

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

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Дромарецький Андрій Валентинович

(прізвище, ім'я, по батькові)

УДК 612.822 : 577.112 : 577.322

(індекс)

ДИСЕРТАЦІЯ

Порушення Ca^{2+} -залежної сигналізації гіпокальцину як механізм

первинної аутосомно-рецесивної ізольованої дистонії

(назва дисертації)

03.00.02 – Біофізика

(шифр і назва спеціальності)

Біологічні науки

(галузь знань)

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

А.В. Дромарецький

(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник (консультант) Білан Павло Володимирович

доктор біологічних наук, професор

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

Київ – 2025

Анотація

Дромарецький А.В. Порушення Ca^{2+} -залежної сигналізації гіпокальцина як механізм первинної аутосомно-рецесивної ізольованої дистонії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. – Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, 2024.

Кальцієва сигналізація в нейронах є необхідною для регуляції багатьох клітинних функцій. Механізми, за допомогою яких зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію у нейронах можуть регулювати ці функції, в більшості випадків забезпечуються за допомогою невеликих проміжних універсальних або спеціалізованих нейронних кальцієвих сенсорних білків (Neuronal Ca^{2+} Sensor (NCS) proteins). Саме ці білки в подальшому регулюють активність ефektorних білків, таких як канали, насоси та ензими. Останні дослідження доводять, що ці білки є вкрай важливими в різних аспектах нейронних дисфункцій і що генетичні мутації білків NCS прямо впливають на розвиток неврологічних захворювань. Таким чином, детальне розуміння фундаментальних аспектів молекулярних і клітинних механізмів регуляції ефektorів за допомогою нейронних кальцієвих сенсорних білків і їх патологічних змін є вкрай важливим для розробки новітніх підходів до лікування різноманітних нервових захворювань. Первинна аутосомно-рецесивна ізольована дистонія (DYT2) є неврологічним захворюванням, яке проявляється у вигляді неконтрольованих постійних або повторюваних скороченнях м'язів. Такі скорочення можуть призводити до аномальних рухів кінцівок та болісних поз у пацієнта, що негативним чином впливає на якість їх життя. Нещодавні дослідження вказують на зв'язок даного захворювання з мутаціями гена нейронного кальцієвого сенсорного білка гіпокальцина (HPCA), а саме точковими міссенс-мутаціями N75K та T71N. Цей ген майже виключно експресується у мозку, особливо з високим рівнем експресії у корі, смугастому тілі, мозочку та гіпокампі – саме в тих його ділянках, що змінюються при роз-

витку дистонії. НРСА має три EF домени, що здатні приєднувати Ca^{2+} . Приєднання Ca^{2+} до цих доменів призводить до кальцій-залежної конформаційної зміни білка, що супроводжується виходом його N-термінального кінця, котрий містить залишок жирної кислоти мірістоїлу, з гідрофобної кишені молекули. Це дозволяє НРСА переміщуватись (транслокуватись) з цитозолу і вбудовуватися за допомогою мірістоїлу до внутрішнього шару плазматичної мембрани. Раніше було показано, що саме ця -залежна транслокація НРСА призводить до гальмування коркових та гіпокампальних нейронів завдяки активації струму повільної постгіперполяризації (sANP). Метою роботи було встановити біофізичні механізми сигналізації гіпокальцина, що контролюють струм повільної гіперполяризації, виявити відмінності в біофізичних властивостях мутантних варіантів T71N та N75K білка гіпокальцина від властивостей білка дикого типу, а також обумовлені цими відмінностями порушення молекулярних сигнальних механізмів, в роботі яких цей білок бере участь. Дослідження проводилось з використанням генетичних, електрофізіологічних та флуоресцентних методів. А для оцінки концентрації експресованих в нейронах різних екзогенних варіантів гіпокальцина було розроблено новітню методику виміру концентрації досліджуваних флуорофорів, що заснована на використанні оптичних спектральних характеристик обладнання та використаних флуоресцентних міток і опорних барвників з відомою концентрацією. В роботі показано, що мутація N75K, виявлена при дистонії типу DYT2, призводить до втрати гіпокальцином його функцій, як сенсора іонів кальцію при фізіологічній нейронній активності. Такий мутований гіпокальцин не може контролювати розвиток повільної постгіперполяризації в нейронах, адже ця мутація змінює можливості гіпокальцина до Ca^{2+} -залежної транслокації із цитозолу до плазматичної мембрани. Транслокація гіпокальцина N75K до плазматичної мембрани апікального дендрита нейрона, який бере участь в генерації струму повільної постгіперполяризації, була помітно та достовірно зменшена порівняно з гіпокальцином дикого типу. Це зменшення супроводжувалось неспроможністю мутантного варіанту гіпокальцина N75K викликати струм повільної постгіперполяризації в додаток до того струму, що був викликаний транслокацією ендогенного

гіпокальцина. В той час як експресія гіпокальцина дикого типу призводила до збільшення цього струму. Проте, дана мутація N75K не впливає ні на мірістоіловий перемикач, ні на просторовий розподіл вбудовування білка до плазматичної мембрани. Водночас мутація T71N не призводить до змін у транслокації гіпокальцина. Загалом мутація N75K зумовлює підвищену збудливість нейронів у відповідь на серію пачок потенціалів дії та θ -стимуляцію, оскільки даний мутант не викликає гальмівні струми повільної постгіперполяризації. Таким чином, наступні за пачковою активністю нейронів постсинаптичні струми будуть викликати потенціали дії у таких нейронах з більшою імовірністю, що може бути механізмом рухових розладів, які спостерігаються при первинній дистонії типу DYT2. Моделювання нейронної активності підтверджує порушену і надмірну збудливість нейронів з мутантним варіантом гіпокальцина N75K подібно до клітин з відсутнім гіпокальцином. Модель нейрона з урахуванням Ca^{2+} -залежної передачі сигналу за допомогою гіпокальцина та викликаного його транслокацією струму повільної постгіперполяризації чітко повторює як експериментально виміряні транслокації гіпокальцина, так і струми повільної постгіперполяризації, що спостерігались в наших експериментах. Дослідження з моделюванням на основі такої моделі показали підвищену збудливість нейронів які експресують мутантний варіант N75K, в порівнянні з диким типом гіпокальцина. Це підвищення було показано в різних умовах, при яких генерація потенціалів дії може виникати у нейронах центральній нервовій системі. Зокрема було показано, що мутація N75K призводить до скорішого початку та збільшеної частоти тонічної нейронної активності, підвищеної генерації потенціалів дії та порушеної адаптації їх частоти в межах серії імпульсів які індуковані синаптичною стимуляцією, а також значного зменшення інтервалу часу затримки до наступного потенціалу дії, що викликається постсинаптичним потенціалом. Отримані результати вказують на те, що генетичні втручання націлені на збільшення експресії гіпокальцина дикого типу у нейронах аномально збуджених низхідних шляхів, котрі регулюють роботи скелетної мускулатури, може відновити повільну постгіперполяризацію в цих нейронах і нормалізувати тонус мускулатури. Таке втручання могло б бути ефективним інстру-

ментом для лікування пацієнтів з даним типом дистонії.

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

Summary

Dromaretsky A.V. Perturbed Ca^{2+} -dependent signaling of DYT2 hippocalcin mutant as mechanism of autosomal recessive dystonia. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts. A dissertation submitted to acquire the degree of Candidate of Science in Biology (PhD), specialty – 03.00.02 – Biophysics – Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, 2024.

Calcium (Ca^{2+}) signaling plays an essential role in neuronal activity and regulation. Any disruption in this signaling can lead to neurological issues, ranging from minor disorders to severe diseases. The process of interpreting and converting Ca^{2+} signals into internal neuronal regulation is managed by various systems, including neuronal Ca^{2+} sensor proteins (NCS), which are key players in this process. The operation of these sensor proteins and their interactions with other systems can be complex, making it challenging to detect dysfunctions, let alone repair them. A deeper understanding of the molecular and cellular mechanisms underlying this proteins operation is essential to address these challenges and advance our ability to manage neurological disorders. Primary autosomal-recessive dystonia (DYT2) is a neurological movement disorder syndrome that results in sustained or repetitive muscle contractions. Such contractions cause twisting and repetitive movements or abnormal painful postures, negatively affecting the quality of life. Recent publications demonstrate the connection between this condition and mutations in the gene of neuronal calcium sensor protein hippocalcin (HPCA), namely missense mutations N75K and T71N. The gene is almost exclusively expressed in the brain with high level of expression in the cortex, striatum, cerebellum and hippocampus, i.e. in brain areas revealing abnormalities in dystonia. HPCA contains three EF-hand domains capable of binding Ca^{2+} . The binding results in a Ca^{2+} -myristoyl switch, a Ca^{2+} -dependent conformation change leading to protrusion of its myristoyl-containing N-terminal region out of a hydrophobic pocket of the molecule. This allows HPCA to translocate from the cytosol to the plasma membrane. It is established that this

Ca^{2+} -dependent translocation of HPCA leads to inhibition of cortical and hippocampal neurons by gating a slow afterhyperpolarization (sAHP) current. The research aimed to find differences in biophysical properties of mutant variants N75K and T71N of the hippocalcin protein compared with a wild-type variant and resulting alterations in the function of molecular signaling to which this protein contributes. The research was conducted with the use of genetic, electrophysiological, and fluorescent methods. A special technique was developed to estimate the concentration of the expressed variants of hippocalcin with an attached fluorescent tags. The technique is based on the calculations involving optical spectral properties of the equipment and used fluorophores as well as other fluorescent dyes that served as references with known concentrations. This research demonstrates that mutation N75K, which was associated with dystonia DYT2, causes HPCA to lose its functions as a calcium ion sensor under conditions of physiological neural activity. Due to the altered capability of the mutated hippocalcin to perform Ca^{2+} -dependent translocation to the plasma membrane, this variant of hippocalcin is unable to control slow after-hyperpolarization in neurons. Translocation of the N75K hippocalcin mutant to the plasma membrane of neuronal apical dendrites that is responsible for the generation of a sAHP current was severely reduced compared to the wild-type hippocalcin variant. This reduction led to the inability of the mutated hippocalcin variant N75K to generate additional sAHP current to one generated by the translocation of the endogenic wild-type hippocalcin. In contrast, the expression of wild-type hippocalcin caused that current to rise. Yet this mutation N75K does not affect the myristoyl switch, nor the spatial distribution of the hippocalcin binding to plasma membrane. Mutated hippocalcin variant T71N did not exhibit any significant changes in the translocation. In general, the hippocalcin mutation N75K causes increased neuronal excitability due to reduced sAHP and its inhibition effect in response to a series of action potentials bursts and θ -stimulation. It follows that the postsynaptic currents which occur subsequent to the action potential burst possess an increased likelihood of inducing further action potentials in the affected neurons. This phenomenon may serve as the fundamental cause of the motor symptoms observed in the dystonia DYT2 movement disorder. Simulations of

neural activity confirm the presence of a defective and heightened excitability in neurons bearing the mutated hippocalcin variant N75K, a finding consistent with the results observed in experimental studies. A neuronal model that accounts for the Ca^{2+} -dependent signaling of hippocalcin and its translocation-induced sAHP current aligns with the experimental trends observed in our studies. These trends include the translocation of hippocalcin as well as the sAHP current in cells expressing either the wild-type or mutated N75K variant of hippocalcin. Simulations based on this model demonstrate an increased excitability in neurons expressing the mutated hippocalcin variant N75K, in contrast to those expressing the wild-type variant. This enhancement in excitability was observed under various conditions, akin to those found within the central nervous system. It was further demonstrated that the N75K mutation accelerates the onset of tonic neural activity, resulting in an increased frequency of firing. This mutation facilitates the generation of action potentials, disrupts the adaptation of their frequency during bursts of pulses induced by synaptic stimulation, and notably reduces the inter-pulse interval within burst firing. The results received suggest that genetic interventions designed to promote the expression of the wild-type hippocalcin variant in the neurons of the abnormally excited descending pathways responsible for skeletal muscle control may, in turn, restore sAHP in these neurons and thereby normalize muscle tone. Such approaches could prove to be an effective means of treating patients afflicted with this form of dystonia.

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

Список публікацій за темою

В яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

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

DOI: 10.1371/journal.pone.0194031

Особистий внесок здобувача: проведення частини електрофізіологічних і флуоресцентних експериментів; збір та організація експериментальних даних; обробка даних; написання програмного забезпечення для обробки даних; обробка частини даних; підготовка рисунків.

2. Osypenko D., Dovgan A., Kononenko N., Dromaretsky A., Matvieienko M., Rybachuk O., Zhang J., Korogod S., Venkataraman V., Belan P. Perturbed Ca²⁺-dependent signaling of DYT2 hippocalcin mutant as mechanism of autosomal recessive dystonia. Neurobiology of Disease. 2019. 132: 104529.

DOI: 10.1016/j.nbd.2019.104529

Особистий внесок здобувача: проведення частини експериментів з клітинами HEK-293 та культивованими нейронами гіпокампу; написання програмного забезпечення для обробки даних; обробка частини даних; написання частини результатів; підготовка рисунків.

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

DOI: 10.3389/fncel.2017.00342

Особистий внесок здобувача: встановлення та налаштування бокового інфрачервоного освітлення для відеореєстрації; технічна реалізація експериментів для вимірювання концентрацій Ca²⁺ за допомогою флуоресцентного барвника «Fura-2» та оцінки концентрацій та розподілу барвника у нейронах; підготовка рисунків.

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

DOI: 10.22141/2309-8147.5.3.2017.172351

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

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

DOI: 10.15407/fz64.04.041

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

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Osypenko D. S., Dovgan A. V., Kononenko N. I., **Dromaretsky A. V.**, Matveenko M., Rybachuk O. A., Zhang J., Korogod S. M., Venkataraman V., Belan P.

Impaired signaling of *dvt2* hippocalcin mutant as mechanism of autosomal recessive dystonia.

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

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

Neurocalcin delta translocation is not dependent on its dimerization.

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

3. Duzhyy D., Dovgan A., Kononenko N., **Dromaretsky A.**, Voitenko N., Belan P.
Developing double stranded RNAs to efficiently suppress expression of T-type Ca channels for treating diabetic neuropathy.
Federation of European Neuroscience Societies Forum 2024, pp PS05-28M-382.
Vienna, Austria, 2024.
4. Dovgan A.V., Kononenko N.I., Viviano J., **Dromaretsky A.**, Belous I., Marimonchik A., Satretdinova R., Zhang J., Venkataraman V., Belan P.V.
N-terminal domains of neurocalcin δ and hippocalcin underlies their distinct signalling.
Тематичний VII з'їзд Українського біофізичного товариства, Київ, 2018.

Зміст

	Анотація	1
	Summary	5
	Список публікацій за темою	8
	Перелік умовних скорочень	14
	Вступ	16
	Обґрунтування вибору теми дослідження	16
	Зв'язок роботи з науковими програмами, грантами, планами, те- мами	19
	Мета дослідження	19
	Завдання дослідження	20
	Методи дослідження	21
	Наукова новизна отриманих результатів	21
	Практичне значення отриманих результатів	21
	Особистий внесок здобувача	22
	Апробація результатів дисертації	23
	Публікації	23
	Структура та обсяг дисертації	23
Розділ 1	Огляд літератури	25
1.1	Роль іонів кальцію у внутрішньоклітинних процесах	25
1.2	Білки NCS	27
1.2.1	Роль сенсорних білків у клітині	27
1.2.2	NCS-родина кальцій-чутливих білків	28
1.2.3	Внутрішньоклітинна локалізація білків сімейства NCS та їх взаємодія з іонами кальцію	29
1.2.4	Роль NCS-білків у фізіології клітини та організму	30

1.2.5	Значення NCS-білків для регуляції потенціал-керованих каналних комплексів	31
1.2.6	Адаптація частоти потенціалів дії	32
1.2.7	Повільна постгіперполяризація	33
1.2.8	Гіпокальцин	36
1.2.9	Первинна автосомно-рецесивна дистонія DYT2	41
Розділ 2	Матеріали та методи	44
2.1	Клітинна культура НЕК-293	44
2.2	Клітинна культура РС-12	44
2.3	Гіпокамральні нейрони	44
2.4	Препарування спинного мозку щурів	45
2.5	Плазмідні	45
2.6	Трансфекція	46
2.7	Завантаження клітин препарату спинного мозку щурів кальцієвим барвником	46
2.8	Ретроградне завантаження барвника до гангліонарних клітин сітківки щурів	47
2.9	Електрофізіологічні реєстрації	47
2.10	Флуоресцентні реєстрації транслокації білків	49
2.11	Кероване вивільнення іонів кальцію та реєстрація флуоресценції в клітинах НЕК-293	51
2.12	Порівняння буферної ємності по іонам кальцію	52
2.13	Статистичний аналіз	55
2.14	Комп'ютерне моделювання	55
Розділ 3	Результати	62
3.1	Оцінка концентрації флуоресцентних молекул в поодиноких живих клітинах	62

3.2	Вплив мутацій, що викликають дистонію DYT2 на властивості НРСА щодо зв'язування іонів кальцію	78
3.3	Мутація N75K змінює біофізичні властивості НРСА	86
3.4	Мутація N75K впливає на залежну від іонів кальцію транслокацію НРСА в нейронах гіпокампа	95
3.5	Короткі серії потенціалів дії не призводять до транслокації N75K .	100
3.6	Порушена транслокація НРСА N75K при θ -стимуляції	106
3.7	Мутантний варіант гіпокальцину N75K не керує струмом sАНР при наявності білка дикого типу	111
3.8	Мутантний варіант НРСА N75K підвищує збудливість нейронів . .	114
Розділ 4	Обговорення результатів	122
4.1	Біофізичні властивості мутанта N75K	122
4.2	Функціональні порушення спричинені мутацією N75K	127
	Висновки	132
	Список використаних джерел	134
Додаток 1	Список публікацій здобувача	152

Перелік умовних скорочень

Ca^{2+}	– іон кальцію
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	– внутрішньоклітинна концентрація іонів кальцію
AHP	– After Hyper Polarization – Пост-Гіпер-Поляризація
AM	– ацетокси-метиловий
BK	– Big K^+ (channel) – K^+ канал високої провідності
EPSP	– Excitatory PostSynaptic Potential - збуджувальний постсинаптичний потенціал
fAHP	– fast AHP – швидка гіпер-поляризація
FRET	– Fluorescence resonance energy transfer - Флуоресцентне резонансне перенесення енергії
HPCA	– Hippocalcin – білок гіпокальцин
IK	– Intermediate K^+ (channel) – K^+ канал середньої провідності
mAHP	– medium AHP – швидка гіпер-поляризація
PIP2	– phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate – фосфатидилінозитол 4,5-бісфосфат
ROI	– Region Of Interest
sAHP	– slow AHP – повільна гіпер-поляризація
SK	– Small K^+ (channel) – K^+ канал малої провідності
SPD	– spectral power distribution
TBS	– Theta-Burst Stimulation - θ -стимуляція пачками імпульсів
WT	– wild type – дикий тип

- НЧ** – Низько-частотний
- ПЗЗ** – Пристрій з Зарядовим Зв'язком
- УФ** – Ультра-фіолет
- ЦНС** – Центральна Нервова Система

Вступ

Обґрунтування вибору теми дослідження

Кальцієва сигналізація в нейронах є необхідною для регуляції багатьох клітинних функцій [6]. Механізми, за допомогою яких зміни внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} у нейронах можуть регулювати ці функції, в більшості випадків забезпечуються за допомогою невеликих проміжних універсальних або спеціалізованих нейронних Ca^{2+} сенсорних білків (Neuronal Ca^{2+} Sensor (NCS) proteins) [7, 8]. Саме ці білки далі регулюють активність ефекторних білків, таких як канали, насоси та ензими. Стає все більш очевидним, що ці білки можуть бути вирішальними в різних аспектах нейронних дисфункцій та захворювань нервової системи, опосередковано або безпосередньо, як прямий наслідок їх генетичних варіацій або мутацій [9—12]. Таким чином, детальне розуміння фундаментальних аспектів молекулярних і клітинних механізмів регуляції ефекторів за допомогою нейронних Ca^{2+} -сенсорних білків і їх патологічних змін є вкрай важливим для розробки новітніх підходів до лікування різноманітних нервових захворювань [8, 9, 13].

Первинна дистонія – це неврологічний синдром порушення руху при якому спостерігаються тривалі та повторювані скорочення м'язів, що призводить до скручених та повторюваних неконтрольованих рухів або аномальних болісних поз. У мозку хворих даним захворюванням немає явних морфологічних аномалій [14]. Разом з тим, анатомічні та функціональні дослідження показують різні типи відхилень в багатьох областях мозку, у тому числі в корі головного мозку, смугастому тілі, мозочку, таламусі, стовбурі головного мозку, а також у гіпокампі, що може бути причиною прояву симптомів дистонії [15]. Таким чином, дистонія викликана не порушеннями у певній ділянці мозку, а скоріше загальним порушенням областей мозку, які залучені в обробці моторної низхідних шляхів [14, 16], що вказує на зміни функціонуванні одного або кількох генів, що експресуються в багатьох ділянках мозку.

Варто зазначити, що пацієнти з ідіопатичною та функціональною дистонією

мають відмінності в об'ємі сірої речовини в гіпокампі [17, 18]. На додаток, у випадку комбінованої дистонії проявляється зв'язок між морфологічними та функціональними аномаліями в гіпокампі та симптомами дистонії [19, 20]. Також, спостерігалися значні зміни в синаптичній передачі [21, 22], регуляції концентрації Ca^{2+} [23] та експресії білків, що зв'язують Ca^{2+} [24] в гіпокампі у різних тваринних моделях дистонії. Ці дані вказують на те, що певні аномалії у гіпокампі скоріш за все прямо пов'язані з проявом симптомів дистонії, а сам гіпокамп є частиною системи, порушення в якій викликають дистонію.

Нещодавні генетичні дослідження пацієнтів з DYT2 дистонією виявили три точкові мутації в гені *NRSA*, що кодує нейрональний кальцієвий сенсорний білок (NCS) гіпокальцин (*NRSA*). Цей ген майже виключно експресується у мозку, особливо з високим рівнем експресії у корі, смугастому тілі, мозочку та гіпокампі [25] – саме в тих областях, що проявляють розвитку дистонії [14, 16]. *NRSA* має три EF домени, що здатні приєднувати Ca^{2+} [26, 27]. Приєднання Ca^{2+} до цих доменів призводить до кальцій-залежної конформаційної зміни білка, що супроводжується виходом його N-термінального кінця, котрий містить залишок жирної кислоти мірїстоїлу, з гідрофобної кишені молекули [28]. Це дозволяє *NRSA* переміщуватись (транслокуватись) з цитозолу і вбудовуватись до плазматичної мембрани [27, 29, 30]. Раніше було показано, що саме ця Ca^{2+} -залежна транслокація *NRSA* призводить до гальмування коркових та гіпокампальних нейронів шляхом активації струму повільної гіперполяризації (sANP) [31—34].

Молекулярний субстрат sANP та механізми його регуляції залишається загадкою понад 30 років з часу його відкриття. Протягом багаторічних досліджень різні типи калієвих каналів були запропоновані як молекулярний субстрат повільної ANP [31, 35]. Спочатку калієві канали типу SK, а потім KCNQ вважалися основними чинниками sANP у ЦНС [31—33, 36—38]. Нещодавно було висловлено припущення, що sANP частково виникає внаслідок тристоронньої взаємодії між кальцієвими каналами L-типу (*Cav1.3*), ріанодиновими рецепторами та калієвими кальцій-залежними (*KCa3.1*) каналами на з'єднаннях ендоплазматичного ретикулу та

плазматичної мембрани [35, 39, 40]. Останні дослідження sANP у гіпокампальних та кортикальних нейронах розширили спектр можливих молекулярних субстратів і показують ідентифікований внесок до струму sANP наступних калієвих каналів: KCa3.1 [41, 42], Kv7 [43], Kir6 [43], KCNQ2/3 [11, 44], KATP (KCNJ11), KNa, KCNT1-2 [11], і Na⁺ – K⁺ обмінника [45]. Ці дослідження надають деякі відповіді та одночасно створюють нові запитання щодо фармакологічних та біофізичних властивостей sANP. Одна з загадок пов'язана з тим, що було встановлено, що sANP контролюється Ca²⁺-залежною сигналізацією гіпокальцина. Однак конкретні молекулярні механізми, а також загальне розуміння того, як один білок може регулювати групу різних калієвих каналів, все ще є невідомими. Також невідомо, чи можуть зміни в сигналізації гіпокальцина сприяти підвищенню активності нейронів, що спостерігається при багатьох формах дистонії, і, зокрема, чи може це призводити до розвитку дистонії DYT2.

Таким чином, актуальними є проблеми оцінки основних біофізичних властивостей білка гіпокальцина, особливо пов'язаних з концентрацією НРСА всередині клітини та субклітинних компартментів, а також з його розподілом між цитозолем та плазматичною мембраною, відмінності в біофізичних властивостях мутантних варіантів білка, що лежать в основі розвитку дистонії DYT2 та обумовлені цими відмінностями порушення сигналізації НРСА, що можуть призводити до змін sANP та активності нейронів. Розв'язання даної проблеми потребує розробки нових підходів у вимірюваннях й оцінках біофізичних параметрів, їх валідації та реалізації даних підходів на практиці.

Мутації НРСА в позиціях T71N та N75K, що проявляються при розвитку дистонії DYT2 знаходяться в другому EF домені та можуть порушувати здатність цього домену приєднувати Ca²⁺ [25], що у свою чергу перешкоджає транслокації НРСА та може послаблювати гальмування. Варто зазначити, що за допомогою функціональної мікроскопії та PET було показано, що дистонія пов'язана з порушенням гальмуванням в коркових та підкоркових областях [46]. Тому ми висунули гіпотезу, що DYT2-мутації спричиняють порушення сигнальних функцій НРСА та механізму

sАНР, що призводить до надмірної збудливості нейронів. В ході виконання дисертаційної роботи ми перевірили цю гіпотезу з використанням нейронів гіпокампа, які є частиною нейрональної мережі, що спричиняє прояви хвороби [19, 20], а також є найбільш дослідженою клітинною моделлю НРСА-залежної регуляції струму sАНР [31, 33].

Зв'язок роботи з науковими програмами, грантами, планами, темами

Робота виконана відповідно до загального плану науково-дослідних робіт структурної лабораторії молекулярної біофізики відділу загальної фізіології нервової системи (з 22.05.2017 - відділ молекулярної біофізики, з 05.10.2023 - відділ біофізики сенсорної сигналізації) Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України в рамках науково-дослідних проєктів/робіт: «Вивчення генетично-детермінованих молекулярних механізмів міжклітинної та внутрішньоклітинної сигналізації в нормі та при патологіях» (2012–2016 рр., державний реєстраційний номер роботи - 0112U001475), «Клітинні сигнальні системи в нормі та патології» (2014-2018 рр., державний реєстраційний номер роботи - 0113U007273), «Сигналізація нейрональних кальцієвих сенсорних білків в нейронах ЦНС в нормі і патології» (2019–2023 рр., державний реєстраційний номер роботи - 0118U007345), «Вплив нейромедіаторів на сигналізацію нейрональних кальцієвих сенсорних білків в нейронах ЦНС в нормі і патології» (2024-2027 рр., державний реєстраційний номер роботи - 0124U001556).

Мета дослідження

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

Завдання дослідження

Для досягнення поставленої мети дослідження було поставлено наступні завдання:

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

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

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

Методи дослідження

Для проведення дослідження використані наступні методи. Клітинної біології: культивування лінійних культур клітин НЕК-293, РС-12, отримання препаратів спинного мозку та сітківки щурів, первинної культури нейронів гіпокампа щурів; Молекулярної фізіології: експресія екзогенних білків шляхом трансфекції. Біофізичні: петч-клемп, флуоресцентна мікроскопія. Математичні: обробка інформації в зображеннях матричними операціями з використанням програмного забезпечення «Matlab» та «Python», моделювання роботи нейрона.

Наукова новизна отриманих результатів

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

Практичне значення отриманих результатів

Запропонований нами метод визначення внутрішньоклітинної концентрації флуорофорів, може бути використаний у дуже широкому спектрі біофізичних досліджень. Він підходить практично для всіх типів флуоресцентних барвників та конфі-

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

Особистий внесок здобувача

Здобувачем були самостійно опрацьовані літературні джерела, сформульовані завдання дослідження, розроблені відповідні експериментальні протоколи. Проведення флуоресцентних експериментів та аналіз флуоресцентних зображень щодо досліджень транслокацій гіпокальцина і його мутантів у клітинах НЕК-293, відпрацювання методики вимірювання концентрацій флуорофорів для набору фільтрів «51017» з різними типами клітин, статистична обробка, узагальнення відповідних отриманих результатів та написання всіх розділів дисертації були проведені здобувачем самостійно. Електрофізіологічні, флуоресцентні експерименти проведені на нейронах гіпокампу та моделювання сигналізації гіпокальцину та його мутантів були проведені разом зі співавторами опублікованих робіт. Формулювання мети дослідження, обговорення отриманих результатів, формулювання висновків проведено за участі наукового керівника.

Апробація результатів дисертації

Дану роботу апробовано на наукових семінарах в Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. 20-ий з'їзд Українського Фізіологічного Товариства з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження П.Г. Костюка, 27-30 травня 2019 р., м. Київ D. S. Osypenko, A. V. Dovgan, N. I. Kononenko, A. V. Dromaretsky, M. Matveenکو, O. A. Rybachuk, J. Zhang, S. M. Korogod, V. Venkataraman, P. Belan; Impaired signaling of *dyt2* hippocalcin mutant as mechanism of autosomal recessive dystonia. SfN 2018, Сан-Дієго, США, 2018, N. I. Kononenko, A. Dovgan, J. Viviano, A. Dromaretsky, J. Zhang, V. Venkataraman, P. V. Belan, Neurocalcin delta translocation is not dependent on its dimerization. FENS Forum 2024, Відень, Австрія, 2024, Duzhyu D., Dovgan A., Kononenko N., Dromaretsky A., Voitenko N., Belan P.; Developing double stranded RNAs to efficiently suppress expression of T-type Ca channels for treating diabetic neuropathy. Тематичний VII з'їзд Українського біофізичного товариства, Київ, 2018, Dovgan A.V., Kononenko N.I., Viviano J., Dromaretsky A., Belous I., Marimonchik A., Satretdinova R., Zhang J., Venkataraman V., Belan P.V.; N-terminal domains of neurocalcin δ and hippocalcin underlies their distinct signalling.

Публікації

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

Структура та обсяг дисертації

Дисертація складається з огляду літератури, розділу матеріалів та методів, результатів, основної частини, списку використаних літературних джерел зі 153 посиланнями, 90 рисунків та 4 таблиць. Основний текст займає 133 сторінки, вся ро-

бота викладена на 154 сторінках.

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

Розділ 1. Огляд літератури

1.1. Роль іонів кальцію у внутрішньоклітинних процесах

Зміна концентрації вільних іонів кальцію Ca^{2+} керує великою кількістю клітинних фізіологічних процесів у нейронах. Шляхом дії на іонні канали та синаптичну передачу [47] кальцієві сигнали здатні призводити до функціональних змін в нейронах, що можуть тривати від кількох секунд до днів. Кальцієвий сигнал може керувати експресією генів [48], ростом [49], розвитком [50], існуванням та смертю нейронів [51]. Особлива роль Ca^{2+} як вторинного посередника і велика кількість систем транспортування Ca^{2+} , які беруть участь в регуляції рівня Ca^{2+} в клітині, дозволяють виділити кальцієву систему як окрему область внутрішньоклітинних механізмів передачі сигналу.

Зміна концентрації вільних іонів кальцію в цитоплазмі є універсальним внутрішньоклітинним сигналом для контролю багаточисельними клітинними процесами. Що вказує на наявність великого різноманіття механізмів передачі кальцієвого сигналу, які відрізняються швидкістю, амплітудою, просторово-часовим розподілом [52]. Ця багатогранність виникає через використання величезного молекулярного набору сигнальних компонентів, котрі та складають базу передачі Ca^{2+} сигналу [53]. Цей набір компонентів може бути скомбінований для утворення сигналів з різними просторово-часовими профілями. Ще більше варіацій досягається внаслідок взаємодії Ca^{2+} з іншими шляхами передачі сигналів [54].

В різних частинах нейронів присутні багаточисельні Ca^{2+} -канали, що виконують певні функції. Потенціал-керовані канали N та P/Q типів на синаптичних закінченнях запускають вивільнення нейромедіатора. Потенціал-керовані канали типу L у сомі та проксимальному дендриті забезпечують регуляцію експресії деяких генів. Вони також функціонують як «кінетичні фільтри», що дозволяє їм ефективно реагувати на невеликі деполяризації в дендритних шипах [52]. Кальцієві сигнали в шипах, що служать посередником в ранніх синаптичних модифікаціях, що включені в навчання та пам'ять, забезпечуються входом Ca^{2+} через потенціал-керовані кана-

ли, а також через ліганд-залежні канали, такі як NMDA-рецептори [55], так і через вивільнення Ca^{2+} з RYR та InsP3Rs депо [56].

Оскільки InsP3Rs чутливі як до Ins(1,4,5)P3, так і до Ca^{2+} , вони можуть працювати як детектори збігів для кореляції активності перед- і постсинаптичних входних сигналів, що є центральним механізмом формування пам'яті [57]. Наприклад, у нейронах гіпокампа, електрична активність призводить до входу кальцію через потенціалкеровані кальцієві канали та разом з активацією метаболічних глутаматних рецепторів (mGluR1) та наступним утворенням Ins(1,4,5)P3, викликає синергетичне звільнення Ca^{2+} з внутрішньоклітинних депо [52].

При підвищенні внутрішньоклітинної концентрації кальцію, різноманітні процеси, чутливі до Ca^{2+} , перетворюють його на клітинну відповідь. Інструментарій сигналізації Ca^{2+} включає численні білки, які зв'язують кальцій, і можна розділити за їхньою основною функцією на буфери Ca^{2+} та сенсори Ca^{2+} . Останні реагують на підвищення кальцію активацією різноманітних процесів. До класичних сенсорів належать тропонін С, ТnС, і кальмодулін, САМ, які мають чотири кальцієво-зв'язуючі структури, так звані EF-домени, і піддаються різким конформаційним змінам, що призводять до активації різних ефекторних молекул. Тропонін С контролює взаємодію актина і міозина під час циклу скорочення серцевих і скелетних м'язів. Функція кальмодуліну більш загальна – він регулює такі процеси, як скорочення гладеньких м'язів, транскрипція генів, модуляція іонних каналів та багато метаболічних процесів. На додаток до вищезгаданих білків з порівняно широкою функціональністю, є також білки, які зв'язують кальцій, виконуючи одну специфічну функцію. Наприклад, синаптотагмін асоціюється з мембранними везикулами і є сенсором екзоцитозу кальцію. Універсальність сигналізації Ca^{2+} значно посилюється зв'язком деяких кальцієво-чутливих процесів з іншими сигнальними шляхами.

У спокої концентрація вільних іонів кальцію в нейроні підтримується на рівні 50..100 нмоль/л, тоді як у позаклітинному середовищі така концентрація становить кілька ммоль/л. Це призводить до того, що при відкритті кальцієпроникних каналів концентрація вільних іонів кальцію в цитозолі може досягати кількох мкмоль/л

[58].

Після того, як Ca^{2+} виконав свої сигнальні функції, він швидко видаляється з цитоплазми різноманітними насосами та обмінниками. Ca^{2+} -АТФази, РМСА та обмінники $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ виводять кальцій назовні, тоді як АТФази сарко/ендоплазматичного ретикулуму (SERCA) переміщують Ca^{2+} до внутрішньоклітинних депо. Іншим важливим компонентом зменшення цитозольної концентрації іонів кальцію є мітохондрії, які швидко захоплюють Ca^{2+} під час розвитку кальцієвого сигналу, а потім повільно звільняють його під час фази відновлення. Це захоплення Ca^{2+} мітохондріями є важливим для формування як амплітуди, так і просторово-часових структур кальцієвих сигналів [59].

1.2. Білки NCS

1.2.1. Роль сенсорних білків у клітині

У нейронах зміни в концентрації цитозольного кальцію можуть призвести до запуску абсолютно різноманітних за часом (від мілісекунд до десятків хвилин) та протилежних за дією процесів, таких як LTD та LTP. Це стає можливим в основному завдяки тому, що зміни концентрації кальцію, що призводять до різних процесів, мають абсолютно різні часові та просторові характеристики [53]. Наприклад, для виклику LTD застосовується низькочастотна (1 Гц) стимуляція протягом тривалого часу (5 хв.), що призводить до тривалого збільшення концентрації іонів кальцію в постсинаптичних терміналах. Збільшення ж концентрації іонів кальцію на десятки мілісекунд у пресинаптичних терміналах викликає екзоцитоз везикул з нейромедіатором, спричиняючи таким чином LTP. Потреба створювати різноманітні кальцієві сигнали та перетворювати їх у певні фізико-хімічні процеси в клітині призвела до виникнення в ході еволюції різноманітних типів кальцієвих каналів, які відрізняються як за часовими характеристиками та кальцієвою провідністю, так і за механізмами, а також різних білків - кальцієвих сенсорів, що різняться як за чутливістю до іонів кальцію та часовими характеристиками, так і за їх розташуванням в клітині.

1.2.2. NCS-родина кальцій-чутливих білків

Характерними представниками кальцієвих сенсорів є білки з родини NCS (від англ. Neuronal Calcium Sensor). Білки NCS мають чотири специфічні EF-домени, два або три з яких можуть зв'язувати кальцій. Найближчий до N-кінця EF-домен у всіх білків цього типу не має здатності зв'язувати кальцій. Білки NCS мають високу спорідненість до кальцію [60] і, скоріше, вони виступають як кальцієві сенсори, ніж як буфери, такі як кальбіндин чи парвальбумін, оскільки після зв'язування з кальцієм вони зазнають конформаційні зміни.

NCS-1 (або фриквенін) є найбільш раннім еволюційним представником цього типу білків, оскільки він вже ідентифікований у дрозофіли [61]. Трохи далі на еволюційній шкалі знаходяться білки, подібні до візиніну (VILIP), які представлені в геномі *Caenorhabditis elegans* та у більш пізніх видів. Білки класів C і D - рековерин і білки, активовані гуанілциклазою (GCAP) - присутні у земноводних і більш пізніх видів. І, нарешті, білки класу E, які регулюють деякі типи кальцієвих каналів (KChIP), представлені в геномі починаючи з риб.

Рековерин, перший виявлений представник сімейства білків NCS, він був виявлений лише у сітківці, де він виконує роль інгібітора родопсин-кінази, що запобігає інактивації родопсина [27]. Рековерин не єдиний білок сімейства NCS, який бере участь у передачі зорової інформації. Усі білки, активовані гуанілциклазою, зустрічаються у сітківці та беруть участь у передачі зорової інформації.

Білок NCS-1, який експресується у більшості, якщо не у всіх, типах нейронів, а також у деяких типах клітин, що не належать до нервової системи [62].

Багато NCS-білків специфічні лише для нервових клітин, проте, наприклад, KChIP2 представлений також у кардіоміоцитах [63]. В нервовій тканині білки сімейства NCS можуть бути представлені як у багатьох типах нервових клітин, наприклад, KChIP3, так і бути специфічними для певного типу нейронів (гіпокальцин характерний для пірамідальних клітин гіпокампа, а VILIP-3 - для клітин Пуркіне мозочка) [62].

1.2.3. Внутрішньоклітинна локалізація білків сімейства NCS та їх взаємодія з іонами кальцію

За винятком KChIP2, KChIP3 та KChIP4, всі білки сімейства NCS мають приєднану до N-кінця мірістоїлову групу, завдяки чому вони можуть вбудовуватися в мембрану. Вбудовування багатьох білків сімейства NCS в мембрану відбувається залежно від кальцію - біохімічний та структурний аналіз цих білків дозволяє говорити про наявність у них так званого кальцій-мірістоїлового перемикача [64]. Робота цього перемикача була добре показана на прикладі рековерина. У вільній від кальцію формі рековерина, мірістоїловий хвіст захищений всередині гідрофобної порожнини, тому при малих концентраціях кальцію рековерин не вбудовується в мембрану. При зв'язуванні рековерина з кальцієм відбуваються конформаційні зміни в молекулі, що призводить до звільнення мірістоїлового хвоста, внаслідок чого рековерин може зворотно зв'язуватися з мембраною. Наявність кальцій-мірістоїлового перемикача вивчали для всіх NCS-білків, його функціонування було продемонстровано і для білків у живих клітинах. Гіпокальцин, нейрокальцин- δ , VIP-1 та VIP-3 мають кальцій-мірістоїловий перемикач, водночас NCS-1 зв'язаний з мембраною і при низьких концентраціях кальцію [65]. Усі ці білки в основному зв'язуються з плазматичною мембраною або з апаратом Гольджі в нейронах. Навпаки, білок KChIP1 зв'язаний з мембраною і при низьких концентраціях кальцію локалізований переважно на везикулярних структурах [65].

Різні місця вбудовування NCS-білків пов'язані з різними послідовностями амінокислотних залишків на N-кінці цих білків [28], які визначають спорідненість білка до різних фосфоліпідів. Відмінності в кальцій-мірістоїловому перемикачі дозволяють NCS-білкам по-різному реагувати на кальцієвий сигнал. NCS-1 і KChIP1, що обходяться без кальцій-мірістоїлового перемикача, швидко реагують на локальне підвищення рівня кальцію поруч із місцем, куди вони зараз вбудовані. Разом з тим для білків з кальцій-мірістоїловим перемикачем для вбудовування в мембрану необхідне тривале підвищення концентрації кальцію, що дозволяє їм реагувати ли-

ше на тривалі зміни концентрації кальцію.

1.2.4. Роль NCS-білків у фізіології клітини та організму

Сучасні молекулярні біологічні дослідження, пов'язані зі зміною експресії NCS-1, продемонстрували важливість цих білків для нормального функціонування, як нервових клітин, так і деяких систем тіла в цілому.

Наприклад, підвищена експресія білка NCS-1 призвела до збільшення залежного від частоти підсилення синаптичної відповіді. Низький рівень експресії одного і того ж білка призвів до погіршення здатності навчання та пам'яті, а збільшений - навпаки [61]. Крім того, NCS-1 важливий для деяких типів екзоцитозу [66], для регулювання певних типів кальцієвих [67] та кальцієвих [68] каналів для короткочасної синаптичної пластичності нейронів гіпокампа [69]. Було показано, що білок KChIP2 бере участь у регуляції високошвидкісних (А-тип) калієвих струмів, що виникають завдяки калієвим каналам Kv4, присутніх у міоцитах та в мозку [63]. Білок KChIP3 відіграє роль репресора під час транскрипції, а його відсутність призводить до збільшення рівня динорфіна та зменшення больової реакції, крім того, при «вимкненні» (англ. knockout) цього білка спостерігається збільшення довготривалої потенціації в гіпокампальних нейронах, викликане зменшенням струму, пов'язаного з Kv4-каналами [70].

Показано, що існує зв'язок між експресією NCS-білків та деякими захворюваннями, характерними для людини. У пацієнтів із шизофренією та біполярною дезорієнтацією виявлено підвищений рівень експресії NCS-1, і були знайдені кореляти між рівнем експресії VILIP1 та амілоїдними згустками при хворобі Альцгеймера [71]. У пацієнтів-епілептиків рівень експресії KChIP3 був нижче, ніж у контрольній групі [72].

1.2.5. Значення NCS-білків для регуляції потенціал-керованих каналних комплексів

Було проведено кілька досліджень, що стосуються впливу NCS-білків на потенціалкеровані кальцієві канали. Зокрема, було виявлено, що NCS-1 відіграє роль у ланцюгу реакцій, відповідальних за інгібування P/Q-типу кальцієвих каналів G-білковим рецепторним комплексом хромафінних клітин надниркової залози [72]. Також було показано, що NCS-1 необхідний для регуляції роботи P/Q-типу кальцієвих каналів у гігантських синаптичних терміналах (calyx of Held) [73]. NCS-1 може регулювати та інші типи кальцієвих каналів; зокрема, повідомлялося про інгібіторну дію NCS-1 на N- та L-типи кальцієвих струмів [74].

Найбільш дослідженим є участь KChIP-типа NCS-білків у регуляції функціонування A-типу калієвих каналів Kv4. Дослідження субодиниць цих каналів показали, що білки KChIP-типа безпосередньо взаємодіють з каналами та, ймовірно, є складовою частиною каналного комплексу.

Одночасна трансфекція білків типу KChIP та субодиниць Kv4 призводить до формування каналних комплексів, аналогічних за провідністю і вибірковістю нативним калієвим каналам типу A; сама за себе субодиниця Kv4 не проводить струм. Крім модулювання провідності Kv4-каналів, білки типу KChIP, які належать до групи NCS-білків, впливають на концентрацію калієвих каналів на мембрані клітини [75]. Це свідчить про те, що білки KChIP додатково стимулюють транспорт субодиниць Kv4 до плазматичної мембрани. Цей факт підтверджується імуноцитохімічними та флуоресцентними дослідженнями живих клітин [76]. Було показано, що NCS-1 може зв'язуватися та змінювати властивості Kv4-каналів. Порівняно з білками типу KChIP, NCS-1 практично не впливає на трафік субодиниць Kv-4 [76].

Було продемонстровано участь деяких NCS-білків у регуляції трафіку та функціонування деяких рецепторних комплексів. Зокрема, білок NCS-1 інгібує ендцитозну інтерналізацію допамінових D-2 рецепторів [77]. Механізм інгібування включає пряму взаємодію між рецептором та зв'язаним з G-білком рецепторною

кіназою-2 GRK-2, що призводить до сповільнення реакції фосфорилування, необхідної для інтерналізації. VILIP-1 та нейрокальцин- δ інгібують реакцію фосфорилування M2-мускаринових рецепторів GRK-2 [78], хоча роль цього процесу в інтерналізації мускаринових рецепторів залишається невизначеною. Білок VILIP-1 стимулює вироблення цГМФ, що, очевидно, пов'язано з тим, що VILIP-1 взаємодіє з деякими гуанілат-циклазами, які виконують роль рецепторів для сигнальних пептидів [79].

1.2.6. Адаптація частоти потенціалів дії

Адаптацією називається збільшення інтервалу між потенціалами дії у серії таких імпульсів в межах однієї деполяризації при збільшенні кількості та тривалості збудження нейрона. Така зміна може відбуватись з різних причини і може бути викликана внутрішньоклітинними або зовнішніми факторами. Адаптація може бути виміряна як зміна інтервалу між імпульсами на початку серії в порівнянні з кінцем. Оскільки адаптація часто супроводжується змінами внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} викликаною активацією потенціалзалежних кальцієвих каналів, то адаптацію зазвичай пов'язують зі струмами повільної постгіперполяризації sAHP [80] рис. 1.1.

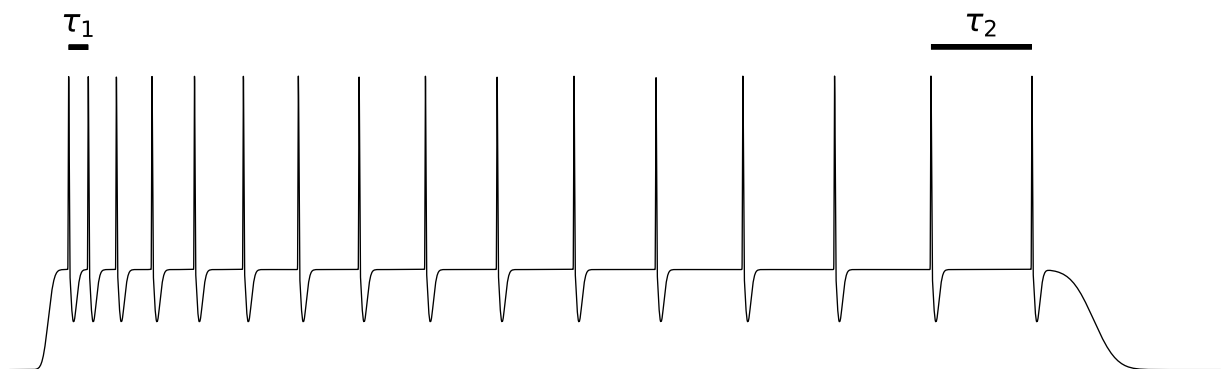


Рис. 1.1. Ілюстративне зображення адаптації частоти потенціалів дії, яка проявляється у зміні затримки між імпульсами і може бути оцінена як порівняння затримок між двома першими (τ_1) та двома останніми (τ_2) імпульсами

1.2.7. Повільна постгіперполяризація

Нейронна активність проявляється в серіях потенціалів дії (деполяризації) у відповідь на вхідний сигнал. Серія потенціалів дії може бути різною за формою, частоті, тривалості та часових затримках. Ці параметри залежать від багатьох процесів, що відбуваються в нейронах і одним з таких процесів є постгіперполяризація (англ. AHP). За результатом своєї роботи у нейроні AHP є внутрішнім негативним зворотнім зв'язком, котрий виконує інтегрування сигналів потенціалів дії цього нейрона і погіршує умови для виникнення наступних потенціалів дії шляхом зменшення внутрішнього потенціалу нейрона через протікання вихідного струму. Гіперполяризація проявляється у вигляді подібному до транз'єнту з затуханням та певною постійною часу (тривалістю). Так гіперполяризацію розділяють на швидку (англ. fAHP) з тривалістю 2..5 мс, середню (англ. mAHP) 50..100 мс та повільну (англ. sAHP) з тривалістю понад 1 с (рис. 1.4)[81]. Але ці типи гіперполяризації від-

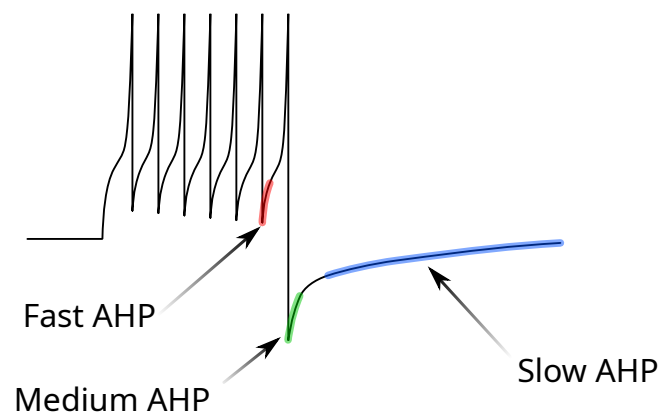


Рис. 1.2. Ілюстративне зображення потенціалу всередині нейрону з проявом гіперполяризації різних типів після деполяризації.

різняються не тільки тривалістю (постійною часу) але й величиною струму та механізмами, що призводять до їх активації та прояву. В усіх випадках гіперполяризація утворюється за рахунок вихідного K^+ -струму проти напрямку поля, але завдяки дифузії через провідність певних пасивних, але керованих каналів. Струм дифузії

fАНР проходить через K^+ -канали високої провідності (BK), струм mАНР через K^+ -канали низької провідності (SK), вони ж Kv7 K^+ канали. А от механізми активації струму sАНР залишаються невідомими.

Окремі дослідження в різних типах клітин виявляли різні K^+ канали котрі брали участь в пропусканні струму sАНР, але їх блокування не призводило до повного припинення струму sАНР. Так, у дослідженнях в пірамідальних нейронах області гіпокампу CA1 було виявлено проміжний калієвий канал ІК (KCa3.1) (див. далі) який бере участь в пропусканні струму sАНР, в інших дослідженні було виявлено зв'язок цього струму з Ca^{2+} каналами Cav1.3 (L-типу), а також ріанодиновими рецепторами (RYR) в зонах контакту ендоплазматичного ретикулуому з плазматичною мембраною, а також участь $Na^+ - K^+$ обмінників [35].

В експерименті активація струму sАНР можлива за рахунок синаптичної стимуляції серією імпульсів, або при прориві клітини піпеткою з фіксацією напруги тимчасово на вищому рівні, чи з подачею імпульсів струму через піпетку. Однак прорив клітини ускладнює дослідження струму sАНР, адже призводить до змін в складі цитоплазми, а це, в свою чергу, може призвести до часткового зникнення умов при яких можливий струм sАНР [82] і потрібно використовувати перфорований контакт з піпеткою. При подачі серії імпульсів струму через піпетку sАНР проявляється у вигляді адаптації частоти потенціалів дії (див. рис. 1.1)[83]. А при фіксації напруги зі сходиною підвищення цієї напруги тривалістю близько 1 с sАНР проявляється у вигляді вихідного струму який можна відділити від mАНР за допомогою блокаторів [39]. При такій стимуляції деполяризація не виникає через фіксацію напруги, але механізми які можуть її викликати активуються разом з АНР різних типів.

На відмінності в механізмах та природі K^+ каналів котрі лежать в основі sАНР вказують відмінності в типах блокаторів у порівнянні з іншими типами АНР. Так, на sАНР не діють блокатори aramin, TEA та інші [84]. Хоча sАНР все ж можна заблокувати за допомогою нейротоксину отрути скорпіона ChTx, агоністом β адренорецептора та іншими [85].

Такі особливості струму sАНР як затримка наростання до максимальної ве-

личини порядку 0,5 с після стимулу та суттєва постійна часу спаду $\tau \approx 1,5$ с [81, 86] не відповідають швидкій активації SK каналів [87]. Це одна з причин чому ранні дослідження були сфокусовані на пошуку Ca^{2+} механізмів які беруть участь в sАНР [86].

Далі проведено розгляд різних типів K^+ каналів асоційованих з sАНР.

Канали Kv7. Канали типу Kv7 є потенціал керованими K^+ каналами. Ці канали відомі завдяки пропусканню так званого M-струму. Керування цими каналами відбувається як за рахунок змін концентрації Ca^{2+} та і за рахунок змін напруги. Канали Kv7 набувають чутливості до концентрації Ca^{2+} завдяки приєднанню кальмодуліна, складної та різної взаємодії з ним залежно від наявних ізоформ каналу Kv7, і здебільшого супроводжується зменшенням струму цих каналів [82, 88, 89]. Відомо, що ізоформи цього типу каналів Kv7.2, Kv7.3 та Kv7.5 експресуються в відділах гіпокампа CA1, CA3 та зубчастій звивині [32, 37, 38, 90]. Отримана завдяки приєднанню кальмодуліна чутливість до концентрації Ca^{2+} можливо призводить до того, що струм каналів Kv7 стає тривалим і бере помітну участь в sАНР. Так, в окремих роботах за рахунок блокування каналів Kv7 було показано, що вони пропускають суттєву долю струму sАНР у пірамідальних нейронах відділу CA1 гіпокампу [37]. А в інших роботах доля струму каналів Kv7 в загальному струмі sАНР була відсутня або не суттєва [86, 90]. Можливо це пояснюється тим, що без додаткових взаємодій напруга яка потрібна для відкриття цих каналів знаходиться поза межами діапазону в якому відбувається sАНР, а при взаємодії з фосфатидилінозитол 4,5-бісфосфатом (PIP₂) відкриття цих каналів і участь у пропусканні струму sАНР можливі [38, 91, 92].

Канали SK1. Канали SK1 (KCa2.1) є ізоформою K^+ каналів SK, що можуть брати участь в пропусканні струму sАНР [93]. Ці канали не чутливі до напруги. Як у випадку Kv7 повільний характер відкриття цих каналів також забезпечується внаслідок чутливості до концентрації Ca^{2+} . Ця чутливість набувається ними завдяки взаємодії з Ca^{2+} каналами L-типу. Це твердження опирається на виявлений функціональний зв'язок цих каналів [93], кореляцію в їх взаємному розташуванні у клітині

[94] та часовий перебіг відкривання цих каналів, що відповідає перебігу sАНР [94]. Але експерименти у нейронах з відсутніми каналами SK1 дали негативний результат щодо перевірки причетності цих каналів до пропускання струму sАНР [95].

Канали ІК. Канали ІК (інші назви KCa3.1, SK4 або по назві гена KCNN4 яким кодується) належать до тої є генної родини, що й SK1..3 [96], вони присутні не тільки в гіпокампі, а ще, наприклад в ентеральній нервовій системі [97]. Чутливість до концентрації Ca^{2+} цими каналами досягається завдяки приєднанню кальмодуліну [98, 99] та за допомогою зв'язку з Ca^{2+} -каналом Т-типу (Cav3.2) [100, 101]. На відміну від інших K^+ каналів сімейства SK вони мають в рази більшу провідність та іншу чутливість до блокаторів. Деякі з блокаторів ІК каналів дозволили заблокувати струм sАНР в нейронах гіпокампа [102].

Натрій-калієві іонні обмінники. Окремі дослідження виявили участь $Na^+ - K^+$ обмінників у процесі sАНР [103, 104]. Вплив цих іонних обмінників на sАНР сильно залежить від попередньої активності нейрона, що ускладнює визначення тривалості sАНР з використанням блокаторів K^+ каналів [105]. Також на долю струму sАНР опосередкованого $Na^+ - K^+$ обмінниками впливає та часовий перебіг суттєво впливає температура, вміст іонів у піпетці для прориву клітини та вимивання окремих компонентів потрібних для роботи цих обмінників [45, 105].

Аналогічну роль як у кальмодуліна в додаванні чутливості K^+ каналам до концентрації Ca^{2+} може виконувати білок гіпокальцин [27] (див. далі).

1.2.8. Гіпокальцин

Гіпокальцин - це білок, який належить до сімейства NCS-білків і має однако-ву послідовність амінокислот у щурів, мишей, корів та людини [106]. Гіпокальцин має дві функціональні ділянки, здатні зв'язувати іони кальцію (EF-домени), крім того, до N-кінця гіпокальцина «прикріплена» гідрофобна мірїстоїлова група.

Наявність кальцій-мірїстоїлового «перемикача» дозволяє гіпокальцину переважно знаходитись у цитозолі при базовій концентрації кальцію і вбудовуватись у плазматичну мембрану та елементи апарату Гольджі у відповідь на збільшення

концентрації кальцію [27, 65] рис. 1.3. Гіпокальцин експресується переважно в пірамідальних нейронах CA1 відділу гіпокампа [62]. Вважається, що гіпокальцин бере участь у регуляції експресії генів за допомогою каскаду реакцій, пов'язаних з MAPK - мітоген-активованою протеїнкіназою. У мишей, дефіцитних за гіпокальцином (нокаут, $HPCA^{-/-}$), спостерігалось зменшення фосфорилування білка CREB у відповідь на активацію NMDA каналів або деполяризацію мембрани. Зменшена активація білка CREB можлива через неправильну роботу ERK-каскаду, оскільки блокатор кінази мітоген-активованого білка, PD98059, блокував викликане стимулюванням фосфорилування білка CREB у гіпокампальних зрізах у контрольних мишей, але не у $HPCA^{-/-}$ мишей [107]. Подальше дослідження кальцій-залежного Ras/Raf/MEK/ERK сигнального каскаду показало відсутність прямої взаємодії між гіпокальцином і Raf-1 або MEK-кіназою.

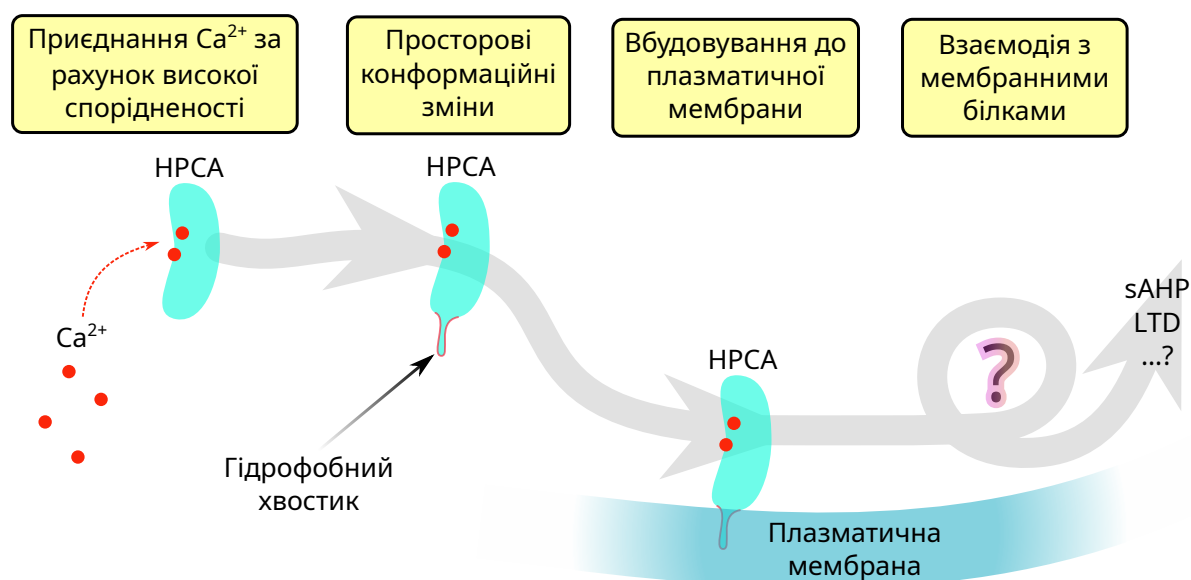


Рис. 1.3. Функціонування білка гіпокальцина в нейроні.

Виявлено, що гіпокальцин не впливає на активацію Ras. Однак, миші $HPCA^{-/-}$ демонстрували знижену активацію кінази Raf-1 та ERK, спричинену активацією NMDA каналів або деполяризацією. Це можна пояснити, якщо припустити, що гіпокальцин регулює інший каскад реакцій, що призводить до активації

кінази Raf-1, наприклад, шляхом взаємодії з В/Акт протеїнкіназою та білком 14-3-3 [108]. За допомогою двохгібридного скринінгу в дріжджах було показано, що гіпокальцин є можливим посередником при взаємодії двох кіназ – MLK-2 та MLK-3 сімейств [109]. Ця взаємодія між гіпокальцином та MLK-кіназами не є кальційзалежною та не впливає на активність MLK кіназ в інших трансфікованих гіпокальцином клітинах. Слід зазначити, що разом з невеликою ГТФ-азою Cdc42 гіпокальцин збільшує кальційзалежну активацію фосфоліпази D(PLD) [110]. В клітинах NIH3T3 було показано, що активація PLD, спричинена збільшеною експресією гіпокальцина, пов'язана з активацією ERK каскаду [111]. В клітинах гіпокампулярної клітинної лінії H19-7, збільшена експресія гіпокальцина призводила до підвищеної експресії NeuroD, базового спіраль-петля-спіраль-транскрипційного фактора, що супроводжувалося помітним збільшенням нервових відростків. Введення гіпокальцинової siRNA, яка блокує синтез гіпокальцина, в клітки H19-7 призводило до повного блокування синтезу NeuroD [112]. З усього вищезазначеного випливає, що гіпокальцин впливає на експресію генів шляхом участі в регулюванні MAPK-сигнального каскаду. Активація MAPK-каскаду та пов'язане з цим збільшення експресії деяких генів та, як наслідок, синтез відповідних білків, є необхідними механізмами для забезпечення тривалої синаптичної пластичності, що лежить в основі навчання та пам'яті.

Вважається, що гіпокамп, який є частиною мозку, що відповідає за навчання та пам'ять, зокрема за розпізнавання місця розташування в просторі [113]. Це повністю підтверджується з тим, що у мишей $HPCA^{-/-}$ спостерігаються проблеми з просторовою та робочою асоціативною пам'яттю [107]. Крім того, гіпокальцин бере участь у формуванні NMDAR-залежної довготривалої депресії, LTD [114]. Гіпокальцин прямо взаємодіє з β -субодиницею клатринового адапторного комплексу AP2, який зв'язує клатрин з цитозольними доменами мембрано-зв'язаних білків, що призначені для інтерналізації [115]. У гіпокампулярних нейронах цей гіпокальцин-AP2 комплекс взаємодіє виключно з GluR2-субодиницею AMPA рецептора [114]. Кальційзалежний ендоцитоз AMPA рецепторів є процесом, що лежить в основі фор-

мування NMDAR-залежної LTD [116]. Введення мутантного гіпокальцина без всіх структур EF-доменів у пірамідальні нейрони відділу CA1 блокувало синаптично-викликану LTD, залишаючи без змін опосередковану AMPA-рецепторами синаптичну передачу та процеси, пов'язані з LTP [114]. У гіпокампальних нейронах гіпокальцин є ключовим проміжним зв'язком між входом Ca^{2+} , спричиненим серією ділянок дії, та активацією калієвих каналів, які опосередковують струм повільної після-гіперполяризації sAHP (рис. 1.4) [33]. Коротка деполяризація, достатня для виникнення sAHP-струму у мишей дикого типу, не викликала струм sAHP у мишей $\text{HPCA}^{-/-}$. Введення гіпокальцина в культуру гіпокампа кроликів призводило до яскраво вираженого струму sAHP у нейронах, тоді як нейрони з експресованим мутантом гіпокальцина з порушеним мірістоїловим хвостиком демонстрували малий струм sAHP, схожий на той, що спостерігався у нетрансфікованих нейронах. При інфікуванні нейронів верхніх шийних гангліїв гіпокальцин-експресуючими вірусами спостерігалися KCNQ2 - та KCNQ3 -опосередковані струми та sAHP-подібний струм [37], що демонструє зв'язок між можливою взаємодією гіпокальцина та KCNQ2/3 та активацією калієвих каналів, які опосередковують у нейронах гіпокампа струм sAHP.

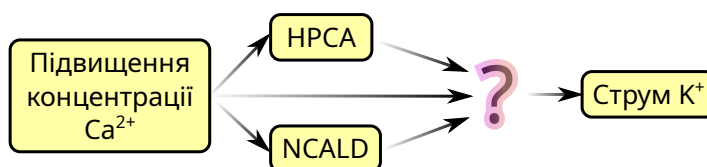


Рис. 1.4. Струм повільної постгіперполяризації sAHP викликаний переміщенням білка гіпокальцина HPCA та нейрокальцину- δ NCALD до плазматичної мембрани.

У деяких дослідженнях було показано, що гіпокальцин володіє нейропротекторними властивостями. Гіпокальцин взаємодіє з білком-інгібітором нейронного апоптозу (NAIP) [51]. Підвищена експресія лише одного гіпокальцина не збільшувала виживання клітин, але одночасне підвищення експресії гіпокальцина і NAIP збільшувало виживання нейронів в присутності кальцієво-індукованих агентів апоптозу, таких як іономіцин і тапсигаргін. Коекспресія гіпокальцина і NAIP рятує

клітини нейробластоми від кальцієво-індукованого апоптозу, при цьому не суттєво впливаючи на загибель симпатичних нейронів, викликану відсутністю фактору росту нерва (NGF) [117]. У мишей $НРСА^{-/-}$ систематичне введення каїнатної кислоти призводило до збільшення смерті нейронів, спричиненої епілептичним нападом, в відділі СА3 гіпокампа, супроводжуваної підвищеною активацією caspase-3 [118]. Крім того, введення квінолінової кислоти NMDAR-агоніста в зону СА1 гіпокампа призводило до загибелі значної кількості нейронів відділу СА1. В культурі, нейрони $НРСА^{-/-}$ мали гірше виживання, і в них спостерігалась більша активність caspase-12, ніж у нейронів $НРСА^{+/+}$, що, очевидно, пов'язано зі збільшенням ER-стресу [118]. Участь гіпокальцина в процесах, пов'язаних з виведенням Ca^{2+} з клітини, було показано за допомогою експресуючих гіпокальцин COS7 клітин. Таким чином, гіпокальцин захищає гіпокампальні нейрони від різних пошкоджень, спричинених перевантаженням кальцію, шляхом взаємодії з NAIP, зменшення ER-стресу та підтримання рівня виведення кальцію з клітини. Також було показано зв'язок гіпокальцина з посиленням диференціації нейронів і одночасним пригніченням диференціації астроцитів [119].

Гіпокальцин модулює активність аденіліл- та гуаніліл-циклаз (Асс та GСs) в нюховому епітелії, в місцях розташування війок дорослих нюхових нейронів. У війках нюхових нейронів речовина з запахом активує АСs та GСs, що призводить до утворення цАМФ та цГМФ. Підвищення концентрації цих циклічних нуклеотидів призводить до активації цАМФ- та цГМФ-керованих каналів та введення іонів натрію та кальцію, що викликає генерацію потенціалу дії [120].

У нюхових війках при низьких концентраціях Ca^{2+} гіпокальцин збільшує активність АС, але цей ефект зменшується при високих концентраціях Ca^{2+} [121]. При низьких концентраціях Ca^{2+} обробка протеїнкіназою нюхових війок зменшувала ефект гіпокальцина на активність АС, проте гіпокальцин збільшував активність АС як у контролі, так і для оброблених протеїнкіназою нюхових війок. При високих концентраціях Ca^{2+} лише в оброблених протеїнкіназою нюхових війках спостерігалось значне збільшення активності АС в присутності гіпокальцина. Вхід іонів каль-

цію у відповідь до застосування ароматизатора призводив до фосфорилування Ас, що, в свою чергу, може призводити до підтримки низького рівня активності АС. Можливо, ці процеси є частиною механізму нюхової адаптації. На відміну від впливу на АС, гіпокальцин значно зменшував активність GC, виключно при концентраціях вільного кальцію від 1 до 10 нмоль/л [121]. Вплив гіпокальцина на активність GC був тим меншим, чим більшою була концентрація іонів кальцію [106]. У дослідженнях з використанням мишей $HPCA^{-/-}$ було показано, що внесок гіпокальцина у GC-опосередковану систему перетворення та передачі сигналу становить приблизно 30 % [106]. Таким чином, гіпокальцин може брати участь у тонкій настройці, опосередкованій циклічними нуклеотидами системи розпізнавання стимулу та нюхової адаптації в нюховому епітелії.

1.2.9. Первинна автосомно-рецесивна дистонія DYT2

Дистонія це хвороба, що супроводжується порушенням моторики рухів у людини та проявляється у формі неконтрольованих рухів, тремору, незвичних поз під час сну. Первинна автосомно-рецесивна дистонія (DYT2) це один з випадків цієї хвороби, який був ізольований та досліджений, в результаті чого були виявлені міссенс мутації білка гіпокальцина (рис. 1.5), що передавались аутосомно-рецесивним успадкуванням [25]. Було висунуто гіпотезу, що ці мутації порушують передачу Ca^{2+} сигналу цим білком. За результатами детальних досліджень цих мутацій не було виявлено порушень в структурі білка гіпокальцина, проте було виявлено порушення його олігомеризації [26]. Було показано, що нейронах, які експресують мутантні варіанти білка гіпокальцина в порівнянні з нейронами з диким типом цього білка спостерігалось надмірне підвищення концентрації Ca^{2+} , які входять через керовані напругою Ca^{2+} канали типу CaV2.

У хворих на первинну автосомно-рецесивну дистонію DYT2 було виявлено три мутації у гені білка гіпокальцина T71N, N75K та A190T. Перші дві з цих мутацій призводять до заміни амінокислот у функціональних EF-доменах білка гіпокальцина (рис. 1.6, 1.7). А заміна N75K присутня в особливій позиції EF-домену - одному

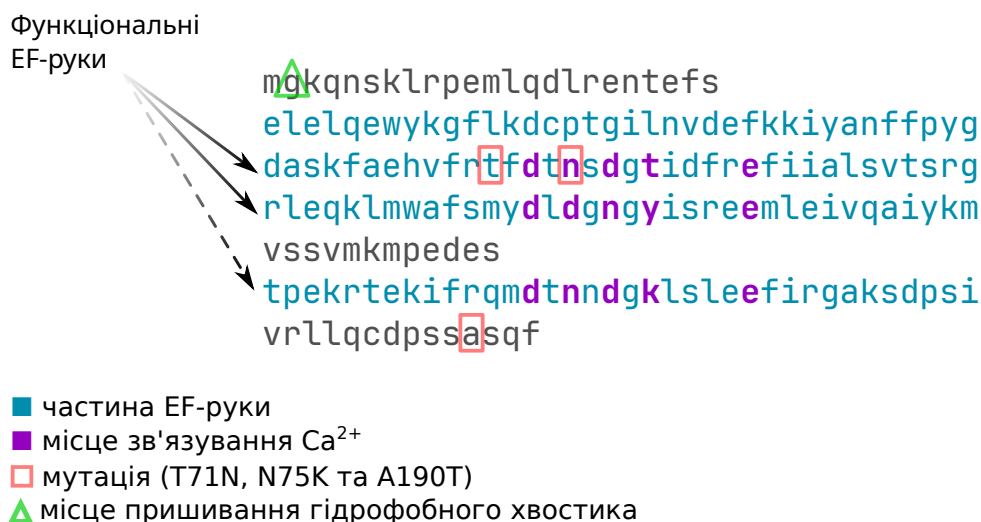


Рис. 1.5. Мутації в гені білка гіпокальцина, що присутні у хворих на первинну автосомно-рецесивну ізольовану дистонію DYT2.

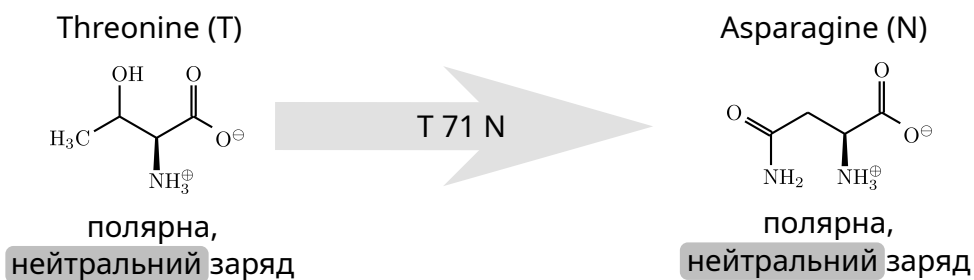


Рис. 1.6. Заміна амінокислоти при мутації гіпокальцина T71N.

з п'яти місць зв'язування Ca²⁺. Щобільше, ця мутація супроводжується заміною амінокислоти з нейтрально зарядженою функціональною групою на амінокислоту з позитивно зарядженою функціональною групою, що може впливати на спорідненість до Ca²⁺. Мутація A190T не представляє інтересу, адже не зачіпає принципових місць білка гіпокальцина і була досліджена в інших роботах [26]. В інших роботах були виявлені інші мутації пов'язані з білком гіпокальцином, що призводили до експресії усіченого білка [122] у хворих на дистонію.

Таким чином, попередня оцінка вказує на те, що мутація N75K викликає пі-

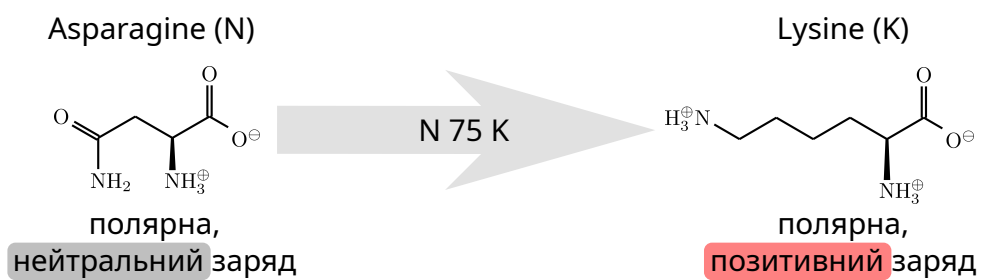


Рис. 1.7. Заміна амінокислоти при мутації гіпокальцина N75K.

дозру як така, що призводить до функціональних порушень в роботі білка гіпокальци-
цина. Проте, ця гіпотеза вимагає перевірки.

Розділ 2. Матеріали та методи

2.1. Клітинна культура НЕК-293

Клітини НЕК-293 були отримані з культурального банку клітин Національної Академії Наук України (інститут фізіології ім. О.О. Богомольця). Клітини НЕК-293 були культивовані на круглих покривних скельцях в середовищі DMEM з додатковим вмістом 10 % фетальної бичачої сироватки та 0,25 % гентаміцину. Клітини було розміщено в плашці з 12 лунками при температурі 37 °C та вологій атмосфері з концентрацією CO₂ 5 %. Заміна культурального середовища здійснювалась кожні 3..5 діб, а клітини розділялись при необхідності. Клітини були трансфіковані з додаванням 0,3..0,5 мг ДНК на скельце з використанням «Lipofectamine 3000» та при приблизному заповненні скельця клітинами в 75 %. З подальшим культивуванням перед експериментом впродовж 1..3 діб.

2.2. Клітинна культура РС-12

Клітини РС-12 були отримані з культурального банку клітин Національної Академії Наук України (інститут фізіології ім. О.О. Богомольця). Клітини РС-12 були культивовані на круглих покривних скельцях в середовищі DMEM з додатковим вмістом 10 % фетальної бичачої сироватки, 5 % кінської сироватки та 0,25 % гентаміцину. Клітини було розміщено в плашці з 12 лунками при температурі 37 °C та вологій атмосфері з концентрацією CO₂ 5 %. Заміна культурального середовища здійснювалась кожні 3..5 діб, а клітини розділялись при необхідності. Клітини були трансфіковані з додаванням 0,3..0,5 мг ДНК на скельце з використанням «Lipofectamine 2000» та при приблизному заповненні скельця клітинами в 75 %. З подальшим культивуванням перед експериментом впродовж 1..3 діб.

2.3. Гіпокампальні нейрони

Всі виконані процедури в роботі були схвалені комітетом з наукової етики. Нейрони були виділені з новонароджених щурів «Wistar» (0..1 постнатальних діб;

86 тварин обох статей). Тварини були вбиті швидкою декапітацією без анестезії. Всі щури були з віварію Інституту Фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Гіпокамп щурів був ферментативно-дисоційований з використанням трипсину. Далі суспензія клітин з приблизною густиною $3..5 \times 10^5$ клітин/см³ була посаджена на покривні скельця з шаром ламініна та полі-L-орнітіна. Клітини підтримувались за допомогою середовища, що складалось з мінімально необхідного розчину: 1 % коняча сироватка, 1 % добавки N2 та 2 % B27. Це середовище знаходилось при температурі 37 °C в вологій атмосфері з концентрацією CO₂ у 5 % як описано в [29].

2.4. Препарування спинного мозку щурів

Всі виконані процедури в роботі були схвалені комітетом з наукової етики. Препарат спинного мозку був отриманий з щурів «Wistar» (7..14 постнатальних діб). Всі щури були з віварію Інституту Фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Тварини були вбиті швидкою декапітацією без анестезії. Після чого хребет тварин був виділений та поміщений до чашки Петрі з розчином сахарози з рН = 7,4 та вмістом: 200 ммоль/л сахарози, 26 ммоль/л NaHCO₃, 11 ммоль/л глюкози, 7 ммоль/л MgCl₂, 2 ммоль/л KCl, 1,2 ммоль/л NaH₂PO₄, 0,5 ммоль/л CaCl₂. Розчин підтримувався при кімнатній температурі та насичувався «Карбогеном» (95 % O₂ та 5 % CO₂). Далі було виділено спинний мозок, тверда мозкова оболонка розрізана по вентральній середній лінії, що дало змогу розділити спинний мозок на дві частини. Половина спинного мозку була зафіксована за допомогою клею на металевій основі для проведення експериментів [3].

2.5. Плазмід

Трансфекція клітин проводилась з використанням плазмід НРСА-YFP, НРСА-CFP, НРСА та YFP, CFP були приготовані як описано в [65].

Для створення асоційованих з дистонією мутації, T71N та N75K, були використані праймери наведені в табл. 2.1. Мутації були створені з використанням набору для сайт-специфічного мутагенезу «QuikChange II XL» за стандартними про-

токолами. Всі конструкти були перевірені секвенуванням.

Перелік праймерів використаних для отримання мутацій
T71N та N75K

Табл. 2.1

T71N	Fwd CAT GTC TTC CGC AAT TTT GAC ACC AAC -3', Rev. 5'- GTT GGT GTC AAA ATT GCG GAA GAC ATG-3'
N75K	Fwd 5'- ACT TTT GAC ACC AAA GCG ACG GCA CCA -3', Rev5'- TGG TGC CGT CGC TTT GGT GTC AAA AGT -3'

2.6. Трансфекція

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

2.7. Завантаження клітин препарату спинного мозку щурів кальцієвим барвником

В експериментах з препаратом спинного мозку (див. п. 2.4) нейрони були завантажені Ca^{2+} -чутливим барвником «Fura-2». Для завантаження барвник додавався в розчин препарату спинного мозку разом з детергентом «Pluronic» «F-127» для солюбілізації молекул барвника [3]. Барвник проникав до цитозолу через плазматичну мембрану за рахунок солюбілізації детергентом та наявних ацетоксиметиллових (АМ) ефірних груп, котрі далі відсікались ендогенними естеразами всередині клітини, що не давало змоги молекулам барвника вийти за межі клітини через плазматичну мембрану. Знімання зображень флуоресценції даного барвника проводилось на мікроскопі «BX50» як описано в [3].

2.8. Ретроградне завантаження барвника до гангліонарних клітин сітківки щурів

Ретроградне завантаження барвника «Fluorogold» до гангліонарних клітин сітківки проводилось на зафіксованих у стереотаксії дорослих щурах «Wistar» вагою 0,2..0,3 кг з використанням анестезії, шляхом ін'єкцій 200 нл 2 % розчину барвника до верхнього горбика (*superior colliculus*) кожної півкулі [5].

2.9. Електрофізіологічні реєстрації

Візуалізація нейронів вирощених в культурі проводилась з використанням інвертованих мікроскопів («Olympus» IX70 та IX71). Спрощена схема мікроскопа показана на рис. 2.1. Перевагою інвертованого мікроскопа є те, що випромінювання

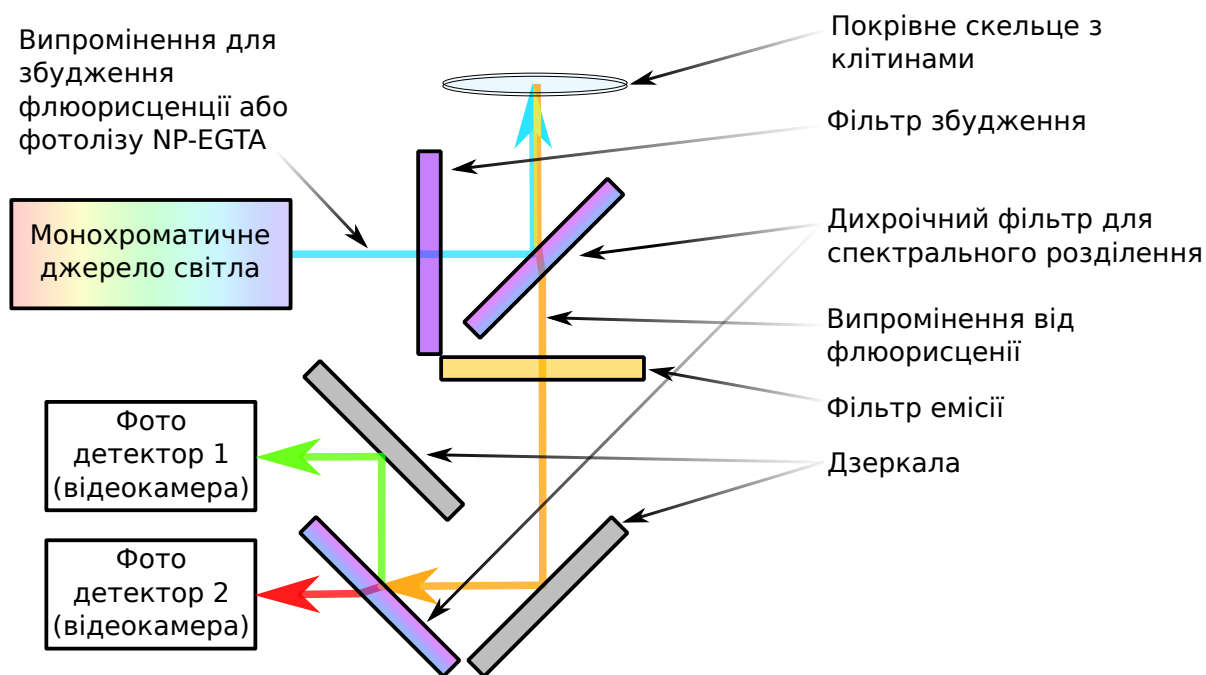


Рис. 2.1. Функціональна схема мікроскопа.

не проходить через товщу розчину, що принципово для УФ випромінювання. Записи активності нейронів в режимі як фіксації струму так і фіксації напруги були отримані за допомогою підсилювача з АЦП/ЦАП «ЕРС-10/2» і програмного забезпечення «НЕКА PatchMaster» (НЕКА, Germany). Основний склад зовнішньоклітинного

розчину наведений в табл. 2.2. Склад внутрішньоклітинного розчину наведений в

Склад зовнішньоклітинного розчину

Табл. 2.2

Речовина	Концентрація, моль/л	Опис
Базові компоненти		
Na Cl	150×10^{-3}	
K Cl	$2,5 \times 10^{-3}$	
Ca Cl ₂	2×10^{-3}	
Mg Cl ₂	1×10^{-3}	
HEPES	10×10^{-3}	
глюкоза	10×10^{-3}	
Блокатори		
габазин	5×10^{-6}	для блокування GABA _A рецепторів, додавався кожного разу
APV	40×10^{-6}	для блокування іонотропних глутаматних NMDA рецепторів при вимірах sAHP
CNQX	10×10^{-6}	для блокування іонотропних глутаматних AMPA рецепторів при вимірах sAHP
Параметри розчину: pH = 7,3; осмотичність = 325..330 мосм		

табл. 2.3.

Реєстрації трансфікованих нейронів проводились у режимі «ціла клітина», а транслокації гіпокальцина викликались деполяризацією з -70 до 0 мВ на різні проміжки часу від $0,125$ с до 4 с. Електроди для петч-клемпу мали опір $2..4$ МОм. Реєстрації мембранного потенціалу та мембранного струму фільтрувались НЧ фільтром з частотою зрізу 3 кГц і з частотою дискретизації 20 кГц. Записи зі струмом витоку понад 200 пА або опором доступу (послідовним опором) більш як 30 МОм

Склад внутрішньоклітинного розчину

Табл. 2.3

Речовина	Концентрація, моль/л	Опис
Базові компоненти		
K-Methansulfonate	135×10^{-3}	
K Cl	10×10^{-3}	замінювався на Cs Cl для експериментів з реєстрацією транслокації в режимі фіксованої напруги
EGTA	$0,2 \times 10^{-3}$	
Mg ATP	4×10^{-3}	
Na GTP	$0,4 \times 10^{-3}$	
Na-Phosphocreatin 5	5×10^{-3}	
HEPES	10×10^{-3}	
Блокатори		
QX-314	$3..5 \times 10^{-6}$	внутрішньоклітинний блокатор натрієвих каналів для експериментів з реєстрацією транслокації в режимі фіксованої напруги
Параметри розчину: pH = 7,3; осмотичність = 300..305 мосм		

відкидались. Всі експерименти проводились при кімнатній температурі 24 °С.

2.10. Флуоресцентні реєстрації транслокації білків

Запис зображень з плином часу для клітин НЕК та гіпокампальних нейронів трансфікованих білками з флуоресцентними мітками проводився з використанням системи «TILL Photonics», встановленої на інвертованих мікроскопах («Olympus» IX70 або IX71). Використовувались масляні імерсійні об'єктиви ($\times 40$ з числовою апертурою 1,35 або $\times 60$; 1,25). Програмно апаратний комплекс «TILLvision» або

«LiveAcquisition» виконував контроль виконання протоколу стимуляції та відеознімання. Для запису зображень використовувались ПЗЗ відеокамера «Imago» або «QImaging Exiblue» типово з частотою відеознімання 0,5..2 Гц. Обробка зображень здійснювалось за допомогою програм (скриптів) написаних у пакетах програмування та обробки даних «Matlab», «TILLvision» та на мові програмування «Python». Ці скрипти порівнювали відносні зміни інтенсивності з плином часу в порівнянні з початковим рівнем для виявлення місць транслокації флуоресцентно-мічених білків. Величина транслокації визначалась як відносна зміна інтенсивності ΔF флуоресценції мітки, яка пришита до досліджуваного білка, до її початкової інтенсивності F_0 , тобто до початку електрофізіологічної чи оптичної стимуляції

$$\frac{\Delta F}{F_0}. \quad (2.1)$$

Просторово-часова характеристика транслокації була показана на основі зміни середньої інтенсивності флуоресценції міченого білка в областях інтересу (ROI). Записані камерою зображення з однаковим часовим кроком оброблялись як відеоряд у вигляді тензора. Области інтересу визначались шляхом створення з цього основного відеоряду пари відеопослідовностей. Ці дві послідовності зсунуті по часу на 2..7 кадрів між собою та утворені усередненням сусідніх по часу 2..5 кадрів. Кількість кадрів для усереднення в обох відео послідовностей однакова, зсув постійний для одної реєстрації. Далі від зсунутої по часу відеопослідовності №2 представленої у вигляді тривимірного тензора віднімався тензор відеопослідовності №1, в результаті чого було утворено диференційну відеопослідовність (рис. 2.2). Для зменшення шуму до результату віднімання було застосовано просторовий фільтр по двох координатах з ядром 3×3 . Місця транслокації були знайдені як цільні двовимірні області на диференційному відеоряді для яких зміна інтенсивності флуоресценції була більше 2% в порівнянні з базовою інтенсивністю. Для візуальної наочності позитивні зміни інтенсивності були виділені червоним кольором, а негативні - зеленим. Вицвітання флуоресцентної мітки було компенсоване [29].

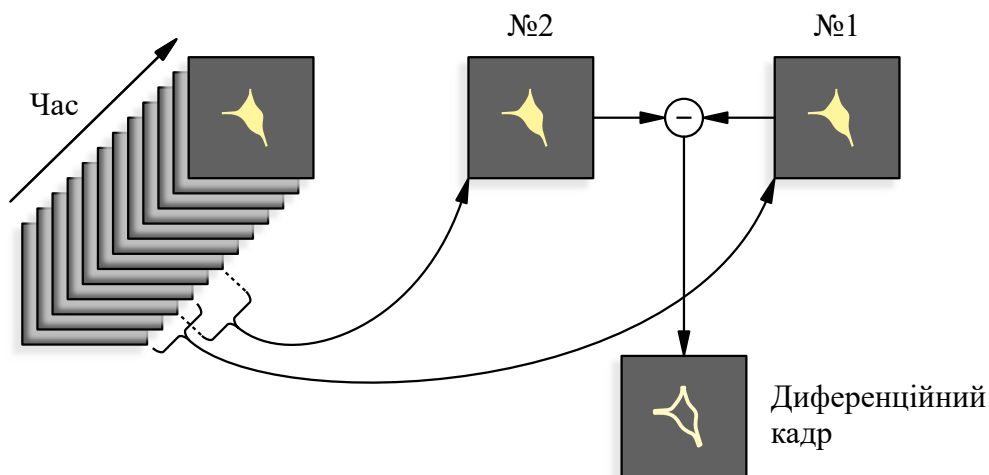


Рис. 2.2. Ілюстративний приклад отримання одного диференційного кадру з зареєстрованого відеоряду

2.11. Кероване вивільнення іонів кальцію та реєстрація флуоресценції в клітинах НЕК-293

В клітини НЕК-293 було завантажено чутливий до концентрації Ca^{2+} (далі $[\text{Ca}^{2+}]$) барвник «Fura Red» та фотодеструктивний буфер Ca^{2+} «NP-EGTA». Концентрації цих речовин були однакові і рівні 5 мкмоль/л, а речовини були з ацетоксиметилловими (AM) ефірними групами, що дозволяло їм проникати через цитоплазматичну мембрану клітин. При завантаженні клітини витримувались при температурі 37 °С впродовж 30 хвилин для досягнення однакової швидкості завантаження в кожному експерименті. Після цього зовнішньоклітинний розчин з завантажуваними реагентами був замінений чистим зовнішньоклітинним розчином. Внутрішньоклітинна концентрація Ca^{2+} (далі $[\text{Ca}^{2+}]_i$) була керовано-збільшена внаслідок послівних УФ-спалахів (тривалістю 500..1000 мс, з довжиною хвилі 335 нм та частотою повторення 0,1 Гц) від керованого монохроматичного джерела світла «TILL Photonics Polychrome». Поточна величина $[\text{Ca}^{2+}]_i$ вимірювалась з тою самою частотою що й транслокація білків (0,5..2 Гц) з використанням завантаженого барвника «Fura Red». Оскільки цей барвник зменшує інтенсивність при збільшенні $[\text{Ca}^{2+}]_i$, то

зміни в $[Ca^{2+}]_i$ були представлені як

$$\frac{F_0 - F}{F} = \frac{\Delta F}{F}, \quad (2.2)$$

де F_0 є величиною інтенсивності флуоресценції до початку вивільнення Ca^{2+} , а F - поточна інтенсивність. Збільшення $[Ca^{2+}]_i$ призводить до зростання $\Delta F/F$. Залежність лінійна лише при $\Delta F \ll F$. Таким чином $\Delta F/F$ являє собою відносну і нелінійну оцінку $[Ca^{2+}]_i$. Однак у випадку одночасної спільної трансфекції (ко-трансфекції) мічені WT НРСА та досліджуваний мутантний варіанти можуть бути експресовані в одній й тій самій клітині. В такому випадку білки зазнають впливу однакового просторово-часового розподілу $[Ca^{2+}]_i$ при керованому вивільненні Ca^{2+} (рис. 3.25..3.37). Таким чином можна визначити залежність транслокації білків від $[Ca^{2+}]_i$ у вигляді функції залежної від $\Delta F/F$ і виконати порівняти для різних клітин (рис. 3.34, 3.36, 3.35, 3.37).

Кількість та тривалість УФ-спалахів були обрані для досягнення суттєвого збільшення $[Ca^{2+}]_i$ і для майже повного керованого вивільнення Ca^{2+} зв'язаного NP-EGTA. При цьому NP-EGTA руйнується (рис. 2.3) і не має суттєвого впливу на буферну ємність по Ca^{2+} при завершенні транзйенту вивільнення цих іонів викликано-го УФ-спалахами. Спаляхи повторювались поки спостерігалось збільшення $[Ca^{2+}]_i$ в клітинах НЕК-293, які рівномірно експресували WT НРСА або мутантний варіант. Відсутність подальшого зменшення інтенсивності флуоресценції «Fura red», яка залежить від $[Ca^{2+}]_i$, викликана вичерпуванням NP-EGTA, а не насиченням «Fura red». Це твердження впливає з того, що амплітуда транзйенту вивільнення Ca^{2+} в сусідніх нетрансфікованих клітинах, які зазнають впливу тої самої послідовності УФ-спалахів, була суттєво більша (рис. 3.13).

Для кожного експерименту було підготовлено більше 3 клітинних посадок.

2.12. Порівняння буферної ємності по іонам кальцію

Певна буферна ємність K_X по Ca^{2+} для певного буфера X при підвищенні $[Ca^{2+}]_i$ визначається як відношення збільшення концентрації Ca^{2+} , що зв'язані буфером, $\Delta[XCa]$, до величини збільшення Ca^{2+} , $\Delta[Ca^{2+}]_i$ [123]:

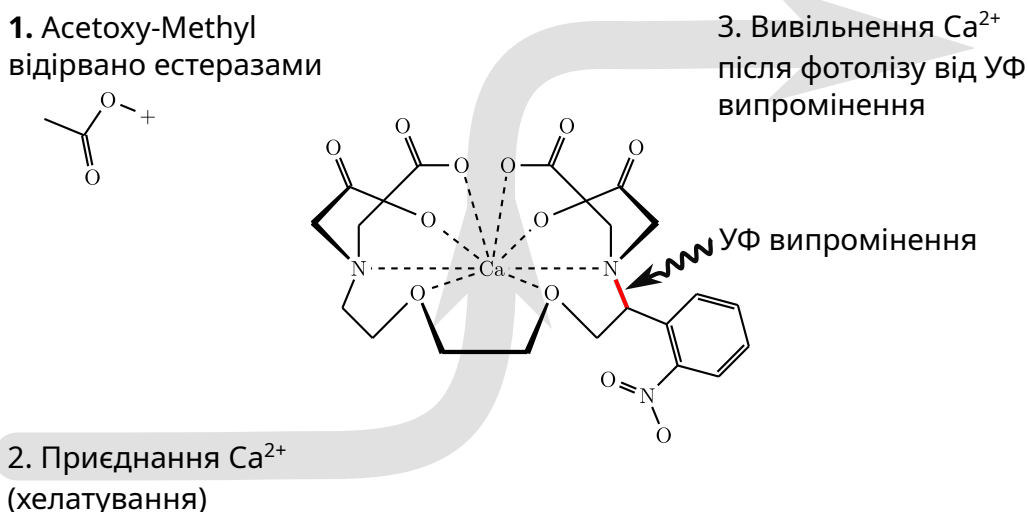


Рис. 2.3. Схема роботи фотодеструктивного Ca^{2+} -буферу NP-EGTA-AM.

$$K_X = \frac{\Delta[\text{X Ca}]}{\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i} \quad (2.3)$$

Якщо вважати, що швидкість насичення клітини NP-EGTA та «Fura red» не залежить від експресії конкретного екзогенного білка, то будь-яка різниця в транзйентах зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$ для різних варіантів НРСА буде обумовлена різницею буферної ємності цих білків. Тоді амплітуда A та постійна часу спаду τ транзйенту зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$ може бути пов'язана з буферною ємністю по Ca^{2+} екзогенного буфера (наприклад, WT НРСА, K_{WT}) наступними рівняннями [124]

$$A = \frac{\Delta[\text{Ca}^{2+}]_T}{1 + K_T + K_{\text{WT}}} \quad (2.4)$$

$$\tau = \frac{1 + K_T + K_{\text{WT}}}{\gamma} \quad (2.5)$$

де $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_T$ це збільшення загальної (Total) концентрації Ca^{2+} , як вільних, так і зв'язаних буфером, внаслідок керованого вивільнення з NP-EGTA, K_T – сума буферних ємностей по Ca^{2+} всіх буферів: ендогенних, NP-EGTA, «Fura red», а γ – швидкість викиду Ca^{2+} з клітини. Таким чином, амплітуда транзйентів зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$, A є обернуто залежною від K_{WT} , в той час, як для постійної часу спаду τ ця залежність лінійна.

В даній роботі було використано відмінності в часовому перебігу транзйенту спаду $[Ca^{2+}]_i$ для виявлення різниці в буферній ємності по Ca^{2+} в цитозолі. Для таких кількісних порівнянь можна було б використовувати A і τ . Однак виміряна амплітуда транзйенту спаду $[Ca^{2+}]_i$ була представлена як відносна зміна інтенсивності флуоресценції $\frac{F_0-F}{F}$ (рис. 3.13..3.37). А остання величина мала системну та важку для оцінки похибку обумовлену перекриванням спектрів «Fura red» та використаних флуоресцентних міток CFP та YFP. Це перекривання дає суттєвий вклад вимірної інтенсивності флуоресценції мічених білків до величини F_0 в спектральному каналі «Fura red». В клітинах з високим рівнем експресії білків, флуоресцентно-мічених за допомогою CFP та YFP, перекривання спектрів призводило до того, що інтенсивність флуоресценції міток складала 70..80 % величини F_0 в каналі «Fura red». Цю похибку не можна точно компенсувати розділенням величин через вирішення системи лінійних рівнянь інтенсивностей в кожному спектральному каналі. Буферні ємності по Ca^{2+} у NP-EGTA та «Fura red» і ендогенних буферів також додають похибку вимірювання. І для того, щоб збільшити вклад екзогенних експресованих білків до буферної ємності по Ca^{2+} було навмисне обрано клітини з високим рівнем експресії білків. Але при цьому ще більше збільшилась попередня похибка величини F_0 . Амплітуда транзйентів зміни $[Ca^{2+}]_i$ була суттєво вища в нетрансфікованих клітинах НЕК-293 у порівнянні з клітинами трансфікованими НРСА-CFP (див. рис. 3.13), що вказує на порівняно меншу буферну ємність у нетрансфікованих клітин. Проте було вирішено не використовувати ці амплітуди для статистичного порівняння в таких експериментах.

Часова залежність транзйенту спаду $[Ca^{2+}]_i$ не залежить від величини F_0 і тому може бути використана для порівняння буферних ємностей по Ca^{2+} . Варто врахувати, що транслокація флуоресцентних білків та їх вигорання можуть призводити до появи певної похибки у величині ΔF в спектральному каналі «Fura red». Для того, щоб скасувати, або хоча б суттєво зменшити, цю похибку, величина інтенсивності флуоресценції «Fura red» в момент проходження транзйенту зміни $[Ca^{2+}]_i$ була поділена на поточну величину інтенсивності флуоресценції відповідного флуоре-

сцентного білка виміряної для всієї клітини НЕК-293.

2.13. Статистичний аналіз

Чисельні результати були представлені у вигляді середнього значення та його стандартної похибки. Статистична значущість між групами була перевірена з використанням t -критерію Стьюдента. З однаковими дисперсіями та значущістю 95 %. Середня величина для кожного експерименту була обчислена як середнє від всіх нейронів перевірених за даним протоколом.

2.14. Комп'ютерне моделювання

Моделювання було проведено з використанням моделі пірамідального нейрона 5го неокортикального шару, що була розроблена в програмі «NEURON» [125]. В даній роботі було модифіковано модель яка була описана раніше в [126] і доступна у базі «ModelDB» [127]. З цієї моделі було взято геометрію клітини (реконструйована дендритна арборизація, сома, мієлінізований аксон), механізми внутрішньоклітинної кальцієвої динаміки, біофізичні властивості та розподіл іонних каналів. Зокрема мембрана соми та аксону мали потенціалкеровані канали з каналами Na^+ струмів зі швидкою інактивацією та K^+ струмів з відсутньою інактивацією. Канали присутні у дендритній мембрані: Na^+ зі швидкою інактивацією; Ca^{2+} з високопороговою активацією та відсутньою інактивацією (L-тип); мускаринові K^+ (M-тип); Ca^{2+} -залежні K^+ (SK-тип); пасивного струму витоку [126]. Наші модифікації референсної моделі містили такі додаткові механізми:

1. Потенціалнезалежна провідність G_S пов'язану з потенціалом реверсії $E_S = 0$ мВ, було додано для відтворення активації збуджувальних постсинаптичних рецепторів.
2. Кінетичні властивості Ca^{2+} струму L-типу були змінені для досягнення відповідності часового профілю входу Ca^{2+} та профілю їх концентрації до експериментально спостережених рівнів. Ці властивості були подібні описаним у [128].
3. Було додано Ca^{2+} канали T-типу, оскільки їх присутність спостерігалась в наших

експериментах. Властивості струму цих каналів були подібні до описаних у [129].

4. Було додано динаміку НРСА як WT, так і мутанту. Динаміка була представлена у нашій попередній моделі, яка описувала зв'язування Ca^{2+} НРСА-ом, вбудовування Ca^{2+} -зв'язаного НРСА до мембрани та подальше вивільнення та повернення до цитозолу.
5. Для представлення помітного внеску зв'язування Ca^{2+} НРСА та Ca^{2+} було додано буфер зі швидким зв'язуванням цих іонів.
6. Для представлення sАНР було додано K^+ -провідність залежну від долі НРСА на мембрані.

Як і в оригінальній моделі – модифіковані провідності та механізми (1-3) були рівномірно розташовані по дендритах. В той час як інші (4-6) були наявні лише у певних регіонах дендритів – близько до соми. Це було необхідно для представлення точкових місць транслокації НРСА на дендритах, подібно до спостережень у наших експериментах [29, 30].

Вирази, що описують іонні струми та $[\text{Ca}^{2+}]$ взяті з еталонної моделі та описані в [126]. У цієї моделі було змінено величини струмів через одиницю мембранної поверхні. Ці струми описуються виразами:

Ca^{2+} -струм L-типу. [128]

$$J_{\text{CaL}} = G_{\text{CaL}} \cdot (m^2 h + s^2) \cdot (V - E_{\text{Ca}}), \quad (2.6)$$

де V це мембранний потенціал; $G_{\text{CaL}} = 10 \text{ См/м}^2$ – максимальна провідність; $E_{\text{Ca}} = 120 \text{ мВ}$ – потенціал реверсії струму; m , h та s – кінетичні змінні, а саме, потенціал залежної активації, Ca^{2+} -залежної інактивації та активації, що описується виразами:

$$\frac{dm}{dt} = (m_{\infty} - m)/\tau_m \quad (2.7)$$

$$m_{\infty} = \frac{1}{1 + e^{-\frac{V - V_{1/2}}{k}}} \quad (2.8)$$

$$k = 4,6 \cdot F/RT \quad (2.9)$$

$$\tau_m = 1,5 \text{ мс} \quad (2.10)$$

$$\frac{ds}{dt} = \frac{s_{\infty} - s}{\tau_s} \quad (2.11)$$

$$s_{\infty} = \frac{a}{a + 1} \quad (2.12)$$

$$a = \left(\frac{[\text{Ca}^{2+}]}{0,03} \right)^2 \quad (2.13)$$

$$\tau_s = \tau_{\min} + \frac{1}{[\text{Ca}^{2+}]_i + 0,01} \quad (2.14)$$

$$\tau_{\min} = 180 \text{ мс} \quad (2.15)$$

$$h = \frac{K}{K + [\text{Ca}^{2+}]_i} \quad (2.16)$$

$$K = 0,025 \text{ ммоль/л} \quad (2.17)$$

де F , R та T – постійна Фарадея, газова постійна та абсолютна температура, відповідно.

Ca²⁺-струм Т-типу. [129]

$$J_{\text{CaT}} = G_{\text{CaT}} \cdot m^2 \cdot h \cdot (V - E_{\text{Ca}}) \quad (2.18)$$

де $G_{\text{CaL}} = 10 \text{ См/м}^2$ це максимальна провідність; m та h це, відповідно, кінетичні змінні потенціалзалежної активації та інактивації, що визначається як:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{m_{\infty} - m}{\tau_m} \quad (2.19)$$

$$\tau_m = \tau_{\min} + \frac{1}{Q_{10} \cdot (\alpha_m + \beta_m)} \quad (2.20)$$

$$\tau_{\min} = 1,44 \text{ мс} \quad (2.21)$$

$$m_{\infty} = \alpha_m \cdot \tau_m \quad (2.22)$$

$$\alpha_m = e^{\frac{V + 51}{5,67}} \quad (2.23)$$

$$\beta_m = e^{-\frac{V + 128}{15,33}} \quad (2.24)$$

$$\frac{dh}{dt} = \frac{h_{\infty} - h}{\tau_h} \quad (2.25)$$

$$\tau_h = \tau_{\min} + \frac{1}{Q_{10} \cdot (\alpha_h + \beta_h)} \quad (2.26)$$

$$\tau_{\min} = 26,67 \text{ мс} \quad (2.27)$$

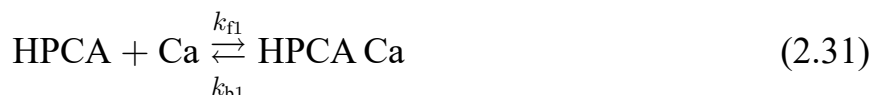
$$h_{\infty} = \alpha_h \cdot \tau_h \quad (2.28)$$

$$\alpha_h = e^{-\frac{V + 41}{4,32}} \quad (2.29)$$

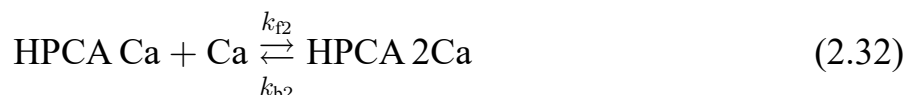
$$\beta_h = e^{-\frac{V + 423,33}{53,33}} \quad (2.30)$$

Динаміка НРСА була описана реакційно-дифузійними рівняннями. Реакції зв'язування та розірвання зв'язку, а також переміщення між цитозолем та мембраною для WT та мутантного НРСА були описані кінетичними рівняннями наступним чином.

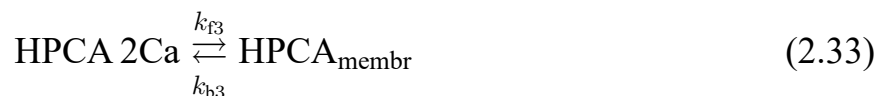
Зв'язування Ca^{2+} вільним НРСА WT і формування цитозольної фракції з одним Ca^{2+} яку далі позначено НРСА-Са:



Зв'язування Ca^{2+} НРСА-Са і формування цитозольної фракції з двома Ca^{2+} яку далі позначено НРСА-2Са:



Транслокація НРСА-2Са з цитозолю до плазматичної мембрани та формування мембранної фракції $\text{НРСА}_{\text{membr}}$ за рахунок Ca^{2+} -мірістоїлового перемикача:



Подібними виразами описана динаміка мутанту НРСАmut.

Для того, щоб всі реагенти, в тому числі різні форми НРСА, буфер та Ca^{2+} могли вільно дифундувати як радіально, так і повздовж, весь простір всередині дендриту був поділений на дискретні концентричні циліндричні шари, кожний з яких далі був поділений на рівні продовжні сегменти. В такому випадку зміни концентрації Ca^{2+} в даному шарі описуються як:

$$\frac{\partial[\text{Ca}^{2+}]}{\partial t} = \Delta[\text{Ca}^{2+}] \cdot D_{\text{Ca}} \cdot \frac{S}{\Delta r} \quad (2.34)$$

$$\frac{\partial[\text{Buffer}]}{\partial t} = \Delta[\text{Buffer}] \cdot D_{\text{Buffer}} \cdot \frac{S}{\Delta r} \quad (2.35)$$

де D_{Ca} та D_{Buffer} є коефіцієнтами дифузії Ca^{2+} та буферу відповідно; S це площа області між сусідніми шарами; Δr це радіально товщина шару.

Подібними виразами була описана дифузія НРСА WT, НРСА-Са та НРСА-2Са, а також мутантних форм (НРСАmut, НРСАmut-Са та НРСАmut-2Са).

Початкові концентрації НРСА WT і мутантних типів, Ca^{2+} , кінетичні швидкості прямої (k_{fi}) та зворотної (k_{bi}) реакції для $i = 1, 2, 3$ наведені в табл. 2.4.

Параметри динаміки НРСА для проведення моделювання

Табл. 2.4

	Початкова концентра- ція, ммоль/л	Коефіцієнт дифузії, D , (мкм) ² /(мс)	k_{f1} , (ммоль/л· мс) ⁻¹	k_{b1} , (мс) ⁻¹	k_{f2} , (ммоль/л· мс) ⁻¹	k_{b2} , (мс) ⁻¹
НРСА	0,03821	0,05	40,00	0,01	—	—
НРСА-Са	—	0,05	40,00	0,01	—	—
НРСА- 2Са	—	0,05	—	—	0,01	0,002
НРСА _{membr}	—	0,05	—	—	—	—
НРСА- mut	0,03821	0,05	12,00	0,01	—	—
НРСА- mut-Са	—	0,05	9,00	0,01	—	—
НРСА- mut-2Са	—	0,05	—	—	0,07	0,003
НРСА- mut _{membr}	—	0,001	—	—	—	—
Buffer	20	0,05	10,00	1,00	—	—

Моделювання калієвого струму sАНР. Рішення наведених вище рівнянь дає концентрації мембранних порцій НРСА_{membr} та НРСА-mut_{membr}. Використавши отримані величини можна визначити величину калієвого струму sАНР, що активований WT та мутантним НРСА котрі транслокувались до плазматичної мембрани. Струм описується виразом:

$$J_K = G_K \cdot n \cdot (V - E_K) \quad (2.36)$$

де $G_K = 600 \text{ См/м}^2$ це максимальна провідність; $E_K = -90 \text{ мВ}$ – потенціал реверсії струму; n – кінетична змінна активації викликаної НРСА та НРСА-mut. Ця змінна визначається як:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_\infty - n}{\tau_n} \quad (2.37)$$

$$\tau_n = \frac{1}{Q_{10} \cdot (\alpha_n + \beta_n)} \quad (2.38)$$

$$n_\infty = \alpha_n \cdot \tau_n \quad (2.39)$$

$$\alpha_n = Ra \cdot (\text{НРСА}_{\text{membr}} + \text{НРСА-mut}_{\text{membr}}) \quad (2.40)$$

$$Ra = 0,01 \text{ (ммоль/л} \cdot \text{мс)}^{-1}; \beta_n = Rb = 0,02 \text{ ммоль/л/мс} \quad (2.41)$$

Кінетичні константи взаємодії НРСА та мутанту N75K з Ca^{2+} та плазматичною мембраною (k_{fi} і k_{bi} , $i = 1, 2, 3$, див. табл. 2.4) були підібрані так, щоб змодельовані амплітуди та постійні часу транзйенту транслокації (переміщення) були наближені до отриманих практично кривих (див. далі рис. 3.42..3.47, 3.57а)..3.57д), 3.74, 3.73). Параметри, що визначають провідність АНР (Ra) та кількість НРСА, котрий транслокується до мембрани (Rb) також були підібрані для відповідності моделі до практичних вимірів sАНР струму (див. далі рис. 3.68..3.71, рис. 3.73).

Провідність рецепторів, що розташовані у сомі та точнічно-активуються гліотрансміттерами [130], була обрана рівною $2,5 \text{ См/м}^2$ (див. далі рис. 3.75, 3.76) або варіювалась (див. далі рис. 3.77).

Активация глутаматергічної провідності G_S під час транзйенту, котра викликає серію імпульсів потенціалів дії у сомі (див. далі рис. 3.78, 3.79..3.80), була змодельована шляхом додавання до часової характеристики транзйенту G_S дзвоноподібної несиметричності на основі «альфа-функції» з програмного пакета «NEURON»:

$$G_S(t) = G_{S.\max} \frac{t - t_0}{\tau} e^{-\frac{t - t_0 - \tau}{\tau}} \quad (2.42)$$

де t , t_0 і τ це відповідно поточний час, час початку транзйенту та постійна часу;
 $G_{S.\max}$ – максимальна величина G_S [125].

У всіх виразах, що наведені вище, Q_{10} це температурний коефіцієнт:

$$Q_{10} = 2,3 \frac{t^\circ - 36}{10} \quad (2.43)$$

де t° це температура у градусах Цельсію, яка при моделюванні була рівна 36°C .

Розділ 3. Результати

3.1. Оцінка концентрації флуоресцентних молекул в поодиноких живих клітинах

Перебіг фізіологічних процесів залежить від концентрації молекул, що беруть в них участь. Тому для широкого кола як фундаментальних досліджень, так і досліджень механізмів патологічних порушень, необхідно мати можливість оцінювати концентрації взаємодіючих молекул на рівні окремих клітин і їх компартментів. Зокрема, це дуже важливо для кращого розуміння механізмів, що порушуються при різних неврологічних розладах, яким і присвячене дане дослідження [1—5]. Якщо молекули, концентрацію яких нам потрібно оцінити, мають флуоресцентні властивості або можуть бути помічені флуорофорами, то їх локалізацію і концентрацію в клітині можна оцінити за величиною флуоресценції. Зокрема, при використанні в дослідженні експресії екзогенних білків, мічених флуоресцентним білком, отриманих завдяки трансфекції клітин плазмідами, виникає необхідність оцінки концентрації цих екзогенних білків. Це необхідно, щоб впевнитися, що концентрація цих білків не виходить за межі фізіологічних рівнів і одночасно є достатньою для змін роботі відповідних молекулярних систем. В даній роботі Ca^{2+} -залежна сигналізація гіпокальцину досліджувалась у нейронах гіпокампу, що ендогенно експресують високі рівні гіпокальцину (до 30 мкмоль/л [131]) і нам необхідно було знайти чи є рівні екзогенної експресії гіпокальцину співмірними. Тому, в даній роботі було поставлено завдання розробити універсальний метод оцінки концентрації флуоресцентних молекул у живих поодиноких клітинах і застосувати його до визначення концентрації екзогенно-експресованих білків.

Найпростіший та швидкий шлях оцінки концентрації флуоресцентних молекул в живій клітині може бути заснований на вимірі інтенсивності їх флуоресценції. Ми вперше запропонували проводити дані оцінки за допомогою диференційних вимірів по відношенню до іншого опорного (контрольного) флуоресцентного барвника з відомою концентрацією, що знаходиться в тій же живій клітині. В якості опорного

барвника можна використовувати флуорофор, що у відомій концентрації завантажується до клітин за допомогою методів внутрішньоклітинної перфузії. Метод було відпрацьовано в дослідженнях з використанням різних типів флуорофорів і клітин [3—5] і застосовано для оцінки концентрацій екзогенно-експресованого гіпокальцина в нейронах первинної культури гіпокампа щурів [1]. Спрощена схема проведення вимірів концентрації експресованих екзогенних флуоресцентних білків показана на рис. 3.1.

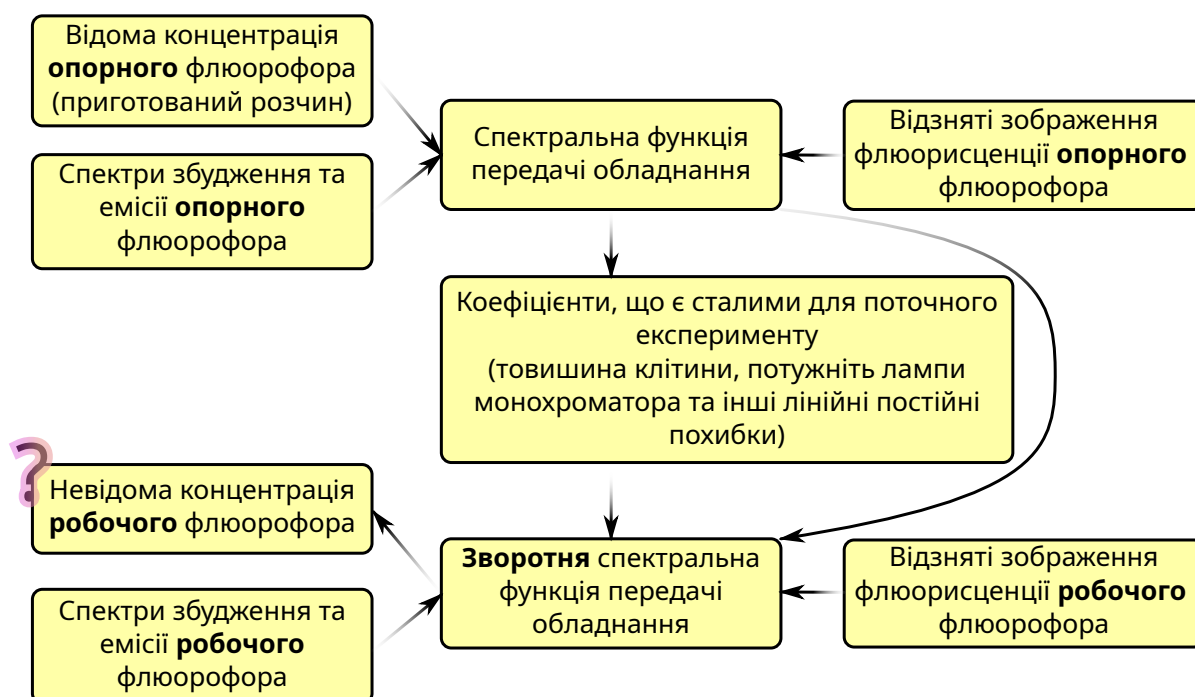


Рис. 3.1. Спрощена схема проведення вимірів концентрації експресованих екзогенних флуоресцентних білків з використанням контрольних барвників.

Як було зазначено вище, детальне розуміння фундаментальних аспектів кальцієвої сигналізації в нейронах і їх патологічних змін, а також використання флуоресцентних методів для цих досліджень, є вкрай важливим для розробки новітніх підходів до лікування різноманітних нервових захворювань. Тому в даній роботі новітні експериментальні підходи, засновані на використанні флуо-

ресцентних барвників та кальційметрії, застосувалися при дослідженні декількох патологічних станів, а саме хронічного болю [3], глаукоми низького тиску [4, 5] та первинній дистонії типу DYT2 [2]. Хоча основна лінія досліджень була націлена на знаходження молекулярних і клітинних механізмів дистонії типу DYT2, нами також був розроблений підхід, що забезпечує надійний інструмент для дослідження функціональних властивостей нейронів пластинки X спинного мозку, що задіяні в регуляції хронічного вісцерального болю [3], та проведено оцінку ефективності оптичної методики лікування глаукоми низького тиску за допомогою ретроградного мічення флуорофорами гангліонарних клітин сітківки [4, 5].

При дослідженнях функціонування нейронів у пластинці X нами запропоновано використання препарату спинного мозку *ex-vivo* із дорсальним і вентральним корінцями, та застосуванням бічного світлодіодного освітлення для чіткої візуалізації нейронів необхідної для електрофізіологічних реєстрації методом патч-клемп. Кальцієва сигналізація в препаратах спинного мозку використовувалася, щоб досліджувати індуковані деполяризацією зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію в нейронах пластинки X, які можуть виникати при обробці больових сигналів. Нами також використовувалися ретроградні флуоресцентні барвники, щоб ідентифікувати симпатичні прегангліонарні та проєкційні нейрони пластинки X [3]. Ретроградний флуоресцентний барвник «Fluorogold» застосовувалися і для експериментів з гангліонарними клітинами сітківки [4, 5]. Всі ці роботи по дослідженню даних типів нейронів зроблені в різних типах тканин дозволили нам краще сформулювати методичні та методологічні підходи, що були застосовані в подальших дослідженнях молекулярних та клітинних механізмів первинної дистонії.

Вимір концентрації білків за таким підходом вимагає розрахунку спектральних функцій передачі обладнання (апаратна функція). Тут здебільшого мається на увазі оптичне обладнання, крім відеокамери (детектора), котра також має спектральну залежність функції передачі оптичного сигналу в електричній. Функція передачі сигналу обладнання складається з двох основних частин - до збудження флуоресцентно-міченого білка та після емісії флуоресценції цього білка. Наприклад,

один з варіантів набору обладнання, використаного в даній роботі для перевірки методу виміру концентрації білків, та вклад окремих пристроїв до функції передачі:

1. Обладнання до збудження флуоресцентно-міченого білка.

1.1. Джерело світла «Polychrome V». Для джерела випромінення є відомий спектр (спектральна потужність, SPD) наданий виробником, але поточна потужність може відрізнятись. Частиною джерела світла також є дифракційна ґратка та шторки які виконують вибірку з широкого спектра випромінення джерела до вузького спектра потрібного в конкретному експерименті. Цей блок регульований і його спектр може зсуватись завдяки повороту ґратки, тому потрібно розглядати кілька випадків повороту цього блоку. Для використаних в даній роботі фільтрів представляють інтерес тільки дві центральні довжини хвилі повороту блоку вибірки спектра: 435 нм та 505 нм.

1.2. Оптичний фільтр збудження (вхідний) «Chroma» «51017x» або «69008x». Виконує додаткову спектральну фільтрацію випромінення від джерела світла перед дихроїчним дзеркалом.

1.3. Дихроїчне дзеркало «Chroma» «51017bs» або «69008bs». Відбиває випромінення в певних діапазонах довжини хвиль на досліджувані клітини та пропускає інше випромінення від клітин до детектора.

1.4. Об'єктив «Olympus» 40× з апертурою 1.35. Фокусує випромінення на досліджуваних клітинах.

2. Обладнання після емісії флуоресцентно-міченого білка.

2.1. Об'єктив. Той же самий об'єктив тепер фокусує зображення від клітин.

2.2. Фільтр емісії «Chroma» «51017m» або «69008m». Пропускає випромінення в певних діапазонах довжини хвиль від досліджуваних клітин.

2.3. Дихроїчне дзеркало «Chroma» «51017bs» або «69008bs». Описано вище, випромінення проходить у зворотному напрямі.

2.4. Відеокамера (детектор) «QImaging EXi Blue». Виконує перетворення оптичного сигналу в електричний, має свою спектральну чутливість яка пропорційно змінюється залежно від величини експозиції.

За таким підходом було побудовано спектральні функції передачі для наявного обладнання до збудження флуоресценції клітин (рис. 3.2). І аналогічно після

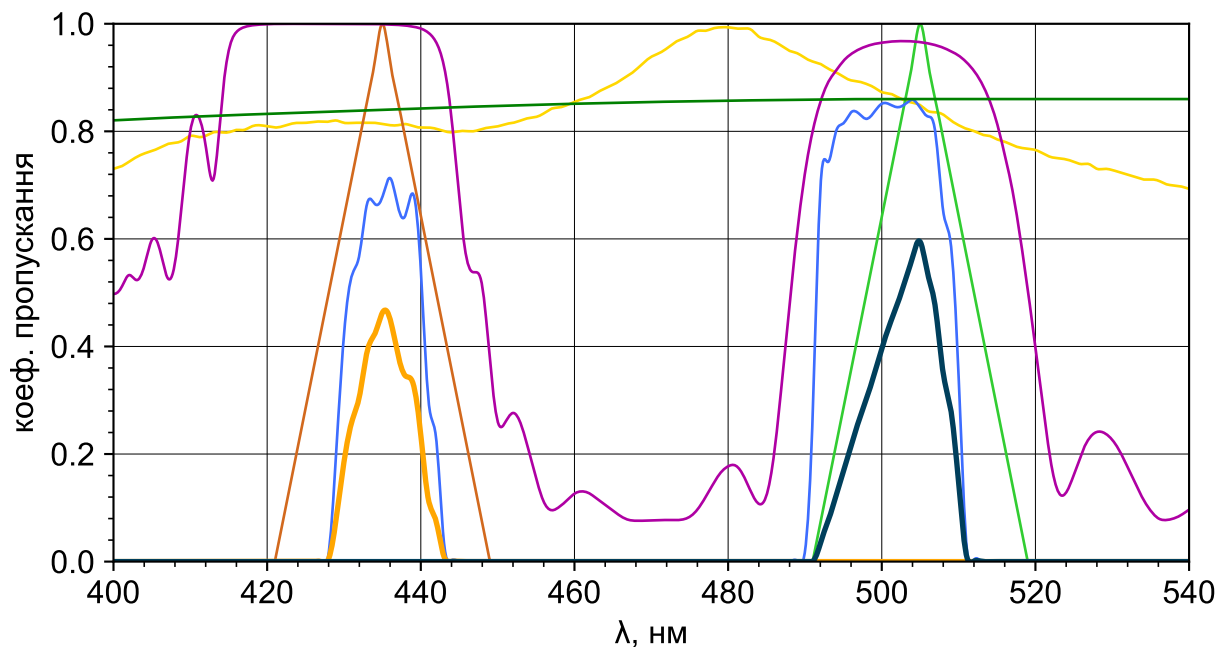


Рис. 3.2. Спектральна функція передачі обладнання до збудження флуоресцентних білків для двох центральних довжин хвиль блоку вибірки в джерелі випромінення 435 нм (помаранчевий), 505 нм (темно синій) отриманий від точкового помноження складових частин: нормованого спектра джерела світла без блоку вибірки довжин хвиль (жовтий); спектру фільтра збудження (синій) «51017x»; спектра дихроїчного дзеркала для відбивання світла (фіолетовий) «51017bs»; спектру пропускання об'єктива (темно зелений); та двох окремих спектрів пропускання блоку вибірки в джерелі випромінення 435 нм (коричневий) та 505 нм (світло зелений).

емісії флуоресцентного випромінювання від клітин (рис. 3.3).

Також для перевірки методу та для виміру концентрації досліджуваних білків було використано інші фільтри збудження, емісії та інше дихроїчне дзеркало, саме набір фільтрів «Chroma» «69008». Так, на рис. 3.4 показано два варіанти спектральної функції передачі обладнання до збудження флуоресценції для двох центральних довжин хвиль блоку вибірки в джерелі випромінення 435 нм, 505 нм та 575 нм, а також спектральну функцію передачі обладнання після емісії випроміню-

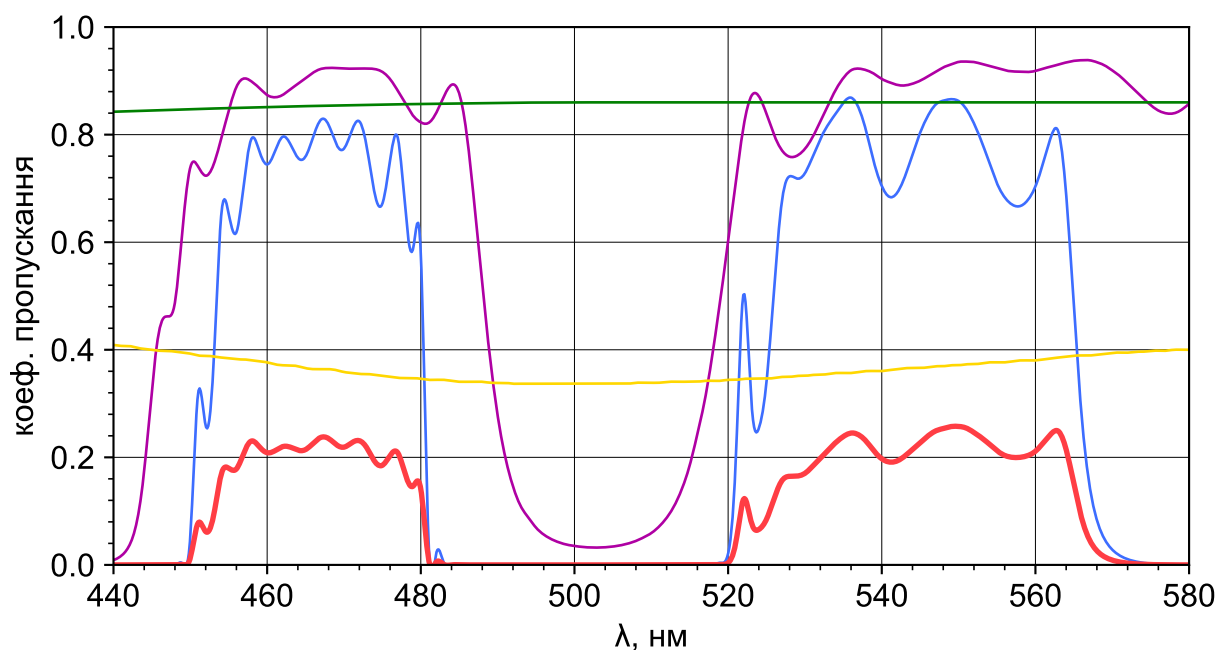


Рис. 3.3. Спектральна функція передачі обладнання після емісії випромінювання флуоресцентними білками (червоний колір) отриманий від точкового помноження складових частин: спектру фільтра емісії (синій) «51017m»; спектру дихроїчного дзеркала для проходження світла (фіолетовий) «51017bs»; спектру пропускання об'єктива (зелений); нормованого спектра чутливості детектора (жовтий).

вання флуоресцентно-міченими білками. З рис. 3.2, 3.3 та 3.4 видно, що набір фільтрів «69008» пропускає більшу спектральну потужність в порівнянні з «51017», тому в даній роботі далі використано саме цей набір.

Флуоресцентні барвники, в тому числі білкові мітки, також мають свої спектри, які потрібно врахувати: спектр збудження $S_{зб}(\lambda)$ та спектр емісії $S_{ем}(\lambda)$. В більшості випадків спектр збудження ідентичний спектру абсорбції. На рис. 3.5 показано спектр збудження та емісії флуорофору «Oregon 488», а також результат точкового помноження цих спектрів на відповідні спектральні функції передачі обладнання з набором фільтрів «Chroma» «69008» при повороті блоку вибірки довжини хвилі в джерелі випромінення 505 нм. Спектр збудження та емісії флуорофору «Alexa Fluor 594», а також результат точкового помноження цих спектрів на відповідні спектральні функції передачі обладнання з набором фільтрів «Chroma»

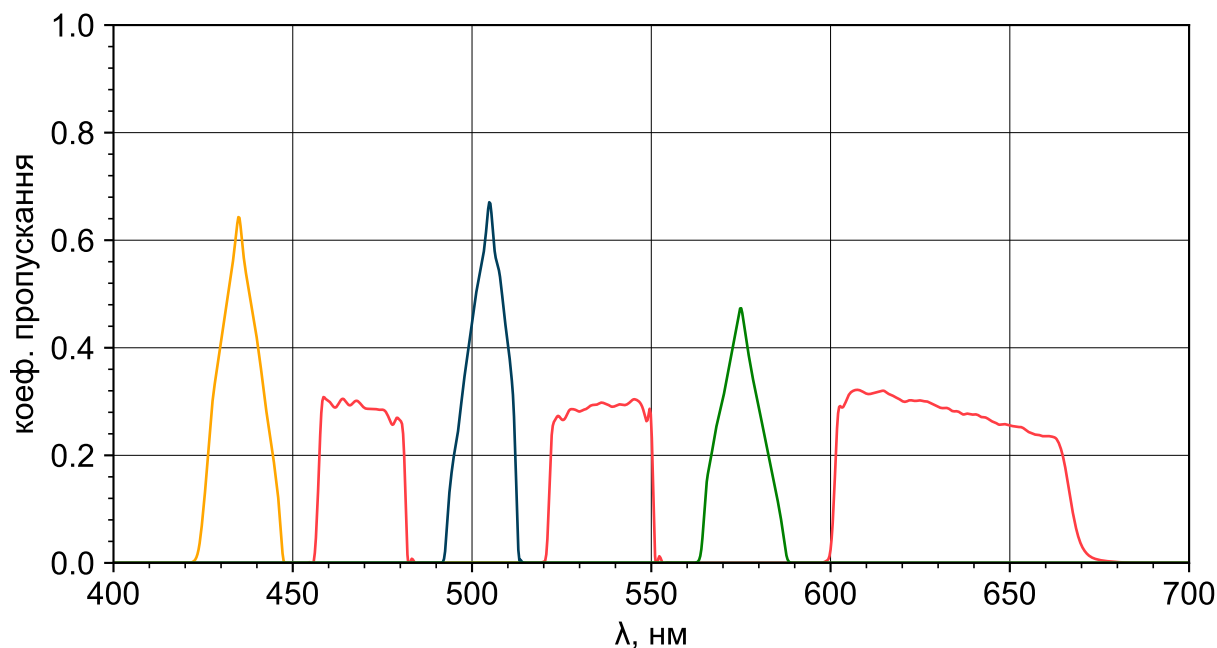


Рис. 3.4. Спектральна функція передачі обладнання до збудження флуоресцентних білків для двох центральних довжин хвиль блоку вибірки в джерелі випромінювання 435 нм (жовтий), 505 нм (темно синій), 575 нм (зелений) та функція передачі обладнання після емісії випромінювання флуоресцентними білками (червоний колір) отриманий від точкового помноження складових частин (спектрів обладнання).

«69008» при повороті блоку вибірки довжини хвилі в джерелі випромінювання 575 нм показано на рис. 3.6. Також, спектр збудження та емісії флуорофорів «ЕСFP» та «ЕУFP» і результат точкового помноження їх спектрів на відповідні спектральні функції передачі обладнання з набором фільтрів «Chroma» «69008» при повороті блоку вибірки довжини хвилі в джерелі випромінювання 435 нм та 405 нм показано на рис. 3.7 та рис. 3.8.

Показані спектри збудження та емісії флуоресцентних барвників нормовані на своє максимальне значення. Ці величини є різними для різних флуоресцентних барвників. Фізично розмірною формою запису спектра збудження є молярний коефіцієнт екстинкції залежно від довжини хвилі $\varepsilon(\lambda)$. Для багатьох флуоресцентних барвників коефіцієнт екстинкції відомий, як величина виміряна $\varepsilon_{\text{вимір}}$ при певній довжині хвилі $\lambda_{\text{вимір}}$ збудження (це може бути довжина хвилі 260 нм, 280 нм або та

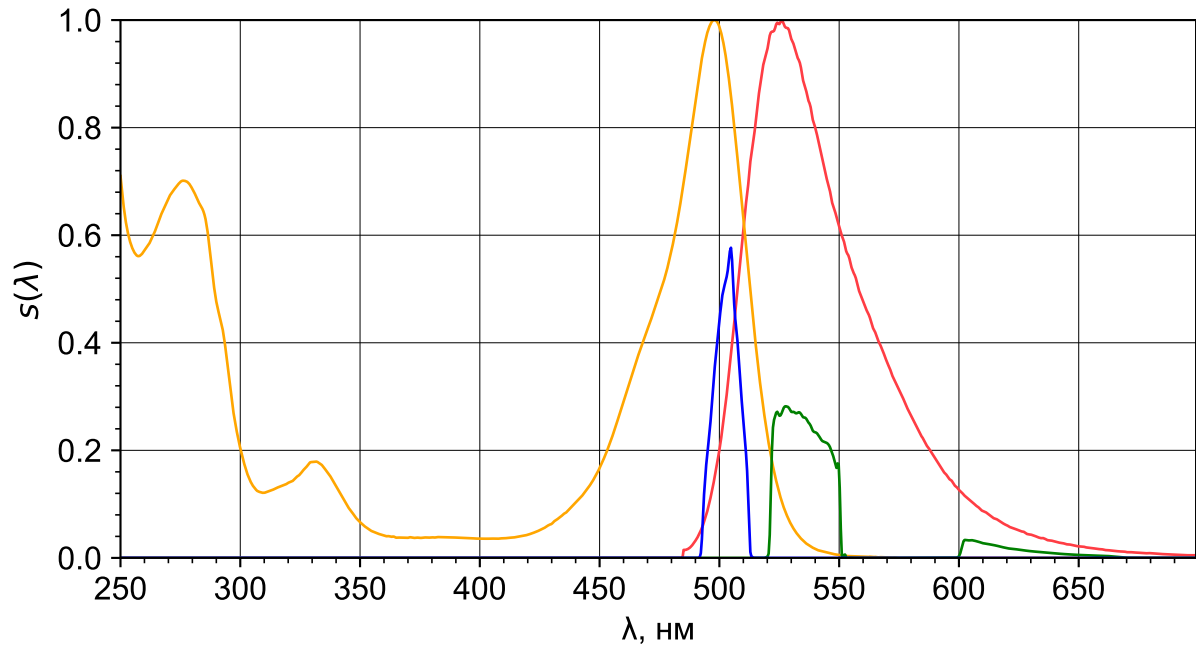


Рис. 3.5. Нормовані на максимальну величину спектри збудження (жовтий колір) та емісії (червоний) флуорофору «Oregon 488»; результат точкового помноження цих спектрів на відповідні спектральні функції передачі обладнання з набором фільтрів «Chroma» «69008» при повороті блоку вибірки довжини хвилі в джерелі випромінення 505 нм (синій та зелений колір відповідно)

при якій проявляється найбільше збудження флуоресценції). При наявності таких даних можна повернути безрозмірний нормований спектр збудження $s_{зб}(\lambda)$ до розмірної величини $S_{зб}(\lambda)$:

$$S_{зб}(\lambda) = s_{зб}(\lambda) \cdot \frac{\varepsilon_{\text{вимір}}}{s_{зб}(\lambda_{\text{вимір}})}. \quad (3.1)$$

Аналогічно нормалізований спектр емісії $s_{ем}(\lambda)$ можна перетворити на розмірну величину $S_{ем}(\lambda)$ шляхом повторної нормалізації на площу під кривою цього спектру та помноження на квантовий вихід даного флуоресцентного барвника Q :

$$S_{ем}(\lambda) = s_{ем}(\lambda) \cdot \frac{Q}{s_{ем.\Sigma}} \quad (3.2)$$

де

$$s_{ем.\Sigma} = \int_0^{\infty} s_{ем}(\lambda) d\lambda \quad (3.3)$$

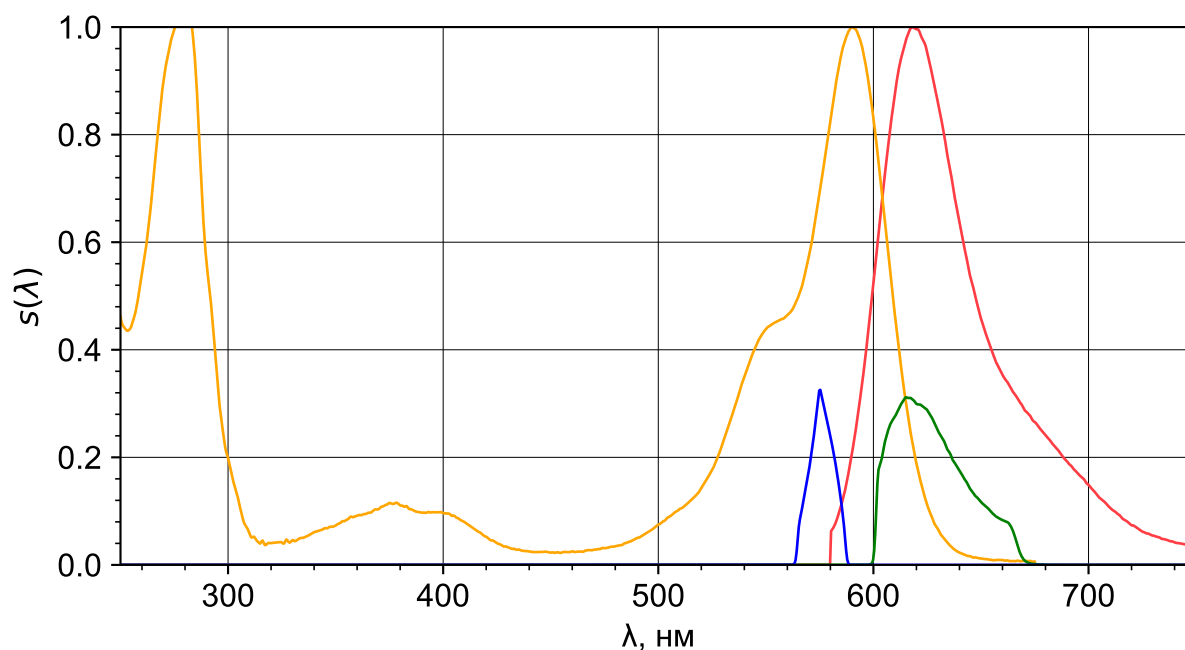


Рис. 3.6. Нормовані на максимальну величину спектри збудження (жовтий колір) та емісії (червоний) флуорофору «Alexa Fluor 594»; результат точкового помноження цих спектрів на відповідні спектральні функції передачі обладнання з набором фільтрів «Chroma» «69008» при повороті блоку вибірки довжини хвилі в джерелі випромінення 575 нм (синій та зелений колір відповідно)

Нормований спектр емісії флуоресцентного барвника зазвичай має відмінне від нуля значення у певному діапазоні довжин хвиль, в якому і проводиться чисельне інтегрування.

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

$$C = \frac{E}{K_{зб} \cdot K_{ем} \cdot V} \quad (3.4)$$

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

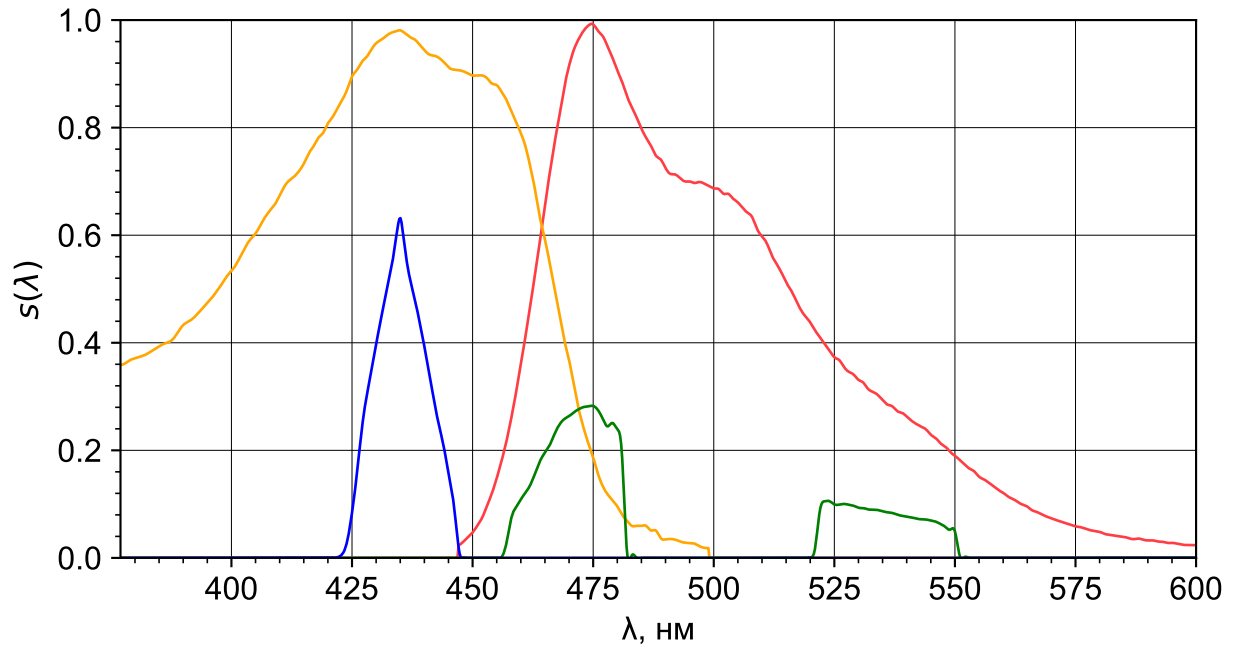


Рис. 3.7. Нормовані на максимальну величину спектри збудження (жовтий колір) та емісії (червоний) флуорофору «ECFP»; результат точкового помноження цих спектрів на відповідні спектральні функції передачі обладнання з набором фільтрів «Chroma» «69008» при повороті блоку вибірки довжини хвилі в джерелі випромінення 435 нм (синій та зелений колір відповідно)

дених вище та інтегрування по довжині хвилі

$$K_{зб} = \int_0^{\infty} P p(\lambda) T_{виб}(\lambda) T_{ф.зб}(\lambda) T_{дихр.зб}(\lambda) T_{об}(\lambda) S_{зб}(\lambda) d\lambda = P k_{зб} \quad (3.5)$$

та

$$K_{ем} = \int_0^{\infty} S_{ем}(\lambda) T_{об}(\lambda) T_{дихр.ем}(\lambda) T_{ф.ем}(\lambda) I i_{кам}(\lambda) d\lambda = I k_{ем} \quad (3.6)$$

де P невідома, але постійна потужність лампи, як було зазначено вище ця величина не суттєва оскільки однакова для двох барвників і буде скорочена далі; $p(\lambda)$ нормована спектральна потужність джерела світла без блоку вибірки; $T_{виб}(\lambda)$ спектральна функція пропускання блоку вибірки в джерелі випромінення, форма залишається сталою, але спектр зсувається залежно від налаштувань блоку; $T_{ф.зб}(\lambda)$ спектральна функція пропускання фільтра збудження; $T_{дихр.зб}(\lambda)$ спектральна функція пропускання сигналу дихроїчного дзеркала для відбивання випромінення збудження флуоре-

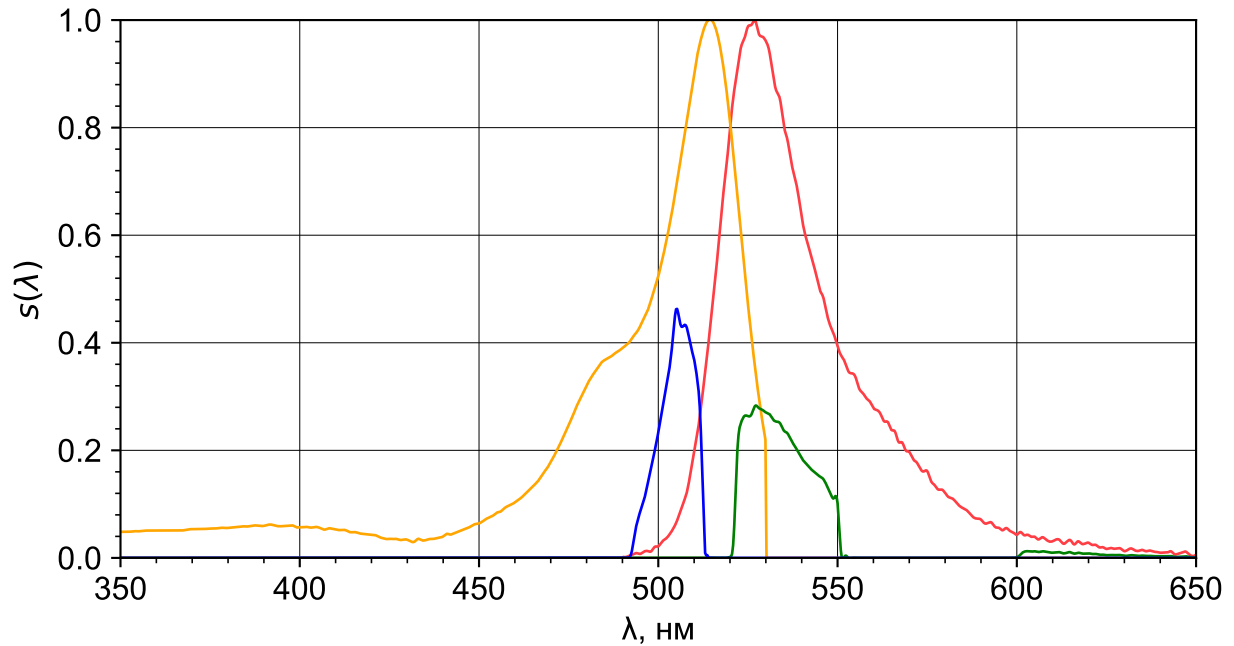


Рис. 3.8. Нормовані на максимальну величину спектри збудження (жовтий колір) та емісії (червоний) флуорофору «EYFP»; результат точкового помноження цих спектрів на відповідні спектральні функції передачі обладнання з набором фільтрів «Chroma» «69008» при повороті блоку вибірки довжини хвилі в джерелі випромінювання 505 нм (синій та зелений колір відповідно)

сценції; $T_{об}(\lambda)$ спектральна функція пропускання об'єктива; $T_{дихр.ем}(\lambda)$ спектральна функція пропускання сигналу дихроїчного дзеркала для проходження випромінювання емісії; $T_{ф.ем}(\lambda)$ спектральна функція пропускання фільтра емісії; I коефіцієнт перетворення оптичного сигналу в сигнал (електричний аналоговий, цифровий або інший) відеокамери (детектора), аналогічно до потужності лампи буде скорочений; $i_{кам}(\lambda)$ спектральна нормована функція передачі сигналу, з оптичного в інший, у відеокамері (детекторі).

Зазвичай для дихроїчних дзеркал надається лише спектральна функція пропускання сигналу на відбивання випромінювання $T_{дихр.зб}(\lambda)$, але потрібну спектральну функцію передачі сигналу на проходження випромінювання $T_{дихр.ем}(\lambda)$ можна отримати як

$$T_{дихр.ем}(\lambda) = 1 - T_{дихр.зб}(\lambda) \quad (3.7)$$

Опираючись на (3.4), (3.5), (3.6) та (3.7) для випадку двох різних флуоресцен-

тних барвників «1» та «2» в одному експерименті при однакових умовах

$$\begin{cases} V_1 = V_2 = V \\ P_1 = P_2 = P \\ I_1 = I_2 = I \end{cases} \quad (3.8)$$

можна записати

$$\frac{C_1}{C_2} = \frac{k_{зб.2}k_{ем.2}}{k_{зб.1}k_{ем.1}} \cdot \frac{E_1}{E_2} = k_{12} \cdot \frac{E_1}{E_2} \quad (3.9)$$

або

$$C_1 = C_2 \cdot k_{12} \cdot \frac{E_1}{E_2} \quad (3.10)$$

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

Запропонований вище підхід до вимірювання концентрації флуорофорів в живих поодиноких клітинах також відлагоджувався на нейронах спинного мозку щурів для оцінок концентрації флуоресцентного кальцієвого барвника «Fura-2», що був завантажений до нейронів спинного мозку щурів у формі ефіру [3] та при ретроградному маркуванні гангліонарних клітин сітківки за допомогою ін'єкцій флуоресцентного барвника «Fluorogold» (TermoFisher Scientific, США) у *superior colliculus*, як перший крок перед тим як застосувати його до вимірювання концентрації флуоресцентних білків у різних компартментах культивованих нейронів гіпокампа [4, 5]. Метод в цілому дозволяв проводити необхідні оцінки згідно з наведеними вище розрахунками, але точність цих оцінок не можливо було встановити, Тому ми запровадили додатковий підхід для оцінки точності отриманих результатів перед тим, як застосувати його до досліджень рівня екзогенної експресії гіпокальцина [1].

Для перевірки точності даного методу було використано тандем білкових барвників «Cerulean» «Venus» без прояву FRET. Концентрація цих білків була невідома, але вона має бути однаковою оскільки кожна молекула цього тандему складається з двох з'єднаних молекул «Cerulean» та «Venus». Одиночний експеримент з

таким тандемом в клітинах «PC-12» показаний на рис. 3.9. А за результатами серії

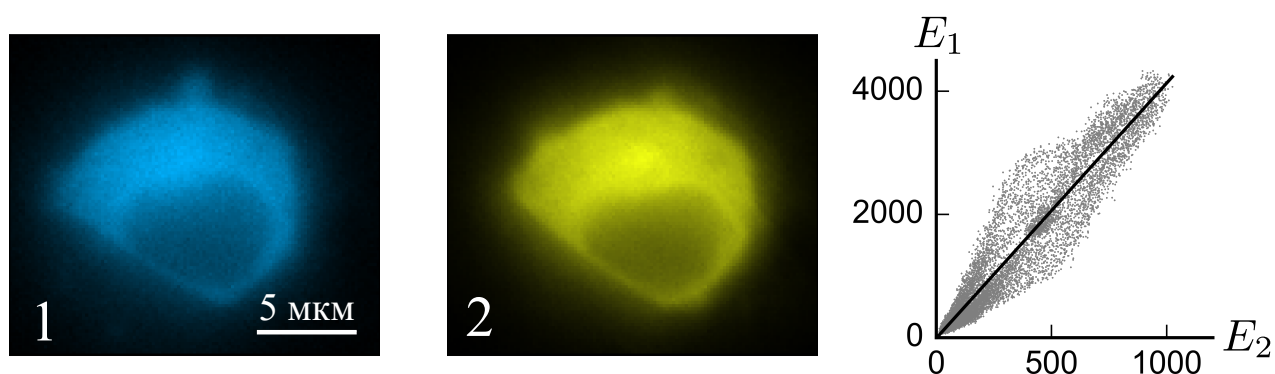


Рис. 3.9. Одиничний експеримент для перевірки методу обчислення концентрації флуоресцентних барвників (в цьому випадку відношення концентрації барвників) в клітині «PC-12»: відзняте зображення флуоресценції клітини (синій псевдоколір) для барвника «Cerulean» при центральній довжині хвилі в блоці вибірки джерела світла 435 нм, також зображення флуоресценції клітини (жовтий псевдоколір) для барвника «Venus» при центральній довжині хвилі в блоці вибірки джерела світла 505 нм та графік по-піксельній кореляції інтенсивності пікселів у відзнятих зображеннях з лінійною апроксимацією їх відношення, яке було приблизно рівне 4,14.

таких експериментів отримане відношення інтенсивностей в відзнятих зображеннях було приблизно 3,69, а в перерахунку на вимірне відношення концентрацій 1,33 при очікуваній величині 1,00. Похибка $\pm 33\%$ прийнятна.

В цих експериментах не було враховано можливе спектральне перекривання, коли в доступному діапазоні довжин хвиль збуджується флуоресценція в обох барвниках. Для випадку «Cerulean» та «Venus» доступні функції передачі обладнання для випромінювання збудження були показані рис. 3.4 жовтим та темно синім кольором відповідно. Перекривання спектрів збудження флуоресценції цих барвників точково помножених на відповідні спектральні функції передачі обладнання незначне і ним можна знехтувати. При використанні барвників з суттєвим перекриванням спектрів збудження флуоресценції відбувається сумація сигналу на виході відеокамери (детектора) з певними коефіцієнтами. В такому випадку доцільно використовувати метод математичного розділення шляхом вирішення систем лінійних рівнянь. Цей метод

може потребувати додаткових фільтрів та дихроїчних дзеркал на шляху випромінювання від флуоресцентної емісії та кількох відеокамер (детекторів) (див. рис. 2.1).

Додаткову перевірку було проведено в клітинах «PC-12» з екзогенно експресованим білковим флуоресцентним барвником «ЕСFP» в ролі досліджуваного білка та опорним флуоресцентним барвником «Alexa Fluor 594», який додавався всередину клітини за допомогою піпетки. Концентрація барвника «Alexa Fluor 594» всередині піпетки була відома. На рис. 3.10 показано знімки клітини з барвниками «ЕСFP» та «Alexa Fluor 594» при відповідному збудженні флуоресценції до прориву клітини піпеткою та через деякий час після прориву. В результаті прориву клітини

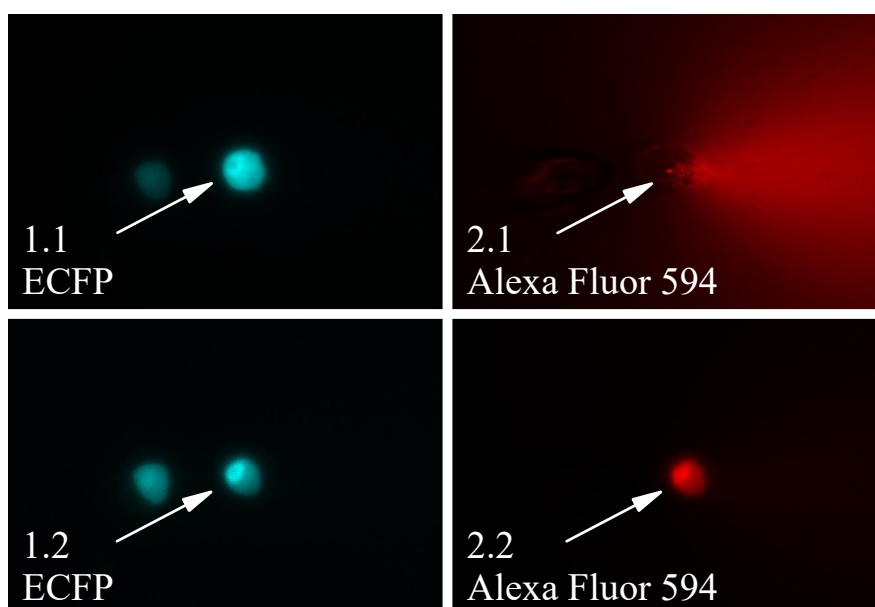


Рис. 3.10. Одиночний експеримент виміру концентрації з флуоресцентними барвниками «ЕСFP» (синій псевдоколір) при центральній довжині хвилі в блоці вибірки джерела світла 435 нм та «Alexa Fluor 594» (червоний псевдоколір) при центральній довжині хвилі в блоці вибірки 575 нм: 1.1 та 2.1 знімки відповідних барвників до прориву клітину піпеткою; 1.2 та 2.2 відповідні знімки барвників через 10 хвилин після прориву клітини.

концентрація барвника «Alexa Fluor 594» через деякий час наближається до концентрації всередині піпетки внаслідок дифузії. Зміни інтенсивності флуоресценції цих барвників в області інтересу та з віднятим фоновим засвіченням показані на рис. 3.11. Однак концентрація барвника «ЕСFP», яка пропорційна вихідному сигнала-

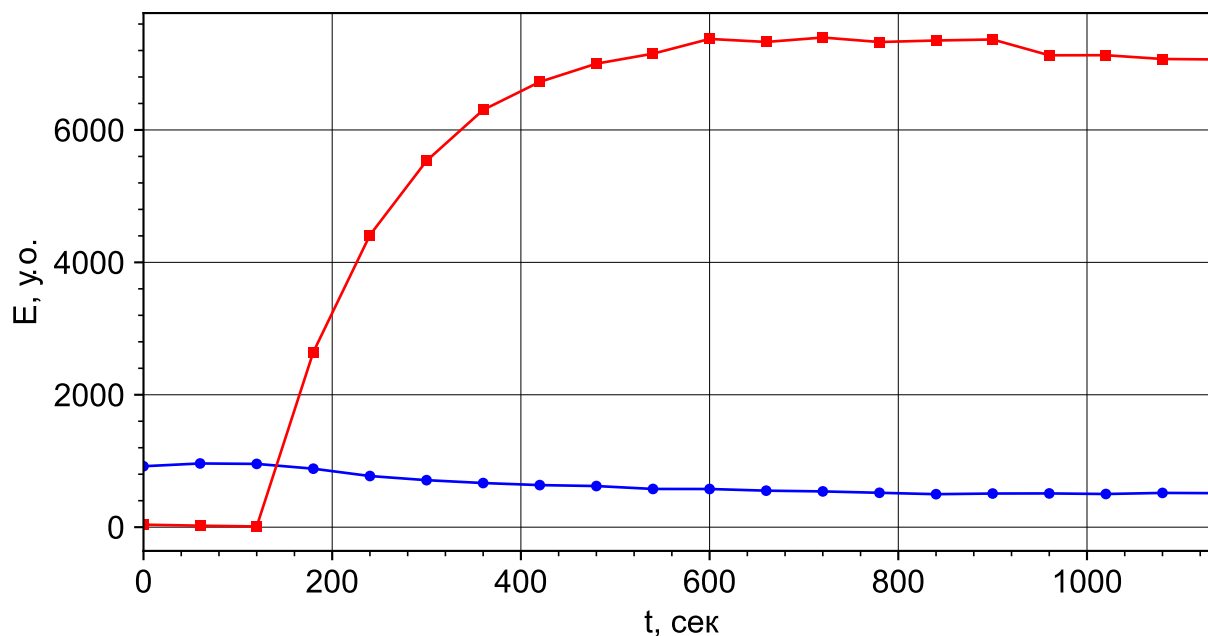


Рис. 3.11. Часові зміни інтенсивності (вихідний сигнал відеокамери) флуоресцентної емісії двох барвників в області інтересу з віднятим фоновим засвіченням в одиночному експерименті: «ЕСFP» (синій) та «Alexa Fluor 594». Прорив клітини піпеткою та вхід барвника «Alexa Fluor 594» в клітину почався на відмітці часу 120 секунд.

лу відеокамери (детектора), змінилась не суттєво, це означає, що значна частина цього білкового флуоресцентного барвника залишилась всередині клітини, скоріше за все у внутрішніх компартментах. А молекула барвника «Alexa Fluor 594» не може потрапити до цих компартментів оскільки вона полярна. Потрібно зробити корекцію, інакше виміряна концентрація «ЕСFP» буде завищеною, оскільки умови (3.8) не виконуються для об'ємів $V_1 \neq V_2$ і вираз (3.10) не вірний. Якщо прийняти (див. рис. 3.11), що через 10 хвилин велика доля барвника «ЕСFP» вийшла з цитозолу клітини до піпетки, то залишковий рівень флуоресценції відповідає внутрішнім компартментам, де концентрація «ЕСFP» не змінилась. Шляхом віднімання від основного сигналу відзнятого відеокамерою цього залишкового рівня можна отримати графік зміни тільки цитозольної концентрації «ЕСFP», а початкове значення на цьому графіку буде пропорційне цій цитозольній концентрації. За результатами серії таких експериментів та з урахуванням сказаного вище концентрація цитопла-

зматичного флуоресцентного білка «ЕСFP» була оцінена як 2,14 мкмоль/л.

За результатами серії таких експериментів для кількох нейронів обчислена медіана концентрації білка НРСА YFP складала $3,4 \pm 1,1$ мкмоль/л з максимальними величинами на рівні 10 мкмоль/л [1].

Після розгляду різних варіантів, для виміру концентрації екзогенних експресованих флуоресцентних білків, було обрано флуоресцентну мітку «EYFP» (див. рис. 3.8), барвник «Alexa Fluor 594» (див. рис. 3.6) та набір спектральних фільтрів «69008». В клітинній культурі гіпокампальних нейронів щурів було експресовано білок гіпокальцин НРСА з флуоресцентною міткою «EYFP» (далі YFP). За допомогою мікропіпетки було здійснено прорив мембрани окремих нейронів, в результаті чого відбулася дифузія розчину флуоресцентного барвника «Alexa Fluor 594» (далі Alexa) до цих клітин. Флуоресцентна емісія збуджувалась при центральній довжині хвилі в джерелі випромінювання 505 нм та 575 нм для YFP та Alexa відповідно. Знімки випромінювання флуоресцентної емісії в цих нейронах показані на рис. 3.12.

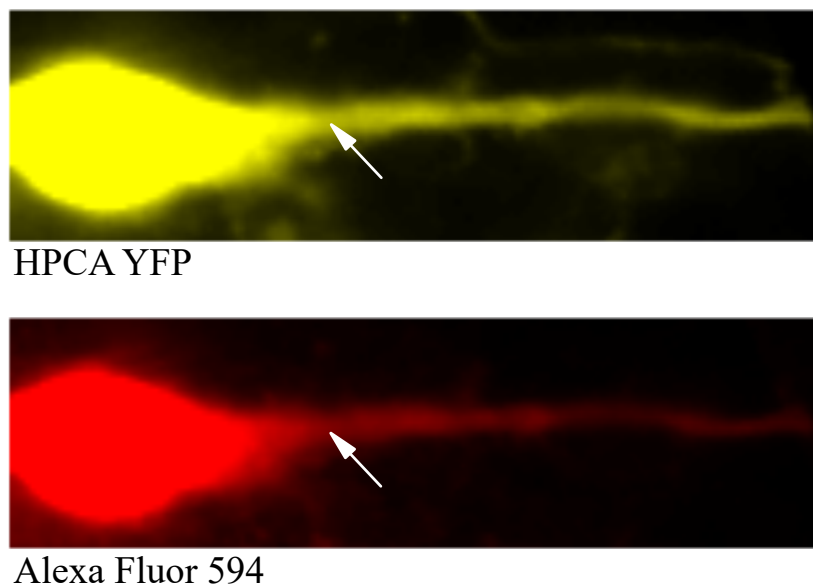


Рис. 3.12. Одиничний експеримент для виміру концентрації білка гіпокальцина з флуоресцентною міткою «EYFP» (жовтий псевдоколір) при центральній довжині хвилі в блоці вибірки джерела світла 505 нм та «Alexa Fluor 594» (червоний псевдоколір) при центральній довжині хвилі в блоці вибірки 575 нм в дендриті гіпокампального нейрона.

З використанням розробленої методики виміру концентрації екзогенно-експресованих флуоресцентно-мічених білків в живих клітинах було визначено, що концентрація експресованого гіпокальцина дикого типу або мутантних варіантів N75K та T71N в наших експериментах сягала майже 10 мкмоль/л [1]. Ця величина порівняна з експресією ендogenous гіпокальцина 30 мкмоль/л. Таким чином, концентрація екзогенних білків була достатньою для того, щоб мати змогу впливати на сигналізацію ендogenous гіпокальцина у культивованих нейронах гіпокампа щурів, що обґрунтувало можливість проведення подальших досліджень з нейронами гіпокампа.

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

НРСА є потужним Ca^{2+} буфером. Так, його вклад до цитозольної буферної ємності може сягати 100 мкмоль/л [132]. Доцільно перевірити, чи погіршують дистонічні мутації N75K та T71N, що присутні у EF-домени 2, зв'язування Ca^{2+} , що в свою чергу призводить до зменшення цитозольної буферної ємності клітин по Ca^{2+} . Для цього було проведено гетерологічну експресію НРСА та його дистонічних мутантів в клітинах НЕК-293. Цей тип клітин було обрано для проведення таких дослідів, оскільки вони дуже подібні до хромафінних клітин, у яких буферна ємність по Ca^{2+} [123] суттєво менша ніж у нейронів [133], котрі в основному використовувались у цій роботі. Можна очікувати, що додатковий екзогенний Ca^{2+} буфер, утворений внаслідок гетерологічної експресії НРСА, може мати більш суттєвий вплив на транз'єнт спаду $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у клітинах, які мають меншу буферну ємність [124].

Для початку, було оцінено чи збільшить експресія НРСА цитозольну буферну ємність по Ca^{2+} достатньо, щоб це призводило до суттєвих змін в транз'єнті спаду $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Для цього, клітини НЕК-293 було трансфіковано НРСА WT з флуоресцентною міткою CFP; далі трансфіковані та нетрансфіковані клітини в тих самих зразках культури були завантажені Ca^{2+} , що зв'язані фото-деструктивним буфером «NG-EGTA» та Ca^{2+} -чутливим барвником «Fura Red». Транз'єнти зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$ були

викликані серією послідовних спалахів УФ випромінювання і виміряні для трансфікованих НРСА WT та нетрансфікованих клітин в одному полі зору (рис. 3.13). Транз'єнт спаду $[Ca^{2+}]_i$ був суттєво повільнішим в клітинах трансфікованих НРСА WT в порівнянні з нетрансфікованими клітинами. Що проявляється у вищому залишковому рівні $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 3.14, 3.15), а саме $\Delta F/F = 0,34 \pm 0,02$ проти $0,17 \pm 0,01$ через 80 с для трансфікованих НРСА WT та нетрансфікованих клітин (далі NT) відповідно, $p < 0,01$, $n_{WT} = 10$ і $n_{NT} = 16$, 4 різні культури клітин. Таким чином, введення екзогенного НРСА явно підвищило буферну ємність по Ca^{2+} в клітинах НЕК-293, що помітно через збільшену тривалість транз'єнту спаду $[Ca^{2+}]_i$. Величина цієї зміни була суттєвою, тому, якщо мутантний НРСА справді має відмінності у зв'язуванні Ca^{2+} , то вони можуть бути помітні в такому експерименті.

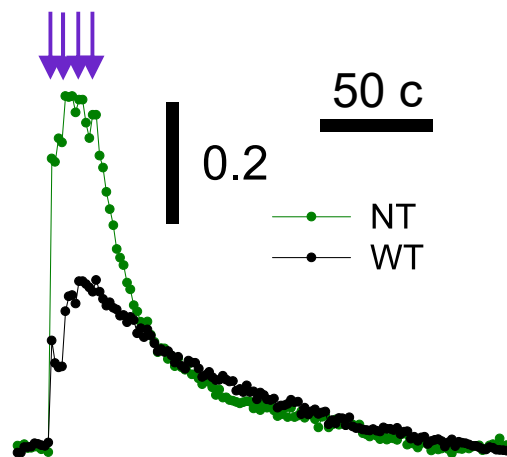


Рис. 3.13. Часовий перебіг транз'єнту $[Ca^{2+}]_i$ викликаних керованим вивільненням Ca^{2+} у клітинах нетрансфікованих (NT, зелена лінія) та трансфікованих НРСА WT (WT, чорна лінія). Фіолетові мітки вказують моменти керованого вивільнення Ca^{2+} . Вертикальні смуги вказують відносні зміни в інтенсивності флуоресценції «Fura Red» при керованому вивільненні Ca^{2+} . Зміни обчислені як $\Delta F/F$.

Наступним кроком була перевірка, чи призведе експресія мутантних дистонічних (DYT2) варіантів НРСА до зменшення буферної ємності по Ca^{2+} в НЕК-293 клітинах у порівнянні з НРСА WT. Ця сама культура клітин була по чергово трансфікована НРСА WT міченим флуоресцентною міткою CFP та дистонічними мутантами міченими за допомогою YFP. В результаті такої процедури були отри-

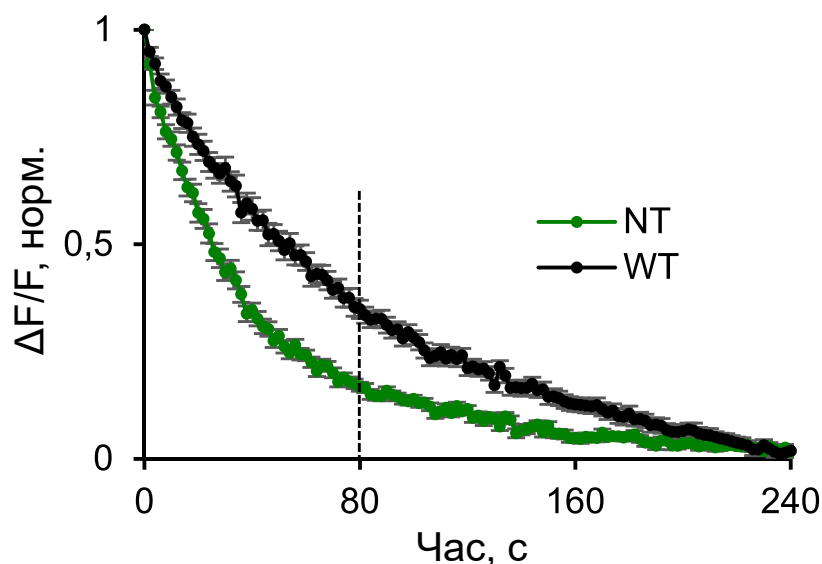


Рис. 3.14. Зведений графік кількох вимірних нормованих транз'єнтів $[Ca^{2+}]_i$ при керованому вивільненні Ca^{2+} . Транз'єнт був повільніший у випадку клітин трансфікованих НРСА WT в порівнянні з нетрансфікованими (NT). Пунктирна лінія відповідає обраному часу для побудови графіків наведених нижче. Розмірність вертикальної вісі координат відповідає усередненим величинам $\Delta F/F$ від кількох експериментів, нормованих на максимальне значення окремого експерименту.

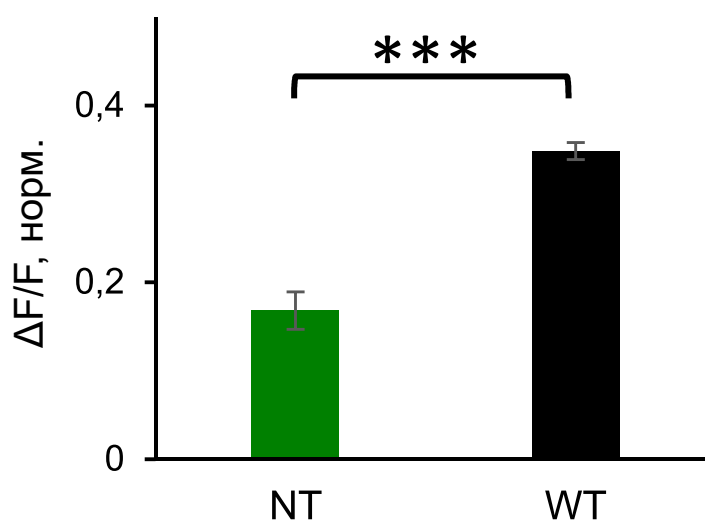


Рис. 3.15. Порівняння усереднених нормованих транз'єнтів $[Ca^{2+}]_i$ вимірних у момент часу 80 с після керованого вивільнення Ca^{2+} . Транз'єнт спаду $[Ca^{2+}]_i$ після керованого вивільнення Ca^{2+} швидший в нетрансфікованих клітинах, що вказує на більшу цитозольну буферну ємність по Ca^{2+} в клітинах трансфікованих НРСА WT.

мані клітини трансфіковані НРСА WT або обраним дистонічним мутантом (< 5 % клітин у кожній групі) в тій самій культурі та в одному полі зору. Таким чином було виявлено, що транз'єнти спаду $[Ca^{2+}]_i$ суттєво швидші в клітинах котрі експресу-

ють мутант НРСА N75K у порівнянні з НРСА WT (рис. 3.16, 3.17, 3.18). А саме $\Delta F/F = 0,35 \pm 0,02$ проти $0,20 \pm 0,02$ через 80 с для НРСА WT та мутанту N75K відповідно, при $p < 0,01$, $n_{WT} = 11$ і $n_{N75K} = 11$, 4 культури клітин. Разом з тим, для випадку мутанту T71N не було виявлено суттєвих відмінностей в цих параметрах у порівнянні з НРСА WT (рис. 3.19, 3.20, 3.21). А саме $\Delta F/F = 0,33 \pm 0,02$ проти $0,29 \pm 0,03$ через 80 с для НРСА WT та мутанту T71N відповідно, при $p < 0,46$, $n_{WT} = 12$ і $n_{N75K} = 23$, 5 культур клітин. Ці результати вказують на зменшену загальну буферну ємність мутантного НРСА N75K в порівнянні з НРСА WT у межах досліджуваного діапазону $[Ca^{2+}]_i$.

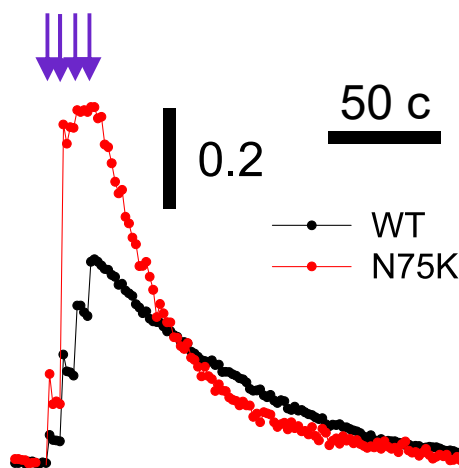


Рис. 3.16. Часовий перебіг транзйенту $[Ca^{2+}]_i$ викликаних керованим вивільненням Ca^{2+} у клітинах трансфікованих НРСА N75K (N75K, червона лінія) та трансфікованих НРСА WT (WT, чорна лінія).

Буферна ємність по Ca^{2+} є функцією $[Ca^{2+}]_i$ [123]. Якщо зв'язування Ca^{2+} в EF-руці 2 у дистонічних мутантів було збережене, але характеризувалось меншою афінністю, то зв'язування Ca^{2+} при вищих рівнях $[Ca^{2+}]_i$ могло б бути порівняно сильнішим ніж при базальному рівні. Ця гіпотеза була перевірена в експерименті з керованим вивільненням Ca^{2+} чотирма УФ-спалахами з інтервалом між ними в 8 с. Оскільки в клітинах НЕК-293 викид Ca^{2+} надзвичайно повільний, то ці спалахи проявились у чотирьох ступенях збільшення $[Ca^{2+}]_i$ і за кожним ступенем спостерігався майже постійний рівень $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 3.22). Описані експерименти проводились по-

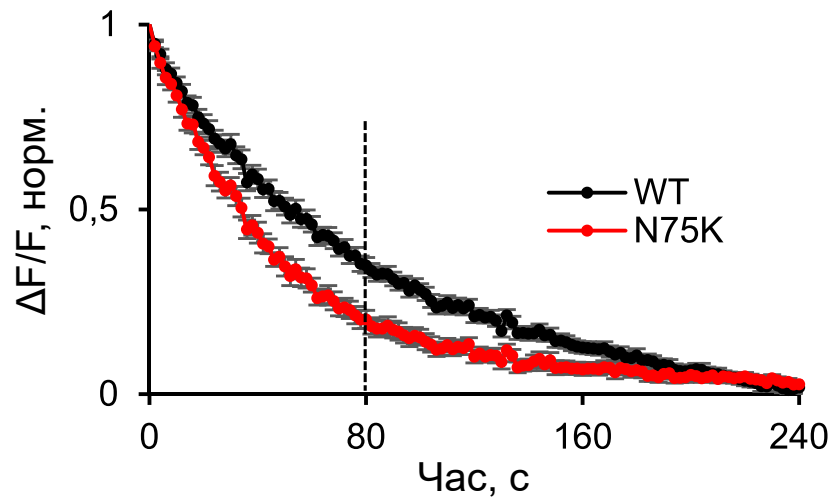


Рис. 3.17. Зведений графік кількох вимірних нормованих транз'єнтів $[Ca^{2+}]_i$ при керованому вивільненні Ca^{2+} . Транз'єнт був повільніший у випадку клітин трансфікованих НРСА WT в порівнянні з трансфікованими НРСА N75K (N75K). Пунктирна лінія відповідає обраному часу для побудови графіків наведених нижче. Розмірність вертикальної вісі координат відповідає усередненим величинам $\Delta F/F$ від кількох експериментів, нормованим на максимальне значення окремого експерименту.

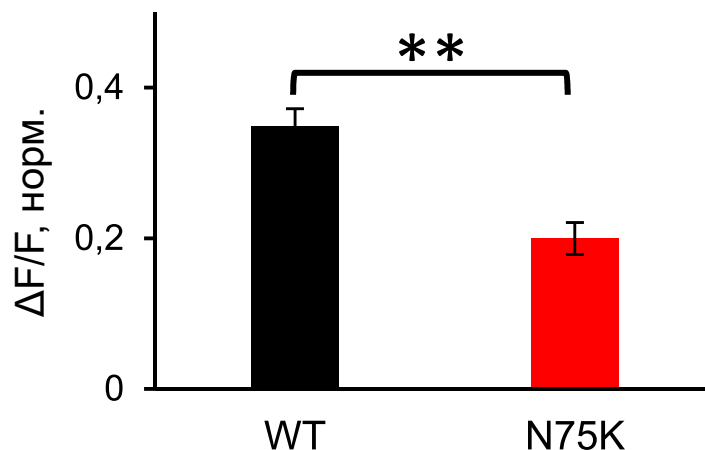


Рис. 3.18. Порівняння усереднених нормованих $[Ca^{2+}]_i$ вимірних у момент часу 80 с після керованого вивільнення Ca^{2+} . Транз'єнт спаду $[Ca^{2+}]_i$ після керованого вивільнення Ca^{2+} швидший в клітинах трансфікованих НРСА N75K, що вказує на меншу цитозольну буферну ємність по Ca^{2+} в них у порівнянні з трансфікованими НРСА WT.

парно в межах однієї культури клітин та одного поля зору для НРСА WT міченого CFP та обраного дистонічного мутанта з міткою YFP. Всі виміряні рівні $[Ca^{2+}]_i$ в конкретній клітині були нормовані на остаточний рівень, що спостерігався після кінцевого спалаху. Було виявлено суттєво більше відносне підвищення $[Ca^{2+}]_i$ пі-

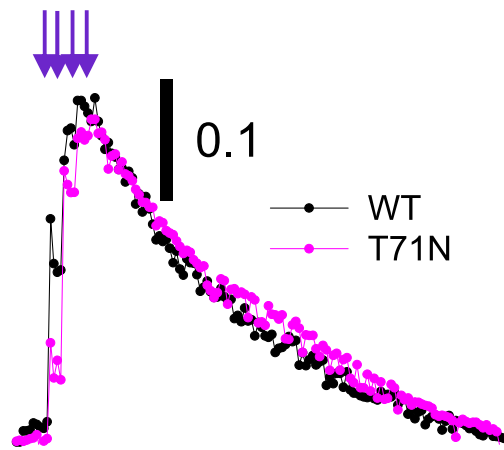


Рис. 3.19. Часовий перебіг транзйенту $[Ca^{2+}]_i$ викликаних керованим вивільненням Ca^{2+} у клітинах трансфікованих НРСА Т71N (Т71N, фіолетова лінія) та трансфікованих НРСА WT (WT, чорна лінія).

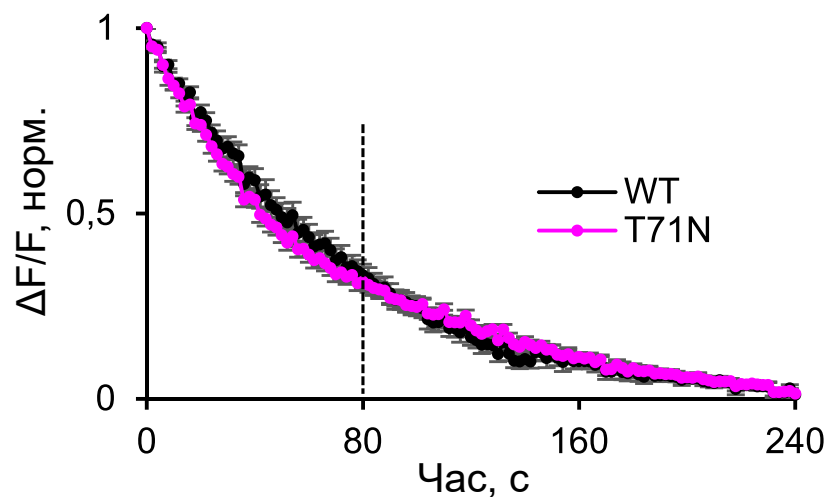


Рис. 3.20. Зведений графік кількох виміряних нормованих транзйентів $[Ca^{2+}]_i$ при керованому вивільненні Ca^{2+} . Транзйент був повільніший у випадку клітин трансфікованих НРСА WT в порівнянні з трансфікованими НРСА Т71N (Т71N). Пунктирна лінія відповідає обраному часу для побудови графіків наведених нижче. Розмірність вертикальної вісі координат відповідає усередненим величинам $\Delta F/F$ від кількох експериментів, нормованим на максимальне значення окремого експерименту.

сля першого спалаху в клітинах, котрі експресують мутант N75K в порівнянні як з НРСА WT та і з мутантом Т71N (рис. 3.22, 3.23). А саме

$$\left. \begin{array}{l} \text{WT} : \Delta F/F = 0,17 \pm 0,03; n = 27 \\ \text{T71N} : \Delta F/F = 0,18 \pm 0,02; n = 26 \end{array} \right\} p < 0,05$$

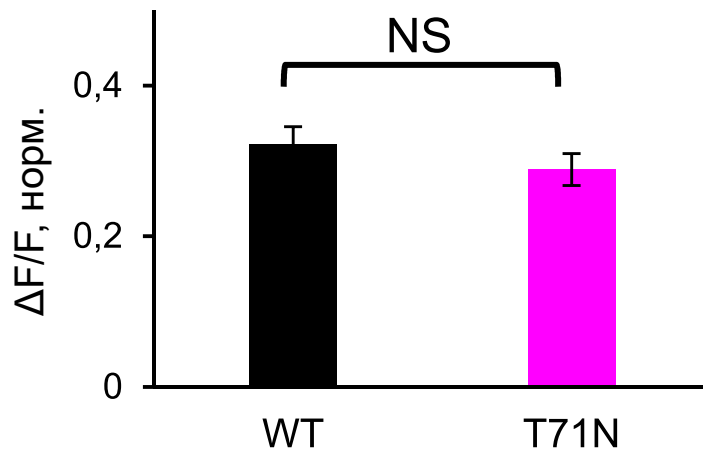


Рис. 3.21. Порівняння усереднених нормованих $[Ca^{2+}]_i$ виміряних у момент часу 80 с після керованого вивільнення Ca^{2+} . Транз'єнт спаду $[Ca^{2+}]_i$ після керованого вивільнення Ca^{2+} у клітинах трансфікованих НРСА Т71N суттєво не відрізняється від спаду у клітин трансфікованих НРСА WT.

та

$$\left. \begin{array}{l} \text{WT} : \Delta F/F = 0,17 \pm 0,03; n = 27 \\ \text{N75K} : \Delta F/F = 0,28 \pm 0,04; n = 11 \end{array} \right\} p < 0,01$$

що вказує на порівняно меншу буферну ємність по Ca^{2+} у мутантного НРСА N75K

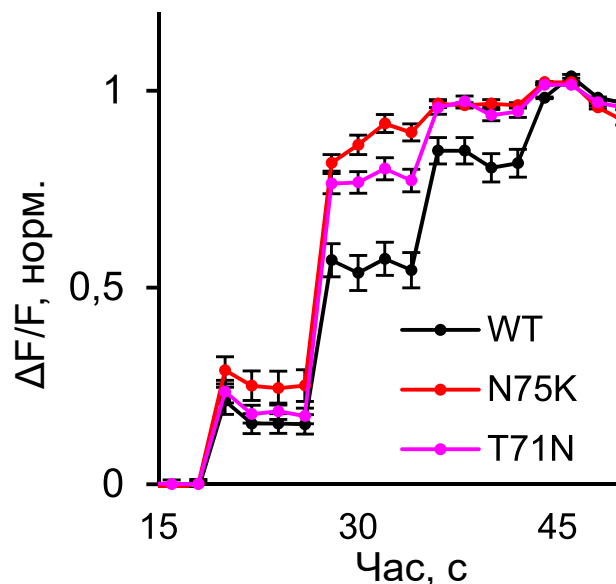


Рис. 3.22. Ступені підвищення $[Ca^{2+}]_i$ у відповідь на серію керованих вивільнень Ca^{2+} у клітин трансфікованих НРСА WT та його дистонічними мутантами Т71N та N75K.

при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$. Водночас спостерігався зворотній результат після 3-го

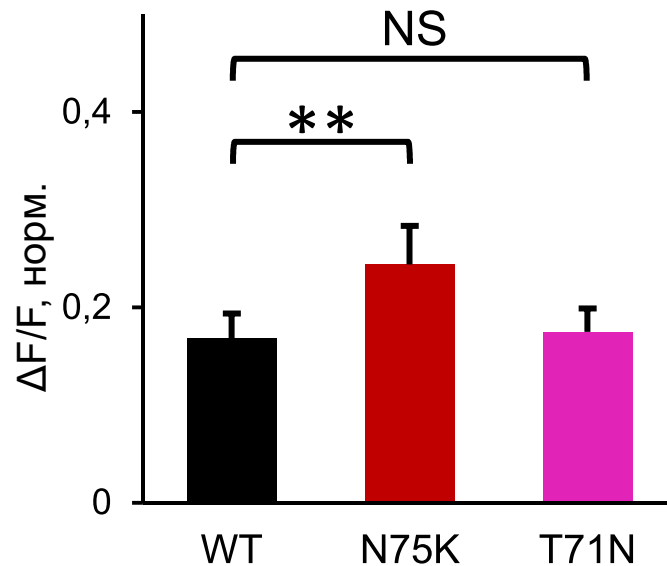


Рис. 3.23. Амплітуди нормованої зміни $[Ca^{2+}]_i$ після першого вивільнення Ca^{2+} . В клітинах, що експресують НРСА N75K амплітуда значно більша, а це вказує на низьку здатність цього мутантного білка приєднувати Ca^{2+} при $[Ca^{2+}]_i$ близькій до базального рівня в порівнянні з іншими розглянутими варіантами НРСА.

спалаху. Так, різниця між нормованими рівнями $[Ca^{2+}]_i$ після 3-го спалаху була значно більша в клітинах, які експресують НРСА WT порівняно як з T71N (рис. 3.22, 3.24)

$$\left. \begin{array}{l} \text{WT} : \Delta F/F = 0,26 \pm 0,02; n = 27 \\ \text{T71N} : \Delta F/F = 0,17 \pm 0,02; n = 26 \end{array} \right\} p < 0,05$$

так і з N75K (рис. 3.22, 3.24)

$$\left. \begin{array}{l} \text{WT} : \Delta F/F = 0,26 \pm 0,02; n = 27 \\ \text{N75K} : \Delta F/F = 0,07 \pm 0,02; n = 11 \end{array} \right\} p < 0,01$$

Такі результати вказують на те, що при підвищенні $[Ca^{2+}]_i$ зв'язування Ca^{2+} послаблюється у НРСА WT та посилюється у мутантного НРСА N75K.

Тому, НРСА WT має більшу загальну буферну ємність ніж мутант N75K в межах досліджуваного діапазону $[Ca^{2+}]_i$. А його буферна ємність порівняно більша при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$ ніж при високому рівні, на відміну від N75K. Останнє також вказує на більшу спорідненість НРСА WT до Ca^{2+} ніж у дистонічного мутантного НРСА N75K.

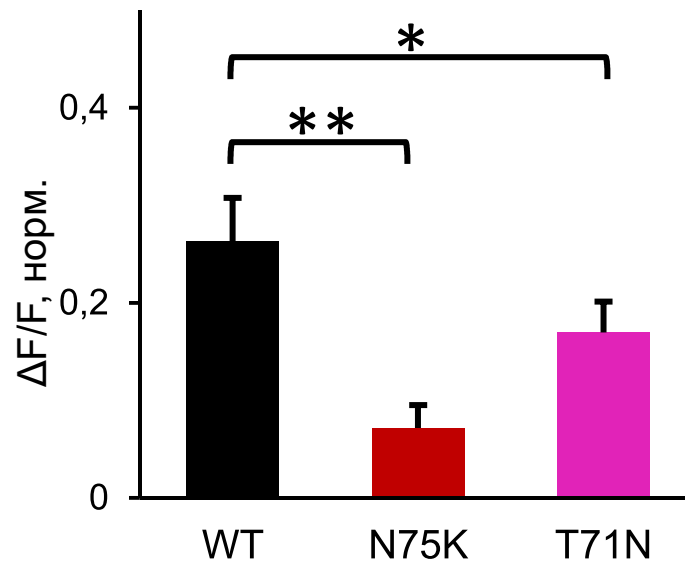


Рис. 3.24. Амплітуда нормованої зміни $[Ca^{2+}]_i$ після 3-го вивільнення Ca^{2+} суттєво менша у клітин трансфікованих НРСА N75K в порівнянні з іншими варіантами. Що вказує на здатність НРСА N75K приєднувати Ca^{2+} при більших концентраціях цих іонів.

3.3. Мутація N75K змінює біофізичні властивості НРСА

Отримані результати вказують на те, що дистонічні мутантні білки мають змінені біофізичні властивості в порівнянні з НРСА WT (рис. 3.13..3.24). Тому, ці мутації можуть призводити до змін в Ca^{2+} -залежності, величині та часових характеристиках процесу транслокації НРСА з цитозолу до мембрани. Вони також можуть впливати на Ca^{2+} -мірістоїловий перемикач [28], що в свою чергу може спричинити повну відсутність транслокації мутантного НРСА. Тому, далі було досліджено чи впливають дистонічні мутації на транслокацію НРСА до мембрани в клітинах НЕК-293. Для цього, клітини НЕК-293 було одночасно трансфіковано НРСА WT міченим флуоресцентною міткою CFP та одним з дистонічних мутантів з міткою YFP. Збільшення в $[Ca^{2+}]_i$ було викликане керованим вивільненням Ca^{2+} з фотодеструктивного буфера «NP-EGTA» за рахунок серії спалахів УФ випромінення (5..6 спалахів з тривалістю 0,5 с та інтервалом 2..10 с). Вимірювання $[Ca^{2+}]_i$ проводилось з використанням «Fura Red». В такому експерименті пара білків НРСА WT та обраного мутантного варіанту є об'єктами впливу однакового просторово-часового розподілу зміни $[Ca^{2+}]_i$. Що дає можливість прямо порівнювати Ca^{2+} -залежність, величину

та часові характеристики транслокації цих білків.

НРСА WT та обраний мутантний НРСА разом були рівномірно розповсюджені по об'єму та мембрані клітини [27, 29], за виключенням окремих малих органел (рис. 3.25). Різке збільшення $[Ca^{2+}]_i$ відбувалось при керованому вивільненні Ca^{2+} і призводило до транслокації НРСА WT та його дистонічних мутантних варіантів до плазматичної мембрани та певних внутрішньоклітинних органел (рис. 3.26, 3.27, 3.29, 3.30). Що вказує на принаймні часткову присутність функціонального Ca^{2+} -мірстоілового перемикача в обох мутантних варіантах. Транслокація НРСА WT та обраного мутантного варіанту відбувалась до одних і тих самих мембранних локусів (рис. 3.26, 3.27, 3.28), з чого можна зробити висновок, про високу спорідненість усіх досліджених варіантів НРСА до певних клітинних мембран. Однак величини транслокації відрізнялись. Саме мутантний НРСА N75K (рис. 3.29), а не T71N (рис. 3.30), суттєво менше транслокувався порівняно з НРСА WT (рис. 3.29): після перших двох вивільнень Ca^{2+}

$$\left. \begin{array}{l} \text{WT} : \Delta F/F = 0,14 \pm 0,03 \\ \text{N75K} : \Delta F/F = 0,06 \pm 0,01 \end{array} \right\} n = 9; p < 0,01$$

і після всіх вивільнень Ca^{2+}

$$\left. \begin{array}{l} \text{WT} : \Delta F/F = 0,44 \pm 0,07 \\ \text{N75K} : \Delta F/F = 0,29 \pm 0,06 \end{array} \right\} n = 9; p < 0,01$$

Такі результати прямо вказують на порушену сигнальну функцію мутантного НРСА N75K, оскільки його транслокація до мембрани при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$ мала. Нормовані на свою амплітуду виміряні рівні транслокації (рис. 3.31) вказують, що дві перші порції вивільнених Ca^{2+} призвели до більшої відносної транслокації НРСА WT в порівнянні з НРСА N75K (рис. 3.32)

$$\left. \begin{array}{l} \text{WT} : \Delta F/F = (32 \pm 3) \% \\ \text{N75K} : \Delta F/F = (22 \pm 2) \% \end{array} \right\} n = 5; p < 0,05$$

в той час, як 4 та 5 порції Ca^{2+} викликали більший нормований рівень транслокації

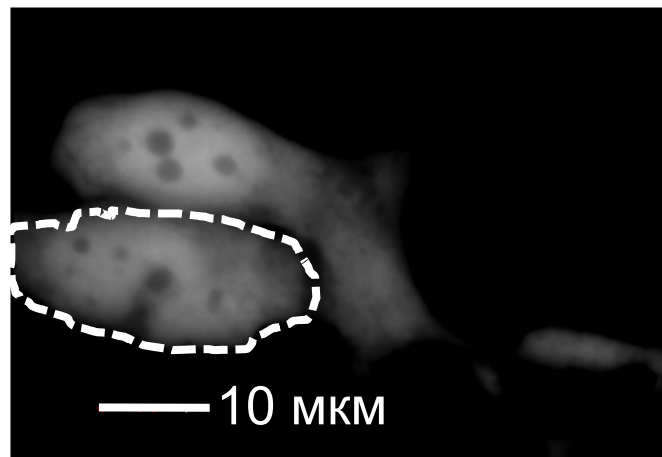


Рис. 3.25. Знімок флуоресценції у клітинах НЕК, спільно трансфікованих НРСА WT з міткою CFP та НРСА N75K з міткою YFP. Знімок зареєстрований в спектральному каналі емісії флуоресцентної мітки CFP.

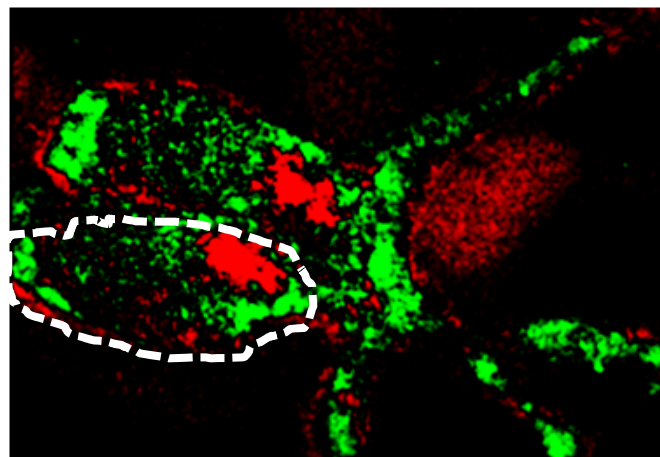


Рис. 3.26. Знімок флуоресценції у клітинах НЕК, спільно трансфікованих НРСА WT з міткою CFP та НРСА N75K з міткою YFP. Знімок зареєстрований в спектральному каналі емісії флуоресцентної мітки CFP. Транслокація НРСА WT з міткою CFP до певних місць в мембрані клітини. Червоні та зелені області вказують на місця в яких транзієнт $[Ca^{2+}]_i$ призвів до транслокації білка туди та звідти, відповідно.

саме НРСА N75K в порівнянні з НРСА WT (рис. 3.32)

$$\left. \begin{array}{l} \text{WT} : \Delta F/F = (28 \pm 3) \% \\ \text{N75K} : \Delta F/F = (41 \pm 2) \% \end{array} \right\} n = 5; p < 0,01$$

Це вказує що НРСА WT більш чутливий до Ca^{2+} при базальному рівні $[Ca^{2+}]_i$ порівняно з N75K. А це підтверджує попередні висновки (див. рис. 3.24), про те, що спорідненість НРСА WT до Ca^{2+} більша ніж у НРСА N75K.

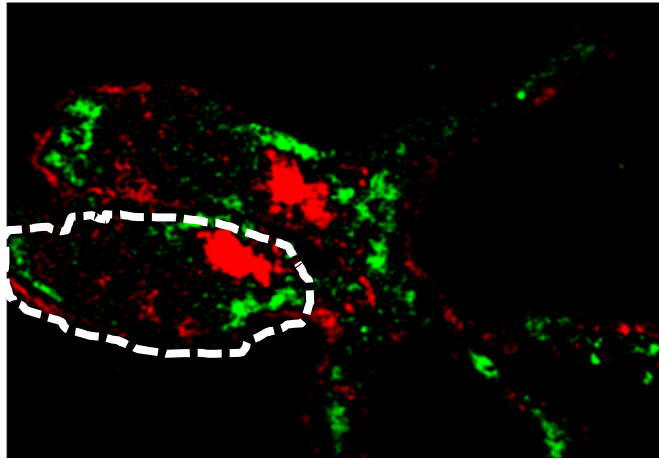


Рис. 3.27. Знімок флуоресценції у клітинах НЕК, спільно трансфікованих НРСА N75К з міткою YFP та НРСА N75К з міткою YFP. Знімок зареєстрований в спектральному каналі емісії флуоресцентної мітки YFP. Транслокація НРСА N75К з міткою YFP до певних місць в мембрані клітини. Червоні та зелені області вказують на місця в яких транзієнт $[Ca^{2+}]_i$ призвів до транслокації білка туди та звідти, відповідно.

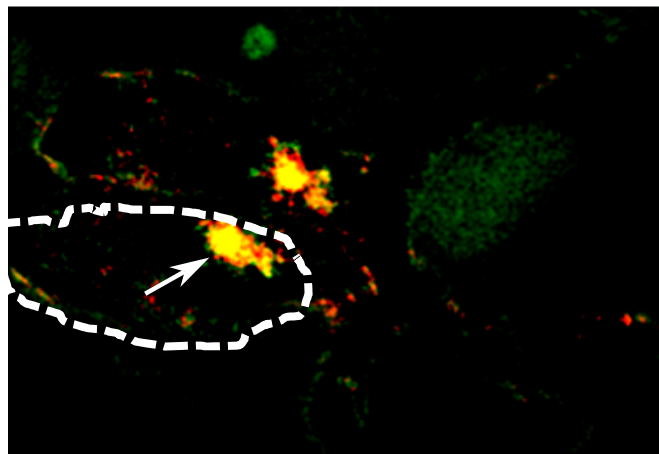


Рис. 3.28. Комбінований знімок флуоресценції у клітинах НЕК, спільно трансфікованих НРСА N75К з міткою YFP та НРСА N75К з міткою YFP. Знімок зареєстрований в спектральному каналі емісії флуоресцентної мітки CFP та YFP. Червоний та зелений псевдокольори відповідають місцям позитивної транслокації НРСА WT та N75K, відповідно. Жовтий псевдоколір утворений в місцях куди одночасно транслокувались обидва білки.

Далі було досліджено залежність транслокації НРСА та його мутантних варіантів в усталеному стані від величини $[Ca^{2+}]_i$, в усьому досяжному внаслідок керованого вивільнення діапазоні $[Ca^{2+}]_i$. Такий експеримент було побудовано опираючись на факт, що у клітинах НЕК-293 транзієнт спаду $[Ca^{2+}]_i$ дуже повільний

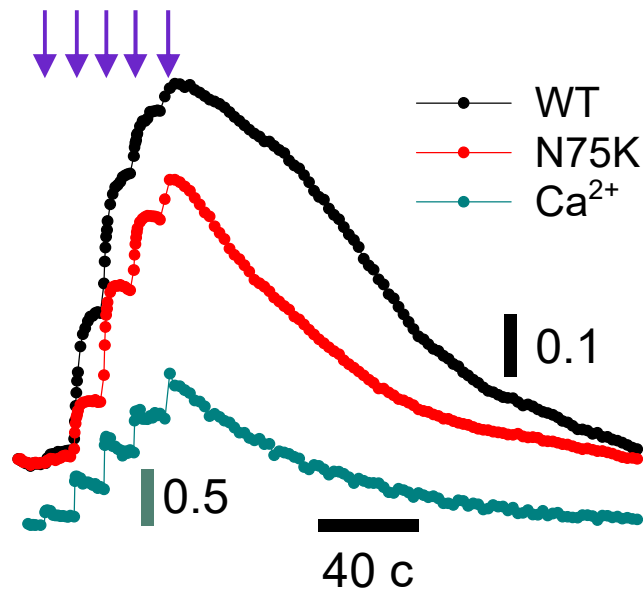


Рис. 3.29. Часовий перебіг транзєнтів при керованому поетапному вивільненї Ca^{2+} (моменти часу вказанї вертикальними стрїлками), обчислених для областї клїтини вказанї стрїлкою на рис. 3.28: зелена лїнія – змїна $[\text{Ca}^{2+}]_i$; чорна та червона лїнія – змїна їнтенсивностї флуоресценцї НРСА WT та N75K вїдповїдно.

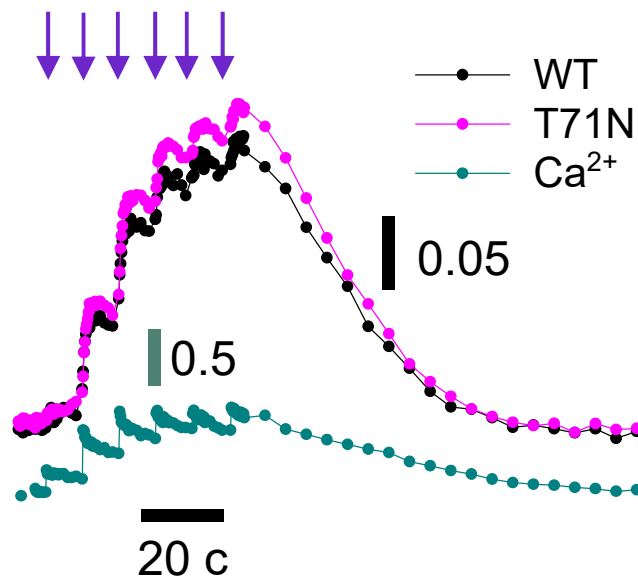


Рис. 3.30. Часовий перебіг транзєнтів при керованому поетапному вивільненї Ca^{2+} (моменти часу вказанї вертикальними стрїлками), обчислених для областї клїтини вказанї стрїлкою на рис. 3.28: зелена лїнія – змїна $[\text{Ca}^{2+}]_i$; чорна та рожева лїнія – змїна їнтенсивностї флуоресценцї НРСА WT та T71N вїдповїдно.

ї може тривати 2..3 хв. (рис. 3.13..3.24, 3.29, 3.30). В порївняннї, процеси, що є частиною механїзму транслокацїї НРСА, майже на два порядки швидшї [29, 30]. Тому досліджуванї бїлки швидко переходять в стан квазїрівноваги щодо $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при її ду-

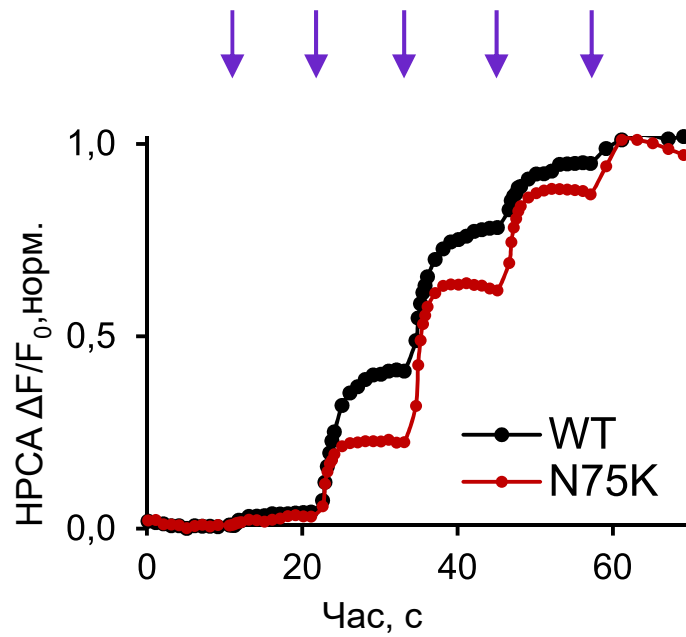


Рис. 3.31. Нормований часовий перебіг наростання інтенсивності флуоресценції білка в області транслокації зображеної, по вертикальній вісі відкладена величина $\Delta F/F_0$ нормована по максимальному значенню.

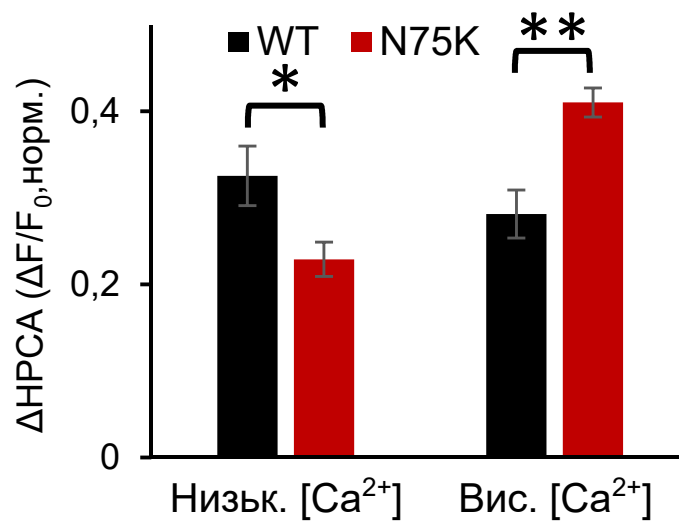


Рис. 3.32. Зведений графік для порівняння відносної інтенсивності флуоресценції в області транслокації білків HPCA WT міченого CFP та його варіанту N75K міченого YFP на початку (перші два спалахи УФ-випромінення) та наприкінці (останні два спалахи) керованого вивільнення Ca^{2+} .

же повільному спаді. Проведені експерименти показали, що амплітуда транслокації була більшою у HPCA WT порівняно з мутантним варіантом N75K в усьому досліді-

джуваному діапазоні $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 3.29)

$$\left. \begin{array}{l} \text{WT} : \Delta F/F = 0,44 \pm 0,06 \\ \text{N75K} : \Delta F/F = 0,29 \pm 0,06 \end{array} \right\} n = 9; p < 0,001$$

Нормована постійна часу τ транзйенту транслокації була меншою для мутантного НРСА N75K, що відповідає пришвидшеному завершенню цього процесу (рис. 3.33)

$$\left. \begin{array}{l} \text{WT} : \tau = (38,3 \pm 1,6) \text{ с} \\ \text{N75K} : \tau = (26,3 \pm 2,4) \text{ с} \end{array} \right\} n = 9; p < 0,001$$

Разом з тим для мутантного НРСА T71N не було виявлено суттєвої різниці в ам-

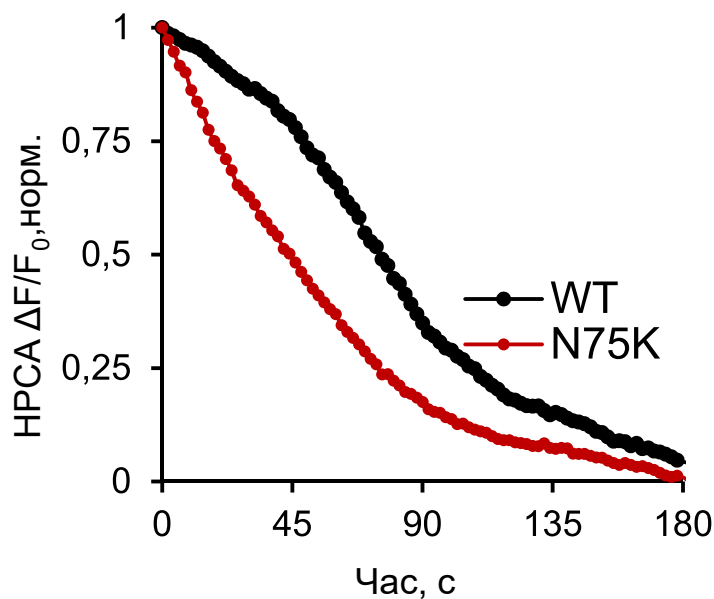


Рис. 3.33. Нормований часовий перебіг спаду транзйенту транслокації показаного на рис. 3.29. Видно прискорений спад транслокації НРСА N75K.

плітуді транслокації та постійній часу спаду в порівнянні з НРСА WT (рис. 3.30):

$$\left. \begin{array}{l} \text{WT} : \Delta F/F = 0,20 \pm 0,02 \\ \text{T71N} : \Delta F/F = 0,24 \pm 0,03 \end{array} \right\} n = 7; p < 0,01$$

та

$$\left. \begin{array}{l} \text{WT} : \tau = (19,5 \pm 3,2) \text{ с} \\ \text{T71N} : \tau = (20,6 \pm 3,4) \text{ с} \end{array} \right\} n = 7; p < 0,05$$

Одночасний вимір як транслокації білків, так і $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 3.29, 3.30) дозволяє побудувати нормовану залежність між цими величинами (рис. 3.34, 3.35).

Побудована для різних варіантів НРСА, ця залежність прямо вказує на погіршену здатність НРСА N75K до транслокації (рис. 3.34) при рівнях $[Ca^{2+}]_i$ близьких до базальних, в порівнянні з НРСА T71N (рис. 3.35).

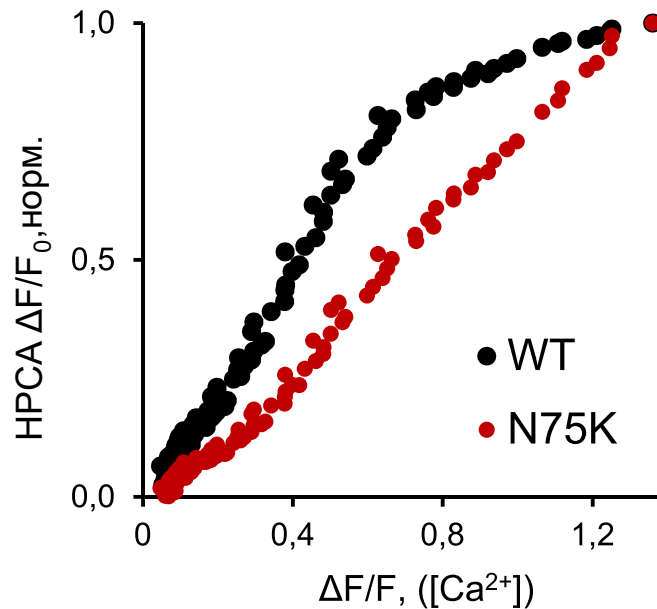


Рис. 3.34. Залежність нормованої транслокації НРСА WT та мутантного варіанту N75K від $[Ca^{2+}]_i$. Видно знижену здатність НРСА N75K до транслокації при $[Ca^{2+}]_i$ близькій до базального рівня. Величина $\Delta F/F$ пропорційна $[Ca^{2+}]_i$ (див. розділ 2.11).

Також для випадку спільно трансфікованих нейронів було проведено вимір площі клітин де проявляється залежність транслокації НРСА WT та N75K від $[Ca^{2+}]_i$. Що дозволяє перевірити сумарну здатність відповідного білка до транслокації в межах досліджуваної $[Ca^{2+}]_i$. Ця площа була суттєво менша для НРСА N75K порівняно з НРСА WT (рис. 3.36)

$$\left. \begin{array}{l} \text{WT} : S = (0,16 \pm 0,02) \text{ у.о.} \\ \text{N75K} : S = (0,10 \pm 0,01) \text{ у.о.} \end{array} \right\} n = 10; p < 0,001$$

але майже однакова при порівнянні НРСА WT та мутантного T71N (рис. 3.37)

$$\left. \begin{array}{l} \text{WT} : S = (0,16 \pm 0,03) \text{ у.о.} \\ \text{T71N} : S = (0,17 \pm 0,02) \text{ у.о.} \end{array} \right\} n = 7; p < 0,001$$

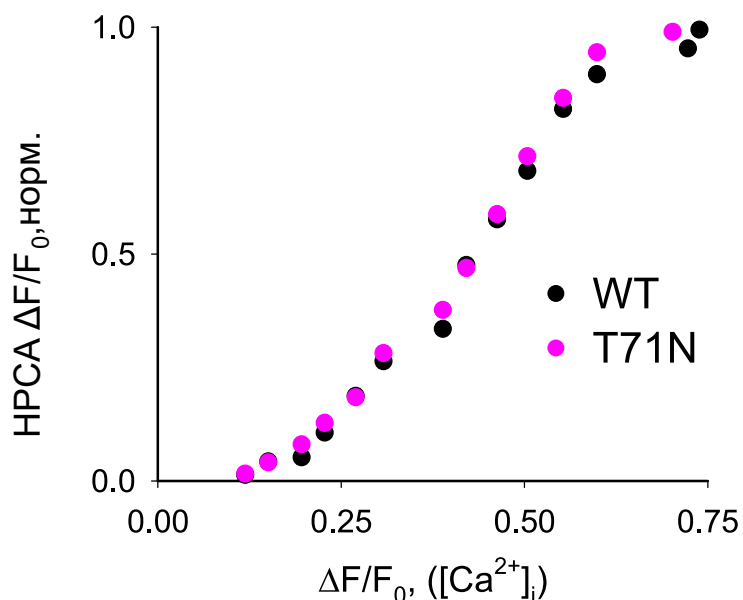


Рис. 3.35. Залежність нормованої транслокації НРСА WT та мутантного варіанту Т71N від $[Ca^{2+}]_i$. НРСА WT та Т71N майже не відрізняються. Величина $\Delta F/F$ пропорційна $[Ca^{2+}]_i$ (див. розділ 2.11).

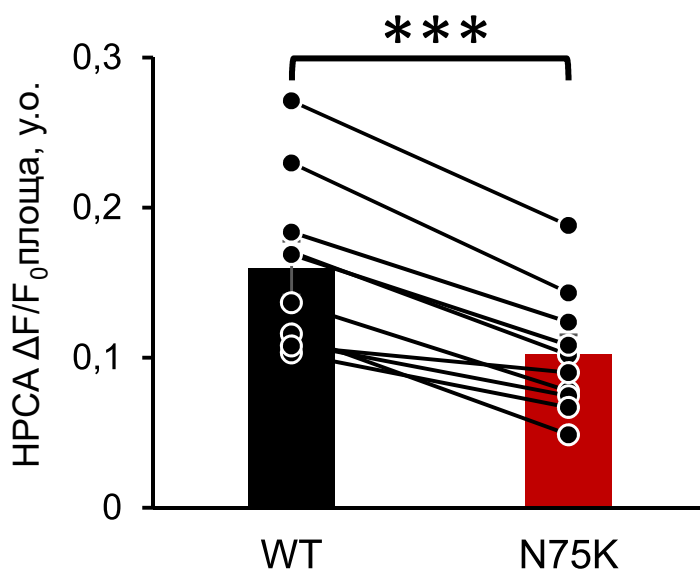


Рис. 3.36. Зведений графік залежності інтенсивності флуоресценції в області транслокації від $[Ca^{2+}]_i$ нормований на відповідну максимальну величину. Помітно меншу чутливість НРСА N75K до підвищення $[Ca^{2+}]_i$ порівняно з НРСА WT. Кожна пара з'єднаних точок представляє область де проявляється залежність транслокації НРСА WT та N75K у вигляді $\Delta F/F_0$ від $[Ca^{2+}]_i$ у вигляді $\Delta F/F$ для певного нейрона спільно трансфікованого плазмідями обох білків.

Загалом ці результати свідчать про те, що дистонічні мутації DYT2 не мають суттєвого впливу на Ca^{2+} -мірістоіловий перемикач та селективність транслокації до певних мембран. Однак порушена у мутантного НРСА N75K Ca^{2+} -чутливість

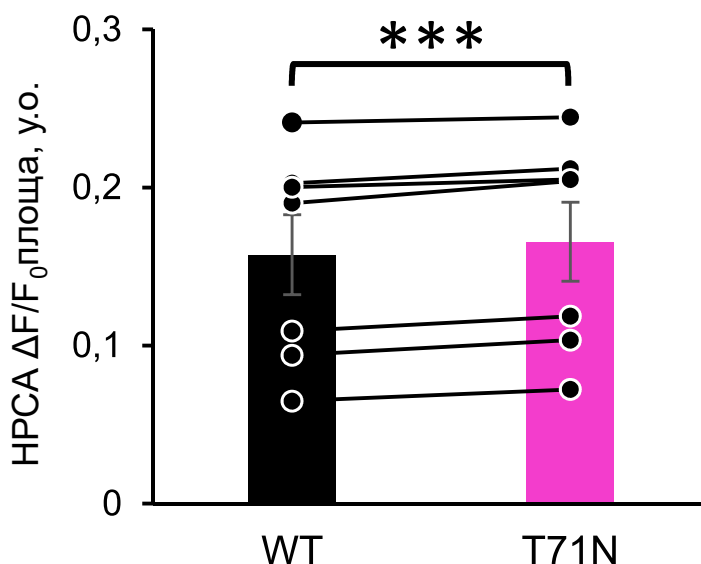


Рис. 3.37. Зведений графік залежності інтенсивності флуоресценції в області транслокації від $[Ca^{2+}]_i$ нормований на відповідну максимальну величину. Різниця між НРСА WT та мутантним варіантом T71N незначна. Кожна пара з'єднаних точок представляє область де проявляється залежність транслокації НРСА WT та T71N у вигляді $\Delta F/F_0$ від $[Ca^{2+}]_i$ у вигляді $\Delta F/F$ для певного нейрона спільно трансфікованого плазмідями обох білків.

призводить значного зменшення транслокації до мембран при фізіологічних рівнях $[Ca^{2+}]_i$.

3.4. Мутація N75K впливає на залежну від іонів кальцію транслокацію НРСА в нейронах гіпокампа

Просторово-часовий розподіл змін $[Ca^{2+}]_i$ викликаних керованим вивільненням Ca^{2+} в клітинах НЕК-293 відрізняється від таких котрі спостерігаються в нейронах при активації потенціалзалежних та ліганд-керованих Ca^{2+} каналів. Крім того, вміст внутрішнього шару фосфоліпідів нейронної мембрани, котрий визначає спорідненість до НРСА скоріше за все відрізняється від ліпідного шару, апарату Гольджі та плазматичної мембрани клітин НЕК-293. Тому, далі було проведено перевірку впливу від змінених мутацією N75K біофізичних властивостей НРСА на Ca^{2+} -залежну транслокацію в гіпокампальних нейронах. Оскільки провідність sAHP скоріше за все локалізовано до проксимальної частина апікального дендрита [134], то транслокація НРСА доцільно досліджувати в цій частині дендритного

дерева. З цією метою було виконано спільну трансфекцію нейронів в первинних гіпокампальних культурах НРСА WT міченим флуоресцентним білком CFP та НРСА N75K міченим YFP. Петч-клемп трансфікованих нейронів проводився в режимі фіксованої напруги, а зміна Ca^{2+} була викликана завдяки деполяризації мембрани з -70 мВ до 0 мВ. Викликані транзєнти $[\text{Ca}^{2+}]_i$ призвели до значно більшої транслокації НРСА WT порівняно з N75K. В широкому діапазоні тривалості деполяризації (рис. 3.38..3.49). Різниця в амплітуді транслокації була особливо помітна при коротких деполяризаціях, які призводять до швидких та малих по амплітуді транзєнтів для $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Наприклад, 3-кратна різниця по амплітуді при деполяризації тривалістю $0,25$ с (рис. 3.42..3.47, 3.50), $p < 0,01$, $n = 6$. Однак, при тривалій деполяризації у 4 с, котра викликає довгий та великий по амплітуді транзєнт $[\text{Ca}^{2+}]_i$, не було виявлено суттєвих відмінностей в амплітуді транслокації між НРСА WT та N75K (рис. 3.51, $p = 0,88$). До того ж, транслокація НРСА WT та мутантного варіанту НРСА N75K відбувалась в одні й ті самі місця плазматичної мембрани (жовті регіони на рис. 3.41). Останнє підтверджує, що мутація N75K суттєво не впливає на Ca^{2+} -мірістоїловий перемикач, спорідненість білка до плазматичної мембрани і, таким чином, не впливає на цільові області взаємодії НРСА. Але, більша транслокація НРСА WT при менших значеннях $[\text{Ca}^{2+}]_i$ порівняно з N75K підтверджує гіпотезу про зменшену чутливість останнього до зміни $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

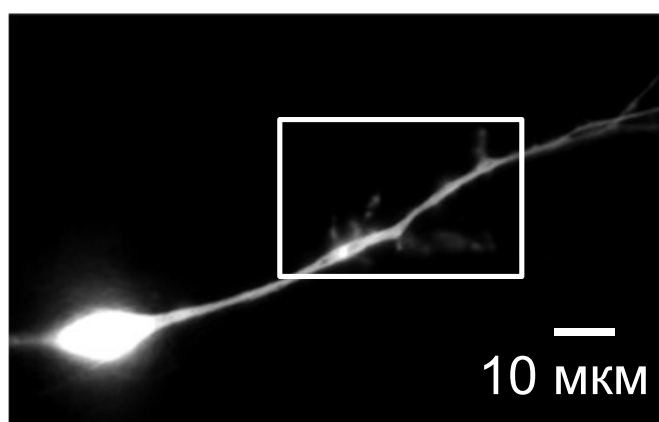


Рис. 3.38. Знімок флуоресценції обраного гіпокампального нейрона, котрий експресує білки НРСА WT мічений CFP та НРСА N75K мічений YFP. Реєстрацію зображення проведено в каналі емісії флуоресцентної мітки CFP. Виділена прямокутником область використана в наступних рисунках.

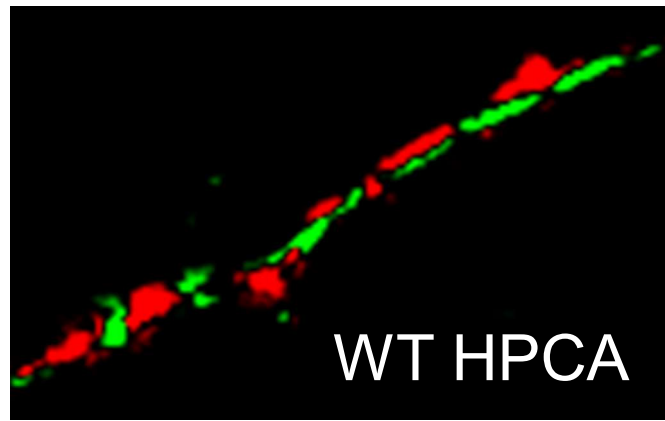


Рис. 3.39. Місця до яких відбувається транслокація NPCA WT міченого CFP (червоний колір на рисунку) в нейронному дендритному дереві у відповідь на деполяризацію нейрона з -70 мВ до 0 мВ на 1 с.

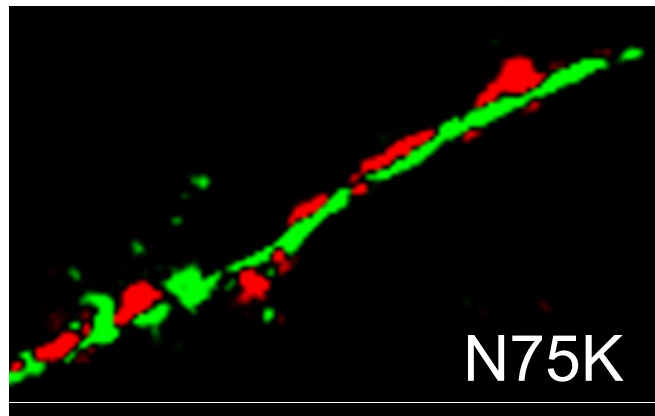


Рис. 3.40. Місця до яких відбувається транслокація NPCA N75K міченого YFP (червоний колір на рисунку) в нейронному дендритному дереві у відповідь на деполяризацію нейрона з -70 мВ до 0 мВ на 1 с.

Важливими критеріями порівняння NPCA з його мутантними варіантами є швидкості наростання та спаду транз'єнту транслокації. Ці параметри характеризують біофізичні властивості взаємодії білка як з Ca^{2+} та і з плазматичною мембраною і, ймовірно, визначають часовий перебіг sANP, що опосередковано транслокацією NPCA до плазматичної мембрани [31—33]. Час наростання в основному залежить від часової характеристики зв'язування Ca^{2+} та дифузії булка до плазматичної мембрани. Через те, що ці процеси мають тривалість менше секунди [135], а реєстрація

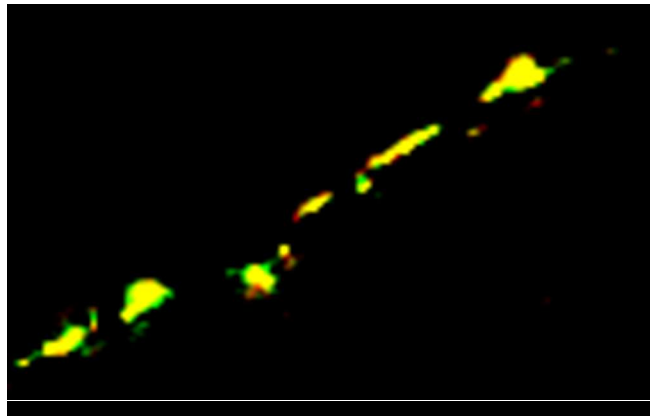


Рис. 3.41. Комбінований знімок області поверхні гіпокампального нейрона куди відбувається транслокація білків НРСА WT та N75К. Жовтим кольором показані області одночасної транслокації обох білків.

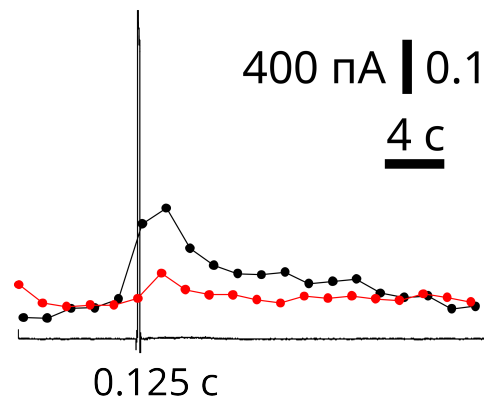


Рис. 3.42. Часовий перебіг транслокації НРСА WT міченого CFP (чорна пунктирна лінія) та НРСА N75К міченого YFP (червона лінія), а також трансмембранний струм (чорна лінія) викликаний прямокутним імпульсом деполяризації -70 мВ до 0 мВ тривалістю $0,125$ с. При малій тривалості деполяризації НРСА N75К майже не транслокується. Вертикальна мірна лінія вказує відносну зміну ($\Delta F/F$) інтенсивності флуоресценції білка в межах області виділеної на рис. 3.39 та рис. 3.40

зображень проводилась з низькою частотою (порядок 1 Гц) для зменшення фотовицвітання, то не представлялось можливим виявити можливу різницю в часі наростання транслокації для порівняння цих двох білків. Але було виявлено, що транз'єнт транслокації значно швидший для мутантного НРСА N75К в порівнянні з НРСА WT для кожної з обраних тривалостей деполяризації (рис. 3.52). Так, при деполяризації

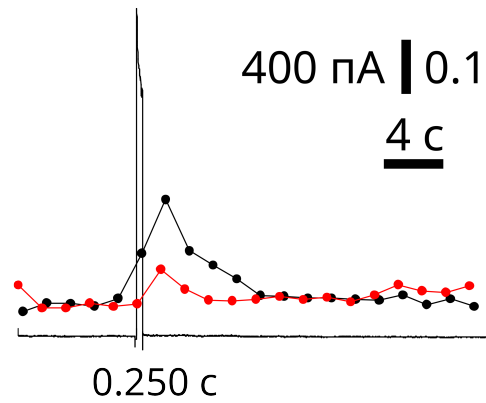


Рис. 3.43. Часовий перебіг транслокації HPCA WT міченого CFP (чорна пунктирна лінія) та HPCA N75K міченого YFP (червона лінія), а також трансмембранний струм (чорна лінія) викликаний прямокутним імпульсом деполяризації -70 мВ до 0 мВ тривалістю $0,250$ с.

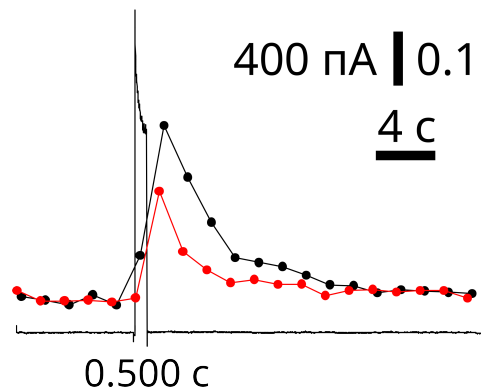


Рис. 3.44. Часовий перебіг транслокації HPCA WT міченого CFP (чорна пунктирна лінія) та HPCA N75K міченого YFP (червона лінія), а також трансмембранний струм (чорна лінія) викликаний прямокутним імпульсом деполяризації -70 мВ до 0 мВ тривалістю $0,5$ с.

2,0 с спад транзйенту

$$\left. \begin{array}{l} \text{WT} : \tau = (10,9 \pm 1,9) \text{ с} \\ \text{N75K} : \tau = (5,9 \pm 1,2) \text{ с} \end{array} \right\} n = 6; p < 0,001$$

При збільшенні тривалості деполяризації збільшується тривалість спаду транзйенту транслокації, що відображає залежність від $[\text{Ca}^{2+}]_i$ для обох білків (рис. 3.52). Однак відношення часу спаду цих білків суттєво не змінюється при збільшенні тривалості деполяризації (рис. 3.52), що вказує на прискорене розірвання зв'язків мутантного

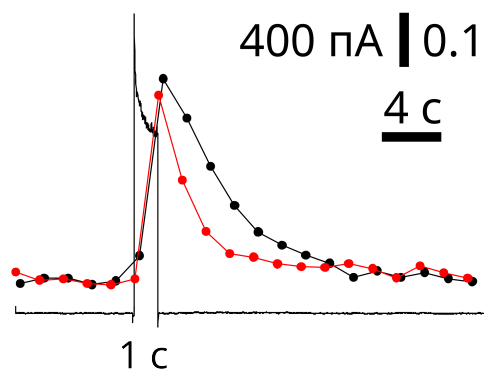


Рис. 3.45. Часовий перебіг транслокації НРСА WT міченого CFP (чорна пунктирна лінія) та НРСА N75K міченого YFP (червона лінія), а також трансмембранний струм (чорна лінія) викликаний прямокутним імпульсом деполяризації -70 мВ до 0 мВ тривалістю 1 с.

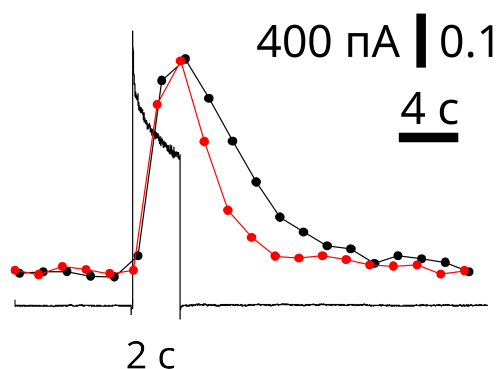


Рис. 3.46. Часовий перебіг транслокації НРСА WT міченого CFP (чорна пунктирна лінія) та НРСА N75K міченого YFP (червона лінія), а також трансмембранний струм (чорна лінія) викликаний прямокутним імпульсом деполяризації -70 мВ до 0 мВ тривалістю 2 с.

НРСА N75K з плазматичною мембраною порівняно з НРСА WT.

3.5. Короткі серії потенціалів дії не призводять до транслокації N75K

Ці експерименти дозволили виявити біофізичні зміни у функціонуванні НРСА, що викликані мутацією N75K в фізіологічному діапазоні $[Ca^{2+}]_i$, котрий можна спостерігати в гіпокампальних нейронах. Але виникає питання, як ці зміни впливають на транслокацію НРСА викликану фізіологічною нейронною активні-

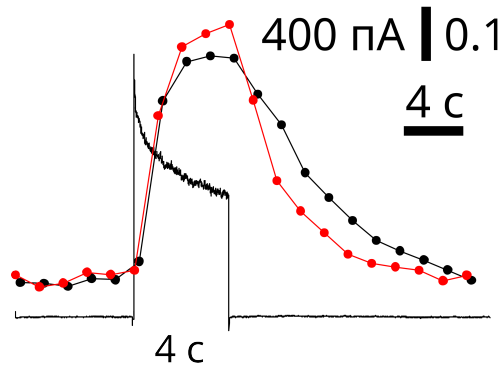


Рис. 3.47. Часовий перебіг транслокації НРСА WT міченого CFP (чорна пунктирна лінія) та НРСА N75K міченого YFP (червона лінія), а також трансмембранний струм (чорна лінія) викликаний прямокутним імпульсом деполяризації -70 мВ до 0 мВ тривалістю 4 с.

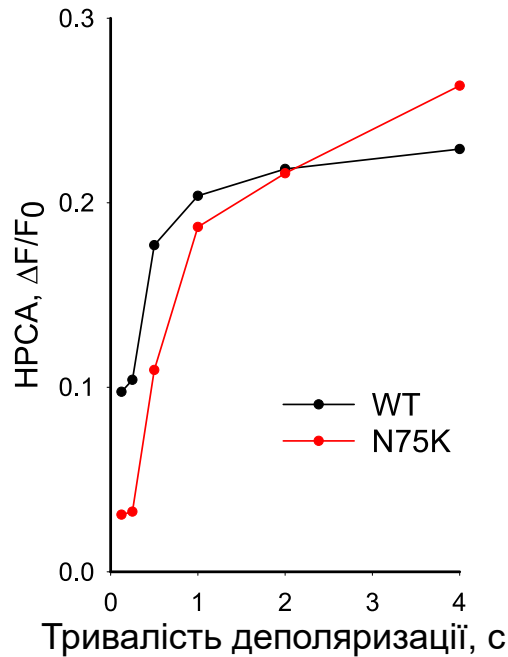


Рис. 3.48. Амплітуда транслокації при різних тривалостях деполяризації НРСА WT міченого CFP та НРСА N75K міченого YFP, експресованих одночасно в кожному з виміряних нейронів.

стю. Транслокація НРСА є фільтром низьких частот по $[Ca^{2+}]_i$ і не відбувається при короткотривалих підвищеннях $[Ca^{2+}]_i$ навіть зі значною амплітудою. По суті $[Ca^{2+}]_i$ інтегрується в даному процесі [29, 30]. Так, одиничний потенціал дії, що призводить до суттєвого підвищення $[Ca^{2+}]_i$ (з постійною часу спаду 12 мс [136]) у дендритному дереві нейрона, не призводить до помітної транслокації НРСА

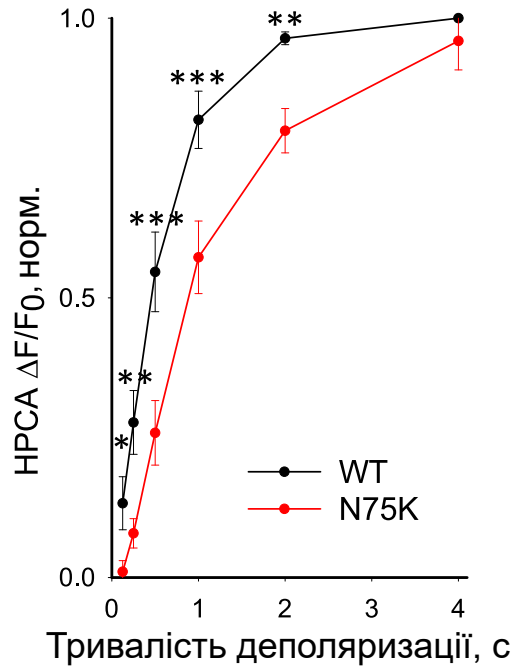


Рис. 3.49. Зведені результати нормованої амплітуди транслокації залежно від тривалості деполяризації. Проявляється порушена здатність НРСА N75К.

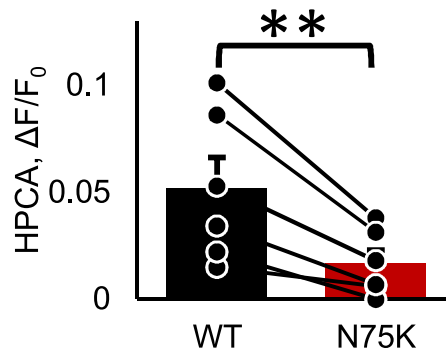


Рис. 3.50. Зменшення амплітуди транслокації НРСА N75К міченого YFP в порівнянні з НРСА WT міченим CFP у випадку короткої деполяризації 0,25 с (малий та короткий імпульс $[Ca^{2+}]_i$).

в дендритах гіпокампальних нейронів [30]. Тому, доцільно дослідити різницю в транслокації між НРСА WT та мутантного N75K як відповідь на серію потенціалів дії (5..100 потенціалів дії з частотою 50 Гц). Серія 5..20 потенціалів дії відповідає фізіологічній внутрішній активності нейронів, в той час, як довші серії мають місце при патологічних порушеннях [83, 137]. Було висунуто гіпотезу, що менша чутливість до Ca^{2+} та підвищена швидкість розірвання зв'язків у мутантного НРСА N75K має призводити до значних відмінностей в роботі Ca^{2+} -сигналів. Оскільки потенціали дії призводять до появи sANP через транслокацію НРСА до плазма-

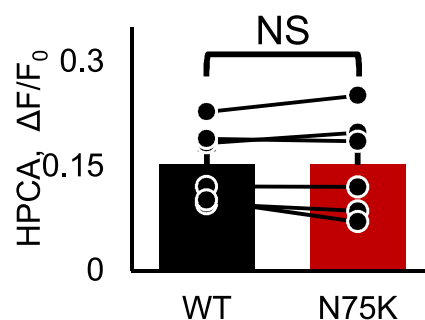


Рис. 3.51. Близький рівень амплітуди транслокації НРСА N75K міченого YFP в порівнянні з НРСА WT міченим CFP у випадку тривалої деполяризації 4 с (великий та довгий імпульс $[Ca^{2+}]_i$). Такий результат вказує на присутність Ca^{2+} -мірістоілового перемикача у мутантного варіанту НРСА N75K.

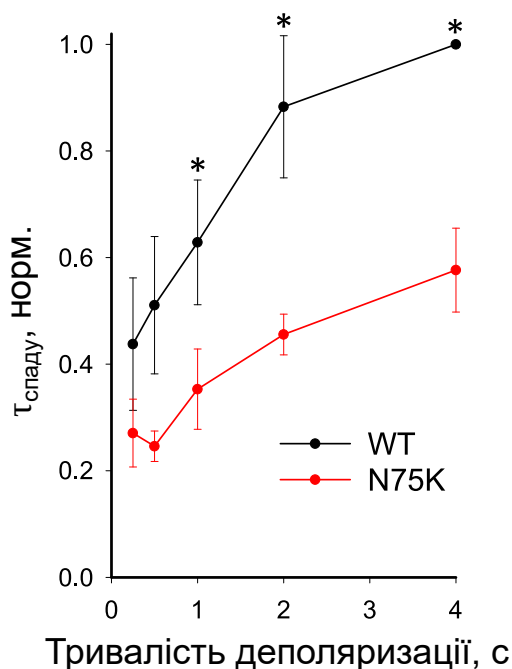


Рис. 3.52. Зведений графік нормованих постійних часу спаду транзйенту транслокації. Спад відбувається швидше у випадку НРСА N75K в порівнянні з НРСА WT.

тичної мембрани [31—33], доцільно перевірити, чи транслокується мутантний варіант цього білка при коротких серіях потенціалів дії. Для цього було проведено експеримент з серіями потенціалів дії у гіпокампальних нейронах, трансфікованих НРСА WT CFP та НРСА N75K YFP. Потенціали дії були викликані стимуляцією деполяризаційним струмом (рис. 3.53..3.56, 3.57). В цих дослідях спостерігалась відтворюваність транслокації НРСА WT у відповідь на серію коротких потенціалів

дії (5..20). А у випадку мутантного НРСА N75К транслокація була майже відсутня (рис. 3.53..3.59). В той час як транслокація НРСА WT досягла $(30 \pm 4)\%$ від максимальної величини після 20 потенціалів дії (рис. 3.59, $n = 11$), і амплітуда була в 6 разів вища ніж при транслокації N75К (рис. 3.60, $n = 11$).

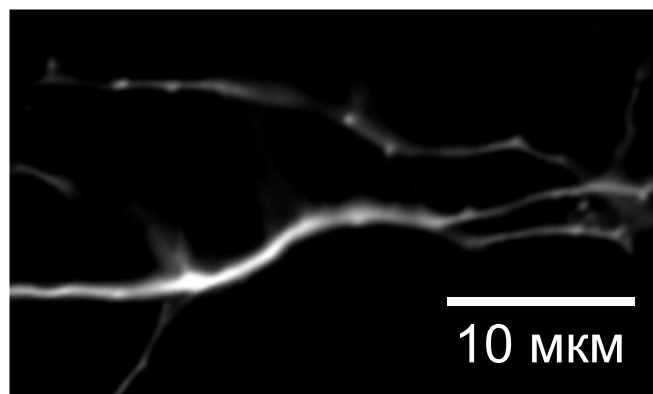


Рис. 3.53. Знімок флуоресценції близького дендритного дерева до показного гіпокампального нейрона в якому експресовані НРСА WT мічений CFP та НРСА N75К мічений YFP. Реєстрацію зображення проведено в каналі емісії CFP.

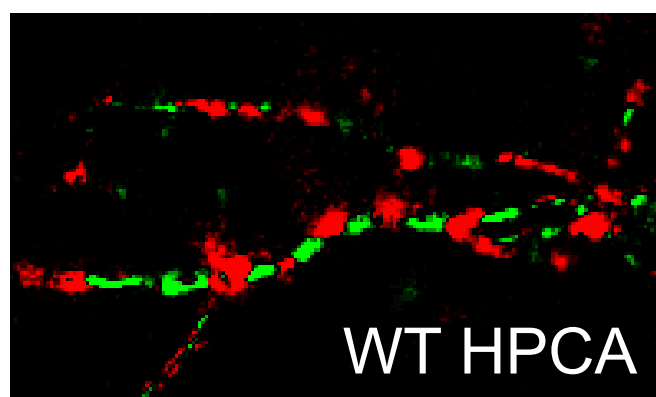


Рис. 3.54. Области транслокації (червоний псевдоколір) НРСА WT міченого CFP до плазматичної мембрани в дендритному дереві нейрона у відповідь на серію з 50 потенціалів дії при частоті 50 Гц.

Довгі серії потенціалів дії викликали транслокацію як НРСА WT, так і N75К (рис. 3.53..3.59). Амплітуда транслокації НРСА N75К була менша ніж у НРСА WT (рис. 3.58, 3.59) і складала $0,51 \pm 0,05\%$ від останньої (після 100 потенціалів дії,

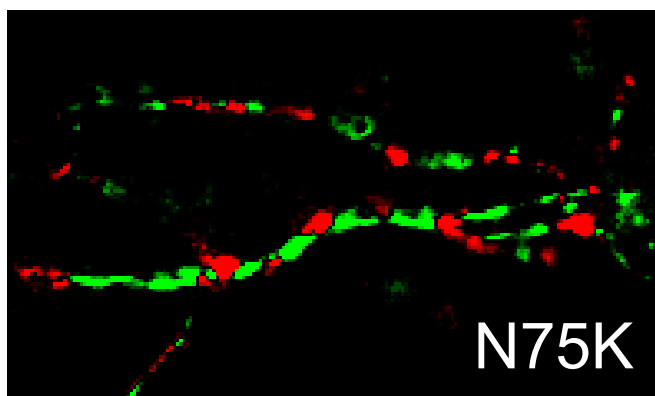


Рис. 3.55. Области транслокації (червоний псевдоколір) мутантного НРСА N75K міченого YFP до плазматичної мембрани в дендритному дереві нейрона у відповідь на серію з 50 потенціалів дії при частоті 50 Гц.

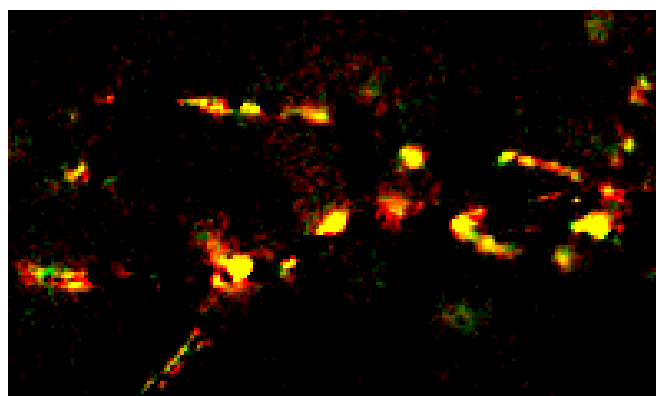


Рис. 3.56. Об'єднане зображення гіпокампального нейрона з показаними (жовтий псевдоколір) місцями одночасної транслокації НРСА WT та N75K.

$p < 0,001$, $n = 11$). Як і в попередніх результатах (рис. 3.25..3.52), НРСА WT та мутантний N75K транслокувались до тих самих місць в дендритній плазматичній мембрані (рис. 3.54..3.56).

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

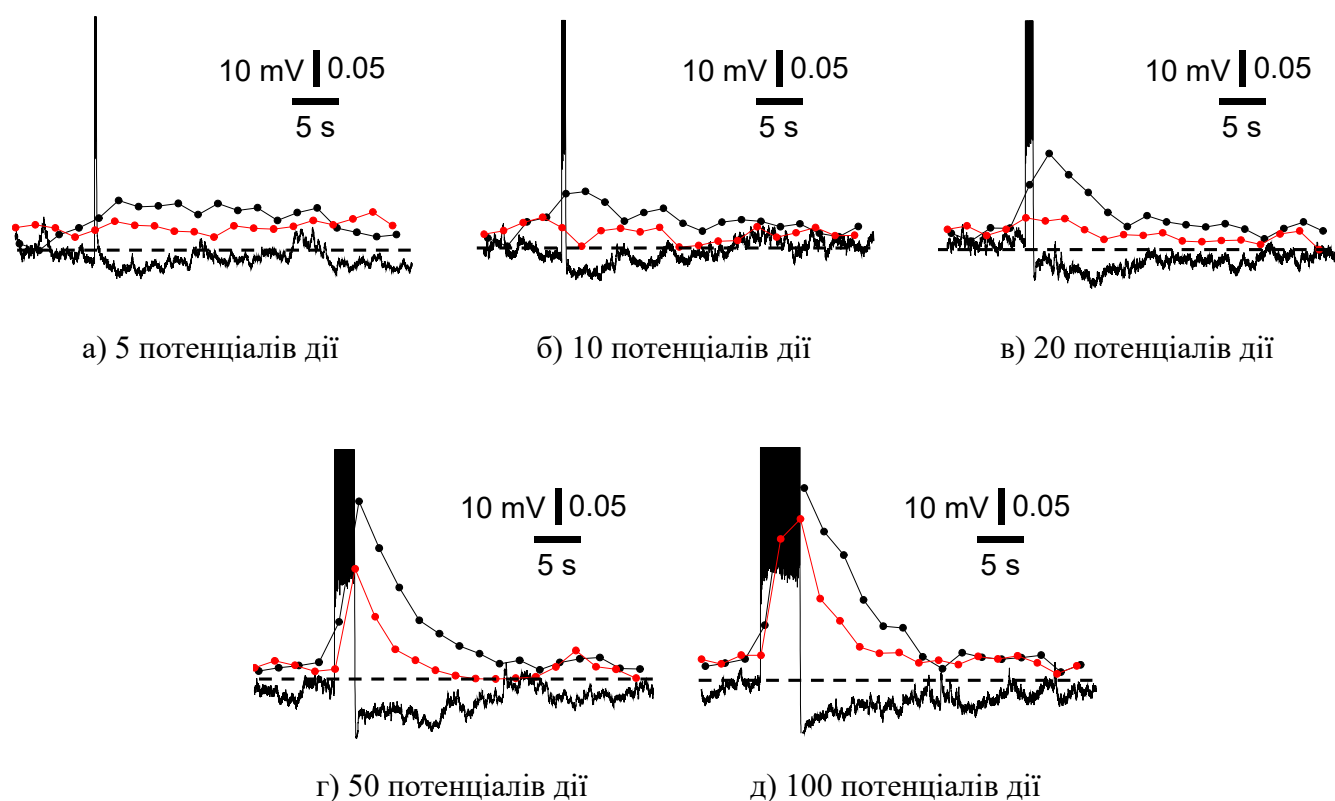


Рис. 3.57. Часовий перебіг транз'єнтів транслокації НРСА WT міченого СFP (чорна лінія), НРСА N75K міченого YFP (червона лінія) та зміни мембранного потенціалу (чорна лінія), що викликані серією з 5, 10, 20, 50 та 100 потенціалів дії в нейроні представлєному на рис. 3.53. Транслокація мутантного варіанту НРСА N75K менша за транслокацію НРСА WT. Чорна вертикальна мірна лінія вказує відносні зміни ($\Delta F/F$) в інтенсивності флуоресценції білків в області виділеній червоним на рис. 3.54 та рис. 3.55. На графіку присутній прояв sАНР викликаної потенціалами дії. Пунктирна горизонтальна лінія показує рівень утримання потенціалу мембрани.

3.6. Порушена транслокація НРСА N75K при θ -стимуляції

Було показано, що НРСА виконує інтегрування зростання $[Ca^{2+}]_i$, яке викликане повторюваними активаціями нейрона або тонічною активністю і результатом є його транслокація цього білка до плазматичної мембрани [29, 30]. Оскільки величина провідності sАНР пропорційна кількості транслокованого НРСА, то це інтегрування буде робити внесок до sАНР викликаної повторюваними активаціями нейрона. Оскільки було виявлено, що мутантний варіант N75K має більшу швидкість розірвання зв'язків з плазматичною мембраною та меншу чутливість до Ca^{2+} порівняно з НРСА WT, то було висунуто гіпотезу, що мутація N75K порушує інтеграцію повто-

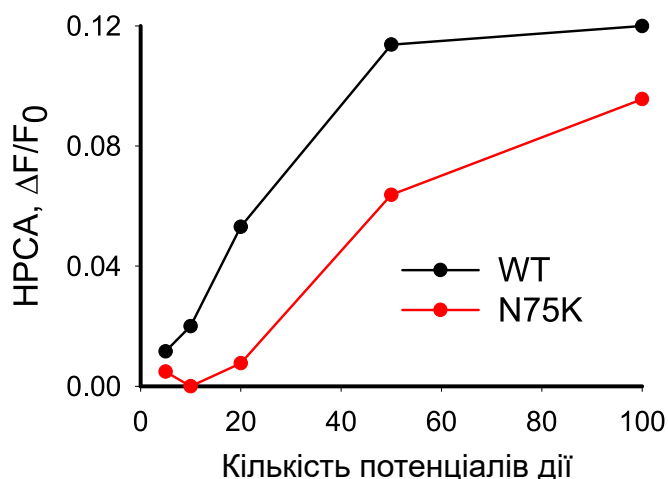


Рис. 3.58. Залежність амплітуди транслокації НРСА WT міченого CFP та НРСА N75K міченого YFP, експресованих одночасно в обраному нейроні, від кількості потенціалів дії в стимуляції.

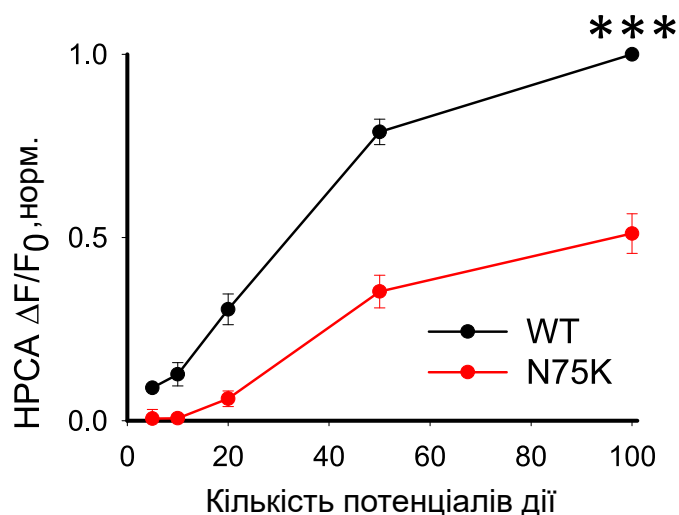


Рис. 3.59. Нормована залежність амплітуди транслокації НРСА WT міченого CFP та НРСА N75K міченого YFP, експресованих одночасно в обраному нейроні, від кількості потенціалів дії в стимуляції.

рюваного підвищення $[Ca^{2+}]_i$. Для перевірки цієї гіпотези, нейрони було стимульовано θ -пачками імпульсів (TBS) [138, 139]. Кожний стимул складався з 5 серій по 5 потенціалів дії (пачка) при 100 Гц та інтервалі 0,2 с. Використовувалось декілька варіантів часового інтервалу між цими θ -пачками 0,2, 2, 5 та 20 с (рис. 3.61..3.67). Для кількісного порівняння сумарних величин транслокацій обох білків було обрано області в яких відбувався транз'єнт транслокації.

Було виявлено, що як НРСА WT, так і N75K внаслідок транслокації до плазматичної мембрани виконують інтегрування транз'єнтів Ca^{2+} , які викликані за до-

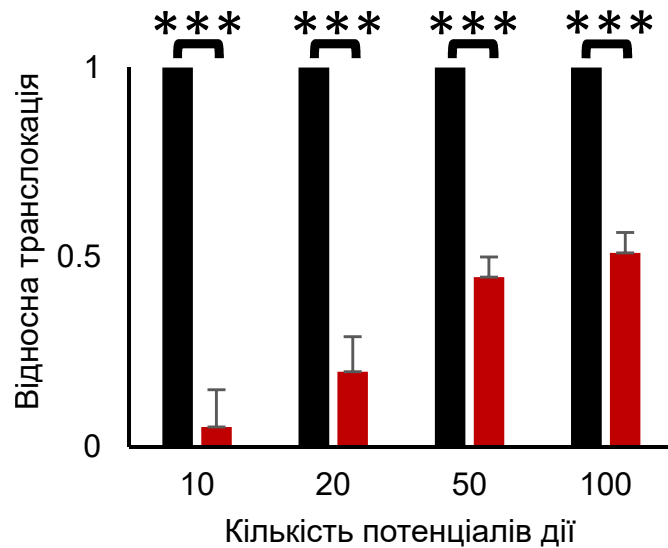


Рис. 3.60. Поручена транслокація мутантного варіанту НРСА N75K. Амплітуда транслокації НРСА N75K міченого YFP нормована на амплітуду транслокації НРСА WT міченого CFP. Помітна відсутність транслокації НРСА N75K при кількості потенціалів дії в стимулі менше 10.

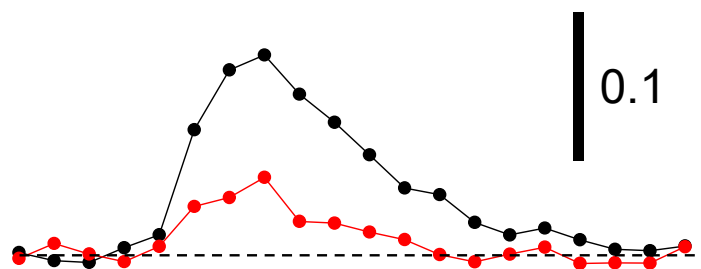


Рис. 3.61. Транслокація одночасно експресованих в обраному нейроні білків НРСА WT міченого CFP (чорна лінія) та мутантного НРСА N75K (червона лінія), що викликана серією з 2 θ -пачок з паузою між пачками 0,2 с. Транслокація НРСА N75K помітно менша. Вертикальна чорна мірна лінія вказує відносну зміну величини $\Delta F/F$ інтенсивності флуоресценції в області транслокації. Пунктирна горизонтальна лінія вказує на базальний рівень флуоресценції білків.

помогою TBS з інтервалом 0,2 с (рис. 3.61, 3.62). Площа поверхні в якій відбувався транз'єнт транслокації мутантного варіанту НРСА N75K була суттєво менша порівняно з НРСА WT (в приблизно 2 рази рис. 3.61, 3.62, 3.16; $p < 0,001$, $n = 6$). Це вказує на те, що хоч N75K також здатний інтегрувати активності викликану TBS з коротким інтервалом, але цей процес все ж порушений в порівнянні з НРСА WT. При середніх тривалостях інтервалів TBS у 2 та 5 с різниця в площі транз'єнту транслокації була ще більша (в приблизно 5 разів, рис. 3.63, 3.64, 3.16; $p < 0,001$, $n = 5$). На додаток, у випадку мутантного варіанту N75K інтегрування було майже

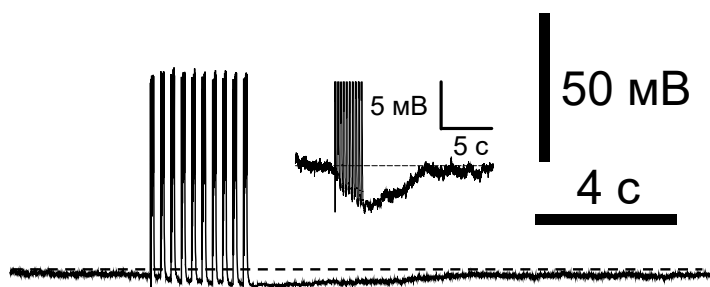


Рис. 3.62. Мембранний потенціал нейрона в якому відбувалась транслокація представлена на рис. 3.61. На вставленому графіку показано sADP спостережену після пачки θ -стимуляції. Пунктирна горизонтальна лінія вказує на базальний рівень мембранного потенціалу утримання нейрона.

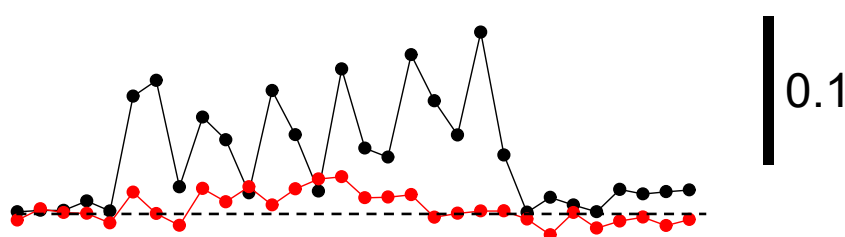


Рис. 3.63. Порушене інтегрування мутантним НРСА N75K θ -стимулу. При серії пачок імпульсів з інтервалом між пачками 2 с. Транслокація одночасно експресованих в обраному нейроні білків НРСА WT міченого CFP (чорна лінія) та мутантного НРСА N75K (червона лінія). Варто відзначити прояв sADP одночасно з транслокацією НРСА.

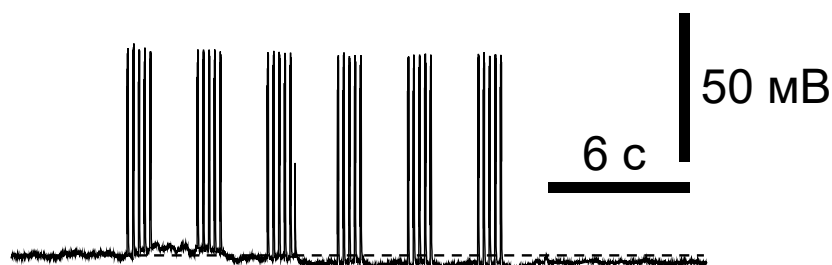


Рис. 3.64. Мембранний потенціал нейрона в якому відбувалась транслокація представлена на рис. 3.63. При θ -стимуляції з серії пачок імпульсів з інтервалом між пачками 2 с. Пунктирна горизонтальна лінія вказує на базальний рівень мембранного потенціалу утримання нейрона.

відсутнє. В той час як НРСА N75K відповідав на кожний TBS відсутнім або незначним транз'єнтом транслокації, НРСА WT був зв'язаний до плазматичної мембрани в інтервалі між імпульсами та поступово накопичувався при TBS, виконуючи інтегрування нейронної активності (рис. 3.63..3.66). Важливо відзначити, що TBS-імпульси також призводили до появи та сумування sADP в деяких з досліджених

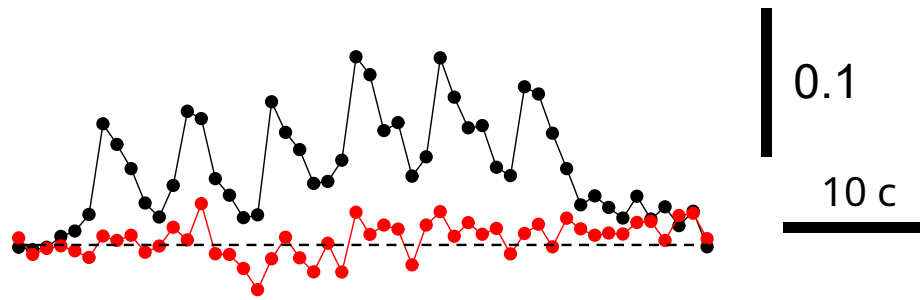


Рис. 3.65. Порухене інтегрування мутантним НРСА N75K θ -стимулу. При серії пачок імпульсів з інтервалом між пачками 5 с. Аналогічно рис. 3.63.

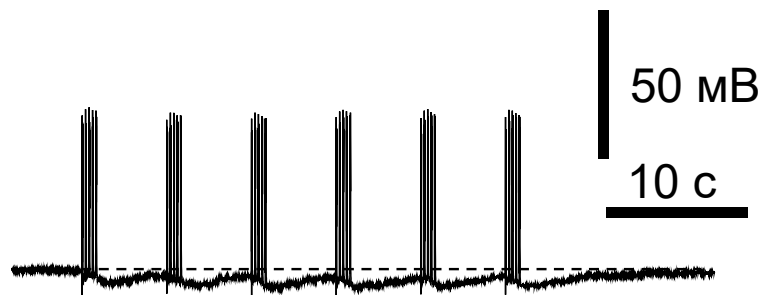


Рис. 3.66. Мембранний потенціал нейрона в якому відбувалась транслокація представлена на рис. 3.65. При θ -стимуляції з серії пачок імпульсів з інтервалом між пачками 5 с. Аналогічно рис. 3.64.

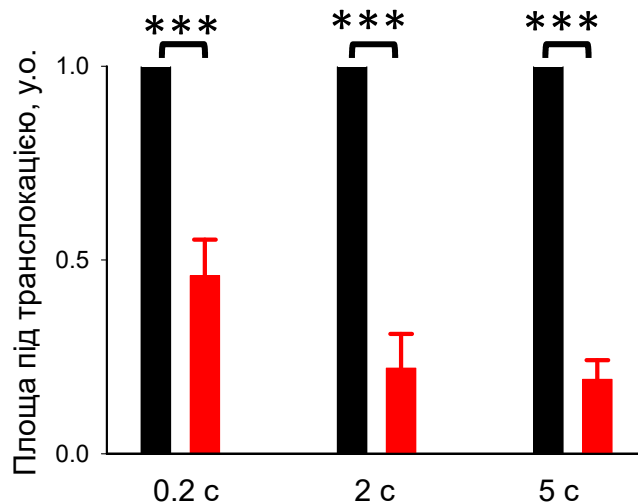


Рис. 3.67. Зведені величини транслокації обчислені для областей де відбувся транз'єнт транслокації мутантного НРСА N75K міченого YFP, нормовані на величини для аналогічних областей транслокації НРСА WT міченого CFP. При θ -стимуляції з різними затримками між пачками імпульсів. Проявляється порухене інтегрування ритмічної нейронної активності мутантним варіантом НРСА N75K.

нейронів (рис. 3.61..3.66). При інтервалі між серією потенціалів дії TBS у 20 с як НРСА WT, так і N75K відповідали на стимул чітко відокремленими транзйентами транслокації (див. рис. 3.63, 3.64), а інтегрування TBS не відбувалось.

Разом ці результати свідчать, що мутація N75K призводить до порушеного інтегрування ритмічної нейронної активності шляхом транслокації НРСА до плазматичної мембрани, що скоріше за все підвищує активність нейронів, оскільки транслокація керує sАНР [33].

3.7. Мутантний варіант гіпокальцину N75K не керує струмом sАНР при наявності білка дикого типу

Далі, було перевірено чи призводить мутація N75K до порушення керування струмом sАНР. Отримані результати вказують на те, що sАНР була присутня в нейронах котрі експресували мутантний варіант НРСА N75K (рис. 3.57, 3.61..3.66), а це свідчить, що N75K не заважав ендogenousму НРСА WT керувати струмом sАНР. Мутантний варіант також транслокувався в ті самі місця в плазматичній мембрані що й НРСА WT (рис. 3.25..3.28, 3.38..3.41, 3.53..3.56). Хоча величина та тривалість транслокації була менша та коротша, відповідно (рис. 3.31, 3.32, 3.42..3.52, 3.57..3.60). Було висунуто гіпотезу, що зменшена транслокація мутантного варіанту має призвести до пропорційного зменшення sАНР, якщо НРСА N75K та WT рівносильно здатні активувати sАНР при транслокації до плазматичної мембрани (може бути присутнє додаткове зменшення sАНР через порушену передачу Ca^{2+} мутантом до мембрани).

Гіпокампальні нейрони експресують до 30 мкмоль/л ендogenousного НРСА WT [131], в той час, як рівень експресії екзогенних білків ледве досягає 10..15 мкмоль/л [1]. Тому, експресія екзогенного НРСА WT може призводити до підвищення (до 50 %) загальної кількості НРСА транслокованого до плазматичної мембрани (ендogenousного та екзогенного) та пропорційного збільшення sАНР. А мутантний НРСА N75K скоріше за все не підвищує sАНР, через те, що порушену транслокацію до плазматичної мембрани.

Для перевірки впливу мутації на струм sАНР було проведено реєстрацію цю-

го струму в гіпокампальних нейронах трансфікованих НРСА N75K та нетрансфікованих. Струм визначався як кінцевий хвіст, що був присутнім після деполяризації клітини тривалістю 2 с з -55 до $+30$ мВ (рис. 3.68, 3.69). Така тривалість деполяризації була обрана для створення досить великого підвищення $[Ca^{2+}]_i$, яке необхідне для виклику струму sАНР та певної транслокації НРСА N75K, котра може викликати додатковий струм sАНР. Однак, збільшення струму sАНР не спостерігалось в нейронах трансфікованих НРСА N75K в порівнянні з нетрансфікованими (рис. 3.68, 3.69, $p = 0,9$, $n = 7$ для нетрансфікованих та $n = 5$ для клітин трансфікованих N75K). Це вказує на неспроможність мутантного НРСА N75K викликати додатковий струм sАНР. Крім того, цей струм не був зменшений при транслокації НРСА, що вказує на відсутність впливу НРСА N75K на функціонування ендogenous НРСА WT, котрий керував струмом sАНР.

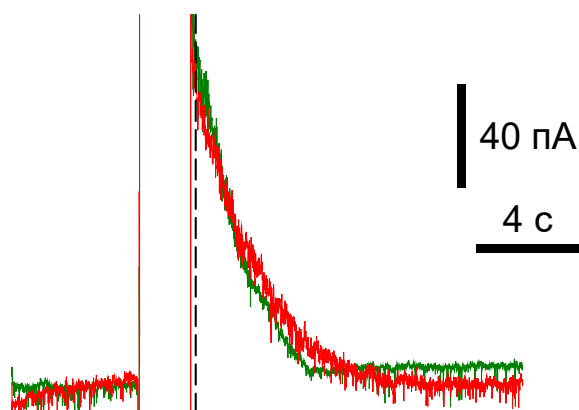


Рис. 3.68. Відсутність впливу мутантного варіанту НРСА N75K експресованого в гіпокампальному нейроні на активацію або інгібування струму sАНР. Графік струмів транзйенту викликаного потенціалами деполяризації тривалістю 2 с у нейронах нетрансфікованих (зелена лінія) та мутантним НРСА N75K (червона лінія)

Можливо, що збільшення струму sАНР в нейронах трансфікованих мутантним варіантом НРСА N75K не було помітне оскільки провідність sАНР була повністю активована транслокацією ендogenous sАНР. Для перевірки цієї гіпотези, було проведено експеримент з трансфікуванням нейронів НРСА WT, для виявлення впливу надмірної експресії НРСА WT на збільшення струму sАНР. В нейронах

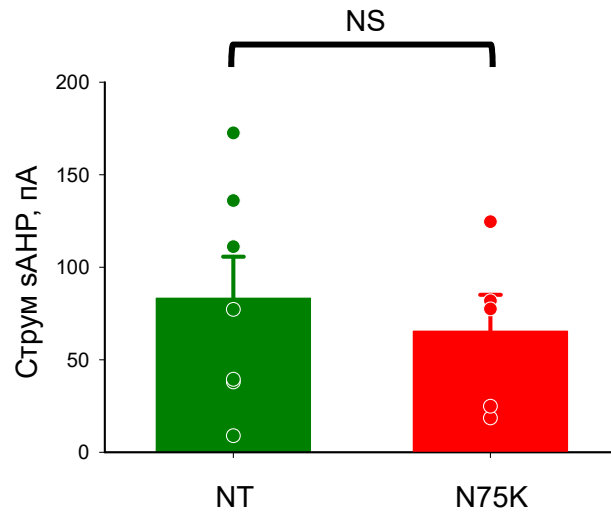


Рис. 3.69. Зведений графік з впливом НРСА N75K на струм sАНР у трансфікованих нейронах в порівнянні з ендогенним НРСА WT у нетрансфікованих нейронах. Вплив представлено амплітудою струму, що спостерігався з часової відмітки через 200 мс після кінця імпульсу деполяризації (пунктирна лінія) і спостерігався впродовж 10 с.

спільно трансфікованих НРСА WT та CFP було проведено реєстрацію струмів. І було виявлено, що середня амплітуда струму sАНР була суттєво збільшена в клітинах з надмірною експресією НРСА WT (рис. 3.70, 3.71; $p < 0,05$, $n = 17$ для нетрансфікованих та трансфікованих НРСА WT клітин). Так, експресія екзогенного НРСА WT призвела до збільшення струму sАНР, на відміну з мутантним НРСА N75K.

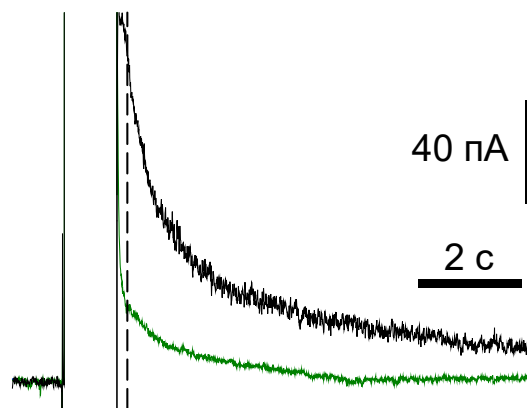


Рис. 3.70. Вплив надмірної експресії НРСА WT на збільшення струму sАНР. Запис струмів викликаних імпульсом деполяризації тривалістю 1 с (пунктирна лінія) в нейронах нетрансфікованими (зелена лінія) та з надмірною експресією НРСА WT (чорна лінія).

З цього можна зробити висновок, що мутантний варіант НРСА N75K не ро-

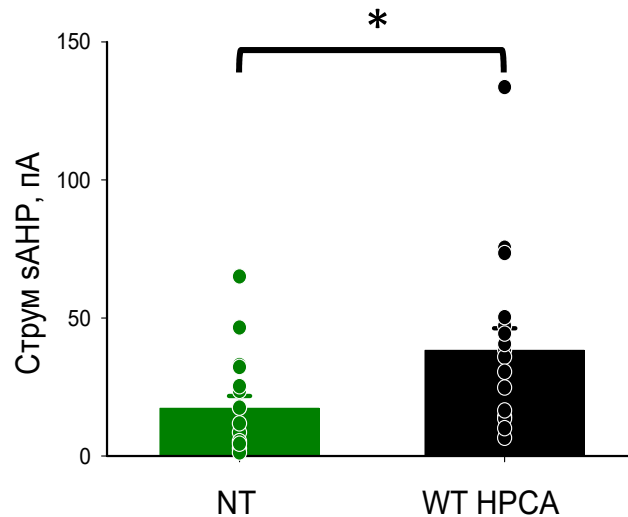


Рис. 3.71. Зведені результати на яких показано ефект від надмірної експресії HPCA WT в гіпокампальних нейронах в порівнянні з вимірами у нетрансфікованих нейронах з ендегенним HPCA WT. Вплив представлено амплітудою струму, що спостерігався з часової відмітки через 200 мс після кінця імпульсу деполяризації (пунктирна лінія) і спостерігався впродовж 10 с.

бить внеску до керування струмом sАНР при наявності ендегенного HPCA WT.

3.8. Мутантний варіант HPCA N75K підвищує збудливість нейронів

Опираючись на експериментальні дані, було проведено моделювання впливу мутації N75K на збудливість нейронів. Для цього було використано загальновідому модель пірамідального нейрона неокортикального шару 5 [126], що розроблена в програмному забезпеченні «NEURON» [125]. До моделі було додано провідність sАНР, керовану транслокацією HPCA до плазматичної мембрани близької частини апікального дендрита [134]. В моделі було реалізовано, що у HPCA спрацьовує мірістоїловий перемикач після зв'язування з Ca^{2+} [27, 132] і він транслокується до плазматичної мембрани завдяки дифузії [27, 29, 30]. Транслокований HPCA керує провідністю sАНР відповідно до першого порядку реакції між HPCA та каналами, котрі беруть участь в цій провідності. У моделі також прийнято, що тільки HPCA який транслокується до близької частини апікального дендрита (перші 70 мкм) [134] бере участь у керуванні струмом sАНР (рис. 3.72). При високих рівнях $[\text{Ca}^{2+}]_i$ як HPCA WT, так і його мутантний варіант N75K транслокуються до тих самих локу-

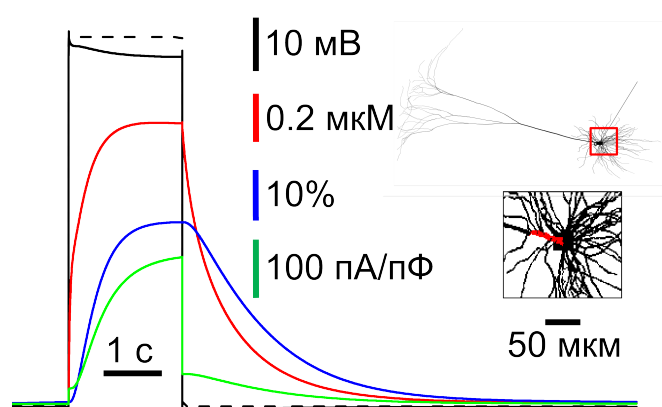


Рис. 3.72. Моделювання транслокації НРСА та струму sАНР викликаних деполяризацією в режимі фіксованої напруги. Морфологія нейрона використана в моделі зображена на вставленому зображенні (верхнє). Провідність sАНР керована транслокацією НРСА до плазматичної мембрани у близькій частині апікального дендрита, показаного у вставленому зображенні (червона мітка у нижній вставці). Струм sАНР (зелена лінія) активований деполяризацією соми (пунктирна чорна лінія), що спричиняє деполяризацію в близькій частині апікального дендрита (чорна лінія), що в свою чергу призводить до підвищення $[Ca^{2+}]_i$ (червона лінія) і як наслідок транслокації НРСА до плазматичної мембрани (синя лінія), де цей білок керує провідністю sАНР. Нижня вставка зображає збільшену частину моделі нейрона, що виділена червоним прямокутником у верхній вставці.

сів мембрани в близькій частині дендрита (рис. 3.38..3.52,3.53..3.60), де мутантний білок може також потенційно керувати калієвою провідністю. Також прийнято, що обидва білки однаково спроможні керувати провідністю sАНР при їх транслокації (рис. 3.73).

Часові константи взаємодії НРСА WT та N75K з Ca^{2+} та плазматичною мембраною були підібрані (див. табл. 2.4) для відтворення амплітуд та постійних часу затухання транз'єнтів транслокації, спостережених в проведених експериментах (для порівняння, рис. 3.42..3.47 проти рис. 3.72..3.74; рис. 3.57 проти рис. 3.73 та рис. 3.59 проти рис. 3.74). Константи, що визначають провідність sАНР та кількість транслокованого до плазматичної мембрани НРСА були також підібрані опираючись на виміри струмів sАНР (для порівняння, рис. 3.68..3.71 проти рис. 3.72..3.73).

Було промодельовано декілька основних умов котрі призводять до нейронної активності в коркових нейронах і було визначено, чи заміна НРСА WT на N75K

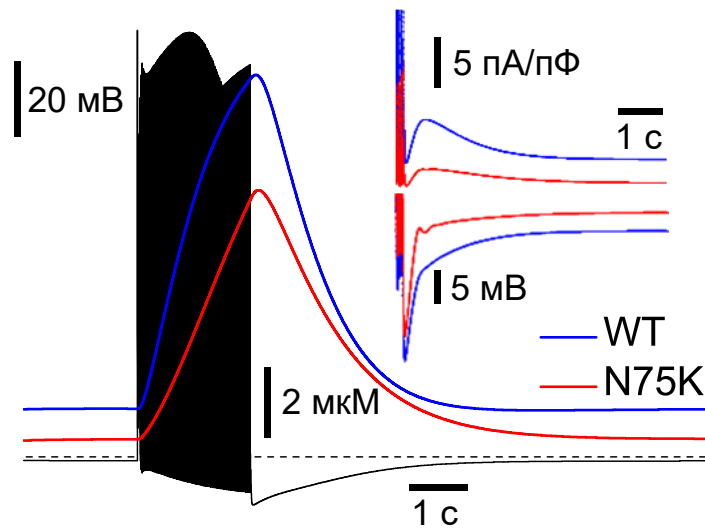


Рис. 3.73. Моделювання транслокації HPCA WT, N75K та зміни струму sANP у відповідь на серію зі 100 потенціалів дії при частоті 50 Гц в нейроні, що експресує обидва білки. Вставка зображає струми (верхні криві) та потенціал мембрани (нижні криві) при прояві sANP після короткої серії з 5 потенціалів дії у нейроні, який експресує один з варіантів HPCA WT або N75K. Варто відзначити помітне зменшення струму sANP та перепаду потенціалу мембрани від sANP у моделі нейрона де експресований HPCA N75K замість WT.

призводить до підвищеної нейронної збудливості. В першу чергу було промодельовано тонічну активацію іонотропних рецепторів [140, 141], що опосередкована вивільненням глутамату [130]. В моделі тонічна активація рецепторів розміщених в сомі (з провідністю 2,5 См/м) викликає регулярне високочастотне спрацьовування коркового нейрона (рис. 3.75). Внесення в модель провідності sANP керованої транслокацією HPCA WT призвело до суттєвого зменшення частоти спрацьовування, в той час керування від мутантного HPCA N75K викликало незначне зменшення частоти спрацьовування в усталеному стані (рис. 3.75). Адаптація спрацьовування після активації тонічних рецепторів також сильно відрізняється в моделюванні з використанням HPCA WT та мутантного N75K (рис. 3.76). На додаток, sANP керована HPCA WT перестала спрацьовувати повністю в широкому діапазоні провідностей викликаних тонічною активацією іонотропних рецепторів, в той час, як ефект від HPCA N75K був значно слабший (рис. 3.77). Загалом ці результати моделювання

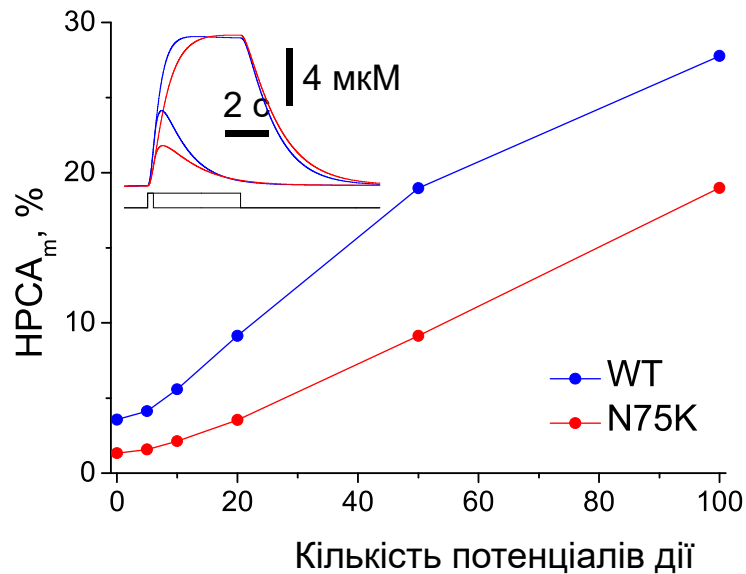


Рис. 3.74. Параметри моделі були підбрані так, щоб взаємодія НРСА WT та N75K з Ca^{2+} та плазматичною мембраною повторювала експериментальні дані отримані при різних умовах. Графік показує залежність транслокації НРСА WT та мутантного N75K до плазматичної мембрани близького дендриту залежно від кількості потенціалів дії згенерованих нейроном (для порівняння з експериментальними даними див. рис. 3.59). Розмірність по вертикальній осі відповідає частці НРСА WT та N75K, що транслокувалась з цитозолу до плазматичної мембрани. Вставка зображає транзєнти транслокації НРСА WT та N75K змодельовані як відповідь на деполяризацію тривалістю 0,5 с та 4, з -70 мВ до 0 мВ (для порівняння див. рис. 3.42..3.47).

вказують, що сигнал, який передається НРСА є необхідним для контролю тонічної активності коркових нейронів, а мутація N75K призводить до суттєвого підвищення їх активності.

Далі було досліджено здатність коркових нейронів до адаптації у відповідь на коротку синаптичну стимуляцію подібну до порогу збуджувального постсинаптичного потенціалу. На рис. 3.78 показано приклад такої стимуляції, де зображено як мутація N75K вплинула на кількість згенерованих потенціалів дії та інтервал між ними. Мутація призвела до збільшення кількості потенціалів дії як відповідь на порогову синаптичну стимуляцію, а також до послаблення адаптації між потенціалами дії. Це вказує на підвищену збудливість коркового нейрона.

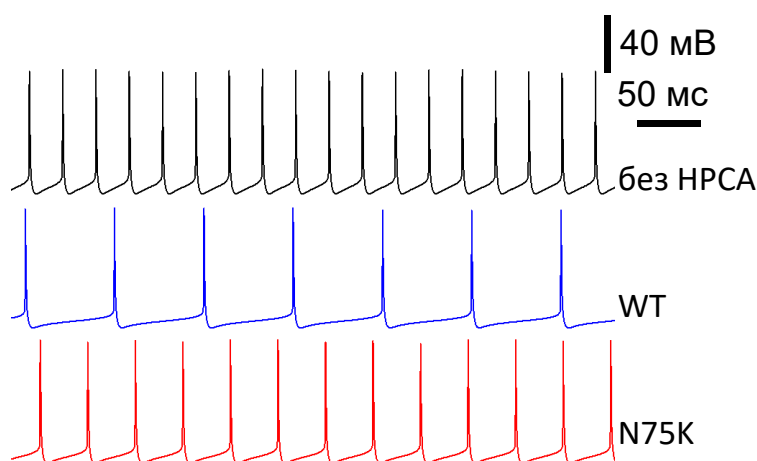


Рис. 3.75. Моделювання активації нейрона викликаній тривалою (2 с) тонічною стимуляцією соматичних глутаматних рецепторів. Ця стимуляція призводить до появи провідності $2,5 \text{ См/м}^2$ при різних умовах: відсутність НРСА у моделі (чорна лінія); наявність НРСА WT при концентрації 30 мкмоль/л (синя лінія); наявність НРСА N75K в такій же концентрації (червона лінія). Помітна значно більша частота потенціалів дії при тонічній активації коли був введений мутантний НРСА N75K в порівнянні з НРСА WT.

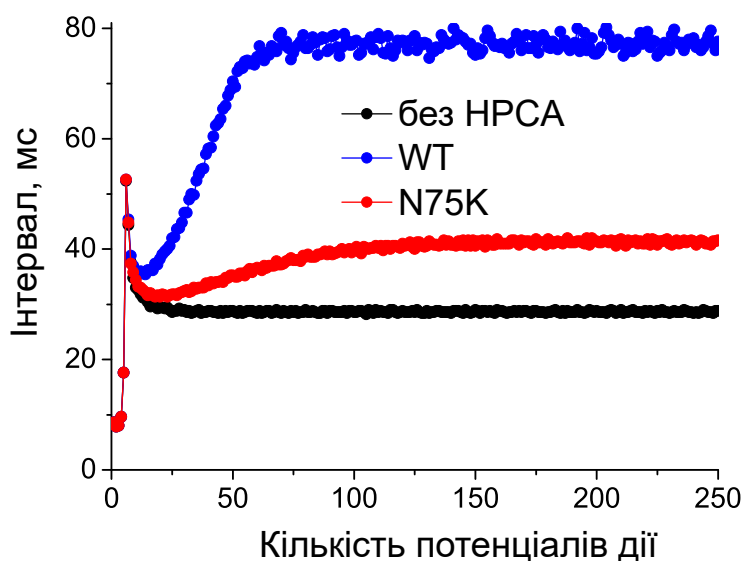


Рис. 3.76. Інтервали між потенціалами дії у випадку зображеному та описаному на рис. 3.75. При тонічній активації рецепторів помітна суттєва різниця в здатності моделі нейрона до адаптації залежно від наявного варіанту НРСА WT або N75K.

Серії зворотних потенціалів дії в коркових нейронах спричиняють тривалу постгіперполяризацію, що зменшує нейронну збудливість на кілька секунд. Це показано в електрофізіологічних досліджах [134] та в моделюванні (рис. 3.79). У випадку моделі нейронів з НРСА N75K ця затримка була значно менша, що вказує на збіль-

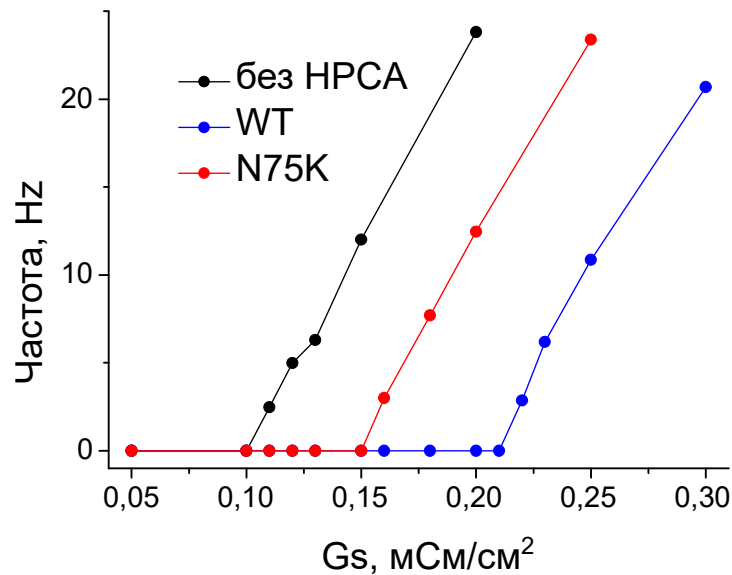


Рис. 3.77. Залежність частоти потенціалів дії в усталеному стані від величини провідності, керованої тонічними глутаматними рецепторами, введеної до моделі. Варто зазначити вікно в тонічній провідності (1,5..2,1) См/м² у якому тонічна активність проявлялась лише в моделі нейронів, що експресують HPCA N75K.

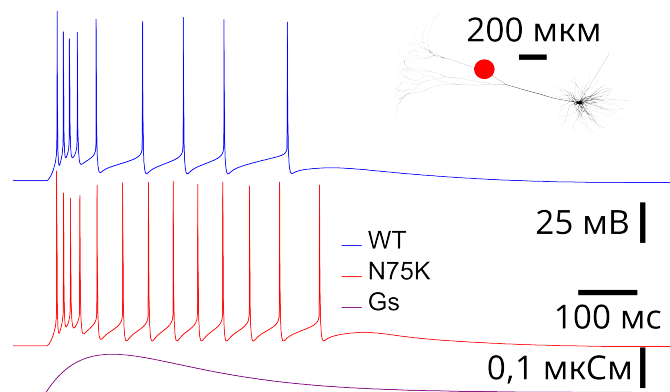


Рис. 3.78. Порівняння транзјенту активації глутаматергічної провідності (нижня крива), викликаної серією сильніших потенціалів дії в моделях нейрона з експресією HPCA WT та N75K. В останньому випадку спостерігається менша адаптація та вища збудливість нейрона, що обумовлена мутацією. Місце розташування цієї провідності у дендритному дереві показано червоною міткою на зображенні-вставці.

шену збудливість нейронів в яких експресований цей мутантний варіант HPCA. На початку кожного моделювання була проведена синаптична стимуляція, що викликала коротку серію з 2 потенціалів дії. Введення в модель 10 зворотних потенціалів дії призвело до розвитку sANP та пригнічення серій потенціалів дії викликаних синаптичною стимуляцією на час 2 с у випадку HPCA WT та 0,2 с для HPCA N75K.

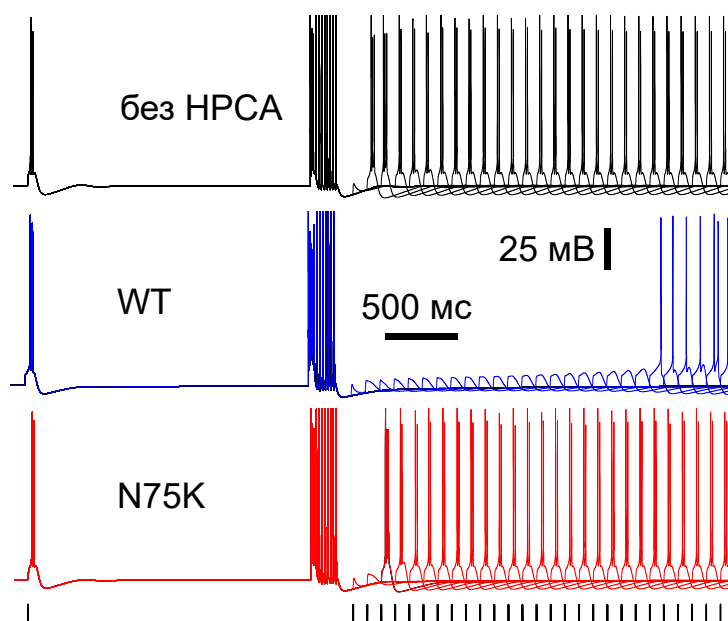


Рис. 3.79. У моделі нейронів, що експресують НРСА WT, була помітно довша затримка в здатності нейрона генерувати потенціали дії у відповідь на синаптичну стимуляцію після серій потенціалів дії, що викликали sАНР.

В кількох змодельованих експериментах було визначено часовий інтервал (вікно) в якому дендритна синаптична стимуляція, яка може викликати відповідь з подвійними імпульсами перед появою 10 зворотних потенціалів дії, не здатна викликати такі імпульси після серії потенціалів дії. Це часове вікно було дуже вузьке (приблизно 150 мс; чорна лінія на рис. 3.79) для коркових нейронів без провідності sАНР та було залежним від внесення малої провідності Ca^{2+} -залежного калієвого струму в моделі. Введення провідності sАНР керованої НРСА призвело до тривалої затримки в здатності нейрона до відповіді на синаптичну стимуляцію з генерацією потенціалів дії (часове вікно приблизно 2000 мс; синя лінія на рис. 3.79). Крім того, перші 4 порогові синаптичні стимуляції викликали скоріше один ніж два потенціали дії. Введення мутантного НРСА N75K до моделі замість НРСА WT, призвело до того, що відповіді на порогові стимуляції продовжувались після затримки, а це подібно до моделі з відсутньою провідністю sАНР (часове вікно приблизно 200 мс; червона лінія на рис. 3.79). Схожі результати були отримані при моделюванні серії потенціалів дій з різноманітною їх кількістю (рис. 3.80). Де проявляється суттєво менша тривалість затримки між потенціалами дії в нейронах, що експресують НРСА N75K в порів-

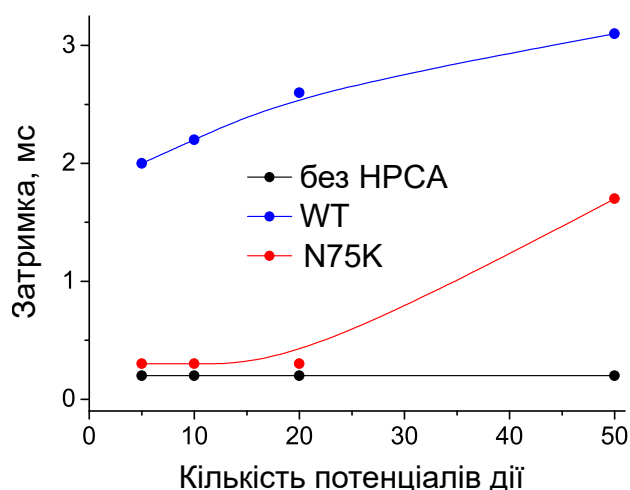


Рис. 3.80. Залежність затримки в здатності моделі нейрона генерувати потенціали дії після серії потенціалів дії залежно від кількості потенціалів в такій серії.

нянні з випадком НРСА WT. Варто зазначити, що найбільша різниця в збудливості нейрона проявлялась при серії з 5..10 потенціалів дії, що частіше зустрічається в коркових нейронах ніж більші серії.

Таким чином, моделювання вказує, що погіршена транслокація мутантного варіанту НРСА N75K до плазматичної мембрани, суттєво підвищує збудливість нейронів в багатьох ситуаціях які виникають в мозку.

Розділ 4. Обговорення результатів

В попередніх дослідженнях було показано, що точкові мутації у НРСА є причиною автосомної рецесивної первинної ізольованої дистонії [25] і є причиною аномальних біофізичних та функціональних властивостей деяких мутантів НРСА [26]. Однак не були відомі молекулярні та клітинні механізми пов'язані з цими точковими мутаціями, і є причиною ненормальної збудливості, що спостерігалася при дистонії [46]. Поєднавши молекулярну генетику з електрофізіологією, візуалізацією – було показано, що дистонічний мутант НРСА N75K має аномальну буферизацію Ca^{2+} , порушену Ca^{2+} -залежну передачу сигналу та не контролює повільну постгіперполяризацію (sАНР), яка зазвичай контролюється транслокацією НРСА до плазматичної мембрани. Це призводить до надмірної збудливості, що найбільш імовірно і є причиною проявів дистонічних симптомів.

4.1. Біофізичні властивості мутанта N75K

В багатьох випадках мутації, що є причинами захворювань, можуть впливати на стабільність білка або синтез, що викликає зміни в рівнях експресії білка або перешкоджає експресії як такій [122]. Однак не у випадку мутацій НРСА N75K та T71N. Було експериментально показано, що обидві мутації мали такі ж рівні експресії що й у НРСА WT при одночасній екзогенній експресії обох у клітинах НЕК-293 та гіпокампальних нейронах (рис. 3.13..3.60). Цей результат збігається з останніми даними, які засвідчують, що мутація T71N не впливає на згортання білка, його стабільність та функціонування у клітинах SH-SY5Y [26]. Таким чином обидва мутанти були експресовані в досліджуваних клітинах, а зміни у передачі сигналу, якщо такі є, найбільш імовірно викликані їх різними біофізичними властивостями.

В роботі було показано, що мутант НРСА N75K має меншу загальну буферну ємність в порівнянні з НРСА WT при фізіологічних рівнях внутрішньоклітинної концентрації вільних Ca^{2+} (рис. 3.16..3.18). Крім того, цей мутант порівняно слабший за НРСА WT в приєднанні Ca^{2+} при низькій $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 3.23) але сильніше

приєднує Ca^{2+} при вищому фізіологічному рівні $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 3.24). Таким чином, були помітні зміни у Ca^{2+} -залежності буферної ємності НРСА при даній мутації N75K. У випадку мутації T71N Ca^{2+} -залежна буферна ємність НРСА також відрізнялась від такої у НРСА WT, однак ця мутація не була настільки видимою в порівнянні з N75K (рис. 3.24).

Мутації N75K та T71N розташовані у другому EF-домени, що приєднує Ca^{2+} та є важливими для властивостей домену щодо приєднання Ca^{2+} . Мутація N75K призводить до заміни другого координаційного щодо Ca^{2+} залишку у послідовності, що приєднує Ca^{2+} у другому EF-домени [25]. Крім того, у цій мутації нейтрально заряджений *asparagine* замінений на позитивно заряджений *lysine*, що безумовно може утворювати заваду для приєднання однойменно зарядженого Ca^{2+} . Наші результати вказують або на малу імовірність приєднання Ca^{2+} до другого EF-домену при мутації N75K, або на дуже ослаблене зв'язування, яке призводить до меншої спорідненості щодо Ca^{2+} . В обох випадках буферна ємність щодо Ca^{2+} у НРСА N75K менша ніж у НРСА WT, а Ca^{2+} -залежна буферна ємність зсунута до вищих величин $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Хоча *threonine* в позиції 71 не обов'язково є Ca^{2+} -координатором, але мутація T71N очікувано вносить порушення з високим рівнем імовірності в усіх чотирьох програмних симуляціях [25]. Однак, не зважаючи на прогноз, ця мутація суттєво не впливає на загальну буферизацію Ca^{2+} , однак Ca^{2+} -залежність буферизації змінилась, що вказує на незначні зміни у зв'язуванні Ca^{2+} в другому EF-домени при даній мутації. Ці зміни корелюють з іншими результатами [26], де було показано, що мутація T71N не змінює загальну спорідненість приєднання Ca^{2+} , але дає значно менший кооперативний ефект приєднання Ca^{2+} .

Білок НРСА відіграє важливу роль в якості Ca^{2+} буферу в нейронах ЦНС [132]. Високі рівні експресії НРСА помічені у коркових та підкоркових нейронах [25, 131]. Загалом НРСА експресований в гіпокампі у концентраціях близько 30 мкмоль/л [131], а у смугастому тілі його концентрація може бути ще вищою [25]. Аналіз схем експресії генів різних нейрональних Ca^{2+} сенсорних білків, до яких

відноситься і НРСА, при клітинних рівнях експресії виявив істотну неоднорідність в рівнях експресії у різних популяціях клітин в одних і тих самих областях мозку [62]. Тому, дуже імовірно, що існують популяції нейрональних клітин з високим рівнем експресії НРСА. Навіть при концентрації 30 мкмоль/л НРСА виявляється найсильнішим Ca^{2+} буфером, в принаймні у випадку гіпокампальних нейронів [132]. Якщо взяти до уваги, що кожна молекула НРСА може приєднати Ca^{2+} до 2, 3 та 4 EF-доменів [26, 132], то загальна Ca^{2+} буферна ємність НРСА може досягати 100 мкмоль/л. Висока спорідненість до Ca^{2+} цих місць зв'язування [26, 27] вказує на те, що НРСА відіграє головну роль в нейронах як буфер Ca^{2+} при базальних рівнях $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Порушене зв'язування Ca^{2+} в другому EF-домени при N75K мутації скоріш за все призводить до зв'язування Ca^{2+} тільки у третьому EF-домени, принаймні при базальному рівні $[\text{Ca}^{2+}]_i$, і таким чином зменшує буферну ємність НРСА по Ca^{2+} у двічі [142, 143]. Таке суттєве послаблення регуляції в одного з головних білків, що зв'язують Ca^{2+} , може сильно вплинути на подальшу передачу Ca^{2+} -залежного сигналу в нейронах низхідних шляхів, які керують скороченнями скелетних м'язів. Такі зміни у буферній ємності по Ca^{2+} у нейронах, що експресують мутант НРСА N75K, схоже призводить до швидших та більших транзєнтів $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у відповідь на таку ж саму мобілізацію Ca^{2+} в цитозолі. Оскільки НРСА майже рівномірно розповсюджений в цитозолі [1, 29, 30], то зміни в буферизації Ca^{2+} очікувано призведуть до порушення передачі Ca^{2+} -сигналу в сомі, дендритах та аксонах, що у свою чергу помітних фізіологічних наслідків, які можуть робити внесок в прояв дистонічних симптомів. Оскільки НРСА грає подвійну роль в нейрональній регуляції – як буфер та сенсор, то порушена буферизація Ca^{2+} у випадку N75K мутації цілком імовірно також впливає на передачу Ca^{2+} -залежного сигналу, навіть якщо мутація не впливає на інші молекулярні властивості білку.

У НРСА зв'язування Ca^{2+} до функціональних EF-доменів виконує функцію Ca^{2+} -мірістоілового перемикача за рахунок конформаційних змін в молекулі при яких мірістоілова група висувається з гідрофобної кишені [28]. Перемикач контролює здатність НРСА переміщуватись до цільових мембран і там взаємодіяти з від-

повідними підлеглими ефекторами [27, 29]. Було виявлено, що не зважаючи на послаблене зв'язування Ca^{2+} в другому EF-домені, обидва мутовані НРСА переміщуються до мембрани при високих рівнях $[\text{Ca}^{2+}]_i$, а це вказує на загалом справну роботу механізму Ca^{2+} -мірістоілового перемикача. До того ж високе та довготривале підвищення $[\text{Ca}^{2+}]_i$ призводило до однакової та подібно розподіленої транслокації НРСА WT та N75K до плазматичної мембрани в гіпокампальних нейронах. Ці результати вказують на те, що не тільки механізм Ca^{2+} -мірістоілового перемикача справний при мутації N75K при високих рівнях $[\text{Ca}^{2+}]_i$, але і здатність білка вбудовуватись у специфічне місце в мембрані також не порушена цією мутацією. Попередні дослідження інших схожих білків сімейства NCS показали, що два Ca^{2+} зв'язуються послідовно – починаючи з 3-го EF-домену з більшою спорідненістю, що посилює зв'язування в 2-й EF-руці з меншою спорідненістю [142, 143], і зв'язування обох місцях необхідне для транслокації НРСА [27]. Тому, варто очікувати, що у випадку мутації N75K Ca^{2+} зв'язується до 2-го EF-домену також при вищих $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в порівнянні з НРСА WT. Або ж, зв'язування Ca^{2+} до 3-го EF-домену призводить лише до послаблення в утриманні мірістоілової групи у випадку N75K, як це було показано для випадку мутації рековерину E85Q, створеної для блокування зв'язування Ca^{2+} до 2-го EF-домену [142]. Не так важливо те, що підтримує функціонування Ca^{2+} -мірістоілового перемикача у випадку мутації N75K при високих $[\text{Ca}^{2+}]_i$, як спостережене порушення роботи перемикача при менших рівнях $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при мутації N75K (в порівнянні з НРСА WT), що було виявлене через помітну ослаблення транслокації при таких умовах (рис. 3.25..3.60). Таким чином, наші дані свідчать про неспроможність НРСА N75K зв'язувати Ca^{2+} 2-м EF-доменом, принаймні при $[\text{Ca}^{2+}]_i$ близьких до базального рівня, що порушує роботу Ca^{2+} -мірістоілового перемикача, котрий справно функціонує у НРСА WT при таких самих умовах.

Подальші дослідження щодо функціональних порушень, що можуть викликати дистонічні мутації гіпокальцину були можливими завдяки проведеній оцінці концентрацій екзогенно-експресованих білків, що була проведена розробленим нами новітнім підходом. Проведені дослідження показали, що при відлагоджених нами

при трансфекціях концентраціях плазмід ми отримували співмірний з ендogenousним рівень експресії трансгенів, що і дозволило екзогенним білкам суттєво впливати на сигналізацію ендogenousного гіпокальцина [2]. Запропонований підхід до вимірювання концентрації екзогенно експресованих білків, може успішно використовуватися і при оцінці концентрацій інших типів флуорофорів, що можуть бути присутні у живих клітинах, наприклад, біолоюмінесцентних молекул. Іншим особливо важливим випадком є оцінка концентрації хімічних флуоресцентних барвників, що застосовуються для вимірювання внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію. Оскільки ці барвники є одночасно потужними кальцієвими буферами, то їх високий рівень у клітинах може впливати на перебіг широкого кола кальційзалежних сигнальних процесів. У більшості досліджень ці барвники завантажуються до клітин у формі ефірів (АМ форма) з наступною де-естерифікацією ендogenousними естеразами та накопиченням де-естерифікованих, заряджених кальцій-чутливих форм всередині клітин [144]. При цьому можуть досягатися дуже високі їх концентрації у цитозолі клітин. Тому оцінка цих концентрацій у співвідношенні до загальної концентрації ендogenousних кальцієвих буферів є дуже важливою для правильної інтерпретації отриманих експериментальних результатів. Даний підхід був нами запропонований для оцінки внутрішньоклітинної концентрації флуоресцентного кальцієвого барвника Fura-2, що був завантажений до нейронів спинного мозку щурів у формі ефіру [3]. Оскільки розроблений методичний підхід дозволяє окремо оцінювати частки флуорофорів у цитозолі та внутрішнім компартментах (див. рис. 3.11), його можна використовувати для кращого розуміння місць накопичення флуорофору в різних компартментах та частинах окремих клітин. Зокрема ретроградні барвники захоплюються синаптичними терміналями нейронів і доставляються до їх сом аксональним транспортом. Часто виникають питання чи утримуються вони у сомі в структурі певних везикул після ретроградного транспортування, чи агрегують утворюючи часточки осаду, чи залишаються в якості розчину у цитозолі? Чи змінюється цей розподіл з часом після забарвлення? Ці питання крім фундаментального аспекту мають також і важливе методичне значення при дослідженнях впливу флуорофорів та їх перерозподілу

між компартментами на швидкість їх накопичення та утримання всередині клітин, а також тривалість виживання клітинних препаратів. Ми відпрацювали запропонований методичний підхід при ретроградному маркуванні гангліонарних клітин сітківки за допомогою ін'єкцій флуоресцентного барвника «Fluorogold» (TermoFisher Scientific, США) у *superior colliculus*, як перший крок перед тим як застосувати його до вимірювання концентрації флуоресцентних білків у різних компартментах культивованих нейронів гіпокампа [4, 5]. Ці дослідження та дослідження з барвниками «Fura-2» та «Fluorogold», в яких дані барвники суттєво накопичувались у внутрішніх компартментах, дозволили нам зрозуміти, що для оцінки цитоплазматичної концентрації флуоресцентних білків нам потрібно досить довго (понад 10 хвилин) перфузувати нейрони гіпокампа в режимі *whole-cell patch-clamp*.

4.2. Функціональні порушення спричинені мутацією N75K

В роботі було показано, що порушене зв'язування Ca^{2+} 2-го EF-домену перешкоджає перетворенню сигналу фізіологічних транз'єнтів $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у транслокацію НРСА до плазматичної мембрани та активації відповідних цільових білків на ній. Основні типи фізіологічної активності, такі як коротка пачка потенціалів дії (до 20) та одиничні тета-пачки, не викликають істотної транслокації НРСА N75K до плазматичної мембрани (рис. 3.53..3.67). Більше того, обробка послідовності θ -пачок шляхом транслокації НРСА також порушена при даній мутації (рис. 3.67). Загально прийнято, що взаємодія НРСА з мембранами є необхідною для передачі сигналу цим білком [31, 33, 114]. Оскільки мутація N75K заважає Ca^{2+} -залежній транслокації НРСА в сомі та дендритах нейронів при основних типах нейрональної активності, то вона певно призводить до порушення передачі сигналу НРСА.

Перше припущення щодо мутацій N75K та T71N вказувало на те, що неповноцінність НРСА спричинена цими мутаціями може послабити керування потенціалкерованими Ca^{2+} каналами і таким чином впливає на відповідь клітини на деполяризацію мембрани [25]. Це припущення підтверджується останніми результатами, які показують порушення регуляції у цих каналах в клітинах, що експресують ди-

стонічні мутанти НРСА [26]. Однак, автори показали, що НРСА олігомеризується Ca^{2+} -залежним чином та зв'язується до керованих напругою Ca^{2+} каналів, а обидві мутації T71N та A190T призводять до порушення олігомеризації, що призводить до збільшення входу Ca^{2+} через потенціалкеровані Ca^{2+} канали N-типу [26], що означає підсилення впливу Ca^{2+} каналів. Водночас наші дані показують, що транслокація НРСА WT викликана активацією потенціалкерованих Ca^{2+} каналів в присутності (рис. 3.38..3.60) або відсутності [29, 30] НРСА N75K виявляється подібною враховуючи, що НРСА N75K мало ймовірно спроможний помітно впливати на Ca^{2+} канали в дендритах гіпокампальних нейронів. Тому схоже, що різні мутації (N75K, T71N та A190T) вносять різні зміни до передачі сигналу НРСА, коли спостерігається посилена передача сигналу $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у випадку мутацій T71N та A190T, і порушена транслокація показана нами для мутації N75K. Інше пояснення цієї розбіжності може критися в тому, що в дендритах передача $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сигналу відбувається скоріше за рахунок L, T та R-типів Ca^{2+} каналів ніж N-типу [52]. Тому мало ймовірно, що мутації T71N та A190T впливають на передачу $[\text{Ca}^{2+}]_i$ сигналу у дендритах нейронів. Скоріше варто очікувати збільшення синаптичного сигналу викликаного цими мутаціями, оскільки N-тип Ca^{2+} каналів експресуються в пресинаптичних терміналях, в яких вони вивільнення нейротрансмітера [145].

Одною з основних відомих функцій НРСА є керування sАНР при транслокації плазматичної мембрани [33]. Було показано, що транслокація НРСА N75K до плазматичної мембрани апікального дендрита нейрона, який бере участь в генерації струму sАНР [134], була помітно ослаблена порівняно з НРСА WT (рис. 3.38..3.67). Це ослаблення супроводжувалось неспроможністю НРСА N75K викликати додатковий sАНР-струм до того, що був викликаний транслокацією ендогенного НРСА, в той час, як експресія НРСА WT призвела до збільшення цього струму (рис. 3.68..3.71). Опираючись на ці дані та на попередні дослідження [31, 33, 34] можна вважати, що провідність sАНР опосередкована реакцією першого порядку між НРСА вбудованим у мембрану та ще невідомим калієвим каналом, який лежить в основі струму sАНР. Модель кортикального нейрона з

урахуванням Ca^{2+} -залежної передачі сигналу НРСА та струму sАНР викликаного НРСА чітко повторює як транслокацію НРСА так і струм sАНР які спостерігались в наших експериментах у клітинах, що експресують НРСА WT або мутант НРСА N75K (рис. 3.72..3.73). Дослідження з моделюванням на основі такої моделі певно показали підвищену збудливість кіркових нейронів які експресують N75K, а не WT НРСА. Це підвищення було показано в умовах при яких проявляються такі ж механізми генерації потенціалів дії, що й у нейронах ЦНС. Зокрема було показано, що мутація N75K призводить до скорішого початку та збільшеної частоти тонічної нейронної активності (рис. 3.75..3.77), підвищеної генерації потенціалів дії та порушної адаптації (див. розділ 1.2.6) їх частоти в межах серії імпульсів які індуковані синаптичною стимуляцією (рис. 3.78), а також зменшеною затримкою між імпульсами при багаторазовому спрацьовуванні (рис. 3.79..3.80).

Попередні дослідження функціональних порушень виявили, що ненормально підвищена збудливість в коркових та підкоркових регіонах низхідних шляхів регуляції скорочення скелетної мускулатури є ключовим патофізіологічним механізмом дистонії [46]. Оскільки НРСА широко експресується в нейронах цих шляхів регуляції [25], то збільшена нейронна збудливість, котра викликана мутацією N75K, може бути основною причиною порушення роботи нейронів, що призводить до неконтрольованих поворотних та повторюваних рухів, незвичної пози у сні, інших розладів які спостерігаються у пацієнтів хворих на дистонію.

Хоча основною причиною дистонічних симптомів вважаються аномалії в нейронах смугастого тіла, а не гіпокампульних і кіркових, однак порушення sАНР викликане мутаціями DYT2 в НРСА у цих регіонах мозку може робити свій внесок у патофізіологічні прояви дистоній DYT2. Крім того, схоже, що sАНР, яка контролює інтенсивність активації нейронів смугастого тіла [146] з досить високою експресією НРСА [25], також зазнає впливу мутації N75K, що проявляється у збільшеній збудливості цих нейронів при дистонії DYT2. Це твердження підтверджується останніми даними, котрі показують, що блокування каналів які беруть участь в струмі sАНР [37, 90] компактної частини чорної субстанції призводить до контрлатеральної ди-

стонічної пози [147]. Крім того, струм sАНР зменшений у мишей з проявами хвороби Паркінсона і це призводить до підвищеної збудливості інтернейронів смугастого тіла [148]. Також на sАНР впливають холінергічні рецептори, блокування яких призводить до збільшеної збудливості нейронів [149]. В свою чергу антихолінергічна терапія, котра суттєво зменшує інгібування sАНР, є ефективним симптоматичним лікуванням дистонічних порушень [16]. Електрофізіологічний аналіз в моделях дистонії у мишей DYT1 вказує на зв'язок з різними типами струмів АНР [150, 151]. Разом ці дані вказують, що зміни в струмі АНР є розповсюдженим в нервовій системі механізмом, що залучений при різних патологічних розладах. Подальші дослідження DYT2 та інших розладів руху можуть проводитись в напрямі пошуку конкретних груп нейронів смугастого тіла з порушеною регуляцією струму sАНР.

В гені відповідальному за експресію НРСА було знайдено дві гомозиготні мутації, що призводять до експресії скороченого білка. Ці мутації виявлено у двох окремих турецьких родинах зі складною дистонією [122]. Результати цього дослідження разом з [25] та нашим дослідженням приводять до гіпотези, що будь-яка мутація НРСА котра призводить до втрати функцій цього білку дуже ймовірно викликає розвиток первинної дистонії. Швидше за все, розвиток відбувається через пригнічення гальмування в мозку, пов'язане зі зниженням або повною втратою sАНР у певних популяціях нейронів. Крім того, було виявлено зв'язок порушень роботи НРСА в норадренергічних нейронах зі збільшенням частот спонтанних потенціалів дії та зменшенням sАНР в моделі хвороби Паркінсона у мишей [12]. Дослідження хвороби Гантінгтона [152] виявили одночасний прояв суттєвого зменшення мРНК НРСА в нейронах смугастого тіла та дистонічних симптомів у випадку моделі хвороби Гантінгтона на мишах. Ці дані підтверджують гіпотезу, що аномальна сигналізація НРСА призводить до порушень рухів. Таким чином подальші генетичні дослідження пацієнтів хворих на дистонію та інші неврологічні порушення рухів на предмет мутацій або аномальної експресії НРСА та NCALD, а також генів які кодують білки, що беруть участь в керуванні струмом sАНР [34], можуть виявити генетичні, молекулярні та клітинні механізми прояву цих хвороб.

Варто зазначити, що миші з нокаутом НРСА, які показують низький результат в завданні на розрізнення, не мають суттєвих моторних порушень [107]. Скоріше за все, інші білки з родини Ca^{2+} сенсорів [8] компенсували нокаут НРСА у мишей, в той час, як мутація N75K у людей, внаслідок своєї часткової несправності, не призвела до такої компенсації [153]. Іншою причиною збереження моторних функцій в мишей з нокаутом НРСА може бути суттєва відмінність нервових мереж які відповідають за контроль рухів у головному та спинному мозку в порівнянні з людиною. Для розуміння відсутності порушень моторної активності у мишей з нокаутом НРСА потрібні миші з НРСА N75K. Таких мишей можна вважати ідеальною моделлю DYT2 на тваринах.

Отримані результати вказують, що генетичне втручання для збільшення експресії WT НРСА в аномально збуджених низхідних нейронних шляхах, котрі регулюють роботи скелетної мускулатури, може відновити повільну постгіперполяризацію в цих нейронах. Таке втручання було б ефективним інструментом для лікування пацієнтів з DYT2.

Підсумовуючи – було показано, що на відміну від WT НРСА мутант N75K не транслокується до плазматичної мембрани дендритних компартментів у відповідь фізіологічні патерни нейронної активності. Це порушення призводить до того, що мутантний білок не здатний контролювати повільну постгіперполяризацію і як наслідок збільшується нейронна збудливість, що скоріше за все і є причиною первинної дистонії.

Висновки

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

1. З використанням розробленої методики виміру концентрації флуорофорів в живих клітинах було визначено, що концентрація екзогенно-експресованого в нейронах білка гіпокальцина дикого типу або його мутантних варіантів N75K та T71N є співмірною з експресією ендogenousного гіпокальцина. Таким чином, було показано, що концентрація екзогенних білків в проведених дослідках була достатньою для того, щоб вони мали змогу впливати на сигналізацію ендogenousного гіпокальцина у культивованих нейронах гіпокампа щурів.
2. Було виявлено, що мутація гіпокальцину N75K, яка спостерігається при первинній дистонії типу DYT2, призводить до зменшення його спорідненості до іонів кальцію при фізіологічних значеннях його внутрішньоклітинної концентрації. Разом з тим інша дистонічна мутація гіпокальцину T71N не призводить до помітних змін спорідненості білку до іонів кальцію.
3. Встановлено, що мутація N75K суттєво зменшує Ca^{2+} -залежну транслокацію гіпокальцина із цитозолу до плазматичної мембрани у нейронах первинної культури гіпокампа щурів. Водночас ця мутація не впливає ні на мірістоїловий перемикач, ні на просторовий розподіл вбудовування білка до цитоплазматичної мембрани якщо воно відбулося. Мутація T71N не призводить до змін у транслокації гіпокальцина.
4. В нейронах первинної культури гіпокампа щурів при додатковій екзогенній експресії гіпокальцина дикого типу збільшується струм повільної постгіперполяри-

зації, sAHP, в той час, як екзогенна експресія мутантного гіпокальцина N75K не збільшує цей струм. Нами зроблений висновок, що дистонічний мутант N75K не може викликати струм повільної постгіперполяризації при фізіологічних концентраціях іонів кальцію. У випадку мутації T71N статистично достовірних відмінностей у регуляції sAHP не виявлено.

5. Проведені нами симуляційні експерименти показують, що зменшена Ca^{2+} -залежна транслокація мутанта N75K до плазматичної мембрани значно підвищує збудливість нейронів у багатьох станах активності, що реалізуються у мозку.
6. Таким чином нами показано, що дистонічний мутант N75K білку гіпокальцина, на відміну від його дикого типу, не може транслокуватись до плазматичної мембрани дендритних компартментів у відповідь на фізіологічно релевантні типи активності нейронів. Це порушення робить мутант нездатним викликати повільну постгіперполяризацію і, як наслідок, підвищує збудливість нейронів, що, ймовірно, і лежить в основі розвитку первинної дистонії типу DYT2.

Список використаних джерел

1. Cherkas V., Grebenyuk S., Osypenko D., Dovgan A. V., Grushevskiy E. O., Yedutenko M., Sheremet Y., Dromaretsky A., Bozhenko A., Agashkov K., Kononenko N. I., Belan P. Measurement of intracellular concentration of fluorescently-labeled targets in living cells. *PLOS ONE*. 2018. 13(4): e0194031.
2. Osypenko D., Dovgan A., Kononenko N., Dromaretsky A., Matvieienko M., Rybachuk O., Zhang J., Korogod S., Venkataraman V., Belan P. Perturbed Ca²⁺-dependent signaling of DYT2 hippocalin mutant as mechanism of autosomal recessive dystonia. *Neurobiology of Disease*. 2019. 132: 104529.
3. Krotov V., Tokhtamysh A., Kopach O., Dromaretsky A., Sheremet Y., Belan P., Voitenko N. Functional Characterization of Lamina X Neurons in ex-Vivo Spinal Cord Preparation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017. 11(342): 1—12.
4. Войтенко Н. В., Риков С. О., Шаргородська І. В., Агашков К. С., Краснякова М. Є., Ніколайчук Н. С., Рибачук О. А., Забенько Є. Ю., Дромарецький А. В. Кількісний аналіз вітальності гангліонарних клітин сітківки при експериментальній глаукомі низького тиску у щурів: ефект терапії поляризованим світлом. *Архів офтальмології України*. 2017. 5(3): 28—36.
5. Агашков К., Краснякова М., Ніколайчук Н., Рибачук О., Забенько Є., Дромарецький А., Шаргородська І., Риков С., Войтенко Н. Вплив поляризованого світла на життєздатність гангліонарних клітин сітківки при глаукомі низького тиску у щурів. *Фізіологічний журнал*. 2018. 64(4): 41—50.
6. Jedrzejewska-Szmek J., Dorman D. B., Blackwell K. T. Making time and space for calcium control of neuron activity. *Current Opinion in Neurobiology*. 2023. 83: 102804.
7. Burgoyne R. D., Haynes L. P. Sense and specificity in neuronal calcium signalling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2015. 1853(9): 1921—1932.

8. Burgoyne R. D., Helassa N., McCue H. V., Haynes L. P. Calcium Sensors in Neuronal Function and Dysfunction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2019. 11(5): a035154.
9. Thomsen M., Lange L. M., Zech M., Lohmann K. Genetics and Pathogenesis of Dystonia. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2024. 19(1): 99—131.
10. Brunetti S., Micheletti S., Palmieri I., Valente E. M., Fazzi E. Benign Hereditary Chorea as a Manifestation of HPCA Mutation. *Movement Disorders Clinical Practice*. 2022. 10(1): 130—134.
11. Weston M. C., Tzingounis A. V. Potassium Channels in Genetic Epilepsy: A Functional Perspective. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* / за ред. Noebels J. L. New-York, US, 2024. С. 944—952.
12. Key J., Mueller A., Gispert S., Matschke L., Wittig I., Corti O., Munch C., Decher N., Auburger G. 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*. 2019. 127: 114—130.
13. Lisek M., Tomczak J., Boczek T., Zylinska L. Calcium-Associated Proteins in Neuroregeneration. *Biomolecules*. 2024. 14(2): 183.
14. Tanabe L. M., Kim C. E., Alagem N., Dauer W. T. Primary dystonia: molecules and mechanisms. *Nature Reviews Neurology*. 2009. 5(11): 598—609.
15. Smit M., Garcia D. V., de Jong B. M., Zoons E., Booij J., Dierckx R. A., Willemsen A. T., de Vries E. F., Bartels A. L., Tijssen M. A. Relationships between Serotonin Transporter Binding in the Raphe Nuclei, Basal Ganglia, and Hippocampus with Clinical Symptoms in Cervical Dystonia: A [11C]DASB Positron Emission Tomography Study. *Frontiers in Neurology*. 2018. 9.
16. Balint B., Mencacci N. E., Valente E. M., Pisani A., Rothwell J., Jankovic J., Vidailhet M., Bhatia K. P. Dystonia. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018. 4(1).

17. Piccinin C. C., Piovesana L. G., Santos M. C. A., Guimares R. P., Campos B. M. D., Rezende T. J. R., Campos L. S., Torres F. R., Amato-Filho A. C., Frana M. C., Lopes-Cendes I., Cendes F., D'Abreu A. Diffuse Decreased Gray Matter in Patients with Idiopathic Craniocervical Dystonia: A Voxel-Based Morphometry Study. *Frontiers in Neurology*. 2015. 5.
18. Tomic A., Agosta F., Sarasso E., Petrovic I., Basaia S., Pesic D., Kostic M., Fontana A., Kostic V. S., Filippi M. Are there two different forms of functional dystonia? A multimodal brain structural MRI study. *Molecular Psychiatry*. 2018.
19. Kuba R., Tyrlikova I., Brazdil M., Rektor I. Lateralized ictal dystonia of upper and lower limbs in patients with temporal lobe epilepsy. *Epileptic Disorders*. 2010. 12(2): 109—115.
20. Rasouli L., Rasouli J. J., Panov F., Yoo J. Y., McGoldrick P. E., Frucht S., Wolf S., Ghatan S. Simultaneous Treatment of Epilepsy and Secondary Dystonia After Anterior Temporal Lobectomy and Amygdalohippocampectomy. *World Neurosurgery*. 2018. 117: 439—442.
21. Kakazu Y., Koh J.-Y., Iwabuchi S., Gonzalez-Alegre P., Harata N. C. Miniature release events of glutamate from hippocampal neurons are influenced by the dystonia-associated protein torsinA. *Synapse*. 2012. 66(9): 807—822.
22. Yokoi F., Chen H.-X., Dang M. T., Cheetham C. C., Campbell S. L., Roper S. N., Sweatt J. D., Li Y. Behavioral and Electrophysiological Characterization of Dyt1 Heterozygous Knockout Mice. *PLOS ONE*. 2015. 10(3): e0120916.
23. Iwabuchi S., Kakazu Y., Koh J.-Y., Harata N. C. Abnormal cytoplasmic calcium dynamics in central neurons of a dystonia mouse model. *Neuroscience Letters*. 2013. 548: 61—66.
24. Byun K., Kim D., Bayarsaikhan E., Oh J., Kim J., Kwak G., Jeong G.-B., Jo S.-M., Lee B. Changes of calcium binding proteins, c-Fos and COX in hippocampal formation and cerebellum of Niemann-Pick, type C mouse. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2013. 52: 1—8.

25. Charlesworth G., Angelova P. R., Bartolom-Robledo F., Ryten M., Trabzuni D., Stamelou M., Abramov A. Y., Bhatia K. P., Wood N. W. Mutations in HPCA Cause Autosomal-Recessive Primary Isolated Dystonia. *The American Journal of Human Genetics*. 2015. 96(4): 657—665.
26. Helassa N., Antonyuk S. V., Lian L.-Y., Haynes L. P., Burgoyne R. D. Biophysical and functional characterization of hippocalcin mutants responsible for human dystonia. *Human Molecular Genetics*. 2017. 26(13): 2426—2435.
27. O'Callaghan D. W., Tepikin A. V., Burgoyne R. D. Dynamics and calcium sensitivity of the Ca²⁺/myristoyl switch protein hippocalcin in living cells. *The Journal of Cell Biology*. 2003. 163(4): 715—721.
28. Ames J. B., Ishima R., Tanaka T., Gordon J. I., Stryer L., Ikura M. Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature*. 1997. 389(6647): 198—202.
29. Dovgan A. V., Cherkas V. P., Stepanyuk A. R., Fitzgerald D. J., Haynes L. P., Tepikin A. V., Burgoyne R. D., Belan P. V. Decoding glutamate receptor activation by the Ca²⁺ sensor protein hippocalcin in rat hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*. 2010. 32(3): 347—358.
30. Markova O., Fitzgerald D., Stepanyuk A., Dovgan A., Cherkas V., Tepikin A., Burgoyne R. D., Belan P. Hippocalcin signaling via site-specific translocation in hippocampal neurons. *Neuroscience Letters*. 2008. 442(2): 152—157.
31. Andrade R., Foehring R. C., Tzingounis A. V. The calcium-activated slow AHP: cutting through the Gordian knot. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2012. 6.
32. Kim K. S., Kobayashi M., Takamatsu K., Tzingounis A. V. Hippocalcin and KCNQ Channels Contribute to the Kinetics of the Slow Afterhyperpolarization. *Biophysical Journal*. 2012. 103(12): 2446—2454.
33. Tzingounis A. V., Kobayashi M., Takamatsu K., Nicoll R. A. Hippocalcin Gates the Calcium Activation of the Slow Afterhyperpolarization in Hippocampal Pyramidal Cells. *Neuron*. 2007. 53(4): 487—493.

34. Villalobos C., Andrade R. Visinin-Like Neuronal Calcium Sensor Proteins Regulate the Slow Calcium-Activated Afterhyperpolarizing Current in the Rat Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*. 2010. 30(43): 14361—14365.
35. Sahu G., Turner R. W. The Molecular Basis for the Calcium-Dependent Slow Afterhyperpolarization in CA1 Hippocampal Pyramidal Neurons. *Frontiers in Physiology*. 2021. 12.
36. Larsson H. P. What Determines the Kinetics of the Slow Afterhyperpolarization (sAHP) in Neurons? *Biophysical Journal*. 2013. 104(2): 281—283.
37. Tzingounis A. V., Nicoll R. A. Contribution of KCNQ2 and KCNQ3 to the medium and slow afterhyperpolarization currents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008. 105(50): 19974—19979.
38. Kim K. S., Duignan K. M., Hawryluk J. M., Soh H., Tzingounis A. V. The Voltage Activation of Cortical KCNQ Channels Depends on Global PIP2 Levels. *Biophysical Journal*. 2016. 110(5): 1089—1098.
39. King B., Rizwan A. P., Asmara H., Heath N. C., Engbers J. D., Dykstra S., Bartoletti T. M., Hameed S., Zamponi G. W., Turner R. W. IKCa Channels Are a Critical Determinant of the Slow AHP in CA1 Pyramidal Neurons. *Cell Reports*. 2015. 11(2): 175—182.
40. Sahu G., Wazen R.-M., Colarusso P., Chen S. W., Zamponi G. W., Turner R. W. Junctophilin Proteins Tether a Cav1-RyR2-KCa3.1 Tripartite Complex to Regulate Neuronal Excitability. *Cell Reports*. 2019. 28(9): 2427—2442.e6.
41. Roshchin M. V., Ierusalimsky V. N., Balaban P. M., Nikitin E. S. Ca²⁺-activated KCa3.1 potassium channels contribute to the slow afterhyperpolarization in L5 neocortical pyramidal neurons. *Scientific Reports*. 2020. 10(1).
42. Tiwari M. N., Mohan S., Biala Y., Shor O., Benninger F., Yaari Y. Corticotropin Releasing Factor Mediates KCa3.1 Inhibition, Hyperexcitability, and Seizures in Acquired Epilepsy. *The Journal of Neuroscience*. 2022. 42(30): 5843—5859.

43. Laker D., Tolle F., Stegen M., Heerdegen M., Köhling R., Kirschstein T., Wolfart J. Kv7 and Kir6 Channels Shape the Slow AHP in Mouse Dentate Gyrus Granule Cells and Control Burst-like Firing Behavior. *Neuroscience*. 2021. 467: 56—72.
44. Springer K., Varghese N., Tzingounis A. V. Flexible Stoichiometry: Implications for KCNQ2- and KCNQ3-Associated Neurodevelopmental Disorders. *Developmental Neuroscience*. 2021. 43(3–4): 191—200.
45. Gullledge A. T., Dasari S., Onoue K., Stephens E. K., Hasse J. M., Avesar D. A Sodium-Pump-Mediated Afterhyperpolarization in Pyramidal Neurons. *Journal of Neuroscience*. 2013. 33(32): 13025—13041.
46. Ibanez V., Sadato N., Karp B., Deiber M.-P., Hallett M. Deficient activation of the motor cortical network in patients with writer's cramp. *Neurology*. 1999. 53(1): 96—96.
47. Stevens C. F. Neurotransmitter Release at Central Synapses. *Neuron*. 2003. 40(2): 381—388.
48. Greer P. L., Greenberg M. E. From Synapse to Nucleus: Calcium-Dependent Gene Transcription in the Control of Synapse Development and Function. *Neuron*. 2008. 59(6): 846—860.
49. Cao Y., Du M., Luo S., Xia Y. Calcineurin modulates growth, stress tolerance, and virulence in *Metarhizium acridum* and its regulatory network. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014. 98(19): 8253—8265.
50. Jan Y.-N., Jan L. Y. The Control of Dendrite Development. *Neuron*. 2003. 40(2): 229—242.
51. Mercer E. A., Korhonen L., Skoglosa Y., Olsson P.-A., Kukkonen J. P., Lindholm D. NAIP interacts with hippocalcin and protects neurons against calcium-induced cell death through caspase-3-dependent and -independent pathways. *The EMBO Journal*. 2000. 19(14): 3597—3607.
52. Higley M. J., Sabatini B. L. Calcium Signaling in Dendrites and Spines: Practical and Functional Considerations. *Neuron*. 2008. 59(6): 902—913.

53. Augustine G. J., Santamaria F., Tanaka K. Local Calcium Signaling in Neurons. *Neuron*. 2003. 40(2): 331—346.
54. Sugawara Y., Echigo R., Kashima K., Minami H., Watanabe M., Nishikawa Y., Muranishi M., Yoneda M., Ohno-Shosaku T. Intracellular calcium level is an important factor influencing ion channel modulations by PLC-coupled metabotropic receptors in hippocampal neurons. *Brain Research*. 2013. 1512: 9—21.
55. MacDonald J. F., Jackson M. F., Beazely M. A. Hippocampal Long-Term Synaptic Plasticity and Signal Amplification of NMDA Receptors. *Critical Reviews™ in Neurobiology*. 2006. 18(1–2): 71—84.
56. Macrez N., Mironneau J. Local Ca²⁺ Signals in Cellular Signalling. *Current Molecular Medicine*. 2004. 4(3): 263—275.
57. Goncalves P. P., Meireles S. M., Neves P., Vale M. P. Methods for analysis of Ca²⁺/H⁺ antiport activity in synaptic vesicles isolated from sheep brain cortex. *Brain Research Protocols*. 2000. 5(1): 102—108.
58. Clapham D. E. Calcium Signaling. *Cell*. 2007. 131(6): 1047—1058.
59. Berridge M. J., Lipp P., Bootman M. D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2000. 1(1): 11—21.
60. Burgoyne R. D., Weiss J. L. The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *Biochem. J*. 2001. 353(Pt 1): 1—12.
61. Braunevell K.-H., Gundelfinger E. D. Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell and Tissue Research*. 1999. 295(1): 1—12.
62. Girard F., Venail J., Schwaller B., Celio M. The EF-hand Ca²⁺-binding protein super-family: A genome-wide analysis of gene expression patterns in the adult mouse brain. *Neuroscience*. 2015. 294: 116—155.
63. Spilker C., Richter K., Smalla K.-H., Manahan-Vaughan D., Gundelfinger E., Braunevell K.-H. The neuronal EF-hand calcium-binding protein visinin-like

- protein-3 is expressed in cerebellar Purkinje cells and shows a calcium-dependent membrane association. *Neuroscience*. 2000. 96(1): 121—129.
64. An W. F., Bowlby M. R., Betty M., Cao J., Ling H.-P., Mendoza G., Hinson J. W., Mattsson K. I., Strassle B. W., Trimmer J. S., Rhodes K. J. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature*. 2000. 403(6769): 553—556.
 65. O'Callaghan D. W., Ivings L., Weiss J. L., Ashby M. C., Tepikin A. V., Burgoyne R. D. 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*. 2002. 277(16): 14227—14237.
 66. Palczewski K., Polans A. S., Baehr W., Ames J. B. Ca²⁺-binding proteins in the retina: Structure, function, and the etiology of human visual diseases. *BioEssays*. 2000. 22(4): 337—350.
 67. Martone M. E., Edelman V. M., Ellisman M. H., Nef P. Cellular and subcellular distribution of the calcium-binding protein NCS-1 in the central nervous system of the rat. *Cell and Tissue Research*. 1999. 295(3): 395—407.
 68. Clayton E. L., Minogue S., Waugh M. G. Mammalian phosphatidylinositol 4-kinases as modulators of membrane trafficking and lipid signaling networks. *Progress in Lipid Research*. 2013. 52(3): 294—304.
 69. Gomez M., De Castro E., Guarin E., Sasakura H., Kuhara A., Mori I., Bartfai T., Bargmann C. I., Nef P. Ca²⁺ Signaling via the Neuronal Calcium Sensor-1 Regulates Associative Learning and Memory in *C. elegans*. *Neuron*. 2001. 30(1): 241—248.
 70. Guo W., Malin S. A., Johns D. C., Jeromin A., Nerbonne J. M. Modulation of Kv4-encoded K⁺ Currents in the Mammalian Myocardium by Neuronal Calcium Sensor-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2002. 277(29): 26436—26443.
 71. Nakamura T. Y., Pountney D. J., Ozaita A., Nandi S., Ueda S., Rudy B., Coetzee W. A. A role for frequenin, a Ca²⁺-binding protein, as a regulator of Kv4 K⁺ -

- currents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001. 98(22): 12808—12813.
72. Sippy T., Cruz-Martín A., Jeromin A., Schweizer F. E. Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nature Neuroscience*. 2003. 6(10): 1031—1038.
 73. Schnurra I., Bernstein H.-G., Riederer P., Braunewell K.-H. The Neuronal Calcium Sensor Protein VILIP-1 Is Associated with Amyloid Plaques and Extracellular Tangles in Alzheimer's Disease and Promotes Cell Death and Tau Phosphorylation in Vitro: A Link between Calcium Sensors and Alzheimer's Disease? *Neurobiology of Disease*. 2001. 8(5): 900—909.
 74. Koh P. O., Undie A. S., Kabbani N., Levenson R., Goldman-Rakic P. S., Lidow M. S. Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002. 100(1): 313—317.
 75. Weisz O. A., Gibson G. A., Leung S.-M., Roder J., Jeromin A. Overexpression of Frequenin, a Modulator of Phosphatidylinositol 4-Kinase, Inhibits Biosynthetic Delivery of an Apical Protein in Polarized Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2000. 275(32): 24341—24347.
 76. Buxbaum J. D., Choi E.-K., Luo Y., Lilliehook C., Crowley A. C., Merriam D. E., Wasco W. Calsenilin: A calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nature Medicine*. 1998. 4(10): 1177—1181.
 77. Hong Y.-M., Jo D.-G., Lee M.-C., Kim S.-Y., Jung Y.-K. Reduced expression of calsenilin/DREAM/KChIP3 in the brains of kainic acid-induced seizure and epilepsy patients. *Neuroscience Letters*. 2003. 340(1): 33—36.
 78. Bahi N. IL1 receptor accessory protein like, a protein involved in X-linked mental retardation, interacts with Neuronal Calcium Sensor-1 and regulates exocytosis. *Human Molecular Genetics*. 2003. 12(>12): 1415—1425.

79. Seidenbecher C. I., Langnaese K., Sanmarti-Vila L., Boeckers T. M., Smalla K.-H., Sabel B. A., Garner C. C., Gundelfinger E. D., Kreutz M. R. Caldendrin, a Novel Neuronal Calcium-binding Protein Confined to the Somato-dendritic Compartment. *Journal of Biological Chemistry*. 1998. 273(33): 21324—21331.
80. Ha G. E., Cheong E. Spike Frequency Adaptation in Neurons of the Central Nervous System. *Experimental Neurobiology*. 2017. 26(4): 179—185.
81. Storm J. F. An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *The Journal of Physiology*. 1989. 409(1): 171—190.
82. Gamper N., Li Y., Shapiro M. S. Structural Requirements for Differential Sensitivity of KCNQ K⁺Channels to Modulation by Ca²⁺/Calmodulin. *Molecular Biology of the Cell*. 2005. 16(8): 3538—3551.
83. Madison D. V., Nicoll R. A. Control of the repetitive discharge of rat CA 1 pyramidal neurones in vitro. *The Journal of Physiology*. 1984. 354(1): 319—331.
84. Lancaster B., Nicoll R., Perkel D. Calcium activates two types of potassium channels in rat hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience*. 1991. 11(1): 23—30.
85. Haug T., Storm J. F. Protein Kinase A Mediates the Modulation of the Slow Ca²⁺-Dependent K⁺Current, IsAHP, by the Neuropeptides CRF, VIP, and CGRP in Hippocampal Pyramidal Neurons. *Journal of Neurophysiology*. 2000. 83(4): 2071—2079.
86. Maylie J., Adelman J. P., Gerlach A. C. Activation kinetics of the slow afterhyperpolarization in hippocampal CA1 neurons. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. 2004. 448(2): 187—196.
87. Xia X.-M., Fakler B., Rivard A., Wayman G., Johnson-Pais T., Keen J. E., Ishii T., Hirschberg B., Bond C. T., Lutsenko S., Maylie J., Adelman J. P. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*. 1998. 395(6701): 503—507.

88. Chang A., Abderemane-Ali F., Hura G. L., Rossen N. D., Gate R. E., Minor D. L. A Calmodulin C-Lobe Ca²⁺-Dependent Switch Governs Kv7 Channel Function. *Neuron*. 2018. 97(4): 836—852.e6.
89. Zhuang W., Yan Z. The S2–S3 Loop of Kv7.4 Channels Is Essential for Calmodulin Regulation of Channel Activation. *Frontiers in Physiology*. 2021. 11.
90. Tzingounis A. V., Heidenreich M., Kharkovets T., Spitzmaul G., Jensen H. S., Nicoll R. A., Jentsch T. J. The KCNQ5 potassium channel mediates a component of the afterhyperpolarization current in mouse hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010. 107(22): 10232—10237.
91. Zhang Q., Zhou P., Chen Z., Li M., Jiang H., Gao Z., Yang H. Dynamic PIP 2 interactions with voltage sensor elements contribute to KCNQ2 channel gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013. 110(50): 20093—20098.
92. Greene D. L., Hoshi N. Modulation of Kv7 channels and excitability in the brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016. 74(3): 495—508.
93. Marrion N. V., Tavalin S. J. Selective activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by co-localized Ca²⁺ channels in hippocampal neurons. *Nature*. 1998. 395(6705): 900—905.
94. Bowden S. E. H., Fletcher S., Loane D. J., Marrion N. V. Somatic Colocalization of Rat SK1 and D class (Cav 1.2) L-type Calcium Channels in Rat CA1 Hippocampal Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 2001. 21(20): RC175—RC175.
95. Bond C. T. Small Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channel Knock-Out Mice Reveal the Identity of Calcium-Dependent Afterhyperpolarization Currents. *Journal of Neuroscience*. 2004. 24(23): 5301—5306.
96. Kaczmarek L. K., Aldrich R. W., Chandy K. G., Grissmer S., Wei A. D., Wulff H. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. C. Nomenclature and Properties of Calcium-Activated and Sodium-Activated Potassium Channels. *Pharmacological Reviews*. 2016. 69(1): 1—11.
97. Nguyen T. V., Matsuyama H., Baell J., Hunne B., Fowler C. J., Smith J. E., Nurgali K., Furness J. B. Effects of Compounds That Influence IK (KCNN4) Channels on

- Afterhyperpolarizing Potentials, and Determination of IK Channel Sequence, in Guinea Pig Enteric Neurons. *Journal of Neurophysiology*. 2007. 97(3): 2024—2031.
98. Wong R., Schlichter L. C. PKA Reduces the Rat and Human KCa3.1 Current, CaM Binding, and Ca²⁺ Signaling, Which Requires Ser332/334 in the CaM-Binding C Terminus. *The Journal of Neuroscience*. 2014. 34(40): 13371—13383.
99. Lee C.-H., MacKinnon R. Activation mechanism of a human SK-calmodulin channel complex elucidated by cryo-EM structures. *Science*. 2018. 360(6388): 508—513.
100. Engbers J. D. T., Anderson D., Asmara H., Rehak R., Mehaffey W. H., Hameed S., McKay B. E., Kruskic M., Zamponi G. W., Turner R. W. Intermediate conductance calcium-activated potassium channels modulate summation of parallel fiber input in cerebellar Purkinje cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. 109(7): 2601—2606.
101. Grundemann J., Clark B. A. Calcium-Activated Potassium Channels at Nodes of Ranvier Secure Axonal Spike Propagation. *Cell Reports*. 2015. 12(11): 1715—1722.
102. Shah M. M., Miscony Z., Javadzadeh-Tabatabaie M., Ganellin C. R., Haylett D. G. Clotrimazole analogues: effective blockers of the slow afterhyperpolarization in cultured rat hippocampal pyramidal neurones. *British Journal of Pharmacology*. 2001. 132(4): 889—898.
103. Turner R. W., Kruskic M., Teves M., Scheidl-Yee T., Hameed S., Zamponi G. W. Neuronal expression of the intermediate conductance calcium-activated potassium channel KCa3.1 in the mammalian central nervous system. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2014. 467(2): 311—328.
104. Higham J., Sahu G., Wazen R.-M., Colarusso P., Gregorie A., Harvey B. S. J., Goudswaard L., Varley G., Sheppard D. N., Turner R. W., Marrion N. V. Preferred Formation of Heteromeric Channels between Coexpressed SK1 and IKCa Channel

- Subunits Provides a Unique Pharmacological Profile of Ca²⁺-Activated Potassium Channels. *Molecular Pharmacology*. 2019. 96(1): 115—126.
105. Tiwari M. N., Mohan S., Biala Y., Yaari Y. Differential contributions of Ca²⁺-activated K⁺ channels and Na⁺/K⁺-ATPases to the generation of the slow afterhyperpolarization in CA1 pyramidal cells. *Hippocampus*. 2018. 28(5): 338—357.
 106. Krishnan A., Duda T., Pertzev A., Kobayashi M., Takamatsu K., Sharma R. K. Hippocalcin, new Ca²⁺ sensor of a ROS-GC subfamily member, ONE-GC, membrane guanylate cyclase transduction system. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2009. 325(1–2): 1—14.
 107. Kobayashi M., Masaki T., Hori K., Masuo Y., Miyamoto M., Tsubokawa H., Noguchi H., Nomura M., Takamatsu K. Hippocalcin-deficient mice display a defect in cAMP response element-binding protein activation associated with impaired spatial and associative memory. *Neuroscience*. 2005. 133(2): 471—484.
 108. Noguchi H., Kobayashi M., Miwa N., Takamatsu K. Lack of hippocalcin causes impairment in Ras/extracellular signal-regulated kinase cascade via a Raf-mediated activation process. *Journal of Neuroscience Research*. 2007. 85(4): 837—844.
 109. Nagata K.-i. The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3. *The EMBO Journal*. 1998. 17(1): 149—158.
 110. Hyun J.-K., Yon C., Kim Y.-S., Noh D.-Y., Lee K.-H., Han J.-S. Role of Hippocalcin in Ca²⁺-induced Activation of Phospholipase D. *Molecules and Cells*. 2000. 10(6): 669—677.
 111. Oh D.-Y., Yon C., Oh K.-J., Lee K. S., Han J.-S. Hippocalcin increases phospholipase D2 expression through extracellular signal-regulated kinase activation and lysophosphatidic acid potentiates the hippocalcin-induced phospholipase D2 expression. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2005. 97(5): 1052—1065.

112. Oh D.-Y., Cho J. H., Park S.-Y., Kim Y. S., Yoon Y.-J., Yoon S. H., Chung K. C., Lee K. S., Han J.-S. A novel role of hippocalcin in bFGF-induced neurite outgrowth of H19-7 cells. *Journal of Neuroscience Research*. 2008. 86(7): 1557—1565.
113. WOOD S. J., PANTELIS C., PROFFITT T., PHILLIPS L. J., STUART G. W., BUCHANAN J.-A., MAHONY K., BREWER W., SMITH D. J., MCGORRY P. D. Spatial working memory ability is a marker of risk-for-psychosis. *Psychological Medicine*. 2003. 33(7): 1239—1247.
114. Palmer C. L., Lim W., Hastie P. G., Toward M., Korolchuk V. I., Burbidge S. A., Banting G., Collingridge G. L., Isaac J. T., Henley J. M. Hippocalcin Functions as a Calcium Sensor in Hippocampal LTD. *Neuron*. 2005. 47(4): 487—494.
115. McMahon H. T., Mills I. G. COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Current Opinion in Cell Biology*. 2004. 16(4): 379—391.
116. Lee S. H., Liu L., Wang Y. T., Sheng M. Clathrin Adaptor AP2 and NSF Interact with Overlapping Sites of GluR2 and Play Distinct Roles in AMPA Receptor Trafficking and Hippocampal LTD. *Neuron*. 2002. 36(4): 661—674.
117. Lindholm D., Mercer E. A., Yu L.-Y., Chen Y., Kukkonen J., Korhonen L., Arumae U. Neuronal apoptosis inhibitory protein: structural requirements for hippocalcin binding and effects on survival of NGF-dependent sympathetic neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2002. 1600(1-2): 138—147.
118. Korhonen L., Hansson I., Kukkonen J. P., Brannvall K., Kobayashi M., Takamatsu K., Lindholm D. Hippocalcin protects against caspase-12-induced and age-dependent neuronal degeneration. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2005. 28(1): 85—95.
119. Park S.-Y., Yoon S. N., Kang M.-J., Lee Y., Jung S. J., Han J.-S. Hippocalcin Promotes Neuronal Differentiation and Inhibits Astrocytic Differentiation in Neural Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2017. 8(1): 95—111.

120. Kaupp U. B., Seifert R. Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels. *Physiological Reviews*. 2002. 82(3): 769—824.
121. Mamman A., Simpson J. P., Nighorn A., Imanishi Y., Palczewski K., Ronnett G. V., Moon C. Hippocalcin in the olfactory epithelium: a mediator of second messenger signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004. 322(4): 1131—1139.
122. Atasu B., Hanagasi H., Bilgic B., Pak M., Erginel-Unaltuna N., Hauser A.-K., Guven G., Simon-Sanchez J., Heutink P., Gasser T., Lohmann E. HPCA confirmed as a genetic cause of DYT2-like dystonia phenotype. *Movement Disorders*. 2018. 33(8): 1354—1358.
123. Neher E., Augustine G. J. Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *The Journal of Physiology*. 1992. 450(1): 273—301.
124. Foehring R. C., Zhang X. F., Lee J., Callaway J. C. Endogenous Calcium Buffering Capacity of Substantia Nigral Dopamine Neurons. *Journal of Neurophysiology*. 2009. 102(4): 2326—2333.
125. Hines M. L., Carnevale N. T. Neuron: A Tool for Neuroscientists. *The Neuroscientist*. 2001. 7(2): 123—135.
126. Mainen Z. F., Sejnowski T. J. Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature*. 1996. 382(6589): 363—366.
127. Hines M. L., Morse T., Migliore M., Carnevale N. T., Hines M. L. ModelDB: A Database to Support Computational Neuroscience. *Journal of Computational Neuroscience*. 2004. 17(1): 7—11.
128. Papoutsis A., Kastellakis G., Poirazi P. Basal tree complexity shapes functional pathways in the prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*. 2017. 118(4): 1970—1983.
129. Vitko I., Chen Y., Arias J. M., Shen Y., Wu X.-R., Perez-Reyes E. Functional Characterization and Neuronal Modeling of the Effects of Childhood Absence Epilepsy Variants of CACNA1H, a T-Type Calcium Channel. *The Journal of Neuroscience*. 2005. 25(19): 4844—4855.

130. Rose C. R., Felix L., Zeug A., Dietrich D., Reiner A., Henneberger C. Astroglial Glutamate Signaling and Uptake in the Hippocampus. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018. 10.
131. Furuta Y., Kobayashi M., Masaki T., Takamatsu K. Age-Related Changes in Expression of Hippocalcin and NVP2 in Rat Brain. *Neurochemical Research*. 1999. 24(5): 651—658.
132. Raghuram V., Sharma Y., Kreutz M. R. Ca²⁺ sensor proteins in dendritic spines: a race for Ca²⁺. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2012. 5.
133. Lee S.-H., Rosenmund C., Schwaller B., Neher E. Differences in Ca²⁺ buffering properties between excitatory and inhibitory hippocampal neurons from the rat. *The Journal of Physiology*. 2000. 525(2): 405—418.
134. Power J. M., Bocklisch C., Curby P., Sah P. Location and Function of the Slow Afterhyperpolarization Channels in the Basolateral Amygdala. *Journal of Neuroscience*. 2011. 31(2): 526—537.
135. Faas G. C., Mody I. Measuring the kinetics of calcium binding proteins with flash photolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2012. 1820(8): 1195—1204.
136. Sabatini B. L., Oertner T. G., Svoboda K. The Life Cycle of Ca²⁺ Ions in Dendritic Spines. *Neuron*. 2002. 33(3): 439—452.
137. Parrilla-Carrero J., Buchta W. C., Goswamee P., Culver O., McKendrick G., Harlan B., Moutal A., Penrod R., Lauer A., Ramakrishnan V., Khanna R., Kalivas P., Riegel A. C. Restoration of Kv7 Channel-Mediated Inhibition Reduces Cued-Reinstatement of Cocaine Seeking. *The Journal of Neuroscience*. 2018. 38(17): 4212—4229.
138. Larson J., Munkácsy E. Theta-burst LTP. *Brain Research*. 2015. 1621: 38—50.
139. Widman A. J., Stewart A. E., Erb E. M., Gardner E., McMahon L. L. Intravascular Ketamine Increases Theta-Burst but Not High Frequency Tetanus Induced LTP at CA3-CA1 Synapses Within Three Hours and Devoid of an Increase in Spine Density. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2018. 10.

140. Pai Y. H., Lim C. S., Park K.-A., Cho H. S., Lee G.-S., Shin Y. S., Kim H.-W., Jeon B. H., Yoon S. H., Park J. B. Facilitation of AMPA receptor-mediated steady-state current by extrasynaptic NMDA receptors in supraoptic magnocellular neurosecretory cells. *The Korean Journal of Physiology; Pharmacology*. 2016. 20(4): 425.
141. Shen W., Nikolic L., Meunier C., Pfrieger F., Audinat E. An autocrine purinergic signaling controls astrocyte-induced neuronal excitation. *Scientific Reports*. 2017. 7(1).
142. Ames J. B., Hamasaki N., Molchanova T. Structure and Calcium-Binding Studies of a Recoverin Mutant (E85Q) in an Allosteric Intermediate State. *Biochemistry*. 2002. 41(18): 5776—5787.
143. Li C., Pan W., Braunewell K. H., Ames J. B. 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*. 2010. 286(8): 6354—6366.
144. Grienberger C., Konnerth A. Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*. 2012. 73(5): 862—885.
145. Simms B. A., Zamponi G. W. Neuronal Voltage-Gated Calcium Channels: Structure, Function, and Dysfunction. *Neuron*. 2014. 82(1): 24—45.
146. Goldberg J. A., Teagarden M. A., Foehring R. C., Wilson C. J. Nonequilibrium Calcium Dynamics Regulate the Autonomous Firing Pattern of Rat Striatal Cholinergic Interneurons. *Journal of Neuroscience*. 2009. 29(26): 8396—8407.
147. Shi L., Bian X., Qu Z., Ma Z., Zhou Y., Wang K., Jiang H., Xie J. Peptide hormone ghrelin enhances neuronal excitability by inhibition of Kv7/KCNQ channels. *Nature Communications*. 2013. 4(1).
148. Sanchez G., Rodriguez M. J., Pomata P., Rela L., Murer M. G. Reduction of an Afterhyperpolarization Current Increases Excitability in Striatal Cholinergic Interneurons in Rat Parkinsonism. *The Journal of Neuroscience*. 2011. 31(17): 6553—6564.

149. Ghamari-Langroudi M., Bourque C. W. Muscarinic Receptor Modulation of Slow Afterhyperpolarization and Phasic Firing in Rat Supraoptic Nucleus Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 2004. 24(35): 7718—7726.
150. Ponterio G., Tassone A., Sciamanna G., Vanni V., Meringolo M., Santoro M., Mercuri N. B., Bonsi P., Pisani A. Enhanced mu opioid receptor–dependent opioidergic modulation of striatal cholinergic transmission in DYT1 dystonia. *Movement Disorders*. 2017. 33(2): 310—320.
151. Sciamanna G., Tassone A., Martella G., Mandolesi G., Puglisi F., Cuomo D., Madeo G., Ponterio G., Standaert D. G., Bonsi P., Pisani A. Developmental Profile of the Aberrant Dopamine D2 Receptor Response in Striatal Cholinergic Interneurons in DYT1 Dystonia. *PLoS ONE*. 2011. 6(9): e24261.
152. Luthi-Carter R. Dysregulation of gene expression in the R6/2 model of polyglutamine disease: parallel changes in muscle and brain. *Human Molecular Genetics*. 2002. 11(17): 1911—1926.
153. Rossi A., Kontarakis Z., Gerri C., Nolte H., Holper S., Kruger M., Stainier D. Y. R. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*. 2015. 524(7564): 230—233.

Додаток 1. Список публікацій здобувача

В яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

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

DOI: 10.1371/journal.pone.0194031

Особистий внесок здобувача: проведення частини електрофізіологічних і флуоресцентних експериментів; збір та організація експериментальних даних; обробка даних; написання програмного забезпечення для обробки даних; обробка частини даних; підготовка рисунків.

2. Osypenko D., Dovgan A., Kononenko N., Dromaretsky A., Matvieienko M., Rybachuk O., Zhang J., Korogod S., Venkataraman V., Belan P. Perturbed Ca²⁺-dependent signaling of DYT2 hippocalcin mutant as mechanism of autosomal recessive dystonia. Neurobiology of Disease. 2019. 132: 104529.

DOI: 10.1016/j.nbd.2019.104529

Особистий внесок здобувача: проведення частини експериментів з клітинами HEK-293 та культивованими нейронами гіпокампу; написання програмного забезпечення для обробки даних; обробка частини даних; написання частини результатів; підготовка рисунків.

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

DOI: 10.3389/fncel.2017.00342

Особистий внесок здобувача: встановлення та налаштування бокового інфрачервоного освітлення для відеореєстрації; технічна реалізація експериментів для вимірювання концентрацій Ca²⁺ за допомогою флуоресцентного барвника «Fura-2» та оцінки концентрацій та розподілу барвника у нейронах; підготовка рисунків.

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

DOI: 10.22141/2309-8147.5.3.2017.172351

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

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

DOI: 10.15407/fz64.04.041

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

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Osypenko D. S., Dovgan A. V., Kononenko N. I., **Dromaretsky A. V.**, Matveenko M., Rybachuk O. A., Zhang J., Korogod S. M., Venkataraman V., Belan P.

Impaired signaling of *dvt2* hippocalcin mutant as mechanism of autosomal recessive dystonia.

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

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

Neurocalcin delta translocation is not dependent on its dimerization.

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

3. Duzhyy D., Dovgan A., Kononenko N., **Dromaretsky A.**, Voitenko N., Belan P.
Developing double stranded RNAs to efficiently suppress expression of T-type Ca channels for treating diabetic neuropathy.
Federation of European Neuroscience Societies Forum 2024, pp PS05-28M-382.
Vienna, Austria, 2024.
4. Dovgan A.V., Kononenko N.I., Viviano J., **Dromaretsky A.**, Belous I., Marimonchik A., Satretdinova R., Zhang J., Venkataraman V., Belan P.V.
N-terminal domains of neurocalcin δ and hippocalcin underlies their distinct signalling.
Тематичний VII з'їзд Українського біофізичного товариства, Київ, 2018.