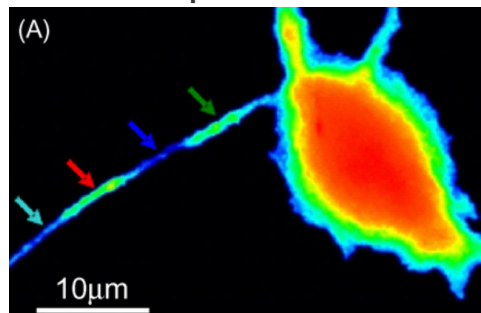


Inhomogeneity in HPCA insertions pattern and translocation amplitudes in compact cells: morphological properties vs PIP2 distribution

Borys Olifirov, 21.06.2021

Повышение кальция в дендритах нейронов приводит к кальций-зависимой транлокации НРСА, однако паттерн транлокации неравномерный вдоль дендрита (*Markova et al., 2008, doi:10.1016/j.neulet.2008.06.089*). Места предпочтительных мест транлокаций устойчивы во времени (*Dovgan, unpublished*). Как *in vitro*, так и *in vivo* показано, что НРСА обладает высоким сродством с минорным фосфолипидным компонентом цитоплазматической мембраны - фосфатидилинозитол 4,5-дифосфатом (PIP2), результаты измерений на липидных везикулах показали $K_d \sim 50$ nM (*O'Callaghan et al., 2005, doi:10.1042/BJ20051001*).

НРСА Ca^{2+} -dependent translocations pattern in dendrite



Markova et al., 2008

В состоянии покоя лишь незначительная доля НРСА встроена в мембрану, 0-8% (*Sheremet et al., 2020, DOI 10.1007/s11062-020-09845-6; Cherkas, unpublished*), а при повышении концентрации кальция в отдельных регионах мембраны концентрация белка может повышаться на 50-100% (*Olifirov, unpublished; Dovgan, unpublished*).

Эти наблюдения позволяют выдвинуть гипотезу, что встраивание такого огромного количества кальциевого сенсора в небольшие по площади регионы мембраны может приводить к изменению ее биофизических свойств, в том числе и буферизировать PIP2. Стоит подчеркнуть, потенциальные мишени подобного воздействия НРСА также демонстрируют высокое сродство к PIP2 или же их активность непосредственно им модулируется (*Hansen, 2015, dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.01.011; Rodríguez-Menchaca et al., 2012, doi: 10.3389/fphar.2012.00170; Dickson et al., 2014, doi/10.1073/pnas.1407133111*).

Однако до сих пор не существует прямых наблюдений связи неравномерностей встраивания НРСА с распределением PIP2 в плазматической мембране а также то, насколько сильно изменение PIP2 может влиять на амплитуды встраивания НРСА в плазматическую мембрану, что критически важно для понимания механизмов взаимодействия НРСА с потенциальными мишенями. Необходимо ли для влияния на них прямое взаимодействие с НРСА или же неспецифическое влияние нейронного кальциевого сенсора на локальное мембранное окружение каналов способно изменять их поведение.

Main points

- **Связан ли паттерн встраивания с морфологическими особенностями?**

Если в модельном объекте НЕК 293 в котором отсутствуют предполагаемые эндогенные мишени НРСА паттерн транслокации равномерный по всей площади мембраны и уменьшение количества PIP2 не приводит к изменению амплитуды транслокации и ее паттерна, значит наблюдаемая в нейронах картина встраивания обусловлена не гетерогенностью липидного состава внутренней поверхности плазматической мембраны. Открытым вопросом остается роль в формировании наблюдаемой картины встраивания взаимодействия НРСА с мишенями в составе мембраны: различными компонентами каналов в случае sAHP, AP2 в случае LTD (для AP2 показана аффинность по отношению к PIP2).

- **Неравномерности паттерна встраивания обусловлена сродством с PIP2 локализованным в компактных рафтах**

Неизвестно локализован ли пул PIP2 в НЕК 293 в составе рафтов или же равномерно распределен в плазматической мембране (что возможно установить совместным измерением PH-domain + FP-Mem), однако если удаление PIP2 из мембраны в результате которого будет наблюдаться снижению амплитуды транслокации НРСА будет прямым доказательством роли PIP2 в процессе кальций-зависимого встраивания НРСА в плазматическую мембрану. В таком случае НРСА может играть двоякую роль в регуляторных процессах: потенциальные мишени заведомо локализованы в областях плазматической мембраны с высоким содержанием PIP2 и таем образом локальный состав мембраны обеспечивает колокализацию мишени и мембранной формы НРСА; кальциевый сенсор выступает промежуточным звеном обеспечивающим кальций-зависимую доставку цитоплазматических мишеней в области плазматической мембраны с высоким содержанием PIP2.

Research plan

- **EYFP-Mem + НРСА-TagRFP**

Характер распределения сайтов встраивания НРСА

- **EYFP-Mem + PH-CFP**

Характер распределения PIP2

- **DrVSP-EYFP + PH-CFP**

Кинетика утилизация мембранного PIP2 за счет активности DRVSP

- **DrVSP-EYFP + PH-CFP + НРСА-TagRFP**

Влияние утилизация мембранного PIP2 на амплитуды транслокаций НРСА