСА-TFR, пропорційну цитозольній кількості цього білка, можна було б отримати шляхом підсумовування інтенсивності флуоресценції у всіх інших пікселях у межах клітини. На жаль, ця проста та приваблива стратегія виявилася неефективною при застосуванні її до аналізу зображень дендритів нейронів гіпокампа через дифракційне обмеження

просторової роздільної здатності конфокальної мікроскопії. Як гарно видно на рис. 3.8Aa1, розподіл флуоресценції EYFP-Mem був відносно однорідним у дендритному сегменті, що перешкоджає встановленню точного місцезнаходження плазматичної мембрани. Причина була в тому, що діаметр дендрита (~2 мкм) 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). Ці обмеження, які є загальними обмеженнями конфокальної мікроскопії, не дозволили нам виділити такий поперечний оптичний зріз дендритного сегменту, щоб отримати флуоресцентне зображення зі значним контрастом між пікселями, що представляють плазматичну мембрану та цитозоль. Таким чином, для подальших експериментів варто було працювати з об'єктами, розміри яких істотно більші, ніж просторова роздільна здатність конфокальної мікроскопії, наприклад із сомами клітин.

На жаль, зображення оптичних зрізів соми нейронів гіпокампа в каналі EYFP демонстрували велику кількість внутрішньоклітинних компартментів, в яких відбувається синтез та посттрансляційна модифікація EYFP-Mem. Деякі компартменти знаходяться пліч-о-пліч з плазматичною мембраною, що перешкоджає точному визначенню пікселів, які можна було б віднести до плазматичної мембрани. Крім того, точні межі соми не можна адекватно окреслити в початкових сегментах клітинних відростків, що також перешкоджає реалізації запланованої стратегії. Тому, щоб продемонструвати дієвість стратегії, ми вирішили оцінити розподіл білка EYFP-Mem між цитозолом і плазматичною мембраною в клітинах, що мають просту геометрію і слабшу внутрішньоклітинну компартменталізацію EYFP-Mem.

3.6.1 Розподіл EYFP-Mem в сомах клітин з простою геометрією

Ми очікували, що подвійне пальмітилювання білка EYFP-Mem і, як наслідок, його висока спорідненість до біологічних мембран, дозволяють використовувати його для оцінки точної локалізації плазматичної мембрани в

клітинах будь-якого типу. Тому ми обрали клітини НЕК 293 (англ. human embryonic kidney, клітини людської ембріональної нирки), що характеризуються простою геометрією та відсутністю відростків. Розмір їх соми становить 15–20 мкм, і ці клітини демонструють відсутність яскравої цитозольної флуоресценції EYFP у зображенні оптичного зрізу соми (рис. 3.10А).

Спершу ми вирішили підтвердити, що EYFP-Мем перебуває здебільшого на плазматичній мембрані і що його флуоресценцію можна використовувати для локалізації плазматичної мембрани в клітинах НЕК 293, попередньо трансфікованих плазмідною, що кодує тільки даний білок (без НРСА-TFP), щоб уникнути можливих проблем, пов'язаних з оптичною взаємодією між TFP та EYFP.

Набір зображень поперечних перерізів клітини НЕК 293 з високою роздільною здатністю вздовж осі Z, отриманих за допомогою конфокальної лазерної скануючої мікроскопії, показано на рис. 3.10А. Збудження флуоресценції проводили за допомогою аргонного лазера (лінія 514.5 нм); емісію флуоресценції виділяли смуговим фільтром 525–575 нм. Розмір пікселя становив 0.138 x 0.138 мкм; роздільна здатність уздовж Z і XY склала 1.2 мкм і 0.25 мкм відповідно. Встановивши такі параметри сканування, нам вдалося зареєструвати флуоресценцію з тонкого шару простору (оптичний зріз), який перетинав клітину на половині її висоти, і не охоплював внутрішньоклітинні компартменти ($Z = 4.28$ мкм, Рис. 3.10А). Яскрава флуоресценція плазматичної мембрани в цьому оптичному зрізі утворює замкнуту контур. Інтенсивність флуоресценції в пікселях контуру пропорційна кількості молекул EYFP-Мем, вбудованих у плазматичну мембрану в даному оптичному зрізі. Інтенсивність флуоресценції в пікселях, розташованих всередині контуру (в цитоплазмі), складається з флуоресценції цитозольних молекул EYFP-Мем в зрізі та, частково, з позафокусної флуоресценції від яскравих ділянок плазматичної мембрани над і під оптичним зрізом, а також від внутрішньоклітинних компартментів, що містять EYFP-Мем. Тому загальну інтенсивність флуоресценції у пікселях, що відповідають цитоплазмі, слід розглядати як оцінку

зверху для цитозольної фракції білка EYFP-Mem. Кількісні оцінки мембранної та цитозольної фракцій EYFP-Mem для конкретного оптичного зрізу проводили за допомогою лінійних профілів інтенсивності флуоресценції, отриманих для січних ліній, що проходять через (або поблизу) геометричного центру оптичного зрізу клітини (рис. 3.10B). Ділянка профілю, що відповідає флуоресценції цитозольної фракції EYFP-Mem, показана червоним кольором, а флуоресценція мембранної фракції – жовтим кольором. Аналогічне обчислення фракцій для декількох лінійних профілів та усереднення отриманих результатів показали, що принаймні 76.1% EYFP-Mem в межах даного оптичного зрізу перебуває на плазматичній мембрані. Беручи до уваги, що фрагмент був обраний випадковим чином серед інших зрізів, що проходять через (поблизу) геометричного центру клітини, оцінки, отримані для зрізу, можуть бути застосовані до розподілу білка у всій клітині.

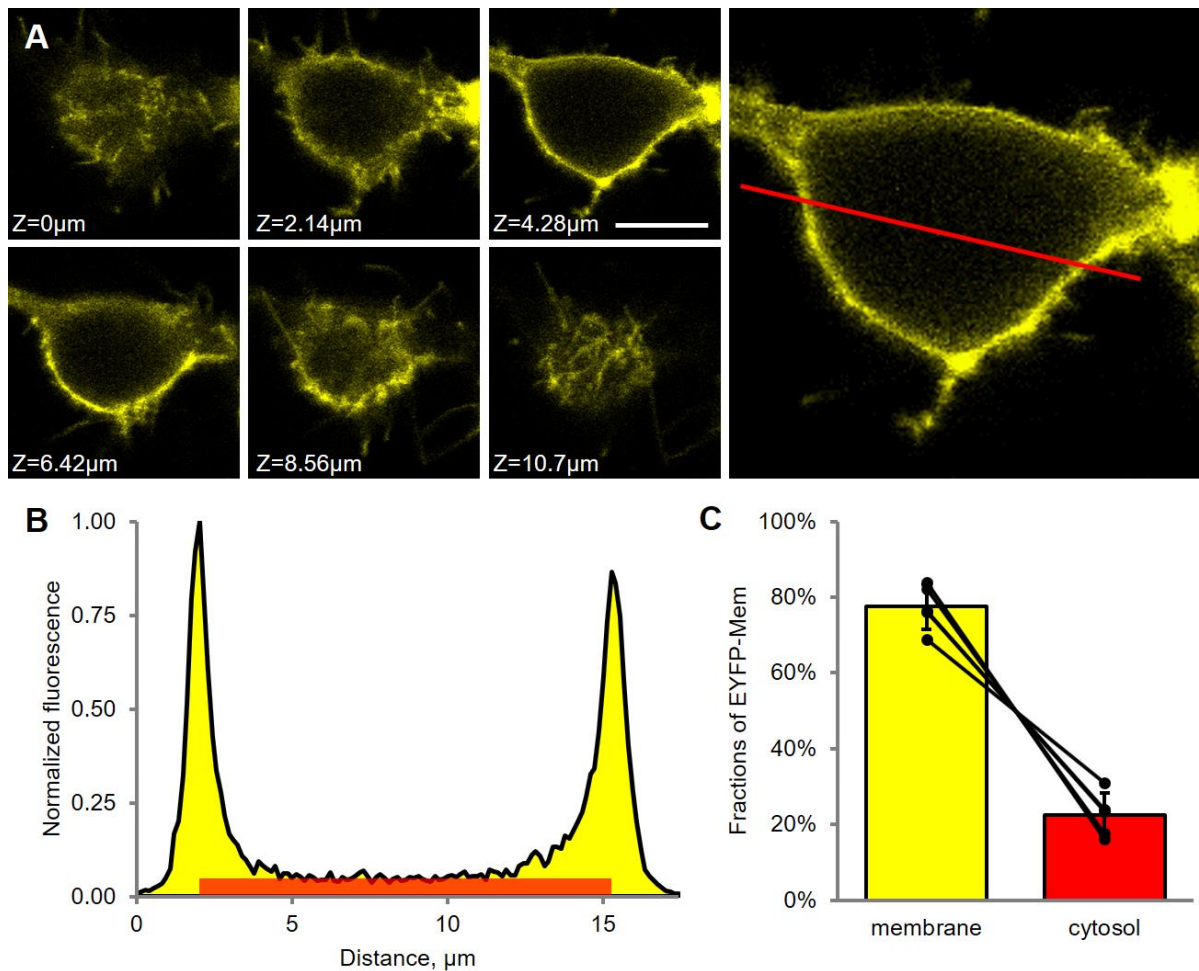


Рисунок 3.10. Фракційний розподіл EYFP-Mem в клітинах HEK 293. А) Z-стек флуоресцентних зображень клітини HEK 293, трансфікованої плазмідом EYFP-Mem. Збільшене зображення оптичного перерізу при $Z = 4.28$ мкм, яке використовувалося для оцінки розподілу EYFP-Mem, наведено праворуч. В) Нормалізований профіль інтенсивності флуоресценції вздовж січної лінії (червона лінія на (А)). Загальна кількість флуоресцентного білка оцінювалася як площа під профілем (жовта область). Цитозольна фракція білка оцінювалася як площа прямокутника висотою в середнє значення інтенсивності всередині клітини та довжиною, рівною відстані між піками (червона область). С) середнє значення цитозольної та мембранної фракцій білка ($n = 5$). Кожна пара точок, з'єднаних лінією, демонструє співвідношення між фракціями в окремій клітині.

Середня оцінка цитозольної фракції EYFP-Mem, обчислена однаконо для декількох клітин HEK 293, становить $22.5 \pm 5.9\%$ ($n = 5$; рис. 3.10С). Як було

сказано вище, це значення є оцінкою зверху; тому ми робимо висновок, що принаймні дві третини ($77.6 \pm 5.9\%$, середнє значення \pm середньоквадратичне відхилення) молекул білка EYFP-Mem перебувають на плазматичній мембрані, що робить дану молекулу дієвим флуоресцентним індикатором плазматичної мембрани в живих клітинах. Важливо зазначити, що дана оцінка пов'язана виключно з молекулами білка, які можуть вільно переміщуватися та перерозподілятися між цитозолем і плазматичною мембраною, а не з іммобілізованими молекулами EYFP-Mem у внутрішньоклітинних компартментах. Таким чином, ми показали, що плазматична мембрана ефективно зв'язує EYFP-Mem, що призводить до відносно низької концентрації даного білка в цитозолі. Інтенсивність флуоресценції в пікселях, що відповідають плазматичній мембрані, у 10–20 разів перевищують відповідні значення в цитозолі (рис. 3.10B). Така висока контрастність флуоресцентного зображення дозволяє виокремити пікселі, що відповідають плазматичній мембрані для подальших вимірювань загального значення інтенсивності флуоресценції HPCA-TFR у цих пікселях для оцінки мембранної фракції флуоресцентно міченого гіпокальцину.

3.6.2 Оцінка розподілу HPCA за допомогою методики січних ліній

Для оцінки розподілу HPCA-TFR між цитозолом та плазматичною мембраною ми котрансфікували клітини НЕК 293 плазмідами, що кодують HPCA-TFR та EYFP-Mem. Візуалізувавши дані клітини за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопа, ми побачили, що HPCA-TFR дифузно розподілений в межах оптичного зрізу, що проходить поблизу половини висоти клітини (рис. 3.11Aa), тоді як EYFP-Mem переважно перебуває на плазматичній мембрані (рис. 3.11Ab), так само, як і у попередній серії експериментів (рис. 3.10).

Спершу ми ідентифікували пікселі, що відповідають плазматичній мембрані. Для цього ми провели аналіз флуоресцентних зображень у каналі

EYFP-Mem, використовуючи підхід, описаний вище (див. пункт 3.6.1 та рис. 3.10). Лінійний профіль інтенсивності флуоресценції EYFP-Mem (жовтий слід на рис. 3.11B) вздовж січної лінії через геометричний центр клітини (червона лінія на рис. 3.11A) дозволив нам визначити границі клітини як координати максимумів профілю. Границі позначені сірими вертикальними лініями на рис. 3.11B. Флуоресценція EYFP, що реєструється в пікселях за межами цих границь, 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 ХУ (0.25 мкм), тобто на відстані 2–4 пікселя, беручи до уваги розмір пікселя 0.14 x 0.14 мкм. Ці міркування узгоджуються з експериментальними даними: половина ширини піків флуоресценції EYFP на їх піввисоті становить менше 0.3 мкм (рис. 3.11B). Тому далі ми вважали, що флуоресценція TFP у 2–4-му пікселях за межами клітинних границь (координати яких співпадають з максимумами флуоресценції EYFP-Mem), може надходити лише від молекул НРСА-TFP, що перебувають на плазматичній мембрані та в тонкому (0.3 мкм) примембранному шарі цитозолу.

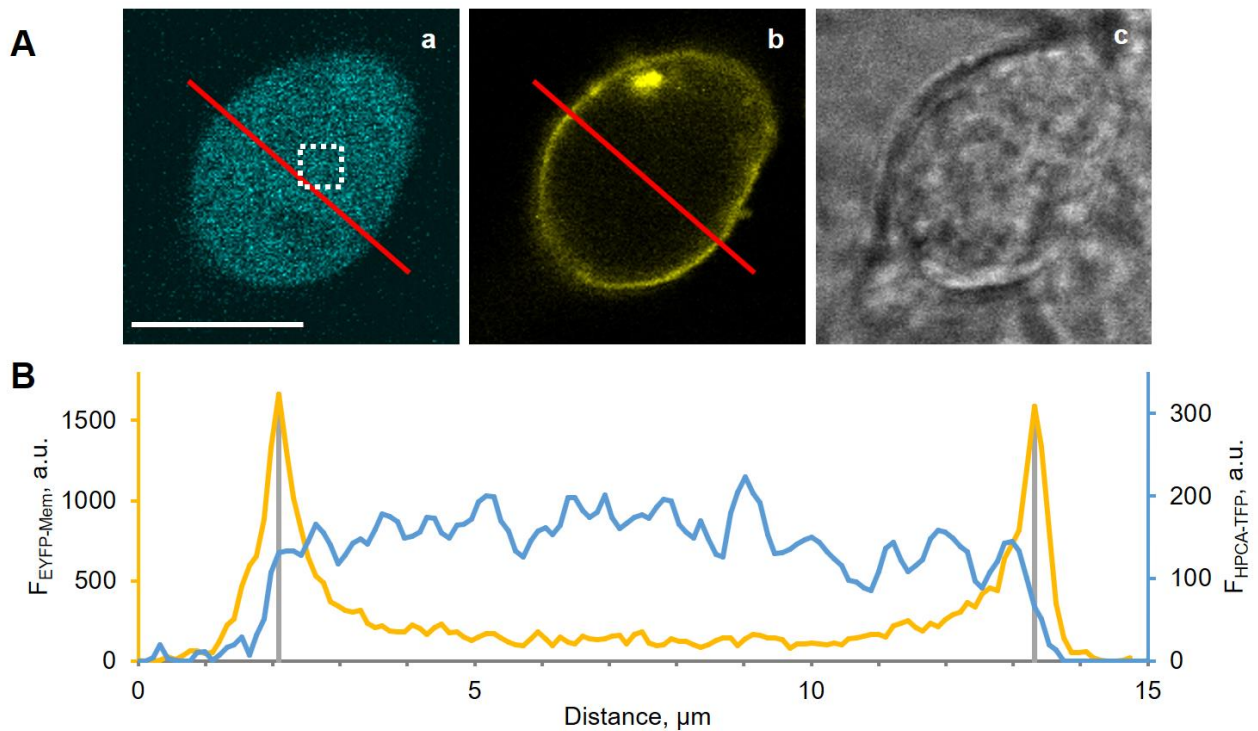


Рисунок 3.11. Розподіл білка гіпокальцину в клітинах НЕК 293. А) флуоресцентні зображення клітини НЕК 293 в каналах НРСА-ТФР (а) та ЕУФР-Мем (б); (с) зображення клітини в світловому контрасті. Пунктирна біла лінія позначає область, що використовується для обчислення середньої інтенсивності флуоресценції в цитозолі. Мірна паличка 10 мкм. В) Лінійні профілі інтенсивності флуоресценції у каналах НРСА-ТФР (синя крива) та ЕУФР-Мем (жовта крива) уздовж червоної січної лінії, показаної на (А). Точки перетину вертикальних сірих ліній з віссю Х вказують координати плазматичної мембрани (клітинних границь). Вертикальні сірі лінії перпендикулярні до осі Х і проходять через вершини профілю ЕУФР-Мем.

Для того, щоб обчислити оцінку зверху мембранної фракції НРСА-ТФР, ми проінтегрували відрізки лінійного профілю інтенсивності флуоресценції, отриманого для каналу НРСА-ТФР, від клітинних границь до пікселів, де середня інтенсивність флуоресценції ТФР опустилася нижче 2σ (де σ – просторовий шум фону в каналі ТФР) або де відстань від границь перевищувала 1.0 мкм (темно-сині області на рис. 3.12А). Беручи до уваги, що профілі флуоресценції

мембранного білка EYFP-Met симетричні (рис. 3.11B), і допускаючи аналогічний симетричний профіль флуоресценції молекул НРСА-TFP, вбудованих у плазматичну мембрану, ми подвоїли інтеграл, отриманий на попередньому етапі оцінки (заштриховані темно-сині області на рис. 3.12A). Отримане значення вважалося пропорційним мембранній фракції НРСА-YFP, тоді як залишкова площа під синьою кривою на рис. 3.12A, вважалася пропорційною її цитозольній фракції гіпокальцину вздовж обраної січної лінії, показаної на рис. 3.11A.

Незважаючи на здебільшого дифузний розподіл НРСА-TFP у клітинах НЕК 293, ми часто спостерігали яскраві ділянки, ймовірно, пов'язані з внутрішньоклітинними органелами, включаючи ядра клітин (дані не показано). Січні лінії, що перетинають зображення проаналізованих клітин і використовуються для оцінки фракцій, можуть проходити крізь такі ділянки, і це може призвести до завищення оцінки цитозольної фракції білка. Тому для автоматизації та оптимізації обчислень ми оцінили цитозольну фракцію НРСА-TFP шляхом усереднення її інтенсивності флуоресценції в квадратній області розміром 2 x 2 мкм всередині оптичного зрізу, але далеко від ядра та плазматичної мембрани (білий пунктирний квадрат на рис. 3.11A). Потім це значення усередненої інтенсивності застосовували до кожного пікселя, який відповідає цитозолу вздовж лінійних профілів інтенсивності флуоресценції НРСА-TFP (синя область на рис. 3.12B).

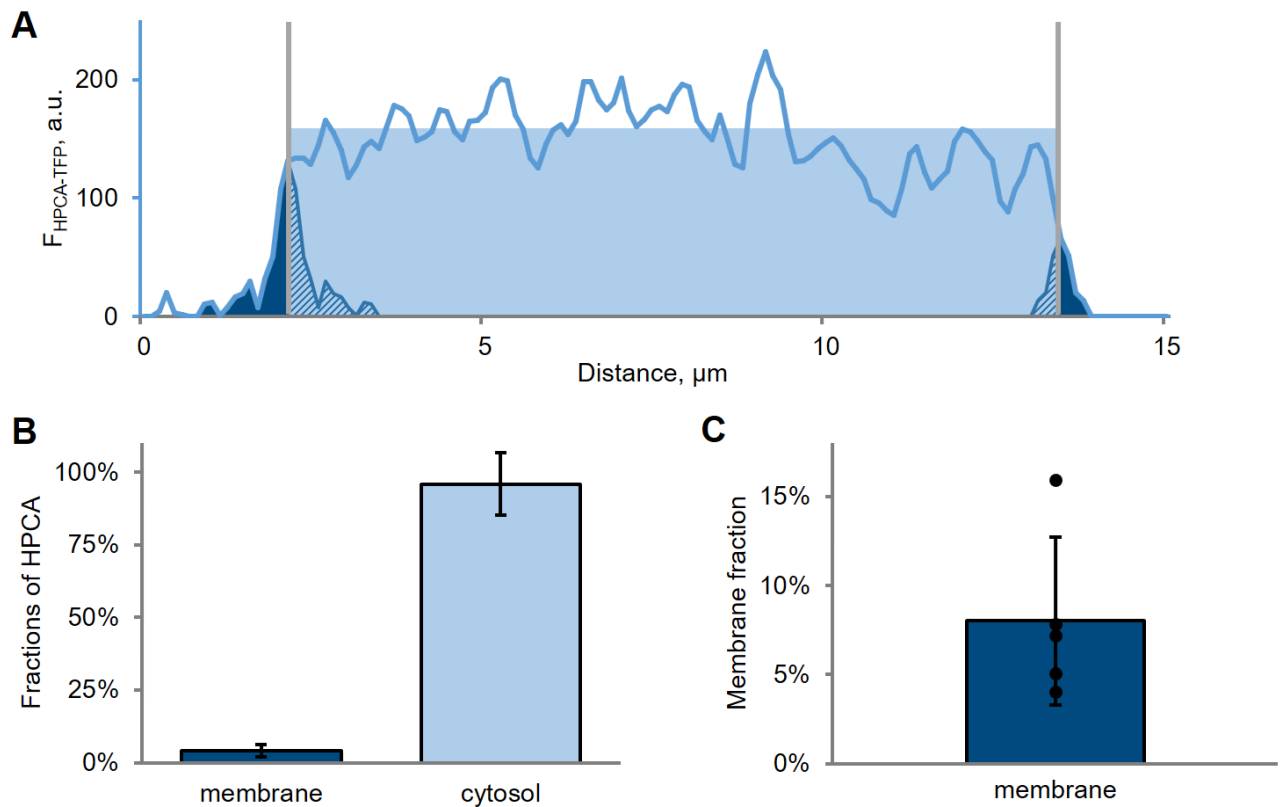


Рисунок 3.12. Оцінка мембранної та цитозольної фракцій білка гіпокальцину в клітинах НЕК 293. А) Лінійний профіль інтенсивності флуоресценції в каналі НРСА-ТФР (синя крива). Вертикальні сірі лінії вказують положення клітинних границь. Мембранну фракцію НРСА-ТФР оцінювали як інтеграл профілю інтенсивності флуоресценції за межами клітинних границь (темно-синя область), збільшений вдвічі з урахуванням симетрії розсіювання світла від молекул, що перебувають на мембрані (заштрихована темно-синя область). Цитозольну фракцію оцінювали як площу синього прямокутника висотою в середнє значення флуоресценції НРСА-ТФР у цитозолі і довжиною між границями клітини. В) Усереднені значення мембранної ($4 \pm 2\%$) та цитозольної ($96 \pm 10\%$) фракцій НРСА-ТФР для репрезентативної клітини. С) Оцінка мембранної фракції НРСА-ТФР 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, обчислювала оцінки мембранної та цитозольної фракцій для кожної лінії, та усереднювала отримані результати. Розподіл НРСА-TFP між цитозолем і плазматичною мембраною в репрезентативної клітини показано на рис. 3.12В. Зведені результати показали, що при базальному рівні внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} НРСА-TFP перебуває здебільшого в цитозолі, а його мембранна фракція в середньому не перевищує $8.0 \pm 4.7\%$ (рис. 3.12С).

РОЗДІЛ 4

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1 Підхід до вимірювання внутрішньоклітинної концентрації флуоресцентно мічених молекул

Ми запропонували простий, але універсальний підхід до вимірювання внутрішньоклітинної концентрації флуоресцентних молекул. Даний метод найкраще підходить для швидкої оцінки концентрації цитозольного флуорофору в одній клітині. Це здебільшого стосується флуорофорів, попередньо завантажених в клітини (наприклад шляхом мікроін'єкції або використання АМ-форм барвників) або флуоресцентних білків, екзогенно експресованих (шляхом вірусної інфекції, транз'єнтної трансфекції тощо). Цей підхід особливо зручно застосовувати в електрофізіологічних дослідженнях, оскільки внутрішньоклітинна перфузія через петч-піпетку є ідеальним інструментом для завантаження клітини контрольною флуоресцентною міткою відомої концентрації. Метод також дозволяє проводити незалежні вимірювання концентрації цитозольних флуорофорів в різних областях клітини (наприклад, у сомі та дендритах чи аксонах, якщо мова йде про нейрони), а також оцінювати мобільну (цитозольну) та нерухому (у внутрішньоклітинних компартментах) фракції досліджуваного флуорофору.

4.1.1 Порівняння нового та раніше розроблених підходів

Раніше було запропоновано кілька елегантних підходів для адекватного кількісного визначення рівнів експресії флуоресцентних білків (ФБ). Van der Wal зі співавторами порівнювали інтенсивність флуоресценції ФБ, екзогенно експресованих всередині клітин та очищеного, бактеріально експресованого ФБ у розчині (Van der Wal et al. 2001). В альтернативному підході вимірювання флуоресценції екзогенно експресованого ФБ були калібровані флуоресценцією в

прозорих кульках та гелях з відомою концентрацією ФБ (Chiu et al. 2002). Автори припускали, що рівні значення інтенсивностей флуоресценції екзогенного та очищеного бактеріального ФБ означають, що концентрації даних білків співпадають. Проте інтенсивність флуоресценції, що надходить від об'єкту, залежить як від концентрації флуорофору, так і від ефективного об'єму, з якого збирається флуоресцентне світло. Якщо концентрації ФБ співпадають, то більший об'єм дасть більшу кількість фотонів. При використанні епіфлуоресцентної системи з широким полем зору та об'єктивів з великою глибиною фокусу ефективні об'єми, від яких реєструється флуоресценція, можуть суттєво відрізнятись. Об'єм внутрішньоклітинного середовища в кожній конкретній клітині різний, а флуоресцентний сигнал, що надходить від прозорої кульки чи гелю, скомпрометований тими фотонами, що надходить від сусідніх ділянок калібрувального зразка. Як можливе часткове подолання даної проблеми, було запропоновано використовувати скляні капілярні посудини прямокутного перерізу з точно відомими лінійними розмірами (Furtado and Henry 2002; Nack et al. 2000). Автори заповнили капіляри розчином рекомбінантного ФБ відомої концентрації та візуалізували їх для отримання калібрувальної кривої залежності інтенсивності флуоресценції ФБ від його концентрації. Отриману калібрувальну криву використали для обчислення ефективної концентрації ФБ всередині клітинної соми на основі флуоресценції, зареєстрованої в досліджуваних клітинах, та геометричних розмірів сом кожної конкретної клітини.

Був розроблений також інший підхід, який дозволяє порівнювати калібрувальний та тестовий сигнали в одному і тому ж препараті за однакових оптичних параметрів епіфлуоресцентного обладнання. М. Dundr зі співавторами використали введення в досліджуваний препарат ротавірус-подібних частинок, які містили відому кількість молекул зеленого флуоресцентного білка, щоб здійснити відповідне калібрування (Dundr et al. 2002).

Тим не менш, усі ці підходи вимагають отримання рекомбінантного білка та приготування штучних прозорих об'єктів (кульок, гелю ротавірус-подібних

частинок) в якості додаткових дорогих та тривалих етапів експериментальної роботи. Ще важливіше те, що властивості флуоресцентного білка залежать від рівня рН, наявності йонів металів та інших параметрів мікросередовища, що оточує ФБ. Тому властивості флуоресценції рекомбінантного білка в калібрувальному розчині можуть відрізнятися від властивостей досліджуваного внутрішньоклітинного ФБ, що робить використання рекомбінантного білка в якості надійного інструменту калібрування неможливим.

Ще один фактор, який не дозволяє використання рекомбінантних білків в якості контрольних міток, полягає у процесі посттрансляційної модифікації ФБ в обраних клітинних системах, адже третинна структура білка напряду визначає біофізичні властивості молекули. Бактерії кишкової палички, найбільш типова клітинна система для отримання рекомбінантних білків, є прокаріотами. Маючи систему шаперонів з механізмом роботи, відмінним від клітин еукаріот (Carrascosa, Llorca, and Valpuesta 2001), бактерії можуть складати білок трохи інакше (Gething 1997). Механізми утворення дисульфідних зв'язків, ще одного фактору, який визначає третинну структуру ФБ, також відрізняються (Natahet, Boyd, and Beckwith 2014). Крім того, глікозилювання або інші ковалентні модифікації, властиві еукаріотам, можуть бути відсутні в клітинних системах для отримання рекомбінантних білків. Ці відмінності в молекулярній структурі можуть призвести до істотної різниці флуоресцених параметрів екзогенно експресованих та рекомбінантних білків, і, як наслідок, знизить точність методу оцінки концентрації ФБ.

Нарешті, і найважливіше, всі розроблені раніше підходи не враховували, що об'єми, від яких реєструється флуоресценція, можуть суттєво відрізнятися. Наприклад, кулька або частина капіляра може мати той же геометричний об'єм, що і сома клітини; однак об'єм цитозолу, в якому розміщений досліджуваний флуорофор, менший, ніж загальний об'єм клітини. Це може призвести до значних (у багато разів) помилок в оцінці концентрації досліджуваного флуоресцентного білка.

Незважаючи на очевидні фактори виникнення можливих помилок, жодних дій для оцінки похибок у раніше розроблених підходах виконано не було. Підхід, представлений у цій роботі, ґрунтується на застосуванні методу локальної фіксації мембранного потенціалу (Molleman 2002) у конфігурації «ціла клітина», електрофізіологічного методу, який широко використовується і розроблений для точного контролю складу внутрішньоклітинного розчину та для реєстрації трансмембранних струмів. Зокрема, це метод дозволяє утримувати значення рН, йонної сили та концентрації компонентів внутрішньоклітинного розчину близькими до тих, за яких були отримані спектральні характеристики флуоресцентних міток. Крім того, за допомогою внутрішньоклітинної перфузії нам вдалося ввести контрольний барвник відомої концентрації в цитозоль клітини і домогтися такого ж просторового розподілу, як і в досліджуваного ФБ, що значно підвищило надійність та точність вимірювань. Таким чином, помилки, пов'язані з неправильною оцінкою об'ємів, заповнених контрольною та досліджуваною мітками, характерні для інших методів, були мінімізовані в нашому підході, що дозволило оцінити концентрацію нейронного Ca^{2+} -сенсорного білка гіпокальцину в малих субклітинних структурах (див. підрозділ 3.4, рис. 3.6 та рис. 3.7).

Послідовна реєстрація флуоресценції контрольної та досліджуваної міток зводила до мінімуму явище флуоресцентного резонансного переносу енергії та унеможливлювала інші проблеми, пов'язані із взаємодією між флуорофорами. Це, серед іншого, дозволяє в рамках даного підходу використовувати пари флуорофорів, спектри яких частково перекриваються (див. пункт 3.2.2).

Не намагаючись усунути всі можливі джерела похибок, ми розробили та вперше виконали процедуру перевірки запропонованого підходу з метою оцінки «інтегральної» помилки методу. Експерименти із тандемом CTV, описані в пункті 3.2.1, точно оцінюють помилку, що виникає із сукупності можливих факторів на всіх етапах вимірювань та обчислень. Похибка становить приблизно 30% для двох флуоресцентних білків, експресованих у клітині (рис. 3.4). Проте перевірка за допомогою CTV містить чимало теоретичних припущень, які

можуть завищувати оцінку похибки. Виконавши валідацію підходу в експериментах з двома органічними барвниками, завантаженими в соми клітин через петч-піпетку у відомих концентраціях, ми продемонстрували, що похибка методу може бути менше 10% (див. пункт 3.2.2). Для додаткового підвищення точності спектри флуоресцентних білків всередині клітин можуть бути виміряні в тому ж експерименті та використані замість даних, отриманих від постачальників. Таким чином можна повністю виключити похибки, пов'язані з мікросередовищем, у якому перебуває ФБ.

4.1.2 Технічна реалізація запропонованого підходу

Основне припущення методу полягає в тому, що як контрольна (відомої концентрації) та досліджувана (концентрація якої вимірюється) мітки мають однаковий просторовий розподіл, тобто відношення їх концентрацій співпадає у всіх точках досліджуваного об'єму зразка. В нашому експериментальному підході ця вимога виконується для всіх клітинних фрагментів, дифузійно зв'язаних з петч-піпеткою після прориву плазматичної мембрани та встановлення конфігурації «ціла клітина». Однак існують випадки, коли значна частина досліджуваного білка перебуває в ендоплазматичному ретикулумі або комплексі Гольджі, де відбувається синтез та посттрансляційна модифікація білка перед його виходом в цитозоль. Ця іммобілізована частина білка буде вносити вклад в зареєстрований флуоресцентний сигнал, і тоді він скоріше буде цитоплазматичний, ніж цитозольний. Оскільки сильно заряджений контрольний барвник (наприклад Alexa Fluor 594) не може продифундувати у внутрішньоклітинні компартменти, цитозольна концентрація досліджуваного ФБ за формулою 3.5 буде суттєво завищена.

На щастя, нерухому частину досліджуваного ФБ можна легко оцінити кількісно для подальшої корекції інтенсивності флуоресценції шляхом віднімання зображень, отриманих до та після вимивання досліджуваного білка.

Інший момент, який слід враховувати, – це товщина досліджуваного зразка, в якому вимірюється концентрація ФБ, порівняно із глибиною фокусу об'єктиву. Флуоресценція від тонких (1–3 мкм) об'єктів, таких як дендрити та аксони, майже повністю потрапляє в одне зображення, отримане за допомогою епіфлуоресцентної системи, яка має таку ж глибину фокусу (1–2 мкм). В цьому випадку усі флуоресцентні фотони, що надходять від досліджуваної та контрольної міток в усій товщі зразка, реєструються детектором і можуть бути прямо використані для подальших обчислень відношення інтенсивностей та відношення концентрацій. Натомість у більших об'єктах, таких як сома нейрона, до детектора при реєстрації флуоресценції буде надходити тільки світло з області простору (оптичний зрізу) товщиною всього 1–2 мкм. У такому випадку можна отримати оцінку концентрації досліджуваного флуорофору для конкретного оптичного зрізу всередині клітини. В таких експериментах доцільно використовувати об'єктиви з малою апертурою, що мають велику глибину фокусу, порівняну з геометричними розмірами клітинної соми. З іншого боку, використання конфокальної мікроскопії з гарною роздільною здатністю по осі Z дозволило б оцінити не тільки цитозольну концентрацію ФБ, але і просторовий 3D-розподіл досліджуваного флуорофору між цитозолем та внутрішньоклітинними компартментами.

Потреба в зборі спектральних характеристик усіх оптичного елемента епіфлуоресцентної системи на перший погляд може здатися обтяжливою, однак у більшості випадків фільтри, дихроїчні дзеркала та інші сертифіковані оптичні компоненти постачаються разом з результатами вихідного контролю після виробництва, який включає спектральні властивості деталей. Більше того, якщо один раз зібрати усі необхідні документи та обчислити оптичні функції, пов'язані з обладнанням, отримані значення можна використовувати протягом усього періоду експлуатації епіфлуоресцентної системи. Типовий куб фільтрів з дихроїчним дзеркалом (так званий 3-cube), що має 3 смуги збудження та емісії, також можна використовувати для різних флуорофорів; отже, для багатьох різних пар флуоресцентних міток можна використовувати одні й ті ж самі

оптичні функції шляхів збудження та емісії (рис. 3.1), не витрачаючи додатково час та зусилля.

Слід підкреслити, що точність обчислення коефіцієнта пропорційності A залежить від точності наданих виробником даних, що описують спектральні властивості оптичних деталей, та від табличного значення квантового виходу флуорофорів. В деяких випадках спектральні властивості оптичних компонентів надаються як усереднені для цілого ряду однакових деталей (наприклад, для партії об'єтивів). Тому деяка неточність (приблизно 5%) у розрахунках коефіцієнта пропорційності A неминуча, як і подальша помилка в концентрації досліджуваної мітки за формулою 3.5. Звичайно, доцільно підтримувати всі оптичні елементи в чистоті та міцно закріпленими у держаках та рамах, щоб мінімізувати можливі відхилення їх спектральних характеристик.

Однак навіть ці невеликі можливі неточності можна звести до мінімуму, якщо досліджуваний об'єкт та флуоресцентні мітки обрані належним чином. В ідеальному випадку, якщо контрольна та досліджувана мітки можуть бути збуджені та візуалізовані на однакових довжинах хвиль, можлива похибка в оптичних функціях обладнання нівелюється при обчисленні коефіцієнта пропорційності A . У той же час, чим більша різниця між довжинами хвиль (збудження та емісії) в досліджуваної та контрольної міток, тим сильніше на коефіцієнт пропорційності A впливає можлива неточність оптичних функцій обладнання (розраховуються на основі наданих спектральних даних). Тому рекомендується вибирати цільові та опорні мітки зі спектрами якомога ближче (як для збудження, так і для емісії). Очевидно, це має практичний сенс лише у випадку, коли клітина дифузійно компактна, і досліджуваний ФБ можна легко вимити. У такому випадку, спершу варто зробити зображення клітини з досліджуваною міткою, а потім підвести до клітини петч-піпетку в конфігурації «ціла клітина», і перфузувати клітину розчином контрольної мітки відомої концентрації. Одночасно з перфузією досліджувана мітка повністю вимивається з клітини. Після встановлення рівноважних концентрацій необхідно зробити

зображення клітини, заповненої контрольною міткою і провести відповідні обчислення за формулою 3.5.

З іншого боку, не завжди можливо повністю вимити досліджуваний ФБ з сильно розгалужених клітин з довгими відростками, навіть якщо білок не іммобілізований у внутрішньоклітинних компартментах. У такому випадку варто підбирати контрольну та досліджувану мітки таким чином, щоб їх спектри не перекривалися, а флуоресценцію можна було б розділити апаратно, за допомогою фільтрів. Якщо ж спектральне перекривання між флуоресцентними мітками неминуче, для розділення флуоресцентних сигналів контрольної та досліджуваної міток можна використати різні математичні підходи, основані на методах лінійної алгебри (Wlodarczyk et al. 2008; Leavesley et al. 2013; Dinant et al. 2008).

4.2 Оцінка концентрації екзогенно експресованого гіпокальцину в нейронах гіпокампа

Використовуючи підхід, запропонований у цій роботі, нам вдалося швидко оцінити цитозольну концентрацію нейронного Ca^{2+} -сенсорного білка гіпокальцину, міченого посиленням жовтим флуоресцентним білком, НРСА-EYFP, в дендритах нейронів гіпокампа, попередньо трансфікованих плазмідною, що кодує даний конструкт. Ми продемонстрували, що рівень експресії білка суттєво змінювався від клітини до клітини, але не перевищував 10 мкМ (рис. 3.7). Таким чином, концентрація екзогенно експресованого гіпокальцину в досліджуваних нейронах гіпокампа принаймні в 3 рази нижча порівняно з концентрацією ендогенного гіпокальцину, яка, як відомо, становить 30 мкМ (Furuta et al. 1999). Таким чином, екзогенний гіпокальцин з флуоресцентною міткою може бути використаний як інструмент для візуалізації Ca^{2+} -залежної транслокації та взаємодії гіпокальцину з його білками-мішенями (Dovgan et al. 2010; Markova et al. 2008) без істотної модифікації сигнальних шляхів ендогенного білка.

Важливо відмітити, що певна кількість HPCA-EYFP може перебувати на плазматичній мембрані, а не в цитозолі дендритів (Dovgan et al. 2010), що вносить певну похибку в оцінці цитозольної концентрації. Глибина фокусу об'єктів, що використовувались в даній серії експериментів (1–2 мкм), близька до діаметру дендритів (1–3 мкм). Тому область простору, в якій реєструвалася флуоресценція міток, повністю охоплювала усю товщу дендрита. Таким чином, навіть у випадку частково мембранної локалізації гіпокальцину в межах досліджуваного дендрита, одержана оцінка відображає загальну концентрацію HPCA-EYFP в дендритному дереві.

4.3 Оцінка розподілу білка гіпокальцину між цитозолем та плазматичною мембраною

У попередніх дослідженнях було показано, що кількість гіпокальцину та кількох інших NCS білків збільшується в плазматичній мембрані внаслідок підвищення рівня $[Ca^{2+}]_i$ у клітинах багатьох різних типів, включаючи нейрони (O'Callaghan, Terpikin, 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 $[Ca^{2+}]_i$. В такому випадку вони могли б регулювати свої мембранні білки-мішені навіть у стані спокою клітини. Раніше було показано, що транслокація гіпокальцину 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 гіпокальцину перебуває на плазматичній мембрані при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$, то це може викликати сталу постгіперполяризацію, що призведе до зниження активності цих конкретних нейронів у їхній мережі (рис. 4.1). Аналогічні міркування можна застосувати до регуляції щільності AMPA-рецепторів в дендритах нейронів гіпокампа.

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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 4.1). Звичайно, такий сценарій можливий лише в тому випадку, якщо при базальному рівні $[\text{Ca}^{2+}]_i$ достатня кількість HPCA 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.

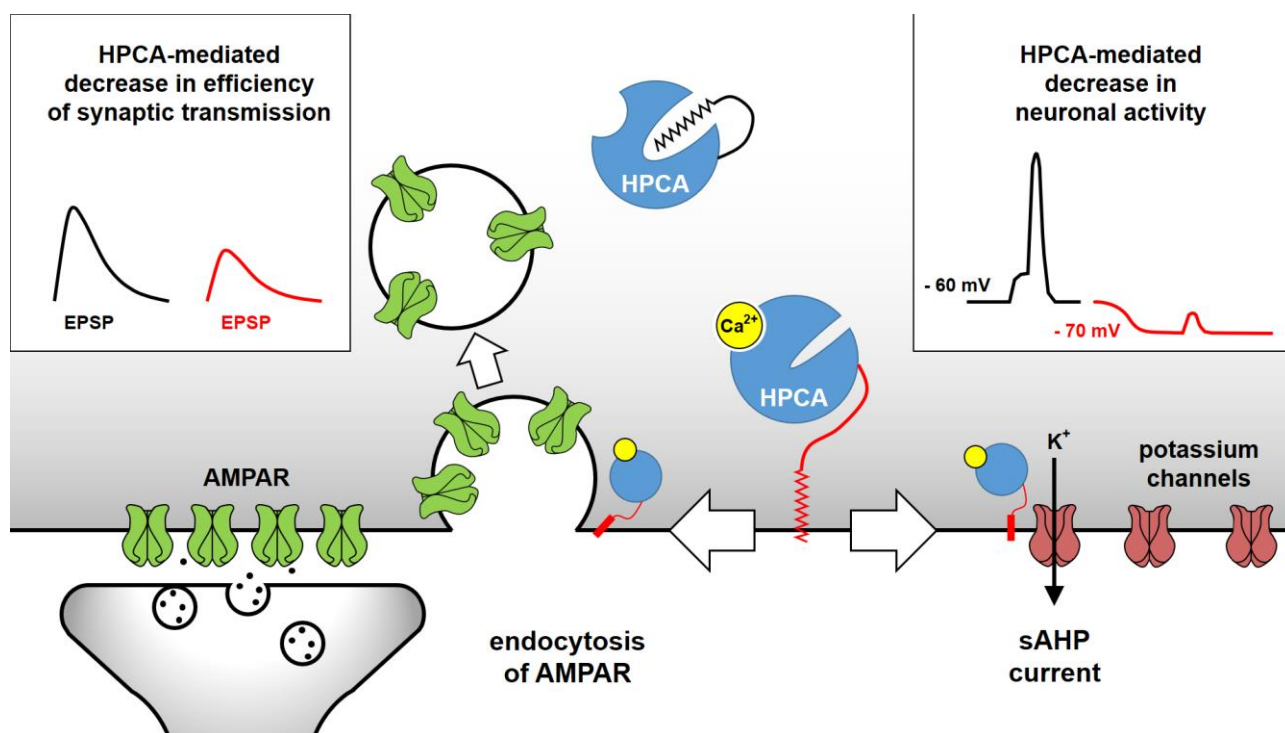


Рисунок 4.1. Схема клітинної сигналізації гіпокальцину. Гіпокальцин зазнає Ca^{2+} -залежної транслокації (кальцій-міристиновий перемикач). Молекули гіпокальцину на мембрані запускають ендоцитоз AMPA-рецепторів (AMPA), в результаті чого щільність рецепторів на постсинаптичній мембрані зменшується. Це призводить до пригнічення збуджуючого постсинаптичного потенціалу (EPSP) у відповідь на стандартний викид нейромедіатора (ліва вставка). З іншого боку, ті самі молекули гіпокальцину на мембрані вочевидь якось впливають на роботу калієвих каналів, в результаті чого виникає струм повільної постгіперполяризації (sAHP current). Цей калієвий струм знижує мембранний потенціал спокою клітини і робить її менш збудливою (права вставка).

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%.

Важливо відмітити, що отримані результати є оцінками зверху для мембранної фракції НРСА. Через принципову неможливість розділити флуоресцентні сигнали від окремих молекул, в оцінку мембранної фракції входить певна частина флуоресценції цитозольних молекул НРСА-TFP у тонкому шарі (~ 0.3 мкм), що знаходиться безпосередньо біля плазматичної мембрани (див. пункт 3.6.2). Тому подальші дослідження слід спрямувати на поліпшення поточних оцінок, а також на вимірювання мембранної фракції гіпокальцину при високих, але фізіологічно досяжних рівнях $[Ca^{2+}]_i$. Крім того, необхідно з'ясувати, чи є концентрація молекул НРСА у плазматичній мембрані (~ 80 нМ) достатньою для того, щоб активувати мембранні білки-мішені гіпокальцину при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$. Цілком ймовірно, що майбутні експерименти із застосуванням як 3D-деконволюції, так і FRET-аналізу (флуоресцентного резонансного переносу енергії) дозволять отримати більш точні оцінки.

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 (імобілізованої 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- “Alexa Fluor® Dyes Spanning the Visible and Infrared Spectrum—Section 1.3 - UA.”
n.d.
- Alger, B. E., and R. A. Nicoll. 1980. “Epileptiform Burst Afterhyperpolarization: Calcium-Dependent Potassium Potential in Hippocampal CA1 Pyramidal Cells.” *Science* 210 (4474): 1122–24. <https://doi.org/10.1126/science.7444438>.
- Ames, J B, R Ishima, T Tanaka, J I Gordon, L Stryer, and M Ikura. 1997. “Molecular Mechanics of Calcium-Myristoyl Switches.” *Nature* 389 (6647): 198–202. <https://doi.org/10.1038/38310>.
- Ames, James B., Nobuko Hamasaki, and Tatiana Molchanova. 2002. “Structure and Calcium-Binding Studies of a Recoverin Mutant (E85Q) in an Allosteric Intermediate State.” *Biochemistry* 41 (18): 5776–87. <https://doi.org/10.1021/bi012153k>.
- Andrade, Rodrigo, Robert C. Foehring, and Anastasios V. Tzingounis. 2012. “The Calcium-Activated Slow AHP: Cutting through the Gordian Knot.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 6 (OCTOBER 2012): 1–38. <https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00047>.
- Arrio-Dupont, Martine, Georges Foucault, Monique Vacher, Philippe F. Devaux, and Sophie Cribier. 2000. “Translational Diffusion of Globular Proteins in the Cytoplasm of Cultured Muscle Cells.” *Biophysical Journal* 78 (2): 901–7. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76647-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76647-1).
- Atasu, Burcu, Hasmet Hanagasi, Basar Bilgic, Meltem Pak, Nihan Erginel-Unaltuna, Ann Kathrin Hauser, Gamze Guven, et al. 2018. “HPCA Confirmed as a Genetic Cause of DYT2-like Dystonia Phenotype.” *Movement Disorders* 33 (8): 1354–58. <https://doi.org/10.1002/mds.27442>.
- Augustine, George J., Fidel Santamaria, and Keiko Tanaka. 2003. “Local Calcium Signaling in Neurons.” *Neuron*. Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00639-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00639-1).

- Barrett, J. N., K. L. Magleby, and B. S. Pallotta. 1982. "Properties of Single Calcium-activated Potassium Channels in Cultured Rat Muscle." *The Journal of Physiology* 331 (1): 211–30. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1982.sp014370>.
- Berridge, Michael J., Peter Lipp, and Martin D. Bootman. 2000. "The Versatility and Universality of Calcium Signalling." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. European Association for Cardio-Thoracic Surgery. <https://doi.org/10.1038/35036035>.
- Bond, Chris T., Paco S. Herson, Timothy Strassmaier, Rebecca Hammond, Robert Stackman, James Maylie, and John P. Adelman. 2004. "Small Conductance Ca^{2+} -Activated K^{+} Channel Knock-out Mice Reveal the Identity of Calcium-Dependent Afterhyperpolarization Currents." *Journal of Neuroscience* 24 (23): 5301–6. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0182-04.2004>.
- Braunewell, Karl Heinz, and Eckart D. Gundelfinger. 1999. "Intracellular Neuronal Calcium Sensor Proteins: A Family of EF-Hand Calcium-Binding Proteins in Search of a Function." *Cell and Tissue Research*. Cell Tissue Res. <https://doi.org/10.1007/s004410051207>.
- Burgoyne, Robert D., and Lee P. Haynes. 2015. "Sense and Specificity in Neuronal Calcium Signalling." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.10.029>.
- Burgoyne, Robert D., Dermott W. O'Callaghan, Burcu Hasdemir, Lee P. Haynes, and Alexei V. Tepikin. 2004. "Neuronal Ca^{2+} -Sensor Proteins: Multitalented Regulators of Neuronal Function." *Trends in Neurosciences*. Trends Neurosci. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.01.010>.
- Burgoyne, Robert D. 2007. "Neuronal Calcium Sensor Proteins: Generating Diversity in Neuronal Ca^{2+} Signalling." *Nature Reviews. Neuroscience* 8 (3): 182–93. <https://doi.org/10.1038/nrn2093>.
- Burgoyne, Robert D, Nordine Helassa, Hannah V McCue, and Lee P Haynes. 2019. "Calcium Sensors in Neuronal Function and Dysfunction." *Cold Spring Harbor*

Perspectives in Biology, March, a035154.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035154>.

- Carrascosa, J. L., O. Llorca, and J. M. Valpuesta. 2001. "Structural Comparison of Prokaryotic and Eukaryotic Chaperonins." *Micron* 32 (1): 43–50.
[https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(00\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(00)00027-5).
- Carter, Matt, and Jennifer Shieh. 2015. "Gene Delivery Strategies." In *Guide to Research Techniques in Neuroscience*, 239–52. Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800511-8.00011-3>.
- Chalfie, Martin, Yuan Tu, Ghia Euskirchen, William W. Ward, and Douglas C. Prasher. 1994. "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression." *Science* 263 (5148): 802–5. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>.
- Charlesworth, Gavin, Plamena R. Angelova, Fernando Bartolomé-Robledo, Mina Ryten, Daniah Trabzuni, Maria Stamelou, Andrey Y. Abramov, Kailash P. Bhatia, and Nicholas W. Wood. 2015. "Mutations in HPCA Cause Autosomal-Recessive Primary Isolated Dystonia." *American Journal of Human Genetics* 96 (4): 657–65.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.02.007>.
- Cherkas, V., S. Grebenyuk, D. Osypenko, A.V. Dovgan, E.O. Grushevskyi, M. Yedutenko, Y. Sheremet, et al. 2018. "Measurement of Intracellular Concentration of Fluorescently-Labeled Targets in Living Cells." *PLoS ONE* 13 (4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194031>.
- Chiu, Chi Sung, Kimmo Jensen, Irina Sokolova, Dan Wang, Ming Li, Purnima Deshpande, Norman Davidson, et al. 2002. "Number, Density, and Surface/Cytoplasmic Distribution of GABA Transporters at Presynaptic Structures of Knock-in Mice Carrying GABA Transporter Subtype 1-Green Fluorescent Protein Fusions." *Journal of Neuroscience* 22 (23): 10251–66.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-23-10251.2002>.
- Coscoy, Sylvie, François Waharte, Alexis Gautreau, Marianne Martin, Daniel Louvard, Paul Mangeat, Monique Arpin, and François Amblard. 2002. "Molecular

- Analysis of Microscopic Ezrin Dynamics by Two-Photon FRAP.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (20): 12813–18. <https://doi.org/10.1073/pnas.192084599>.
- Decastro, Edouard, Serge Nef, Hubert Fiumelli, Stefan E. Lenz, Satoru Kawamura, and Patrick Nef. 1995. “Regulation of Rhodopsin Phosphorylation by a Family of Neuronal Calcium Sensors.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216 (1): 133–40. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2601>.
- Dinant, C., M. E. Van Royen, W. Vermeulen, and A. B. Houtsmuller. 2008. “Fluorescence Resonance Energy Transfer of GFP and YFP by Spectral Imaging and Quantitative Acceptor Photobleaching.” *Journal of Microscopy* 231 (1): 97–104. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2008.02020.x>.
- Disterhoft, John F., Wendy W. Wu, and Masuo Ohno. 2004. “Biophysical Alterations of Hippocampal Pyramidal Neurons in Learning, Ageing and Alzheimer’s Disease.” *Ageing Research Reviews*. Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2004.07.001>.
- Dovgan, A. V., V. P. Cherkas, A. R. Stepanyuk, D. J. Fitzgerald, L. P. Haynes, A. V. Tepikin, R. D. Burgoyne, and P. V. Belan. 2010. “Decoding Glutamate Receptor Activation by the Ca²⁺ Sensor Protein Hippocalcin in Rat Hippocampal Neurons.” *European Journal of Neuroscience* 32 (3): 347–58. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07303.x>.
- Dundr, Miroslav, James G. McNally, Jean Cohen, and Tom Misteli. 2002. “Quantitation of GFP-Fusion Proteins in Single Living Cells.” In *Journal of Structural Biology*, 140:92–99. [https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(02\)00521-X](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(02)00521-X).
- Faas, Guido C., Sridhar Raghavachari, John E. Lisman, and Istvan Mody. 2011. “Calmodulin as a Direct Detector of Ca²⁺ Signals.” *Nature Neuroscience* 14 (3): 301–4. <https://doi.org/10.1038/nn.2746>.
- “Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) and Its Offspring | Learn & Share | Leica Microsystems.” n.d. Accessed September 5, 2020. <https://www.leica->

microsystems.com/science-lab/fluorescence-recovery-after-photobleaching-frap-and-its-offspring/.

“Fluorescence SpectraViewer | Thermo Fisher Scientific - UA.” n.d. Accessed May 9, 2020. <https://www.thermofisher.com/ua/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>.

Furtado, Agnelo, and Robert Henry. 2002. “Measurement of Green Fluorescent Protein Concentration in Single Cells by Image Analysis.” *Analytical Biochemistry* 310 (1): 84–92. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00281-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00281-6).

Furuta, Yoshitaka, Masaaki Kobayashi, Tamotsu Masaki, and Ken Takamatsu. 1999. “Age-Related Changes in Expression of Hippocalcin and NVP2 in Rat Brain.” *Neurochemical Research* 24 (5): 651–58. <https://doi.org/10.1023/A:1021000425070>.

Gell, Chris., David. Brockwell, and Alastair (D. Alastair) Smith. 2006. *Handbook of Single Molecule Fluorescence Spectroscopy*. Oxford University Press.

Gething, Mary Jane. 1997. “Protein Folding: The Difference with Prokaryotes.” *Nature* 388 (6640): 329–31. <https://doi.org/10.1038/40979>.

Girard, F., J. Venail, B. Schwaller, and M. R. Celio. 2015. “The EF-Hand Ca²⁺-Binding Protein Super-Family: A Genome-Wide Analysis of Gene Expression Patterns in the Adult Mouse Brain.” *Neuroscience* 294 (May): 116–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.018>.

Greer, Paul L., and Michael E. Greenberg. 2008. “From Synapse to Nucleus: Calcium-Dependent Gene Transcription in the Control of Synapse Development and Function.” *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.002>.

Gu, Xiaonan, and Nicholas C. Spitzer. 1996. “Breaking the Code: Regulation of Neuronal Differentiation by Spontaneous Calcium Transients.” *Developmental Neuroscience* 19 (1): 33–41. <https://doi.org/10.1159/000111183>.

Hack, Nicola J., Brian Billups, Peter B. Guthrie, John H. Rogers, Elizabeth M. Muir, Thomas N. Parks, and Stanley B. Kater. 2000. “Green Fluorescent Protein as a

- Quantitative Tool.” *Journal of Neuroscience Methods* 95 (2): 177–84.
[https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(99\)00178-8](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(99)00178-8).
- Haeseleer, Françoise, Izabela Sokal, Christophe L.M.J. Verlinde, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Temps, Alexey N. Pronin, Jeffrey L. Benovic, Robert N. Fariss, and Krzysztof Palczewski. 2000. “Five Members of a Novel Ca²⁺-Binding Protein (CABP) Subfamily with Similarity to Calmodulin.” *Journal of Biological Chemistry* 275 (2): 1247–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.1247>.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth. 1981. “Improved Patch-Clamp Techniques for High-Resolution Current Recording from Cells and Cell-Free Membrane Patches.” *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 391 (2): 85–100. <https://doi.org/10.1007/BF00656997>.
- Hatahet, Feras, Dana Boyd, and Jon Beckwith. 2014. “Disulfide Bond Formation in Prokaryotes: History, Diversity and Design.” *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.02.014>.
- Helassa, Nordine, Svetlana V Antonyuk, Lu-Yun Lian, Lee P Haynes, and Robert D Burgoyne. 2017. “Biophysical and Functional Characterization of Hippocalcin Mutants Responsible for Human Dystonia.” *Human Molecular Genetics* 26 (13): 2426–35. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx133>.
- Higley, Michael J., and Bernardo L. Sabatini. 2008. “Calcium Signaling in Dendrites and Spines: Practical and Functional Considerations.” *Neuron*. Neuron.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.020>.
- Hille, B. 2001. “Ion Channels of Excitable Membranes. 2001, Sunderland, MA.” *Sinauer Associates, Inc.*
- “Hippocalcin Expression Pattern in Cortex GENSAT Project at Rockefeller University, Mouse Brain Atlas, Image Navigator.” n.d. Accessed September 5, 2020a. <http://gensat.org/imagenavigator.jsp?imageID=26722>.
- . “Hippocalcin Expression Pattern in Cortex GENSAT Project at Rockefeller

- University, Mouse Brain Atlas, Image Navigator.” n.d. Accessed September 5, 2020b. <http://gensat.org/imagenavigator.jsp?imageID=26137>.
- Hotson, J. R., and D. A. Prince. 1980. “A Calcium-Activated Hyperpolarization Follows Repetitive Firing in Hippocampal Neurons.” *Journal of Neurophysiology* 43 (2): 409–19. <https://doi.org/10.1152/jn.1980.43.2.409>.
- Ibáñez, V., N. Sadato, B. Karp, M. P. Deiber, and Mark Hallett. 1999. “Deficient Activation of the Motor Cortical Network in Patients with Writer’s Cramp.” *Neurology* 53 (1): 96–105. <https://doi.org/10.1212/wnl.53.1.96>.
- Ikura, Mitsuhiro, and James B Ames. 2006. “Genetic Polymorphism and Protein Conformational Plasticity in the Calmodulin Superfamily: Two Ways to Promote Multifunctionality.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (5): 1159–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508640103>.
- “Introduction to Fluorescent Proteins | MicroscopyU (En-US).” n.d. Accessed May 9, 2020. <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescent-proteins>.
- Ivings, Lenka, Stephen R. Pennington, Roz Jenkins, Jamie L. Weiss, and Robert D. Burgoyne. 2002. “Identification of Ca²⁺-Dependent Binding Partners for the Neuronal Calcium Sensor Protein Neurocalcin δ : Interaction with Actin, Clathrin and Tubulin.” *Biochemical Journal* 363 (3): 599–608. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3630599>.
- Key, J., A. K. Mueller, S. Gispert, L. Matschke, I. Wittig, O. Corti, C. Münch, N. Decher, and G. Auburger. 2019. “Ubiquitylome Profiling of Parkin-Null Brain Reveals Dysregulation of Calcium Homeostasis Factors ATP1A2, Hippocalcin and GNA11, Reflected by Altered Firing of Noradrenergic Neurons.” *Neurobiology of Disease* 127 (July): 114–30. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.02.008>.
- Kobayashi, M., T. Masaki, K. Hori, Y. Masuo, M. Miyamoto, H. Tsubokawa, H.

- Noguchi, M. Nomura, and K. Takamatsu. 2005. "Hippocalcin-Deficient Mice Display a Defect in CAMP Response Element-Binding Protein Activation Associated with Impaired Spatial and Associative Memory." *Neuroscience* 133 (2): 471–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.02.034>.
- Kobayashi, Masaaki, Ken Takamatsu, Shigeharu Saitoh, Masayuki Miura, and Tetsuya Noguchi. 1992. "Molecular Cloning of Hippocalcin, a Novel Calcium-Binding Protein of the Recoverin Family Exclusively Expressed in Hippocampus." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189 (1): 511–17. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(92\)91587-G](https://doi.org/10.1016/0006-291X(92)91587-G).
- Koushik, Srinagesh V., and Steven S. Vogel. 2008. "Energy Migration Alters the Fluorescence Lifetime of Cerulean: Implications for Fluorescence Lifetime Imaging Forster Resonance Energy Transfer Measurements." *Journal of Biomedical Optics* 13 (3): 031204. <https://doi.org/10.1117/1.2940367>.
- Lakowicz, Joseph R. 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer.
- Larsson, H. Peter. 2013. "What Determines the Kinetics of the Slow Afterhyperpolarization (SAHP) in Neurons?" *Biophysical Journal*. Biophysical Society. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.3832>.
- Leavesley, Silas J., Andrea L. Britain, Lauren K. Cichon, Viacheslav O. Nikolaev, and Thomas C. Rich. 2013. "Assessing FRET Using Spectral Techniques." *Cytometry Part A* 83 (10): 898–912. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22340>.
- Levy, Lucien M., and Mark Hallett. 2002. "Impaired Brain GABA in Focal Dystonia." *Annals of Neurology* 51 (1): 93–101. <https://doi.org/10.1002/ana.10073>.
- Li, Congmin, Wensheng Pan, Karl H. Braunewell, and James B. Ames. 2011. "Structural Analysis of Mg²⁺ and Ca²⁺ Binding, Myristoylation, and Dimerization of the Neuronal Calcium Sensor and Visinin-like Protein 1 (VILIP-1)." *Journal of Biological Chemistry* 286 (8): 6354–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.173724>.
- Marguet, Didier, Elias T. Spiliotis, Tsvetelina Pentcheva, Michael Lebowitz, Jonathan

- Schneck, and Michael Edidin. 1999. "Lateral Diffusion of GFP-Tagged H2L(d) Molecules and of GFP-TAP1 Reports on the Assembly and Retention of These Molecules in the Endoplasmic Reticulum." *Immunity* 11 (2): 231–40. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80098-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80098-9).
- Markova, Olga, Daniel Fitzgerald, Andrey Stepanyuk, Alexandr Dovgan, Volodymyr Cherkas, Alexei Tepikin, Robert D. Burgoyne, and Pavel Belan. 2008. "Hippocalcin Signaling via Site-Specific Translocation in Hippocampal Neurons." *Neuroscience Letters* 442 (2): 152–57. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.06.089>.
- McAnaney, Tim B, Wei Zeng, Camille F E Doe, Nina Bhanji, Stuart Wakelin, David S Pearson, Paul Abbyad, Xinghua Shi, Steven G Boxer, and Clive R Bagshaw. 2005. "Protonation, Photobleaching, and Photoactivation of Yellow Fluorescent Protein (YFP 10C): A Unifying Mechanism." *Biochemistry* 44 (14): 5510–24. <https://doi.org/10.1021/bi047581f>.
- McCormick, D. A., and D. Contreras. 2001. "On the Cellular and Network Bases of Epileptic Seizures." *Annual Review of Physiology*. Annu Rev Physiol. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.815>.
- McCue, Hannah V., Lee P. Haynes, and Robert D. Burgoyne. 2010a. "Bioinformatic Analysis of CaBP/Calneuron Proteins Reveals a Family of Highly Conserved Vertebrate Ca²⁺-Binding Proteins." *BMC Research Notes* 3. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-118>.
- . 2010b. "The Diversity of Calcium Sensor Proteins in the Regulation of Neuronal Function." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Cold Spring Harb Perspect Biol. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004085>.
- McFerran, Brian W., Margaret E. Graham, and Robert D. Burgoyne. 1998. "Neuronal Ca²⁺ Sensor 1, the Mammalian Homologue of Frequentin, Is Expressed in Chromaffin and PC12 Cells and Regulates Neurosecretion from Dense-Core Granules." *Journal of Biological Chemistry* 273 (35): 22768–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.35.22768>.

- Mercer, E A, L Korhonen, Y Skoglösa, P A Olsson, J P Kukkonen, and D Lindholm. 2000. "NAIP Interacts with Hippocalcin and Protects Neurons against Calcium-Induced Cell Death through Caspase-3-Dependent and -Independent Pathways." *The EMBO Journal* 19 (14): 3597–3607. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.14.3597>.
- Mikhaylova, Marina, Yogendra Sharma, Carsten Reissner, Falko Nagel, Penmatsa Aravind, Bheemreddy Rajini, Karl Heinz Smalla, Eckart D. Gundelfinger, and Michael R. Kreutz. 2006. "Neuronal Ca²⁺ Signaling via Caldendrin and Calneurons." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.08.047>.
- Miyazaki, Shunichi, Hideki Shirakawa, Ken Nakada, and Yoshiko Honda. 1993. "Essential Role of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor/Ca²⁺ Release Channel in Ca²⁺ Waves and Ca²⁺ Oscillations at Fertilization of Mammalian Eggs." *Developmental Biology* 158 (1): 62–78. <https://doi.org/10.1006/dbio.1993.1168>.
- Molleman, Areles. 2002. *Patch Clamping*. Wiley. Wiley. <https://doi.org/10.1002/0470856521>.
- Nagai, Takeharu, Keiji Ibata, Eun Sun Park, Mie Kubota, Katsuhiko Mikoshiba, and Atsushi Miyawaki. 2002. "A Variant of Yellow Fluorescent Protein with Fast and Efficient Maturation for Cell-Biological Applications." *Nature Biotechnology* 20 (1): 87–90. <https://doi.org/10.1038/nbt0102-87>.
- O'Callaghan, Dermott W., Lenka Ivings, Jamie L. Weiss, Michael C. Ashby, Alexei V. Tepikin, and Robert D. Burgoyne. 2002. "Differential Use of Myristoyl Groups on Neuronal Calcium Sensor Proteins as a Determinant of Spatio-Temporal Aspects of Ca²⁺ Signal Transduction." *Journal of Biological Chemistry* 277 (16): 14227–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111750200>.
- O'Callaghan, Dermott W, Alexei V Tepikin, and Robert D Burgoyne. 2003. "Dynamics and Calcium Sensitivity of the Ca²⁺/Myristoyl Switch Protein Hippocalcin in Living Cells." *The Journal of Cell Biology* 163 (4): 715–21.

<https://doi.org/10.1083/jcb.200306042>.

- Ormö, Mats, Andrew B Cubitt, Karen Kallio, Larry A Gross, Roger Y Tsien, and S James Remington. 1996. “Crystal Structure of the Aequorea Victoria Green Fluorescent Protein.” *Science* 273 (5280): 1392 LP – 1395. <https://doi.org/10.1126/science.273.5280.1392>.
- Osypenko, D. S., A. V. Dovgan, N. I. Kononenko, A. V. Dromaretsky, M. Matvieienko, O. A. Rybachuk, J. Zhang, S. M. Korogod, V. Venkataraman, and P. Belan. 2019. “Perturbed Ca²⁺-Dependent Signaling of DYT2 Hippocalcin Mutant as Mechanism of Autosomal Recessive Dystonia.” *Neurobiology of Disease* 132 (July): 104529. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104529>.
- Oyola-Cintrón, Jessica, Daniel Caballero-Rivera, Leomar Ballester, Carlos A. Baéz-Pagán, Hernán L. Martínez, Karla P. Vélez-Arroyo, Orestes Quesada, and José A. Lasalde-Dominicci. 2015. “Lateral Diffusion, Function, and Expression of the Slow Channel Congenital Myasthenia Syndrome AC418W Nicotinic Receptor Mutation with Changes in Lipid Raft Components.” *Journal of Biological Chemistry* 290 (44): 26790–800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.678573>.
- Palmer, Claire L., Wonil Lim, Peter G.R. Hastie, Marie Toward, Viktor I. Korolchuk, Stephen a. Burbidge, George Banting, Graham L. Collingridge, John. T.R. Isaac, and Jeremy M. Henley. 2005. “Hippocalcin Functions as a Calcium Sensor in Hippocampal LTD.” *Neuron* 47 (4): 487–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.06.014>.
- Paterlini, M., V. Revilla, A. L. Grant, and W. Wisden. 2000. “Expression of the Neuronal Calcium Sensor Protein Family in the Rat Brain.” *Neuroscience* 99 (2): 205–16. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00201-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00201-3).
- Phair, Robert D., and Tom Misteli. 2001. “Kinetic Modelling Approaches to in Vivo Imaging.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/35103000>.
- Power, John M., Christina Bocklisch, Peter Curby, and Pankaj Sah. 2011. “Location

- and Function of the Slow Afterhyperpolarization Channels in the Basolateral Amygdala.” *Journal of Neuroscience* 31 (2): 526–37. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1045-10.2011>.
- Raghuram, Vijeta, Yogendra Sharma, and Michael R. Kreutz. 2012. “Ca²⁺ Sensor Proteins in Dendritic Spines: A Race for Ca²⁺.” *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Front Mol Neurosci. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00061>.
- “RCSB PDB - 5G4P: Crystal Structure of Human Hippocalcin at 2.4 Å Resolution.” n.d. Accessed May 16, 2020. <https://doi.org/10.2210/pdb5G4P/pdb>.
- Schwartzkroin, Philip A., and Carl E. Stafstrom. 1980. “Effects of EGTA on the Calcium-Activated Afterhyperpolarization in Hippocampal CA3 Pyramidal Cells.” *Science* 210 (4474): 1125–26. <https://doi.org/10.1126/science.6777871>.
- Simms, Brett A., and Gerald W. Zamponi. 2014. “Neuronal Voltage-Gated Calcium Channels: Structure, Function, and Dysfunction.” *Neuron*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.016>.
- Sondek, John, Andrew Bohm, David G. Lambright, Heidi E. Hamm, and Paul B. Sigier. 1996. “Crystal Structure of a Gα Protein By Dimer at 2.1 Å Resolution.” *Nature* 379 (6563): 369–74. <https://doi.org/10.1038/379369a0>.
- “Spectra Viewer | Chroma Technology Corp.” n.d. Accessed May 9, 2020. <https://www.chroma.com/spectra-viewer>.
- Spilker, Christina, and Karl Heinz Braunewell. 2003. “Calcium-Myristoyl Switch, Subcellular Localization, and Calcium-Dependent Translocation of the Neuronal Calcium Sensor Protein VILIP-3, and Comparison with VILIP-1 in Hippocampal Neurons.” *Molecular and Cellular Neuroscience* 24 (3): 766–78. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00242-2).
- Spilker, Christina, Thomas Dresbach, and Karl Heinz Braunewell. 2002. “Reversible Translocation and Activity-Dependent Localization of the Calcium-Myristoyl Switch Protein VILIP-1 to Different Membrane Compartments in Living Hippocampal Neurons.” *Journal of Neuroscience* 22 (17): 7331–39.

<https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-17-07331.2002>.

- Swaminathan, R., Cathy P. Hoang, and A. S. Verkman. 1997. "Photobleaching Recovery and Anisotropy Decay of Green Fluorescent Protein GFP-S65T in Solution and Cells: Cytoplasmic Viscosity Probed by Green Fluorescent Protein Translational and Rotational Diffusion." *Biophysical Journal* 72 (4): 1900–1907. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78835-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78835-0).
- Takamatsu, Ken, and Tetsuya Noguchi. 1993. "Hippocalcin: A Calcium-Binding Protein of the EF-Hand Superfamily Dominantly Expressed in the Hippocampus." *Neuroscience Research* 17 (4): 291–95. [https://doi.org/10.1016/0168-0102\(93\)90112-4](https://doi.org/10.1016/0168-0102(93)90112-4).
- Tanaka, Toshiyuki, James B. Ames, Timothy S. Harvey, Lubert Stryer, and Mitsuhiko Ikura. 1995. "Sequestration of the Membrane-Targeting Myristoyl Group of Recoverin in the Calcium-Free State." *Nature* 376 (6539): 444–47. <https://doi.org/10.1038/376444a0>.
- Thaler, Christopher, Srinagesh V. Koushik, Paul S. Blank, and Steven S. Vogel. 2005. "Quantitative Multiphoton Spectral Imaging and Its Use for Measuring Resonance Energy Transfer." *Biophysical Journal* 89 (4): 2736–49. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.061853>.
- Tzingounis, Anastassios V., Masaaki Kobayashi, Ken Takamatsu, and Roger a. Nicoll. 2007. "Hippocalcin Gates the Calcium Activation of the Slow Afterhyperpolarization in Hippocampal Pyramidal Cells." *Neuron* 53 (4): 487–93. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.011>.
- Villalobos, Claudio, and Rodrigo Andrade. 2010. "Visinin-like Neuronal Calcium Sensor Proteins Regulate the Slow Calcium-Activated Afterhyperpolarizing Current in the Rat Cerebral Cortex." *Journal of Neuroscience* 30 (43): 14361–65. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3440-10.2010>.
- Wal, Jose Van der, Ron Habets, Péter Várnai, Tamas Balla, and Kees Jalink. 2001. "Monitoring Agonist-Induced Phospholipase C Activation in Live Cells by

Fluorescence Resonance Energy Transfer.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (18): 15337–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007194200>.

Wingard, Jennifer N., Jenny Chan, Ivan Bosanac, Françoise Haeseleer, Krzysztof Palczewski, Mitsuhiro Ikura, and James B. Ames. 2005. “Structural Analysis of Mg^{2+} and Ca^{2+} Binding to CaBP1, a Neuron-Specific Regulator of Calcium Channels.” *Journal of Biological Chemistry* 280 (45): 37461–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508541200>.

Wlodarczyk, Jakub, Andrew Woehler, Fritz Kobe, Evgeni Ponimaskin, Andre Zeug, and Erwin Neher. 2008. “Analysis of FRET Signals in the Presence of Free Donors and Acceptors.” *Biophysical Journal* 94 (3): 986–1000. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.111773>.

Zlokarnik, Gregor, Paul A. Negulescu, Thomas E. Knapp, Lora Mere, Neal Burres, Luxin Feng, Michael Whitney, Klaus Roemer, and Roger Y. Tsien. 1998. “Quantitation of Transcription and Clonal Selection of Single Living Cells with β -Lactamase as Reporter.” *Science* 279 (5347): 84–88. <https://doi.org/10.1126/science.279.5347.84>.

ДОДАТОК 1

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

За матеріалами дисертації опубліковано 6 друкованих робіт: 2 статті у міжнародних наукових журналах (одна з яких входить до першого квартилю (Q1) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank) та 4 тези доповідей на наукових конференціях.

В яких опубліковані основні наукові результати 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).

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

Б. О. Оліфіров, **Є. Ю. Шерemet**, 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. Шерemet**, 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.