Облікова картка дисертації

I. Загальні відомості

Державний обліковий номер: 0420U101636

Особливі позначки: відкрита

Дата реєстрації: 28-09-2020

Статус: Захищена

Реквізити наказу МОН / наказу закладу:

II. Відомості про здобувача

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Шеремет Євгеній Юрійович
2. Sheremet Yevgeniy Yu

Кваліфікація: 03.00.02

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Вид дисертації: кандидат наук

Аспірантура/Докторантура: так

Шифр наукової спеціальності: 03.00.02

Назва наукової спеціальності: Біофізика

Галузь / галузі знань: Не застосовується

Освітньо-наукова програма зі спеціальності: Не застосовується

Дата захисту: 22-09-2020

Спеціальність за освітою: прикладна математика

Місце роботи здобувача: Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України

Код за ЄДРПОУ: 05417093

Місцезнаходження: вул. Богомольця, 4, м. Київ, Київська обл., 01024, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

III. Відомості про організацію, де відбувся захист

Шифр спеціалізованої вченої ради (разової спеціалізованої вченої ради): Д 26.198.01

Повне найменування юридичної особи: Інститут фізіології ім. Богомольця Національна академія наук України

Код за ЄДРПОУ: 00000000

Місцезнаходження: вул. Богомольця, 4, м. Київ, Київ, 01024, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

IV. Відомості про підприємство, установу, організацію, в якій було виконано дисертацію

Повне найменування юридичної особи: Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України

Код за ЄДРПОУ: 05417093

Місцезнаходження: вул. Богомольця, 4, м. Київ, Київська обл., 01024, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

V. Відомості про дисертацію

Мова дисертації:

Коди тематичних рубрик: 34.17

Тема дисертації:

1. Експресія та просторовий розподіл нейронного кальцієвого сенсорного білка гіпокальцину в субклітинних компартментах.

2. Expression and Spatial Distribution of the Neuronal Calcium Sensor Protein Hippocalcin in Subcellular Compartments

Реферат/анотація:

1. Гиппокальцин – нейронный Ca2+-сенсорный белок (NCS), который опосредует внутриклеточные сигнальные пути благодаря своей способности к Ca2+-зависимой 22 транслокации из цитозоля на плазматическую мембрану. Несмотря на то, что подобная транслокация гиппокальцина и других NCS-белков достаточно хорошо изучена, никаких количественных оценок распределения гиппокальцина между цитозолем и плазматической мембраной при базальном уровне внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция ([Ca2+]i) получено не было. В этой работе мы предложили простые и универсальные подходы для таких оценок. Мы показали, что уровень экспрессии экзогенного гиппокальцина (10 мкМ) в исследуемых нейронах гиппокампа по крайней мере втрое ниже по сравнению с концентрацией эндогенного. Таким образом, экзогенный белок можно использовать в качестве инструмента визуализации распределения,

транслокации и взаимодействия гиппокальцина с белками-мишенями без существенного влияния на эндогенную сигнализацию гиппокальцина. Используя метод восстановления флуоресценции после фотовыцветания (FRAP), мы показали, что коэффициент диффузии флуоресцентно меченого гиппокальцина в дендритах нейронов гиппокампа (~40 мкм/с) находится в пределах диапазона значений, характерных для цитозольных белков, причем коэффициент был примерно в 10 раз больше, чем для чисто мембранного белка. Оба эти результаты свидетельствуют о том, что гиппокальцин находится в основном в цитозоле дендритов нейронов гиппокампа. Прямое вычисление фракционного распределения гиппокальцина на базальном уровне [Ca2+]i показали, что мембранная фракция гиппокальцина не превышает 8%. В целом, наши результаты говорят о том, что, будучи преимущественно цитозольным, гиппокальцин может умеренно активировать свои мембранные белки-мишени даже в условиях покоя.

2. Hippocalcin (HPCA) is a neuronal calcium sensor (NCS) protein that provides intracellular signaling via its Ca2+-dependent translocation from the cytosol to the plasma membrane. Although such translocation of HPCA and some NCS proteins is wellestablished, no quantitative estimates of HPCA distribution between the cytosol and plasma membrane at a basal level of free intracellular calcium concentration ([Ca2+]i) have been obtained. Thus, it is still unknown whether HPCA regulates its plasma membrane targets under resting conditions. Moreover, exogenously expressed fluorescently-labeled proteins, widely used for biophysical studies, could probably shift endogenous proteins signaling. That's why the main issues in this study is the estimation of the expression level of the 23 exogenous HPCA construct, compared to that of the corresponding endogenous one, and quantitative estimates of HPCA distribution between the cytosol and plasma membrane at a basal level [Ca2+]i. In this work, we propose a simple and universal approaches for such estimations. The approach for measurement of expression level is based upon common knowledge that the dye fluorescence is directly proportional to its quantum yield and the number of its molecules and that a coefficient of proportionality is determined by spectral properties of the dye and optical equipment used to record fluorescent signals. If two fluorescent dyes are present in the same volume, then a ratio of their concentrations is equal to a ratio of their fluorescence multiplied by some dye- and equipment-dependent coefficient. Thus, if the coefficient and concentration of one dye is known then the concentration of another dye can be determined. Here we have demonstrated how to calculate this coefficient (called a ratio factor) and how to use it for concentration measurements of fluorescently tagged molecules. Using this approach, we estimated a concentration of exogenously expressed HPCA, tagged by a fluorescent protein in a dendritic tree of rat hippocampal neurons loaded via a patch pipette with Alexa Fluor dye of known concentration. We have demonstrated that HPCA expression level (10 μM) in the hippocampal neurons under study is at least 3 times lower compared to the concentration of endogenous one. Thus, the exogenous protein may be used as a tool to visualize HPCA distribution, translocation and target interaction without substantial perturbation of endogenous HPCA signaling. Next, we have evaluated HPCA spatial distribution in living cells at a basal level of [Ca2+]i comparing this distribution with one of exogenously expressed membrane protein, EYFP-Mem. Using fluorescence recovery after photobleaching, we showed that the diffusion coefficient of fluorescently tagged HPCA in the dendrites of the hippocampal neurons (~40 μm2 /s) is within a range of values typical for cytosolic proteins. The coefficient was about 10-fold higher than that for EYFP-Mem. Both results indicate that HPCA is mainly localized in the cytosol of the dendrites of hippocampal neurons. Subsequent direct calculations for HPCA fractions in the cytosol and plasma membrane at a basal level of [Ca2+]i demonstrated that the plasma membrane fraction of HPCA does not exceed 8%. Altogether, our results suggest that although being mainly cytosolic, HPCA may potentially signal to its plasma membrane targets under resting conditions. New approaches, used for obtaining such estimates, can be applied for quantitative evaluation expression level of NCS protein and its spatial distribution in living cells under different experimental conditions and for development of precise biophysical models of their signaling.

Державний реєстраційний номер ДіР:

Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки:

Стратегічний пріоритетний напрям інноваційної діяльності:

Підсумки дослідження:

Публікації:

Наукова (науково-технічна) продукція:

Соціально-економічна спрямованість:

Охоронні документи на ОПІВ:

Впровадження результатів дисертації:

Зв'язок з науковими темами:

VI. Відомості про наукового керівника/керівників (консультанта)

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Білан Павло Володимирович

2. Bilan Pavlo V.

Кваліфікація: д. б. н., 03.00.02

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

VII. Відомості про офіційних опонентів та рецензентів

Офіційні опоненти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Соловйов Анатолій Іванович

2. Solovyov Anatoliy I.

Кваліфікація: д. мед. н., 14.03.03, 14.03.05

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Сиволоб Андрій Володимирович

2. Syvolob Andriy V.

Кваліфікація: д. б. н., 03.00.02

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Рецензенти

VIII. Заключні відомості

Власне Прізвище Ім'я По-батькові голови ради Кришталь Олег Олександрович

Власне Прізвище Ім'я По-батькові головуючого на засіданні Кришталь Олег Олександрович

Відповідальний за підготовку облікових документів

Реєстратор

Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є відповідальним за реєстрацію наукової діяльності Юрченко Т.А.