

mgr farm. Karolina Serwach

Białka STIM w procesie endocytozy receptorów NMDA
w neuronach kory mózgu szczura *in vitro*

Rozprawa na stopień naukowy doktora
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. Joanna Gruszczyńska-Biegała



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa, 2023

Wykonanie niniejszej pracy było możliwe dzięki wsparciu finansowemu udzielonemu przez:

- Narodowe Centrum Nauki (2017/26/E/NZ3/01144),
- Europejski Fundusz Społeczny (EFS-POWR.03.02.00-00-1028/17-00).

Realizacja założeń poniższej pracy była możliwa dzięki współpracy:

- ze Środowiskowym Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych IMDiK PAN,
- z Katedrą i Zakładem Farmakoterapii i Opieki Farmaceutycznej WUM.



NARODOWE CENTRUM NAUKI



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Wykaz publikacji doktorantki:

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

Serwach K., Nurowska E., Klukowska M., Zablocka B., Gruszczynska-Biegala J., STIM2 regulates NMDA receptor endocytosis that is induced by short-term NMDA receptor overactivation in cortical neurons, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2023 (IF = 8,0) – artykuł w przygotowaniu do ponownego wysłania po recenzjach

Serwach K., Gruszczynska-Biegala J., Target Molecules of STIM Proteins in the Central Nervous System, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2020, 13:617422; <https://doi.org/10.3390/ijms20092289>, (IF = 5,639)

Serwach K., Gruszczynska-Biegala J., STIM Proteins and Glutamate Receptors in Neurons: Role in Neuronal Physiology and Neurodegenerative Diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(9), 2289; <https://doi.org/10.3390/ijms20092289>, (IF = 4,556)

Publikacje niewchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

Wojtyniak P., Boratynska-Jasinska A., **Serwach K.**, Gruszczynska-Biegala J., Zablocka B., Jaworski J., Kawalec M., Mitofusin 2 Integrates Mitochondrial Network Remodelling, Mitophagy and Renewal of Respiratory Chain Proteins in Neurons after Oxygen and Glucose Deprivation, *Molecular Neurobiology*, 2022, 59(10):6502-6518; doi: 10.1007/s12035-022-02981-6, (IF = 5,1).

Niniejszą pracę dedykuję mojej Mamie i mojemu śp. Tacie, dzięki którym miałam możliwość kształcić się i zdobywać wiedzę, i którzy wspierali mnie przez wszystkie lata nauki.

Składam serdeczne podziękowania:

Dr hab. Joannie Gruszczyńskiej-Biegała za opiekę naukową, dzielenie się wiedzą merytoryczną, wsparcie, zaufanie i możliwość prowadzenia badań w interesującym projekcie.

Prof. dr hab. Barbarze Zabłockiej za cenne wskazówki merytoryczne, wartościowe rady i dyskusje, a także za okazane wsparcie i życzliwość.

Dr hab. Ewie Nurowskiej za pomoc w prowadzeniu badań z zakresu elektrofizjologii, poświęcony czas i zaangażowanie.

Magistrantom, Martynie Bączek i Marcie Klukowskiej za to, że zawsze mogłam na nie liczyć.

Wszystkim koleżankom i kolegom z Pracowni Biologii Molekularnej za pomoc oraz miłą atmosferę pracy.

Mojemu narzeczonemu za wyrozumiałość, wsparcie i wspólne dzielenie naukowych pasji.

Mojej rodzinie za wiarę w moje możliwości.

Spis treści

Alfabetyczny wykaz skrótów.....	9
Streszczenie	12
Summary	14
Innowacyjność rozprawy	16
1 Wstęp	17
1.1 Mechanizmy regulujące stężenie jonów wapnia w komórkach nerwowych.....	17
1.2 Pojemnościowy napływ jonów wapnia i białka STIM	21
1.2.1 Budowa białek STIM	21
1.2.2 Pojemnościowy napływ jonów wapnia	22
1.2.3 Występowanie białek STIM w ośrodkowym układzie nerwowym.....	24
1.2.4 Rola SOCE i białek STIM w fizjologii komórek układu nerwowego.....	24
1.3 NMDAR.....	26
1.3.1 Budowa NMDAR	26
1.3.2 Występowanie NMDAR w ośrodkowym układzie nerwowym	28
1.3.3 Biosynteza i transport NMDAR	29
1.3.3.1 Biosynteza	29
1.3.3.2 Modyfikacje potranslacyjne i transport wzdłuż mikrotubul.....	30
1.3.3.3 Egzocytoza i dyfuzja boczna	30
1.3.3.4 Endocytoza NMDAR	31
1.3.4 Rola NMDAR w fizjologii komórek układu nerwowego	34
2 Cel pracy	36
3 Materiały i metody	37
3.1 Odczynniki i roztwory	37
3.2 Model badawczy	41
3.2.1 Pierwotna hodowla neuronów kory mózgu szczura	41
3.3 Hodowle bakteryjne	43
3.3.1 Przygotowanie bakterii kompetentnych	43
3.3.2 Transformacja bakterii kompetentnych	43
3.3.3 Izolowanie i oczyszczanie plazmidowego DNA	44
3.4 Produkcja lentiwirusów i transdukcja neuronów	45

3.5	Warunki aktywacji endocytozy NMDAR.....	46
3.5.1	Ocena przeżywalności neuronów	46
3.6	Analiza białek metodą immunoblotting (western blot)	47
3.6.1	Przygotowanie lizatów komórkowych	47
3.6.2	Pomiar stężenia białka metodą Bradforda	47
3.6.3	Biotynylacja białek powierzchniowych	47
3.6.4	Izolowanie białek synaptosomalnych.....	48
3.6.5	Koimmunoprecypitacja	48
3.6.6	Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) i elektrotransfer	48
3.6.7	Detekcja białek z użyciem przeciwciał	49
3.7	Oznaczanie białek powierzchniowych — test immunoenzymatyczny ELISA	51
3.8	Barwienia immunofluorescencyjne	52
3.9	Pomiary elektrofizjologiczne metodą whole cell patch-clamp.....	53
3.10	Analiza statystyczna	54
4	Wyniki	55
4.1	Badanie endocytozy NMDAR po krótkotrwałej, silnej aktywacji tego receptora	55
4.1.1	Oznaczanie immunoreaktywności GluN1, GluN2A, GluN2B i białek STIM w lizatach komórkowych i w błonie komórkowej	55
4.1.2	Oznaczanie immunoreaktywności GluN1, GluN2A, GluN2B i białek STIM w synaptosomach	57
4.1.3	Analiza kolokalizacji GluN1, GluN2A, GluN2B z białkiem markerowym wczesnych endosomów (EEA1).....	58
4.1.4	Pomiar całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR	61
4.2	Wpływ endocytozy NMDAR na oddziaływania białek STIM z NMDAR	63
4.2.1	Analiza koimmunoprecypitacji białek STIM z GluN2A i GluN2B.....	63
4.2.2	Analiza kolokalizacji białka STIM2 z GluN2A i GluN2B	64
4.3	Wpływ białek STIM na proces endocytozy NMDAR.....	67
4.3.1	Oznaczanie immunoreaktywności GluN1, GluN2A, GluN2B w lizatach komórkowych.....	67
4.3.2	Oznaczanie immunoreaktywności GluN1, GluN2A, GluN2B w błonie komórkowej	69
4.3.3	Oznaczanie immunoreaktywności GluN1, GluN2A, GluN2B w synaptosomach...	70
4.3.4	Pomiar całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR	72

5 Dyskusja.....	74
5.1 Endocytoza NMDAR	75
5.2 Wpływ endocytozy NMDAR na lokalizację białek STIM w błonie komórkowej i synaptosomach.....	77
5.3 Oddziaływania białek STIM i NMDAR.....	78
5.4 Wpływ białek STIM na endocytozę NMDAR	80
6 Podsumowanie	84
7 Wniosek	85
Bibliografia	86
Spis rycin	97
Spis tabel.....	98

Alfabetyczny wykaz skrótów

AMPA	kwasy α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy (ang. <i>α-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid</i>),
ATP	adenozyno trójfosforan (ang. <i>adenosine triphosphate</i>),
BSA	albumina surowicy bydłowej (ang. <i>Bovine Serum Albumin</i>),
CaMKII	kinaza białkowa II regulowana przez jony wapnia i kalmodulinę (ang. <i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i>),
CASK	kinaza białkowa fosforylująca reszty seryny regulowana przez jony wapnia i kalmodulinę (ang. <i>Ca²⁺/calmodulin-dependent serine kinase</i>),
CRAC	kanały aktywowane wyrzutem Ca ²⁺ (ang. <i>Calcium Release-Activated Channels</i>),
CTD	domena C-końcowa (ang. <i>C-Terminal Domain</i>),
DAG	1,2-diacyloglicerol (ang. <i>diacylglycerol</i>),
DOC	deoksycholany sodu (ang. <i>sodium deoxycholate</i>),
DTT	ditiotreitol (ang. <i>dithiothreitol</i>),
EEA1	antygen wczesnych endosomów 1 (ang. <i>Early Endosome Antigen 1</i>),
ELISA	test immunoenzymatyczny ELISA (ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>),
EPSC	postsynaptyczny potencjał pobudzający (ang. <i>excitatory postsynaptic current</i>),
ER	siateczka śródplazmatyczna (ang. <i>Endoplasmic Reticulum</i>),
FBS	plodowa surowica bydła (ang. <i>Fetal Bovine Serum</i>),
HBSS	roztwór soli Hanksa (ang. <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>),
HEPES	kwasy 2-(4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazylo)etanosulfonowy (ang. <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>),
IP₃R	receptor trójfosfoinozytolu (ang. <i>inositol trisphosphate receptor</i>),
LBD	domena wiążąca ligand (ang. <i>Ligand-Binding Domain</i>),
LDH	dehydrogenaza mleczanowa (ang. <i>lactate dehydrogenase</i>),
LTD	długotrwałe osłabienie synaptyczne (ang. <i>Long-Term Depression</i>),
LTP	długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. <i>Long-Term Potentiation</i>),
M1	współczynnik kolokalizacji Mandersa 1 (ang. <i>Manders' co-localization coefficient 1</i>),
MAP2	białko związane z mikrotubulami 2 (ang. <i>Microtubule-Associated Protein 2</i>),

NGS	normalna surowica kozia (<i>ang. Normal Goat Serum</i>),
NMDA	kwasy N-metylo-D-asparaginowy (<i>ang. N-Methyl-D-Aspartic acid</i>),
NTD	domena N-końcowa (<i>ang. N-Terminal Domain</i>),
PBS	sól fizjologiczna buforowana fosforanem (<i>ang. Phosphate-Buffered Saline</i>),
PDL	poli-D-lizyna (<i>ang. Poly-D-Lysine</i>),
PFA	paraformaldehyd (<i>ang. paraformaldehyde</i>),
PMCA	pompa wapniowa błony komórkowej (<i>ang. Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase</i>)
PSD95	białko zagęszczenia postsynaptycznego o masie 95 kDa (<i>ang. postsynaptic density protein, 95 kDa</i>),
PSD93	białko zagęszczenia postsynaptycznego o masie 93 kDa (<i>ang. postsynaptic density protein, 93 kDa</i>),
RyR	receptor rianodynowy (<i>ang. ryanodine receptor</i>),
SAP97	białko o masie 97 kDa związane z synapsami (<i>ang. Synapse Associated Protein, 97 kDa</i>),
SAP102	białko o masie 102 kDa związane z synapsami (<i>ang. Synapse Associated Protein, 102 kDa</i>),
scrRNA	RNA z sekwencją niehomologiczną do żadnego z poznanych genów (<i>ang. scrambled RNA</i>),
SDS	dodecylosiarczan sodu (<i>ang. Sodium Dodecyl Sulfate</i>),
shRNA	krótkie RNA o strukturze „spinki do włosów” (<i>ang. short hairpin RNA</i>),
SERCA	pompa wapniowa siateczki śródplazmatycznej, sarkoplazmatyczna ATP-aza wapniowa siateczki śródplazmatycznej (<i>ang. Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase</i>),
SNARE	grupa białek należących do rodziny białek transbłonowych, biorąca udział w rozpoznawaniu i fuzji pęcherzyków z błoną komórkową (<i>ang. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>),
SOAR	region białek STIM aktywujący białko Orai (<i>ang. Stim-Orai Activating Region</i>),
SOC	kanał SOC, kanał pojemnościowo-zależny, (<i>ang. Store-Operated Channel</i>),
SOCE	pojemnościowy napływ Ca ²⁺ (<i>ang. Store-Operated Calcium Entry</i>),
STIM	sensor Ca ²⁺ w siateczce śródplazmatycznej (<i>ang. STromal Interaction Molecule</i>),
TBST	sól fizjologiczna buforowana Tris o pH = 7,4 z dodatkiem Tween20 (<i>ang. Tris-Buffered Saline with 0.1% Tween20</i>),

TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (ang. <i>N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine</i>),
TMB	3,3',5,5'-tetrametylobenzydina (ang. <i>3,3',5,5'-tetramethyl benzidine</i>),
TMD	domena transbłonowa (ang. <i>transmembrane domain</i>),
Tris	tris(hydroksymetylo)aminometan (ang. <i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>),
TRPC	kanal jonowy z rodziny receptorów przejściowego potencjału (ang. <i>Transient Receptor Potential Channel</i>),
TTX	tetrodotoksyna (ang. <i>tetrodotoxin</i>),
VGCC	kanal wapniowy bramkowany napięciem (ang. <i>Voltage-Gated Calcium Channel</i>),

Streszczenie

Zgodnie z hipotezą ekscytotoksyczności, nadmierne uwalnianie glutaminianu do szczeliny synaptycznej i upośledzenie mechanizmów odpowiedzialnych za jego usuwanie skutkuje nagromadzeniem tego neuroprzekaźnika w synapsach i prowadzi do nadmiernej aktywacji jonotropowych receptorów glutaminianergicznych (głównie NMDAR) oraz niekontrolowanego napływu jonów wapnia (Ca^{2+}) do komórki. W efekcie dochodzi do zaburzeń transdukcji wapniowych sygnałów komórkowych, zmian w fosforylacji białek i ekspresji genów. Zmiany te z kolei prowadzą do degradacji neuronów i przyczyniają się do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona i Huntingtona. Obecnie postuluje się, że zwiększenie endocytozy nadmiernie aktywowanych NMDAR może ograniczać napływ Ca^{2+} do komórki i działać neuroprotekcynie. W związku z tym przypuszcza się, że białka regulujące endocytozę nadmiernie aktywowanych NMDAR mogłyby w przyszłości stanowić nowy potencjalny punkt uchwytu leków stosowanych w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych.

Przykładem białek, które mogłyby potencjalnie regulować endocytozę NMDAR, są pełniące funkcję sensorów Ca^{2+} w siateczce śródplazmatycznej, białka STIM. Wyniki ostatnich badań pokazały bowiem, że białka STIM oddziałują w sposób bezpośredni z NMDAR i mogą ograniczać napływ Ca^{2+} przez te receptory. Dlatego też celem niniejszej rozprawy doktorskiej była weryfikacja hipotezy badawczej, która zakładała, że białka STIM biorą udział w procesie endocytozy NMDAR. Do weryfikacji tej hipotezy zastosowano model pierwotnej hodowli neuronów kory mózgu szczura *in vitro*. W badaniach skupiono się na NMDAR, które wykazują najwyższy poziom ekspresji w tym obszarze mózgu szczura, czyli na receptorach zbudowanych z GluN1 i GluN2A (GluN2A-NMDAR) i z GluN1 i GluN2B (GluN2B-NMDAR).

Z zebranych danych eksperymentalnych wynika, że na skutek krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR dochodzi do: (i) obniżenia immunoreaktywności GluN1, GluN2A i GluN2B w błonie komórkowej i synaptosomach, (ii) zwiększenia kolokalizacji GluN1, GluN2A i GluN2B z białkiem markerowym wczesnych endosomów (EEA1) oraz (iii) zmniejszenia amplitudy całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR. Oznacza to, że krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR prowadzi do endocytozy GluN2A-NMDAR i GluN2B-NMDAR. Ponadto wykazano, że STIM2, w odróżnieniu od STIM1, kolokalizuje i ulega koimmunoprecypitacji z GluN2A i GluN2B, co świadczy o występowaniu

bezpośrednich oddziaływań STIM2 z NMDAR. Co ważniejsze, oddziaływania STIM2-GluN2B zwiększały się w warunkach endocytozy NMDAR.

Ponieważ białka STIM mogą ograniczać napływ Ca^{2+} przez NMDAR a oddziaływania STIM2 z NMDAR zwiększają się w warunkach endocytozy tego receptora, w drugiej części pracy badano wpływ wyciszenia ekspresji genów *Stim1* i *Stim2* na ten proces. W pierwszej kolejności dowiedziono, że obniżenie poziomu białek STIM nie wpływa na immunoreaktywność GluN1, GluN2A i GluN2B w komórkach. Następnie pokazano, że podobnie jak w przypadku neuronów typu dzikiego, krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR w neuronach po transdukcji wirusem kontrolnym (scrRNA) wydaje się obniżać immunoreaktywność GluN1, GluN2A i GluN2B w błonie komórkowej i w synaptosomach oraz powoduje obniżenie amplitudy całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR. Wyciszenie ekspresji genu *Stim1*, podobnie jak wprowadzenie scrRNA, nie wpływało na immunoreaktywność GluN1, GluN2A, GluN2B w błonie komórkowej i w synaptosomach, ani na amplitudę całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR. Natomiast po wyciszeniu ekspresji genu *Stim2* i krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR nie obserwowano: (i) obniżenia immunoreaktywności GluN1, GluN2A, GluN2B w błonie komórkowej i w synaptosomach ani (ii) obniżenia amplitudy całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR, jak to miało miejsce w neuronach typu dzikiego. Wyniki te mogą świadczyć, że STIM2, w przeciwieństwie do STIM1, może regulować endocytozę GluN2A-NMDAR i GluN2B-NMDAR.

Podsumowując, wyniki przedstawione w ramach niniejszej pracy pokazują nową, dotychczas niezidentyfikowaną rolę białka STIM2, jaką jest regulacja endocytozy NMDAR po krótkotrwałej, silnej aktywacji tego receptora. Ze względu na to, że nadmierna aktywacja NMDAR prowadzi do neurotoksyczności i neurodegeneracji a endocytoza NMDAR może mieć działanie ochronne dla komórek nerwowych, prowadzenie dalszych badań w tym zakresie może przyczynić się w przyszłości do opracowania terapii neuroprotektoryjnych dla pacjentów dotkniętych chorobami neurodegeneracyjnymi.

Summary

According to the excitotoxicity concept, excessive glutamate release and impairment of the mechanisms responsible for its removal result in the accumulation of this neurotransmitter in synapses, leading to excessive activation of ionotropic glutamatergic receptors (mainly NMDAR) and an uncontrolled influx of calcium ions (Ca^{2+}) into the cell. This in turn disrupts Ca^{2+} signalling, changes protein phosphorylation and gene expression, which leads to the degradation of neurons and contributes to the development of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases. Consequently, it is currently postulated that stimulation of the NMDAR endocytosis may reduce Ca^{2+} influx into the cell and thus have a neuroprotective effect on neurons. Therefore, it seems that proteins that regulate NMDAR endocytosis could constitute a new potential target for drugs used in the treatment of neurodegenerative diseases in the future.

An example of proteins that could potentially regulate NMDAR endocytosis are STIMs, which act as Ca^{2+} sensors in the endoplasmic reticulum. Recent research has shown that STIM proteins directly bind with NMDARs and can reduce NMDAR-mediated Ca^{2+} influx. Therefore, this dissertation aimed to verify a research hypothesis regarding the role of STIM proteins in NMDAR endocytosis. The experiments were conducted on primary rat cortical neurons *in vitro*. The research was focused on the most abundant NMDARs in this area of the rat brain, i.e., receptors composed of GluN1 and GluN2A (GluN2A-NMDAR) and GluN1 and GluN2B (GluN2B-NMDAR).

The experimental data collected during the study show that short-term, NMDAR overactivation (i) decreases the immunoreactivity of GluN1, GluN2A and GluN2B in the plasma membrane and synaptosomes, (ii) increases the colocalization of GluN1, GluN2A, and GluN2B with the marker of early endosomes (EEA1) and (iii) reduces the amplitude of NMDAR-mediated currents. This means that short-term, NMDAR overactivation leads to endocytosis of GluN2A-NMDAR and GluN2B-NMDAR. Moreover, it was shown that, unlike STIM1, STIM2 colocalizes and coimmunoprecipitates with GluN2A and GluN2B, which indicates direct interactions of STIM2 with NMDAR. More importantly, STIM2-GluN2B interactions increased after NMDAR endocytosis.

Since STIM proteins reduce NMDAR-mediated Ca^{2+} influx and the interactions between STIM2 and NMDAR increase after receptor endocytosis, the second part of the study examined the impact of *Stim1* and *Stim2* silencing on this process.

Firstly, it was shown that the reduction of STIM protein level does not affect the immunoreactivity of GluN1, GluN2A, and GluN2B in cell lysates. Then it was revealed that, as in wild-type neurons, short-term, NMDAR overactivation in neurons transduced with a control virus (scrRNA) seems to reduce the immunoreactivity of GluN1, GluN2A, and GluN2B in the plasma membrane and synaptosomes and causes a decrease in the amplitude of NMDAR-mediated current. *Stim1* silencing, similar to scrRNA transduction, did not affect the immunoreactivity of GluN1, GluN2A, and GluN2B in the plasma membrane and synaptosomes or the amplitude of the NMDAR-mediated current. However, *Stim2* silencing and short-term, NMDAR overactivation (i) did not decrease GluN1, GluN2A, and GluN2B immunoreactivity in the plasma membrane and synaptosomes and (ii) did not decrease the amplitude of the NMDAR-mediated current. These results may indicate that STIM2, but not STIM1, can regulate GluN2A-NMDAR and GluN2B-NMDAR endocytosis.

To sum up, the results presented in this study show a new, previously unidentified role of the STIM2 protein, which is the regulation of NMDAR endocytosis after short-term, overactivation of this receptor. Since excessive NMDAR activation leads to neurotoxicity and neurodegeneration, the stimulation of NMDAR endocytosis may have a neuroprotective effect. Thus, further research in this area may contribute to the development of neuroprotective therapies for patients suffering from neurodegenerative diseases in the future.

Innowacyjność rozprawy

Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy zbadania wpływu białek STIM, sensorów Ca^{2+} w siateczce śródplazmatycznej, na endocytozę NMDAR w warunkach krótkotrwałego, silnego pobudzenia tych receptorów w modelu pierwotnej hodowli neuronów kory mózgu szczura *in vitro*. Jej oryginalność i nowatorstwo wynikają z przedstawienia danych doświadczalnych na poparcie hipotezy badawczej zakładającej występowanie zależności pomiędzy białkiem STIM2 (ale nie STIM1) a procesem endocytozy NMDAR. Przedstawione badania prezentują nową, dotychczas niezdefiniowaną funkcję białka STIM2 jako jednego z kluczowych białek regulujących proces endocytozy NMDAR wywołany krótkotrwałą, silną aktywacją tych receptorów.

W poniższej rozprawie po raz pierwszy pokazano, że:

- Bezpośrednie oddziaływania STIM2 z NMDAR zwiększają się w warunkach endocytozy NMDAR wywołanej ich krótkotrwałą, silną aktywacją. STIM1 nie oddziałuje z NMDAR w sposób bezpośredni.
- Obniżenie ekspresji genów *Stim1* i *Stim2* nie wpływa na immunoreaktywność NMDAR w lizatach komórkowych, synaptosomach ani błonie komórkowej.
- Skutkiem obniżenia ekspresji genu *Stim2* jest zahamowanie procesu endocytozy NMDAR. Obniżenie ekspresji genu *Stim1* nie wpływa na proces endocytozy NMDAR.

Niniejsza rozprawa poszerza wiedzę na temat białka STIM2, wykazując jego nową rolę, jaką jest regulacja procesu endocytozy NMDAR po krótkotrwałym, silnym pobudzeniu tych receptorów. Liczne doniesienia naukowe dowodzą, iż nadmierna aktywacja NMDAR prowadzi do neurotoksyczności i neurodegeneracji a endocytoza NMDAR może mieć znaczenie ochronne dla komórek nerwowych. Dlatego prowadzenie dalszych badań w tym zakresie może w przyszłości mieć znaczenie dla poszukiwania nowych terapii neuroprotektoryjnych dla pacjentów dotkniętych chorobami neurodegeneracyjnymi.

1 Wstęp

1.1 Mechanizmy regulujące stężenie jonów wapnia w komórkach nerwowych

Jony wapnia (Ca^{2+}) jako wtórny przekaźnik sygnałów komórkowych regulują liczne procesy zachodzące w komórkach eukariotycznych [Brini i wsp., 2014]. Dlatego też ich stężenie oraz przepływ pomiędzy organellami komórkowymi są ściśle kontrolowane.

W neuronach spoczynkowych stężenie Ca^{2+} w cytoplazmie jest utrzymywane na niskim poziomie i wynosi około 100 nM. W siateczce śródplazmatycznej (*ang. Endoplasmic Reticulum, ER*), będącej głównym wewnątrzkomórkowym magazynem Ca^{2+} , stężenie tych jonów może sięgać setek mikromoli (250 - 600 μM) [Clapham, 2007]. Natomiast w przestrzeni zewnątrzkomórkowej ich stężenie mieści się w przedziale od 1 do 2 mM [Clapham, 2007]. Tak duży gradient stężeń utrzymywany jest przez transport aktywny Ca^{2+} z cytoplazmy, zachodzący z udziałem zlokalizowanych w błonach biologicznych pomp wapniowych oraz wymiennika sodowo-wapniowego (*ang. Sodium-Calcium Exchanger, NCX*; Rycina 1). Błonowe pompy wapniowe transportują Ca^{2+} z cytoplazmy wykorzystując energię pochodzącą z hydrolizy adenozylo trójfosforanu (*ang. adenosine triphosphate, ATP*). Wyróżniamy wśród nich pompę wapniową błony komórkowej (*ang. Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase, PMCA*), która transportuje Ca^{2+} do przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz pompę wapniową siateczki śródplazmatycznej (*ang. Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA*), której funkcją jest transport Ca^{2+} do ER [Clapham, 2007]. Pompy te różnią się wydajnością transportu Ca^{2+} . Dla pompy PMCA stosunek ATP/ Ca^{2+} wynosi 1:1, natomiast dla pompy SERCA 1:2. NCX transportuje Na^+ na wymianę z Ca^{2+} w stosunku 3:1 wykorzystując gradient elektrochemiczny jonów Na^+ [Laude i Simpson, 2009; Brini i wsp., 2014].

W wyniku pobudzenia neuronów dochodzi do uwolnienia glutaminianu do szczeliny synaptycznej, czego rezultatem jest zwiększony napływ Ca^{2+} do cytoplazmy zarówno z przestrzeni zewnątrzkomórkowej, jak i z ER. Lokalnie stężenie Ca^{2+} w cytoplazmie wzrasta około dziesięciokrotnie do stężenia około 1-2 μM , natomiast w ER maleje do 100 μM [Laude i Simpson, 2009]. Jony wapnia napływają do komórki nerwowej głównie przez znajdujące się w błonie komórkowej kanały wapniowe bramkowane napięciem (*ang. Voltage-Gated Calcium Channels, VGCC*) i receptory jonotropowe, takie jak receptory dla kwasu N-metylo-D-asparaginowego (*ang. N-Methyl-D-Aspartate Receptor, NMDAR*) oraz receptory dla kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego (*ang. α -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole Propionic Acid Receptor, AMPAR*; Rycina 1), [Wojda i wsp., 2008]. Skutkiem

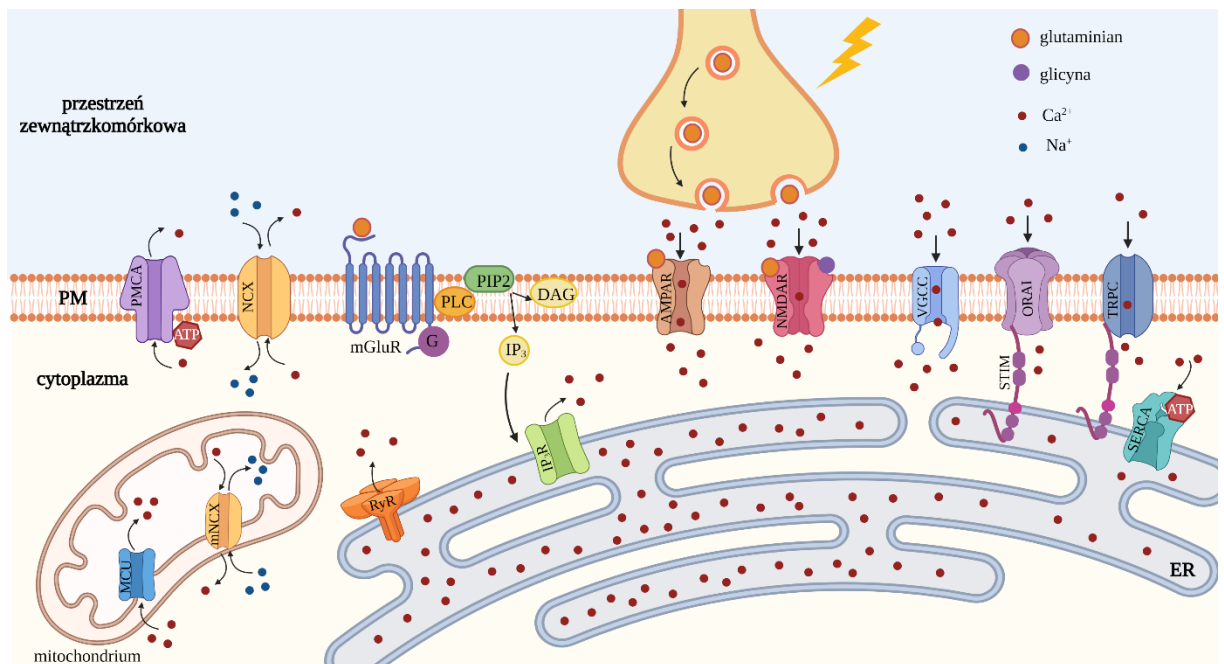
działania glutaminianu jest również aktywacja metabotropowych receptorów glutaminianergicznych (*ang. metabotropic Glutamate Receptors*, mGluRs), co prowadzi do przekazania sygnału poprzez białko G na fosfolipazę C (*ang. Phospholipase C*, PLC). Enzym ten katalizuje reakcję hydrolizy fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (*ang. phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*, PIP₂), w wyniku której powstają wtórne przekaźniki informacji, takie jak inozytolo-1,4,5-trójfosforan (*ang. inositol trisphosphate*, IP₃) oraz 1,2-diacylglicerol (*ang. diacylglycerol*, DAG). Powstałe cząsteczki IP₃ wiążą się ze znajdującymi się w błonie ER receptorami IP₃ (IP₃R), aktywując je oraz powodując uwalnianie Ca²⁺ z ER do cytoplazmy [Szumilo i Rahden-Staron, 2008]. Jony wapnia mogą być transportowane z ER również przez receptory rianodynowe (*ang. ryanodine receptors*, RyRs). Głównym czynnikiem aktywującym ten wpływ jest podwyższone stężenie Ca²⁺ w cytoplazmie a mechanizm ten zwany jest uwalnianiem Ca²⁺ indukowanym przez Ca²⁺ (*ang. Ca²⁺-Induced Ca²⁺ Release*, CICR) [Wojda i wsp., 2008; Brini i wsp., 2014].

Poza ER, jony wapnia magazynowane są również w mitochondriach, aparacie Golgiego oraz jądrze komórkowym [Brini i wsp., 2014]. Mitochondria są drugim po ER najważniejszym magazynem tych jonów. Transport Ca²⁺ z cytoplazmy do macierzy mitochondrialnej odbywa się przy pomocy mitochondrialnego uniportera wapniowego (*ang. Mitochondrial Calcium Uniporter*, MCU), natomiast w przeciwnym kierunku przez mitochondrialny wymiennik sodowo-wapniowy (*ang. mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger*, mNCX) [Baughman i wsp., 2011; De Stefani i wsp., 2011; Palty i wsp., 2010]. Chociaż mitochondria magazynują niewielkie ilości Ca²⁺ (0,2 μM) w neuronach spoczynkowych, stają się bardzo wydajnymi magazynami w czasie aktywacji komórki (1 μM). Transport ten odbywa się zgodnie z gradientem elektrochemicznym [Laude i Simpson, 2009]. Natomiast zwiększone stężenie Ca²⁺ w macierzy mitochondrialnej aktywuje cykl Krebsa i syntezę ATP niezbędnego do aktywnego transportu Ca²⁺ poza cytoplazmę przez pompy PMCA oraz SERCA [Brini i wsp., 2014].

Znajdujące się w cytoplazmie jony wapnia regulują wiele procesów komórkowych, w tym aktywność kinaz i fosfataz białkowych, wśród których wyróżniamy m.in. rodzinę kinaz białkowych C (*ang. protein kinase C*, PKC), kinazę białkową II regulowaną przez jony wapnia i kalmodulinę (*ang. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II*, CaMKII) oraz regulowaną przez Ca²⁺ i kalmodulinę fosfatazę – kalcyneurynę. Zwiększenie stężenia Ca²⁺ w cytoplazmie skutkuje zmienioną fosforylacją białek, wywołując określoną odpowiedź metaboliczną

komórki. Na przykład zwiększony napływ Ca^{2+} do neuronów powoduje zwiększone uwalnianie neurotransmiterów do szczeliny synaptycznej w procesie zależnym od białek SNARE (*ang. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) [Baranska, 1993]. Jony wapnia odgrywają podwójną rolę w tym procesie. Napływając z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do zakończeń aksonalnych w czasie depolaryzacji błony komórkowej, aktywują VGCC. Natomiast dodatkowo zwiększone stężenie Ca^{2+} w zakończeniach aksonalnych umożliwia przyłączenie Ca^{2+} do znajdującej się na powierzchni pęcherzyków synaptycznych synaptotagminy i jej oddziaływania z synaptobrewiną oraz SNAP-25 (*ang. synaptosome-associated protein, 25 kDa*). Oddziaływania te pozwalają na fuzję pęcherzyków synaptycznych z błoną presynaptyczną i uwolnienie neurotransmitera do szczeliny synaptycznej [Brini i wsp., 2014]. Inne procesy regulowane przez Ca^{2+} w komórkach nerwowych to długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (*ang. Long-Term Potentiation, LTP*) oraz długotrwałe osłabienie synaptyczne (*ang. Long-Term Depression, LTD*), które stanowią formy plastyczności synaptycznej leżące u podstaw uczenia się i pamięci (omówione szerzej w podrozdziale 1.3.4 oraz [Serwach i Gruszczynska-Biegala, 2019]). Jony wapnia regulują również transkrypcję genów. Podczas pobudzenia komórki nerwowej, aktywują one bowiem czynnik transkrypcyjny CREB (*ang. cAMP response element-binding protein*), który następnie wiąże się z białkiem CBP (*ang. CREB Binding Protein*) w obrębie promotora i reguluje ekspresję podległych mu genów [Hardingham i wsp., 2001; Brini i wsp., 2014]. Aktywność czynnika transkrypcyjnego CREB w neuronach koreluje z różnymi procesami wewnątrzkomórkowymi, w tym neurogenezą, proliferacją, różnicowaniem, przeżyciem, neuroprotekcją oraz plastycznością synaptyczną [Alberini, 2009].

Wpływ Ca^{2+} z ER do cytoplazmy w czasie aktywacji neuronów skutkuje znacznym obniżeniem ich stężenia w ER. Obniżony poziom Ca^{2+} w ER uzupełniany jest przez kanały aktywowane wyrzutem Ca^{2+} (*ang. Calcium Release-Activated Channels, CRAC*) oraz kanały jonowe z rodziny receptorów przejściowego potencjału (*ang. Transient Receptor Potential Channel, TRPC*) w procesie pojemnościowego napływu jonów wapnia (*ang. Store-Operated Calcium Entry, SOCE*), w którym uczestniczą białka STIM (*ang. STromal Interaction Molecules, STIMs*) [Brini i wsp., 2014; Wegierski i Kuznicki, 2018; Serwach i Gruszczynska-Biegala, 2020].



Rycina 1. Najważniejsze białka i cząsteczki odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy Ca^{2+} w neuronach. Zastosowane skróty: PM – błona komórkowa, PMCA – pompa wapniowa błony komórkowej, ATP – adenozylo trójfosforan, NCX – wymiennik sodowo-wapniowy, mNCX – mitochondrialny wymiennik sodowo-wapniowy, MCU – mitochondrialny uniporter wapniowy, RyR – receptor rianodynowy, mGluR – metabotropowy receptor glutaminianergiczny, G – białko G, PLC – fosfolipaza C, PIP2 – fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan, DAG – diacyloglicerol, IP₃ – inozytolo-1,4,5-trójfosforan, IP₃R – receptor IP₃, AMPAR – receptor AMPA, NMDAR – receptor NMDA, VGCC – kanał wapniowy bramkowany napięciem, ORAI – białko tworzące kanał CRAC, STIM – białko STIM, TRPC – kanał TRPC, SERCA – pompa wapniowa siateczki śródplazmatycznej, ER – siateczka śródplazmatyczna, Ca^{2+} – jony wapnia, Na^{+} – jony sodu. Udział jądra komórkowego oraz aparatu Golgiego został pominięty. Rysunek własny.

1.2 Pojemnościowy napływ jonów wapnia i białka STIM

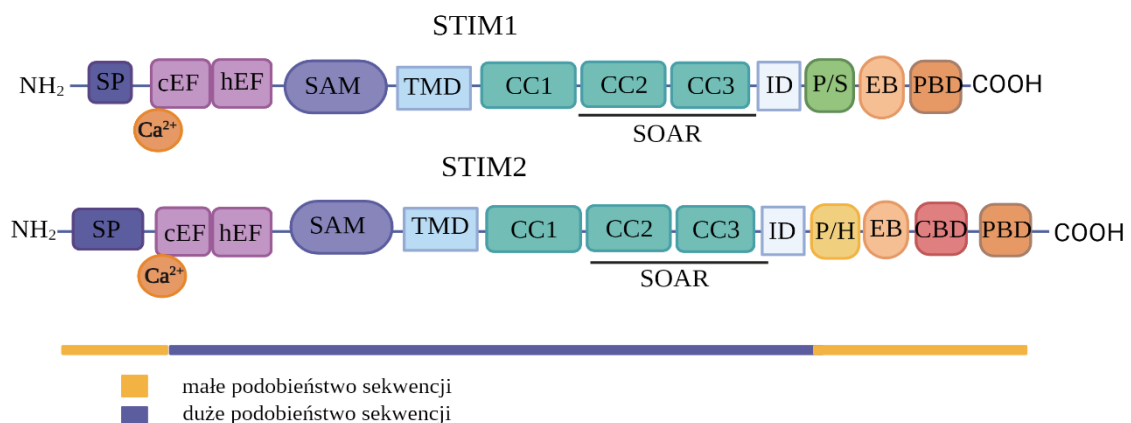
Białka STIM są sensorami Ca^{2+} o wysoce zachowanej filogenetycznie strukturze. Po raz pierwszy zostały zidentyfikowane w 2005 roku w komórkach niepobudliwych przez dwa niezależne zespoły badawcze [Liou i wsp., 2005; Roos i wsp., 2005]. Obecnie wiadomo, że występują również w komórkach pobudliwych takich jak komórki mięśnia sercowego [Nguyen i wsp., 2013] oraz komórki nerwowe [Klejman i wsp., 2009; Gruszczynska-Biegała i wsp., 2011; Samtleben i wsp., 2015; Hartmann i wsp., 2014].

1.2.1 Budowa białek STIM

Zbudowane z 685 aminokwasów białko STIM1 należy do białek transbłonowych i występuje głównie w błonie ER (90%), ale także w błonie komórkowej (10%) [Keil i wsp., 2010; Soboloff i wsp., 2012]. Białkiem homologicznym do STIM1 jest STIM2, które zbudowane jest z 833 aminokwasów [Roos i wsp., 2005; Lopez i wsp., 2012] i w przeciwieństwie do STIM1 jego obecność wykazano jedynie w ER [Soboloff i wsp., 2006]. Oba białka charakteryzuje wysoki stopień podobieństwa sekwencji wynoszący ponad 65% oraz analogiczna budowa (Rycina 2). Białka STIM zbudowane są z trzech domen: domeny zlokalizowanej w ER, domeny transbłonowej (*ang. transmembrane domain*, TMD) oraz domeny cytoplazmatycznej [Soboloff i wsp., 2012; Moccia i wsp., 2015]. Część znajdująca się w ER zawiera kanoniczną domenę wiążącą Ca^{2+} (*ang. cEF-hand*, cEF), domenę niekanoniczną (*ang. hidden EF-hand*, hEF), która stabilizuje domenę cEF i nie wiąże jonów wapnia oraz motyw SAM (*ang. Sterile Alpha Motif*, SAM), który posiada jedno (STIM2) lub dwa (STIM1) miejsca N-glikozylacji i uczestniczy w oddziaływaniach białko-białko. Znajdujący się w domenie N-końcowej peptyd sygnałowy (*ang. Signal Peptide*, SP), który odcinany jest w czasie translacji, jest dłuższy u STIM2. Domena cytoplazmatyczna zbudowana jest z trzech regionów coiled-coil (CC1, CC2 i CC3), wśród których znajduje się miejsce oddziaływania z białkiem Orai (*ang. Stim-Orai Activating Region*, SOAR), domeny dezaktywującej (*ang. Inhibitory Domain*, ID), domeny bogatej w prolinę i serynę (*ang. Proline-Serine rich domain*, P/S; u STIM1) lub domeny bogatej w prolinę i histydyne (*ang. Proline-Histidine rich domain*, P/H; u STIM2), domeny wiążącej białko EB1 (*ang. EB1 binding domain*, EB) i domeny bogatej w lizynę (*ang. polybasic domain*, PBD), odpowiedzialnej za oddziaływanie z fosfolipidami błony komórkowej [Soboloff i wsp., 2012; Prakriya i Lewis, 2015; Fahrner i wsp., 2020; Collins i wsp., 2022]. Dodatkowo w białku STIM2, w przeciwieństwie do STIM1, w domenie C-

końcowej wyróżnia się domenę wiążącą kalmodulinę (*ang. Calmodulin Binding Domain, CBD*) [Collins i wsp., 2022].

Regiony białek STIM, które wykazują największą homologię, obejmują motyw SAM, domenę EF-hand oraz regiony CC1-CC3. Największe różnice strukturalne pomiędzy białkami STIM występują natomiast w obszarze C-końcowym domeny cytoplazmatycznej, która ma kluczowe znaczenie w przemieszczaniu się białek STIM do połączeń ER z błoną komórkową (*ang. ER-PM junctions*) i aktywacji SOCE [Williams i wsp., 2001; Stathopoulos i wsp., 2009]. Dodatkowo kinetyka oligomeryzacji domen EF-hand-SAM w STIM2 jest ponad 70 razy wolniejsza, co przekłada się na wolniejszą kinetykę otwarcia kanałów SOC (*ang. Store-Operated Channels, SOCs*) [Soboloff i wsp., 2012; Kraft, 2015]. Ponadto stała dysocjacji Ca^{2+} dla STIM2 ma wartość dwukrotnie większą niż dla STIM1 i wynosi około 500 μM [Kraft, 2015]. Dlatego też STIM2 jest bardziej czuły na mniejsze zmiany stężenia Ca^{2+} w ER.



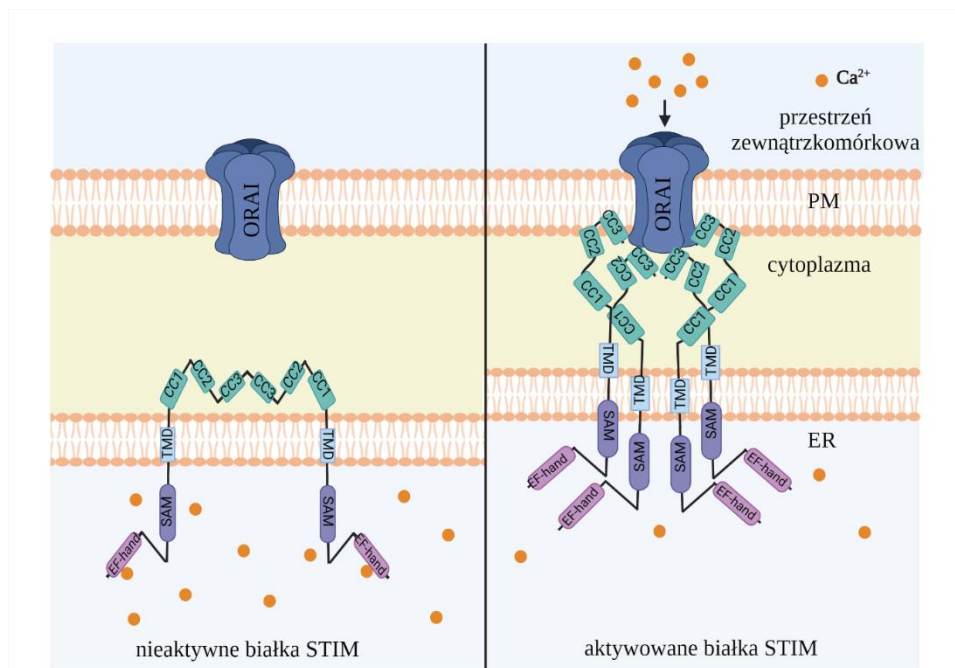
Rycina 2. Budowa białek STIM. Liniowa architektura domenowa białek STIM z uwzględnieniem podobieństwa sekwencji tych białek. Zastosowane skróty: SP – peptyd sygnałowy (usuwany podczas translacji), cEF – domena wiążąca Ca^{2+} , hEF – domena niewiążąca Ca^{2+} , SAM – motyw SAM, TMD – domena transbłonowa, CC1-CC3 – regiony coiled-coil, SOAR – region aktywujący białko Orai, ID – domena dezaktywująca, P/S – region bogaty w prolinę i serynę, P/H – region bogaty w prolinę i histydynę, EB – domena wiążąca EB1, PBD – domena bogata w lizynę, CBD – domena wiążąca kalmodulinę. Rysunek własny.

1.2.2 Pojemnościowy napływ jonów wapnia

Gdy stężenie Ca^{2+} w ER utrzymywane jest na wysokim poziomie, białka STIM tworzą dimery, co uniemożliwia aktywację białka Orai przez region SOAR [Gudlur i wsp., 2018]. W wyniku obniżenia stężenia Ca^{2+} w ER dochodzi do zmian konformacyjnych domeny EF-

hand, motywu SAM oraz regionu SOAR. Białka STIM oligomeryzują i przemieszczają się wraz z ER do miejsc kontaktu z błoną komórkową, w których znajdują się kanały CRAC oraz TRPC. Kanały CRAC zbudowane z sześciu cząsteczek białka Orai1 są selektywne dla Ca^{2+} , natomiast kanały TRPC to nieselektywne kanały kationowe [Hou i wsp., 2012; Liou i wsp., 2007; Baba i wsp., 2006; Smyth i wsp., 2005]. Zarówno CRAC, jak i TRPC należą do kanałów SOC. Skutkiem oddziaływania białek STIM z tymi kanałami jest napływ Ca^{2+} z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do cytoplazmy a w konsekwencji uzupełnienie poziomu Ca^{2+} w ER z udziałem pompy SERCA [Majewski i Kuznicki, 2015]. Mechanizm SOCE został przedstawiony na Rycinie 3.

Rola obu białek STIM w neuronalnym SOCE jest różna [Stathopoulos i wsp., 2009]. Wykazano bowiem, że STIM1 uczestniczy w uzupełnianiu poziomu Ca^{2+} w ER poprzez aktywację SOCE dopiero po znacznym obniżeniu stężenia tych jonów w ER ($< 250 \mu\text{M}$), co następuje po aktywacji komórek nerwowych. Natomiast STIM2 utrzymuje spoczynkowy poziom Ca^{2+} w ER poprzez aktywację SOCE po niewielkim obniżeniu stężenia Ca^{2+} w ER ($< 500 \mu\text{M}$), [Brandman i wsp., 2007; Gruszczynska-Biegala i wsp., 2011, Gruszczynska-Biegala i Kuznicki; 2013].



Rycina 3. Mechanizm SOCE. Do aktywacji białek STIM dochodzi wskutek obniżenia stężenia Ca^{2+} w ER. Aktywowane białka STIM tworzą kompleksy z białkami Orai, w rezultacie dochodzi do napływu Ca^{2+} z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do komórki oraz uzupełnienia poziomu Ca^{2+} w ER. Zastosowane skróty: EF-hand – domena wiążąca Ca^{2+} , SAM – motyw SAM, TMD – domena transbłonowa, CC1-CC3 – regiony coiled-coil, Orai – białko tworzące kanał CRAC, PM – błona komórkowa, ER – siateczka śródplazmatyczna. Rysunek własny.

1.2.3 Występowanie białek STIM w ośrodkowym układzie nerwowym

Obecność białek STIM została udowodniona zarówno w mysim, szczurzym, jak i ludzkim ośrodkowym układzie nerwowym. Poziom ekspresji genów kodujących te białka oraz co za tym idzie immunoreaktywność białek STIM, jest różna w poszczególnych strukturach mózgu [Moccia i wsp., 2015]. U myszy najwyższy poziom ekspresji genu *Stim1* występuje w mózdzku, gdzie gen *Stim2* ulega ekspresji na podobnym poziomie [Hartmann i wsp., 2014; Klejman i wsp., 2009; Skibinska-Kijek i wsp., 2009]. Podobny poziom ekspresji genów kodujących białka STIM występuje również w korze mózgu, wzgórzu oraz ciele migdałowatym [Skibińska-Kijek i wsp., 2009; Hartman i wsp., 2014]. Natomiast w hipokampie poziom ekspresji genu *Stim2* jest wyższy w porównaniu do *Stim1*, stąd STIM2 jest dominującym homologiem w tej strukturze [Kraft, 2015; Skibinska-Kijek i wsp., 2009; Berna-Erro i wsp., 2009]. U szczurów, poziom ekspresji genu *Stim2* jest dwukrotnie wyższy w stosunku do *Stim1*, zarówno w korze mózgu, jak i w hipokampie [Gruszczynska-Biegala i wsp., 2011]. W ludzkim mózgu geny *STIM1* oraz *STIM2* są eksprymowane na podobnym poziomie, przy czym najwyższy poziom ekspresji występuje w korze mózgu oraz hipokampie [Steinbeck i wsp., 2011]. Liczne badania wykazały, że geny kodujące białka STIM ulegają ekspresji w mysich i szczurzych komórkach glejowych, takich jak astrocyty, mikroglej, komórki progenitorowe oligodendrocytów oraz komórki nowotworowe o pochodzeniu astrocytarnym [Kettenmann i Bruce, 2013; Verkhatsky i Parpura, 2014; Kraft, 2015; Molnár i wsp., 2016]. Chociaż oba geny kodujące białka STIM ulegają ekspresji w astrocytach, uważa się, że STIM1 jest bardziej rozpowszechnionym homologiem w tych komórkach. Badania pokazały również podobny poziom mRNA *Stim1* w astrocytach i neuronach kory mózgu szczura [Gruszczynska-Biegala i wsp., 2011].

1.2.4 Rola SOCE i białek STIM w fizjologii komórek układu nerwowego

Białka STIM i aktywowany przez nie proces SOCE odgrywają istotną rolę w fizjologii komórek układu nerwowego. SOCE uczestniczy w regulacji spontanicznego uwalniania neuroprzekaźników do szczeliny synaptycznej [Emptage i wsp., 2001], transmisji synaptycznej [Baba i wsp., 2003; Hartmann i wsp., 2014], dojrzewaniu i stabilizacji grzybkowatych kolców dendrytycznych [Sun i wsp., 2014; Kraft, 2015; Garcia-Alvarez i wsp., 2015; Yap i wsp., 2017], utrzymaniu odpowiedniego stężenia Ca^{2+} w ER w neuronach [Moccia i wsp., 2015], regulacji ekspresji genów oraz proliferacji neuralnych komórek progenitorowych [Lalonde i wsp., 2014; Somasundaram i wsp., 2014; Gopurapilly i wsp., 2018].

W ostatnich latach wykazano, że neuronalne białka STIM mogą regulować napływ Ca^{2+} nie tylko przez kanały CRAC i TRPC, lecz również przez inne kanały i receptory zlokalizowane w błonie komórkowej (co opisano szerzej w [Serwach i Gruszczynska-Biegała, 2020]). Dwie grupy badawcze równolegle pokazały, że białko STIM1 bezpośrednio oddziałuje z kanałami VGCC typu L. Skutkiem tego oddziaływania jest zmniejszenie częstotliwości otwierania tych kanałów podczas depolaryzacji oraz zwiększenie ich internalizacji a w konsekwencji obniżenie napływu Ca^{2+} do komórki [Wang i wsp., 2010; Park i wsp., 2010]. Obecnie uważa się, że zmniejszenie aktywności VGCC oraz aktywacja SOCE w czasie silnego pobudzenia neuronów ma dwojakie znaczenie: aktywuje zależne od SOCE LTP (omówione szerzej w podrozdziale 1.3.4 i [Serwach i Gruszczynska-Biegała, 2019]) oraz hamuje nadmierny napływ Ca^{2+} do komórek nerwowych [Moccia i wsp., 2015]. Badania Dittmera i współpracowników pokazały, że hamowanie aktywności VGCC przez STIM1 stabilizuje grzybkowate kolce dendrytyczne [Dittmer i wsp., 2017]. Natomiast badania innej grupy dowiodły, że w komórkach linii SH-SY5Y (neuroblastoma) z wyciszoną ekspresją genu *Stim1*, dochodzi do niekontrolowanego napływu Ca^{2+} przez VGCC typu L, prowadzącego do śmierci komórek [Pascual-Caro i wsp., 2018]. Co więcej, w innej pracy pokazano, że kompleksy STIM1-TRPC1 hamując napływ Ca^{2+} przez VGCC zwiększają przeżywalność neuronów dopaminergicznych istoty czarnej narażonych na działanie neurotoksyn [Sun i wsp., 2014]. STIM1 jest również niezbędny w regulowanej przez receptory metabotropowe transmisji synaptycznej w komórkach Purkiniego mózdzku, przez co może uczestniczyć w regulacji funkcji motorycznych [Hartmann i wsp., 2014]. Z kolei STIM2 może bezpośrednio oddziaływać z AMPAR, zwiększać napływ Ca^{2+} przez te receptory oraz regulować ich ilość na błonie komórkowej poprzez wpływ na procesy endocytozy i egzocytozy [Garcia-Alvarez i wsp., 2015; Gruszczynska-Biegała i wsp., 2016]. Co więcej, Yap i współpracownicy wykazali, że STIM2 nasila transport AMPAR w kierunku błony komórkowej podczas LTP oraz przyspiesza dojrzewanie kolców dendrytycznych [Yap i wsp., 2017]. Zgodnie z tym, w neuronach hipokampalnych z wyciszoną ekspresją genu *Stim2* obserwowano zmniejszoną gęstość i rozmiar główki kolców dendrytycznych [Garcia-Alvarez i wsp., 2015]. Istnieją również doniesienia świadczące o występowaniu zależności funkcjonalnych pomiędzy NMDAR, SOCE i białkami STIM. Pobudzenie NMDAR w neuronach piramidowych hipokampa prowadzi bowiem do uwalniania IP_3 , który poprzez oddziaływanie ze swoim receptorem zwiększa uwolnienia Ca^{2+} z ER i aktywuje SOCE [Baba i wsp., 2003]. Ponadto wyniki ostatnich badań pokazały, że białka STIM mogą w bezpośredni sposób oddziaływać z NMDAR i ograniczać napływ Ca^{2+} przez te

receptory, jednak mechanizm tego działania nie został jeszcze w pełni poznany [Gruszczynska-Biegala i wsp., 2020].

1.3 NMDAR

NMDAR to jonotropowe receptory glutaminianergiczne przepuszczalne dla jonów: Ca^{2+} , Na^+ i K^+ , które do aktywacji wymagają zarówno depolaryzacji błony komórkowej, jak i przyłączenia glicyny lub D-seryny oraz glutaminianu lub NMDA [Traynelis i wsp., 2010]. W neuronach spoczynkowych kanał jonowy NMDAR blokowany jest przez jony Mg^{2+} .

1.3.1 Budowa NMDAR

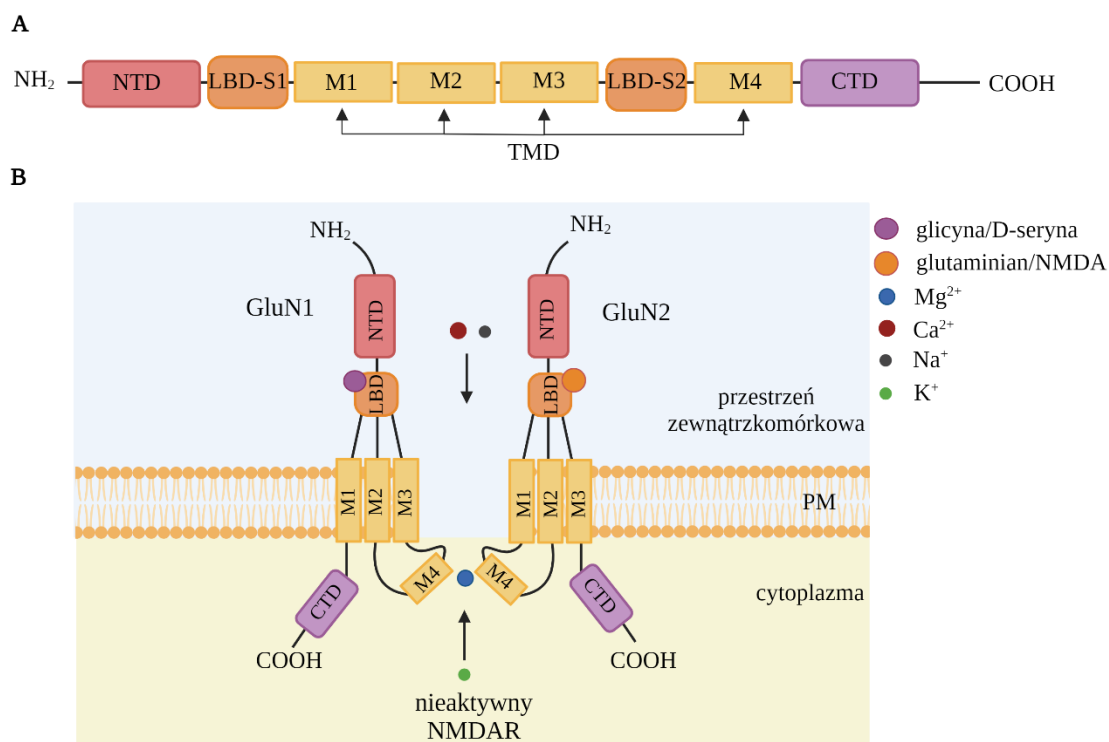
Funkcjonalne NMDAR to tetramery zbudowane z dwóch obligatoryjnych podjednostek GluN1 z miejscem wiązania glicyny/D-seryny i dwóch podjednostek GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D) wiążących glutaminian/NMDA lub dwóch podjednostek GluN3 (GluN3A, GluN3B) wiążących glicynę/D-serynę. Endogenne NMDAR mogą występować jako diheteromery, składające się z dwóch podjednostek GluN1 i dwóch identycznych podjednostek GluN2/GluN3 lub triheteromery, zbudowane z dwóch podjednostek GluN1 oraz dwóch różnych podjednostek GluN2 lub jednej podjednostki GluN2 i jednej podjednostki GluN3. Skład podjednostkowy NMDAR nadaje mu właściwości biofizyczne i farmakologiczne oraz specyficzną przepuszczalność dla Ca^{2+} . Dotychczasowe badania skupiały się głównie na receptorach zbudowanych z GluN1 i GluN2, natomiast wiedza na temat receptorów zawierających GluN1 i GluN3 jest ograniczona [Traynelis i wsp., 2010; Paoletti i wsp., 2013]. Wielkość poszczególnych podjednostek NMDAR u człowieka przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wielkość [aa] podjednostek NMDAR u człowieka [Traynelis i wsp., 2010].

Podjednostka NMDAR	Liczba aminokwasów [aa]
GluN1	938
GluN2A	1464
GluN2B	1484
GluN2C	1233
GluN2D	1336
GluN3A	1115
GluN3B	1043

Każda z podjednostek NMDAR zbudowana jest z zewnątrzkomórkowej domeny N-końcowej (*ang. N-Terminal Domain, NTD*), domeny wiążącej ligand (*ang. Ligand-Binding Domain, LBD*), domeny transbłonowej tworzącej kanał (*ang. Transmembrane domain, TMD*) oraz wewnątrzkomórkowej domeny C-końcowej (*ang. C-Terminal Domain, CTD*), (Rycina 4). Domena NTD jest miejscem wiązania ligandów allosterycznych, czyli małowiązących związków, które nie aktywują receptora, lecz modulują jego odpowiedź na endogenny ligand. Domena LBD zawiera miejsce wiązania endogennego liganda. W jej skład wchodzi dwa segmenty (S1 i S2). Domena TMD składa się z czterech hydrofobowych segmentów (M1-M4), spośród których segment M2 tworzy kanał jonowy receptora, który w receptorach nieaktywnych blokowany jest przez Mg^{2+} . Domena CTD odgrywa znaczącą rolę w transporcie oraz stabilizacji receptora w synapsach. Zawiera ona bowiem miejsce oddziaływań białko-białko, które wiąże się z białkami odpowiedzialnymi za transport, stabilizację w zagęszczeniach postsynaptycznych oraz przekazywanie sygnałów [Sanz-Clemente i wsp., 2013]. Domena ta charakteryzuje się również najmniejszym podobieństwem sekwencji spośród podjednostek GluN2 [Traynelis i wsp., 2010; Strehlow i wsp., 2015]. Schemat budowy NMDAR z uwzględnieniem struktury podjednostki został przedstawiony na Rycinie 4.

Podobnie jak w przypadku białek STIM, sekwencja aminokwasowa podjednostek NMDAR jest wysoce konserwatywna. Podobieństwo sekwencji pomiędzy podjednostkami NMDAR człowieka i szczura wynosi: 99,3% dla GluN1, 95,3% dla GluN2A, 98,5% dla GluN2B, 87,1% dla GluN2C i 95,6% dla GluN2D [Hedegaard i wsp., 2012]. Najwięcej różnic pomiędzy ortologami człowieka i szczura występuje w domenie NTD oraz CTD, natomiast najmniej w domenie LBD oraz TMD, co świadczy o tym, że kluczowe zmiany konformacyjne, zachodzące po przyłączeniu endogennego liganda są wysoce konserwatywne [Hedegaard i wsp., 2012].



Rycina 4. Schemat budowy NMDAR z uwzględnieniem struktury podjednostek GluN1 i GluN2. (A) Liniowa architektura domenowa wspólna dla wszystkich podjednostek NMDAR. (B) Schemat budowy NMDAR. Zastosowane skróty: NTD – domena N-końcowa, LBD – domena wiążąca ligand endogenny, S1, S2 – segmenty S1 i S2, TMD – domena transbłonowa, M1-M4 – hydrofobowe segmenty M1-M4, CTD – domena C-końcowa, PM – błona komórkowa. Rysunek własny.

1.3.2 Występowanie NMDAR w ośrodkowym układzie nerwowym

U szczurów gen kodujący GluN1 (*Grin1*) ulega ekspresji w całym mózgu, we wszystkich stadiach rozwojowych, natomiast ekspresja genów kodujących podjednostki GluN2 (*Grin2*) różni się w zależności od obszaru mózgu i stopnia dojrzałości neuronów [Cull-Candy i Leszkiewicz, 2004; Monyer i wsp., 1994]. W momencie narodzin poziom ekspresji genu *Grin2A* jest niski w całym mózgu, wzrasta natomiast w trakcie rozwoju i utrzymuje się na wysokim poziomie u osobników dorosłych. Gen *Grin2B* ulega silnej ekspresji w całym mózgu, począwszy od życia płodowego do narodzin i wraz z rozwojem jego ekspresja pozostaje na wysokim poziomie, ale ogranicza się głównie do przodomózgowia. Tak więc wraz z rozwojem w strukturach takich, jak kora mózgu i hipokamp ekspresja genu *Grin2B* maleje, natomiast *Grin2A* wzrasta, tak że u osobników dorosłych GluN2A staje się podjednostką dominującą [Sheng i wsp., 1994]. Ekspresja *Grin2C* rozpoczyna się dopiero dwa tygodnie po narodzinach i ogranicza się głównie do mózdzku i opuszki węchowej. Dlatego też podobne zmiany rozwojowe jak w przypadku GluN2A i GluN2B zachodzą również w komórkach ziarnistych

mózdzku, gdzie wraz z rozwojem ekspresja genu *Grin2B* maleje, a *Grin2C* wzrasta. Gen *Grin2D*, podobnie jak *Grin2B*, ulega ekspresji już w życiu płodowym, jednak po urodzeniu jego ekspresja znacznie maleje i ogranicza się do międzymózgowia i śródmózgowia [Monyer i wsp., 1994; Sanz-Clemente i wsp., 2013]. Ponieważ GluN2A-NMDAR oraz GluN2B-NMDAR to najbardziej rozpowszechnione NMDAR w korze mózgu i hipokampie [Cull-Candy i Leszkiewicz, 2004], dalsze rozważania skupiają się głównie na tych receptorach.

Chociaż początkowo sądzono, że NMDAR występują jedynie w komórkach nerwowych, już w latach 90. XX wieku ich obecność wykazano w nieneuronalnych komórkach ośrodkowego układu nerwowego takich jak komórki glejowe [Muller i wsp., 1993; Wang i wsp., 1996; Sharp i wsp., 2003] oraz komórki śródbłonna naczyń mózgowych [Krizbai i wsp., 1998; Sharp i wsp., 2003]. Późniejsze badania potwierdziły występowanie funkcjonalnych NMDAR w hodowlanych astrocytach myszy i szczura [Lalo i wsp., 2006; Skowronska i wsp. 2019(2)]. Nie mniej przyjmuje się, że astrocytarne NMDAR zbudowane są głównie z dwóch podjednostek GluN1, jednej podjednostki GluN2C/D i jednej podjednostki GluN3 [Palygin i wsp., 2011].

1.3.3 Biosynteza i transport NMDAR

1.3.3.1 Biosynteza

Do biosyntezy NMDAR dochodzi głównie w ER w ciele komórkowym neuronu. Jedynie całkowicie złożone receptory są transportowane poza ER [McIlhinney i wsp., 1998]. GluN1 posiada bowiem dobrze scharakteryzowane motywy retencyjne KKK i RRR zlokalizowane w domenie CTD, które utrzymują je w ER do momentu złożenia tetrameru [Standley i wsp., 2000; Scott i wsp., 2001; Horak i wsp., 2008; Horak i Wenthold, 2009]. Sygnały retencyjne dla podjednostek GluN2 nie zostały do tej pory zidentyfikowane. GluN2 w ER oddziałuje z białkami z rodziny MAGUK (*ang. membrane-associated guanylate kinase*), takimi jak białko o masie 102 kDa związane z synapsami (*ang. Synapse Associated Protein, 102 kDa, SAP102*) oraz białko o masie 97 kDa związane z synapsami (*ang. Synapse Associated Protein, 97 kDa, SAP97*) [Sans i wsp. 2003, 2005]. Do tych kompleksów dołączane są białka Sec8 i mPins.[Sans i wsp. 2000, 2003].

1.3.3.2 Modyfikacje potranslacyjne i transport wzdłuż mikrotubul

NMDAR ulegają modyfikacjom potranslacyjnym w wyniku szeregu procesów glikozylacji zachodzących w somatycznym aparacie Golgiego, po czym są pakowane do pęcherzyków i transportowane po mikrotubulach wzdłuż dendrytów [Ramirez i Couve, 2011] (Rycina 5). W transporcie tym uczestniczą białka motoryczne takie jak kinezyiny (*ang. kinesins*, KIF) [Horak i wsp., 2014; Guillaud i wsp., 2003] lub dyneiny oraz kompleks białek SAP102-Sec8-mPins. Poza główną drogą transportu NMDAR wyróżniamy również dwie ścieżki niekanoniczne, w których omijany jest somatyczny aparat Golgiego. W pierwszej z nich NMDAR są transportowane z somatycznej do dendrytycznej ER a stamtąd do dendrytycznego aparatu Golgiego [Jeyifous i wsp., 2009; Grieve i Rabouille, 2011]. Jest to główny sposób transportu GluN2A-NMDAR [Zhang i wsp., 2015] a nagromadzenie tych receptorów w dendrytycznej ER pozwala na ich szybsze dostarczanie do synapsy podczas pobudzenia neuronu. W drugim alternatywnym szlaku transportu NMDAR (głównie GluN2B-NMDAR) są transportowane z somatycznej ER do dendrytycznego aparatu Golgiego w pęcherzykach, przez białka motoryczne, wzdłuż mikrotubul [Jeyifous i wsp., 2009]. Powstałe w tym szlaku pęcherzyki zawierają m.in. SAP97 i kinazę białkową fosforylującą reszty seryny regulowaną przez jony wapnia i kalmodulinę (*ang. Ca²⁺/calmodulin-dependent serine kinase*, CASK), które łączą GluN2B-NMDAR z białkiem motorycznym KIF17 [Jeyifous i wsp., 2009]. Pęcherzyki te charakteryzują się największą mobilnością.

1.3.3.3 Egzocytoza i dyfuzja boczna

NMDAR ulegają egzocytozie do błony komórkowej w obszarach pozasynaptycznych [Gu i Huganir, 2016] a w procesie tym uczestniczą białka SNARE. Fuzja pęcherzyka z błoną komórkową następuje w wyniku oddziaływań v-SNARE (*ang. vesicular SNARE*) – VAMP (*ang. Vesicle-Associated Membrane Protein*) znajdującego się w błonie pęcherzyka i białek t-SNARE (*ang. target SNARE*) – syntaksyny i białka SNAP-25 zlokalizowanych po wewnętrznej stronie błony komórkowej [Sudhof i Rothman, 2009]. Utworzone kompleksy białek v- i t-SNARE są miejscem wiązania innych białek biorących udział w fuzji błon.

Kolejnym etapem transportu NMDAR jest dyfuzja boczna z obszaru pozasynaptycznego do synapsy [Tovar i Westbrook, 2002], w której receptory wiązane są przez białka zagęszczeń postsynaptycznych należące do rodziny MAGUK [Ladepêche i wsp., 2014]. Zaliczamy do nich: białko zagęszczenia postsynaptycznego o masie 95 kDa (*ang. postsynaptic*

density protein, 95 kDa, PSD95), białko zagęszczenia postsynaptycznego o masie 93 kDa (*ang. postsynaptic density protein, 93 kDa, PSD93*), SAP102 oraz SAP97 [Kornau i wsp., 1995; Niethammer i wsp., 1996; Muller i wsp., 1996; Muller i wsp., 1995; Kim i wsp., 1996; Brenman i wsp., 1996]. SAP102 wykazuje największe powinowactwo do GluN2B-NMDAR, a poziom ekspresji kodującego je genu jest najwyższy we wczesnych etapach rozwoju. W niedojrzałych synapsach dominują zatem kompleksy SAP102-GluN2B [Sans i wsp., 2000; Elias i wsp., 2008]. W miarę dojrzewania synapsy zwiększa się ekspresja genu kodującego PSD95, które łączy się głównie z GluN2A-NMDAR. Dlatego też w dojrzałych synapsach przeważają kompleksy PSD95-GluN2A [Barria i Malinow, 2002]. Do zmiany tej dochodzi w wielu obszarach mózgu, takich jak kora mózgu, hipokamp, ciało migdałowe oraz mózdzek [Viera i wsp., 2020].

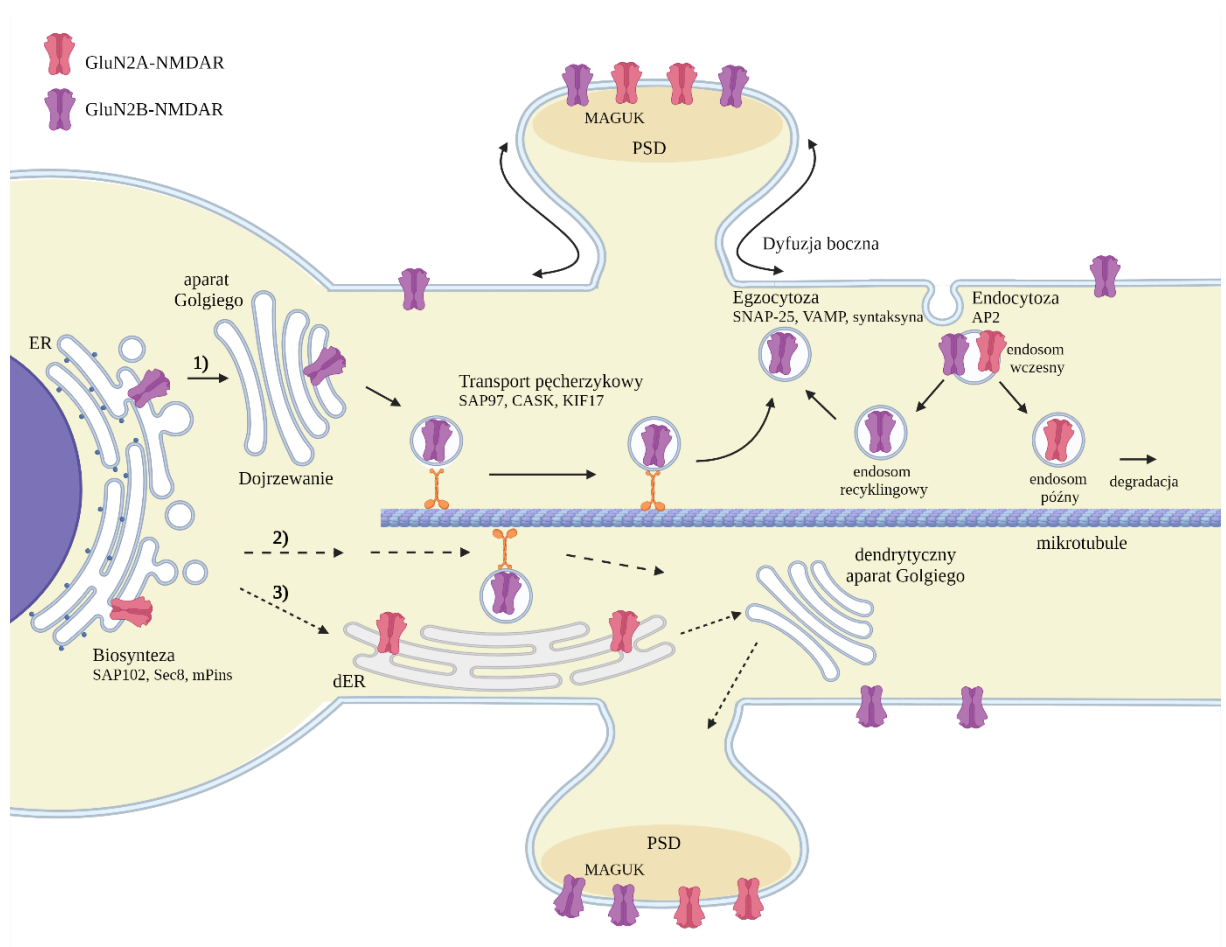
1.3.3.4 Endocytoza NMDAR

NMDAR zlokalizowane w błonie komórkowej ulegają konstytutywnej endocytozie w mechanizmie zależnym od klatryny [Petralia i wsp., 2003; Blanpied i wsp., 2002] lub w alternatywnym mechanizmie niezależnym od klatryny [Horak i wsp., 2014]. NMDAR trafiają do endosomów wczesnych, a następnie do endosomów recyklingowych, skąd wracają do błony komórkowej albo przechodzą do endosomów późnych, a następnie do lizosomów, gdzie dochodzi do degradacji (Rycina 5). Białkiem markerowym wczesnych endosomów jest antygen wczesnych endosomów 1 (*ang. Early Endosome Antigen 1, EEA1*). Chociaż zarówno GluN2A-NMDAR, jak i GluN2B-NMDAR ulegają endocytozie do wczesnych endosomów, to receptory z GluN2A kierowane są następnie do endosomów późnych, a z GluN2B do endosomów recyklingowych [Lavezzari i wsp., 2004; Scott i wsp., 2004]. Stopień internalizacji jest zależny od dojrzałości neuronów oraz składu podjednostkowego NMDAR. Chociaż w neuronach niedojrzałych w ciągu 30 minut internalizowane jest nawet 22% NMDAR, odsetek ten maleje wraz z wiekiem i w neuronach dojrzałych wynosi jedynie 5% [Roche i wsp., 2001]. Wynika to z faktu, że w neuronach niedojrzałych dominują GluN2B-NMDAR, które są bardziej mobilne w porównaniu do GluN2A-NMDAR [Groc i wsp., 2006; Dupuis i wsp., 2014; Ferreira i wsp., 2017; Kelleymayer i wsp., 2018] oraz mają większe powinowactwo do białka adaptorowego AP2, niezbędnego do zainicjowania endocytozy zależnej od klatryny [Lavezzari i wsp., 2004; Groc i wsp., 2006]. Dodatkowo wraz z rozwojem neuronów wzrasta również poziom białek PSD93, PSD95, SAP97, które stabilizują NMDAR w synapsach [Nong i wsp., 2004].

Poza endocytozą konstytutywną NMDAR ulegają również endocytozie regulowanej [Nong i wsp., 2004; Han i wsp., 2013], do której dochodzi zarówno w wyniku aktywacji receptorów innych niż NMDAR takich jak mGluR1 czy receptory nikotynowe $\alpha 7$ -nACh, jak i w rezultacie aktywacji NMDAR. Fakt, że NMDAR mogą ulegać endocytozie w odpowiedzi na działanie endogennych agonistów, został po raz pierwszy opisany przez Westbrook i współpracowników w 2001 roku [Vissel i wsp., 2001]. Autorzy ci wykazali, że w wyniku wielokrotnego podawania 1 mM glutaminianu i 100 μ M glicyny dochodzi do zależnej od klatryny endocytozy NMDAR [Vissel i wsp., 2001]. Wyniki te zostały potwierdzone w kolejnych badaniach pokazujących, że krótkotrwałe traktowanie neuronów korowych i hipokampalnych NMDA i glicyną w wysokich stężeniach prowadzi do endocytozy tych receptorów [Nong i wsp., 2003; Fang, 2011; Lopez-Menendez i wsp., 2019]. Dodatkowo wykazano, że zastosowanie glicyny lub D-seryny przed podaniem NMDA i glicyny sprzyja endocytozie NMDAR [Nong i wsp., 2003; Han i wsp., 2013; Cappelli i wsp., 2022]. Aminokwasy te odgrywają bowiem istotną rolę w aktywacji zależnej od klatryny endocytozy NMDAR. Przyłączenie glicyny lub D-seryny w miejscu A714, znajdującym się w domenie wiążącej ligand endogennej w szczurzym GluN1, prowadzi do zmian konformacyjnych w segmentach S1 i S2. W nieaktywnych NMDAR segmenty te są od siebie oddalone, natomiast przyłączenie glicyny lub D-seryny stabilizuje konformację, w której S1 i S2 znajdują się blisko siebie. Następnie po przyłączeniu glutaminianu lub NMDA do domeny wiążącej ligand endogennej w GluN2, dochodzi do kaskady zmian konformacyjnych, których efektem jest otwarcie kanału jonowego NMDAR, przyłączenie białka adaptorowego AP2 do miejsca znajdującego się na C-końcu receptora oraz endocytoza NMDAR [Han i wsp., 2013]. Przyłączenie tylko jednego z agonistów NMDAR jest niewystarczające ani do otwarcia kanału, ani do aktywacji endocytozy receptora [Nong i wsp., 2003; Nong i wsp., 2004; Han i wsp., 2013]. Dlatego też endocytoza NMDAR może być blokowana farmakologicznie przez kompetencyjnych antagonistów miejsca wiążącego glicynę takich jak MDL29951 czy L689560 [Nong i wsp., 2003]. Zmiany konformacyjne NMDAR po przyłączeniu tych cząsteczek uniemożliwiają bowiem przyłączenie białka adaptorowego AP2 do receptora i zainicjowanie procesu endocytozy [Han i wsp., 2013].

Pula synaptycznych NMDAR jest wypadkową procesów biosyntezy, transportu wzdłuż dendrytu, egzocytozy, dyfuzji bocznej, endocytozy, recyklingu oraz degradacji. Natomiast

proces endocytozy jest jednym z głównych mechanizmów regulujących ilość receptorów NMDAR w błonie komórkowej [Vieira i wsp., 2020].



Rycina 5. Transport NMDAR z ER do synapsy. 1) Kanoniczna droga transportu NMDAR. Tetramery są transportowane z ER do aparatu Golgiego, skąd przenoszone są wzdłuż dendrytów po mikrotubulach, przy pomocy białek motorycznych. NMDAR są wbudowywane do błony komórkowej w obszarach pozasynaptycznych (egzocytoza), a następnie transportowane do synapsy (dyfuzja boczna). Receptory są usuwane z błony komórkowej w mechanizmie endocytozy zależnej od klatryny. Następnie trafiają do endosomów wczesnych a później do endosomów recyklingowych (i z powrotem do błony komórkowej) lub do endosomów późnych i lizosomów (w celu dalszej degradacji). 2) Niekanoniczna droga transportu NMDAR. Receptory transportowane są z ER wzdłuż dendrytów po mikrotubulach, przy pomocy białek motorycznych. Następnie trafiają do dendrytycznego aparatu Golgiego i do synapsy. 3) Niekanoniczna droga transportu NMDAR. Receptory są przenoszone z somatycznej do dendrytycznej ER, a następnie do dendrytycznego aparatu Golgiego, skąd trafiają do synapsy. Zastosowane skróty: PSD – zagęszczenia postsynaptyczne, MAGUK – białka MAGUK (np. PSD95, SAP102, PSD93, SAP97), ER – siateczka śródplazmatyczna, dER – dendrytyczna siateczka śródplazmatyczna, AP2 – białko adaptorowe AP2. Rysunek własny, na podstawie [Vieira i wsp. 2020] i [Ishchenko i wsp. 2021].

1.3.4 Rola NMDAR w fizjologii komórek układu nerwowego

NMDAR odgrywają istotną rolę w aktywności i plastyczności synaptycznej oraz procesach uczenia się i zapamiętywania. W wyniku pobudzenia komórki nerwowej dochodzi do uwolnienia glutaminianu z zakończeń synaptycznych do szczeliny synaptycznej. Glutaminian przyłącza się do zlokalizowanych w błonie postsynaptycznej AMPAR, aktywując je i powodując napływ Na^+ do komórki. W ten sposób dochodzi do powstania postsynaptycznego potencjału pobudzającego (*ang. excitatory postsynaptic current, EPSC*), którego skutkiem jest depolaryzacja postsynaptycznej błony komórkowej oraz pobudzenie NMDAR [Nicoll i Roche, 2013]. Efektem tego pobudzenia jest napływ Ca^{2+} do komórki i aktywacja licznych kaskad sygnałowych, w tym CaMKII. W wyniku aktywacji CaMKII dochodzi do reorganizacji struktury molekularnej zagęszczeń postsynaptycznych [Lisman i wsp., 2012], której rezultatem jest zwiększenie objętości kolców dendrytycznych oraz zwiększenie ilości AMPAR w błonie komórkowej. Proces ten nazywany jest LTP, a jego efektem jest zwiększenie wydajności przewodzenia synaptycznego. Przeciwnościem tego procesu jest LTD. Zarówno LTP, jak i LTD stanowią formy plastyczności synaptycznej leżące u podstaw uczenia się i pamięci [Debanne i wsp., 2003]. Oba procesy zostały omówione szerzej w pracy przeglądowej [Serwach i Gruszczynska-Biegala, 2019].

Chociaż aktywacja NMDAR ma kluczowe znaczenie w fizjologii komórek układu nerwowego, to nadmierne, długotrwałe pobudzenie tych receptorów ma działanie ekscytotoksyczne i prowadzi do rozwoju zaburzeń neurologicznych. Skutkiem nadmiernego uwalniania glutaminianu do szczeliny synaptycznej i upośledzenia mechanizmów odpowiedzialnych za jego usuwanie z synapsy jest nagromadzenie się tego neuroprzekaźnika w szczelinie synaptycznej. To z kolei prowadzi do nadmiernej aktywacji jonotropowych receptorów glutaminianergicznych (głównie NMDAR) i niekontrolowanego napływu Ca^{2+} do komórki. W rezultacie dochodzi do zaburzeń transdukcji wapniowych sygnałów komórkowych, co skutkuje zmianami fosforyzacji białek i ekspresji genów [Choi, 1987; Choi i wsp., 1987 (2)]. Zmiany te prowadzą do degradacji neuronów oraz odgrywają rolę w patogenezie zaburzeń neurologicznych, takich jak urazowe uszkodzenie mózgu, udar mózgu, padaczka, stwardnienie zanikowe boczne oraz chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona i Huntingtona [Choi, 1988; Lipton i Rosenberg, 1994; Fang, 2011; Serwach i Gruszczynska-Biegala, 2019].

Obecnie postuluje się, że zwiększenie endocytozy nadmiernie aktywowanych NMDAR może mieć działanie neuroprotekcyjne. Zmniejszenie ilości NMDAR w błonie komórkowej może bowiem obniżać napływ Ca^{2+} z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do cytoplazmy. A jak wiadomo, nadmierne stężenie Ca^{2+} w cytoplazmie jest jednym z czynników aktywujących apoptozę komórki [Choi, 1987; Choi i wsp., 1987 (2)]. Dlatego też poszukiwanie nowych białek, które mogą regulować endocytozę NMDAR, może mieć w przyszłości istotne znaczenie dla rozwoju wiedzy w zakresie nowych terapii neuroprotekcyjnych dla pacjentów dotkniętych chorobami neurodegeneracyjnymi. Jednymi z potencjalnych białek, które mogłyby regulować ten proces, są białka STIM. Wyniki ostatnich badań pokazały bowiem, że białka te mogą w bezpośredni sposób oddziaływać z NMDAR oraz zmniejszać napływ Ca^{2+} przez te receptory [Gruszczynska-Biegała i wsp., 2020].

Dlatego też, mając na uwadze powyższy stan wiedzy, w niniejszej rozprawie weryfikowano hipotezę, że **białka STIM w neuronach mogą wpływać na proces endocytozy NMDAR poprzez regulację transportu tych receptorów z błony komórkowej do endosomów wczesnych, a tym samym modulować amplitudę prądów jonowych płynących przez te receptory.**

2 Cel pracy

Nadrzędnym celem pracy było zbadanie udziału białek STIM w endocytozie NMDAR wywołanej krótkotrwałą, silną aktywacją tych receptorów w neuronach kory mózgu szczura *in vitro*.

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Zbadanie, czy w warunkach krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR dochodzi do endocytozy NMDAR poprzez:
 - a) oznaczenie immunoreaktywności GluN1, GluN2A, GluN2B w błonie komórkowej i synaptosomach,
 - b) analizę kolokalizacji GluN1, GluN2A, GluN2B z białkiem markerowym wczesnych endosomów (EEA1),
 - c) pomiar całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR.
2. Zbadanie oddziaływań białek STIM z NMDAR w warunkach endocytozy receptora poprzez:
 - a) analizę koimmunoprecypitacji białek STIM z GluN2A i GluN2B,
 - b) analizę kolokalizacji białek STIM z GluN2A i GluN2B.
3. Zbadanie wpływu wyciszenia ekspresji genów kodujących białka STIM na poziom NMDAR w komórce, błonie komórkowej i synaptosomach poprzez oznaczenie immunoreaktywności GluN1, GluN2A, GluN2B w neuronach transdukowanych wirusem kontrolnym (scrRNA) oraz wirusem wyciszającym ekspresję genów kodujących białka STIM1 lub STIM2.
4. Zbadanie czy i w jaki sposób białka STIM wpływają na proces endocytozy NMDAR w neuronach transdukowanych wirusem kontrolnym (scrRNA) oraz wirusem wyciszającym ekspresję genów kodujących białka STIM1 lub STIM2 poprzez:
 - a) oznaczenie immunoreaktywności GluN1, GluN2A, GluN2B w błonie komórkowej i synaptosomach,
 - b) pomiar całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR.

3 Materiały i metody

3.1 Odczynniki i roztwory

Tabela 2. Odczynniki i materiały stosowane w eksperymentach.

Produkt	Producent	Nr kat.
Agar	A&A Biotechnology	2025-250
Akrylamid	Sigma	A7168
Albumina surowicy bydlęcej (BSA), roztwór wzorcowy do oznaczenia stężenia białka	Thermo Scientific	23209
Albumina surowicy bydlęcej (BSA), do blokowania miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał	Sigma	A9418
Antybiotyki stosowane w hodowlach komórkowych (penicylina + streptomycyna)	Gibco	15140122
Antybiotyk stosowany w hodowlach bakteryjnych – Ampicylina	Sigma	A9518
Antybiotyk stosowany w hodowlach bakteryjnych – Chloramfenikol	A&A Biotechnology	2018-25
Antybiotyk stosowany w hodowlach bakteryjnych – Streptomycyna	Lab Empire	STP101.25
B-27 – suplement do hodowli neuronów	Gibco	17504044
BAPTA	Merck	14510
Białko G połączone z agarozą (Protein G-Agarose)	Roche	11243233001
Błękit bromofenolowy	Sigma	114391
β -merkaptoetanol	Sigma	M3148
Bufor Tris-Glicyna-SDS (10 x stężony)	VWR	0783
Chlorek magnezu sześciowodny ($MgCl_2 \cdot 6 H_2O$)	Stanlab	09/06/20
Chlorek potasu (KCl)	Stanlab	33/02/20
Chlorek sodu (NaCl)	Chempur	117941206
Chlorek wapnia ($CaCl_2$)	Sigma	C3306
CultureOne Supplement	Gibco	A3320201
CytoTox-ONE Homogenous Membrane Integrity Assay	Promega	G7890
Deoksyholan sodu (DOC)	Sigma	30970
DL-ditiotreitol (DTT)	Sigma	D9779
Dodecylosiarczan sodu (SDS)	Sigma	L3771
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; medium DMEM z 4 mM L-glutaminą, 4500 mg/L glukozą i pirogronianem sodu)	HyClone	SH30243.02
ECL Western Blotting Detection Reagent (Cytiva)	Amersham	RPN2109
ECL Select Western Blotting Detection Reagent (Cytiva)	Amersham	RPN2235

Etylowy alkohol bezwodny 99,8%	POCH BASIC	BA6480111
Filtry o średnicy 0,45 µm	VWR	514-0063
Fluorek cezu (CsF)	Sigma	20990
Fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF)	Merck	52332
Glicerol	Sigma	G5516
Glicyna	Sigma	G8898
Glukoza	Sigma	G6152
Glutamina	Gibco	25030-081
Glutaminian	Sigma	G1251
HEPES	Sigma	H4034
HEPES (1 M)	Gibco	15630-056
Hoechst 33342	Invitrogen	H3570
Inhibitory proteaz	Roche	05892791001
Izopropanol	Sigma	I9516
Koncentraty wirówkowe Vivaspin 100 kDa	Sartorius	VS2042
Kwas borny (H ₃ BO ₃)	Sigma	B6768-500g
Kwas N-metylo-D-asparaginowy (NMDA)	Alomone	N-170
Kwas siarkowy (VI) (H ₂ SO ₄)	Chempur	115749995
Laminina	Roche	11243217001
LB	A&A Biotechnology	2020-1000
Marker PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific	26616
MDL29951	Achemblock	O33884
Membrana nitrocelulozowa Amersham Protran Supported 0,45 µm (Cytiva)	Amersham	10600016
Metanol 99,8%	Linegal chemicals	50-1224
Nadsiarczan amonu (APS)	Sigma	A3678
Neurobasal	Gibco	21103-049
Normalna surowica kozia (NGS)	Sigma	S26
NP-40	Sigma	85124
Odczynnik Bradforda	Sigma	B6916
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma	P6148
Płodowa surowica bydlęca (FBS)	Sigma	F7524
Płytki 6-dołkowe pokrywane PDL	Corning	354413
Płytki 24-dołkowe pokrywane PDL	Corning	356414
Płytki 24-dołkowe	VWR	734-2325
Płytki 96-dołkowe do pomiaru fluorescencji	Thermo Fisher Scientific	237105
Płytki 96-dołkowe do pomiaru stężenia białka	VWR	734-2781PL
Poli-D-lizyna (PDL)	Sigma	P7280-5mg

Ponceau S	VWR	K793
ProLong™ Gold Antifade Mountant	Thermo Fisher Scientific	P36930
Roztwór soli Hanksa (HBSS)	Sigma	H4641
Sacharoza	Sigma	S7903
Saponina	Sigma	47036
Siarczan cezu (Cs_2SO_4)	Alfa Aesar	A16767.14
Siarczan sodu (Na_2SO_4)	Sigma	238597
Sól fizjologiczna buforowana fosforanem (PBS)	Sigma	P4417
Sól sodowa adenzynotrójfosforanu (Na_2ATP)	Sigma	A3377
Szalki o średnicy 9 cm, do zakładania hodowli pierwotnych	VWR	391-0604
Szalki o średnicy 10 cm, do hodowli komórek HEK 293T/17	VWR	734-2321
Szalki o średnicy 10 cm, pokrywane PDL (Cellware Biocoat Poly-D-Lysine, PDL)	Corning	356469
Szkiełka nakrywkowe o średnicy 13 mm	VWR	631-0149
TEMED	Sigma	T9281
Tetraboran sodu dziesięciowodny	Sigma	B3545-500g
Tetrodotoksyna (TTX)	Alomone	T-550
TMB (1-Step™ Turbo TMB-ELISA Substrate Solution)	Thermo Scientific	34022
Tris	Sigma	T1503
Tris-HCl	Sigma	T5941
Trypsyna	Gibco	15090-046
Tween 20	Sigma	P1379
Wodorofosforan sodu (Na_2HPO_4)	Applichem	A6292,0250
Zestaw do izolowania białek powierzchniowych (Cell Surface Protein Isolation Kit)	Abcam	ab206998
Zestaw do izolowania białek synaptosomalnych (Syn-PER™ Synaptic Protein Extraction Reagent)	Thermo Scientific	87793
Zestaw do izolowania i oczyszczania plazmidowego DNA	Qiagen	12163

Tabela 3. Skład roztworów, buforów, żeli i pożywek stosowanych w eksperymentach.

Nazwa	Skład
Pożywka do pierwotnych hodowli neuronów kory mózgu szczura (Neurobasal wzbogacony)	Neurobasal, 2% B27, 0,5 mM glutamina, 12,5 μ M glutaminian, 100 IU/ml penicylina G, 100 μ g/ml streptomycyna, 1% CultureOne Supplement
Pożywka do hodowli komórek HEK 293T/17 (DMEM wzbogacony)	DMEM z 4 mM L-glutaminą, 4500 mg/L glukozą i pirogronianem sodu, 10% FBS, 100 IU/ml penicylina G, 100 μ g/ml streptomycyna
Bufor do płukania neuronów podczas ich izolowania (HBSS wzbogacony)	HBSS, 11 mM HEPES, 100 IU/ml penicylina G, 100 μ g/ml streptomycyna
Bufor HEBS (2x stężony)	42 mM HEPES, 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 11 mM glukoza, 1,4 mM Na ₂ HPO ₄ , pH = 7,04
Bufor do stymulacji neuronów	10 mM HEPES, 1,3 mM CaCl ₂ , 110 mM Na ₂ SO ₄ , 5 mM Cs ₂ SO ₄ , 0,75 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM glukoza, pH = 7,4 \pm 50 μ M NMDA + 100 μ M glicyna
Bufor boranowy	0,04 M H ₃ BO ₃ , 0,01 M Na ₂ B ₄ O ₇ • 10 H ₂ O, pH = 8,5
Bufor do lizy	1% NP-40, 50 mM Tris (pH = 7,5), 150 mM NaCl, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 1 mM PMSF, inhibitory proteaz
Bufor Laemmliego (6x stężony)	350 mM Tris-HCl (pH = 6,8), 30% glicerol, 10% SDS, 9,3% DTT, 0,012% błękit bromofenolowy
Żel rozdzielający (10%)	0,4 M Tris pH = 8,8, 10% akrylamid, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED
Żel zagęszczający (4%)	0,125 M Tris pH = 6,8, 4% akrylamid, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED
Bufor do elektroforezy	0,025 M Tris, 0,192 M glicyna, 0,1% SDS
Bufor do elektrotransferu	25 mM Tris, 195 mM glicyna, 20% metanol, 0,1% SDS
Bufor TBST	50 mM Tris (pH = 7,5), 154 mM NaCl, 0,1% Tween20
Bufor do strippingu	62,5 mM Tris-HCl (pH = 6,8), 2% SDS, 100 mM β -merkaptioetanol
Whole cell patch-clamp:	
Roztwór wewnątrzkomórkowy	140 mM CsF, 5 mM BAPTA, 1 mM CaCl ₂ , 4 mM MgCl ₂ , 10 mM HEPES, 2 mM Na ₂ ATP, pH = 7,3
Roztwór zewnątrzkomórkowy	140 mM NaCl, 1,3 mM CaCl ₂ , 5 mM KCl, 25 mM HEPES, 33 mM glukoza, 500 nM TTX, pH = 7,35
Roztwór zewnątrzkomórkowy z glicyną	Roztwór zewnątrzkomórkowy + 100 μ M glicyna
Roztwór zewnątrzkomórkowy z MDL29951 i glicyną	Roztwór zewnątrzkomórkowy + 100 μ M glicyna + 5 μ M MDL29951
Roztwór zewnątrzkomórkowy z NMDA i glicyną	Roztwór zewnątrzkomórkowy + 50 μ M NMDA + 100 μ M glicyna

3.2 Model badawczy

Badania opisane w niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzone zostały w modelu *in vitro* na pierwotnych hodowlach neuronów kory mózgu szczura.

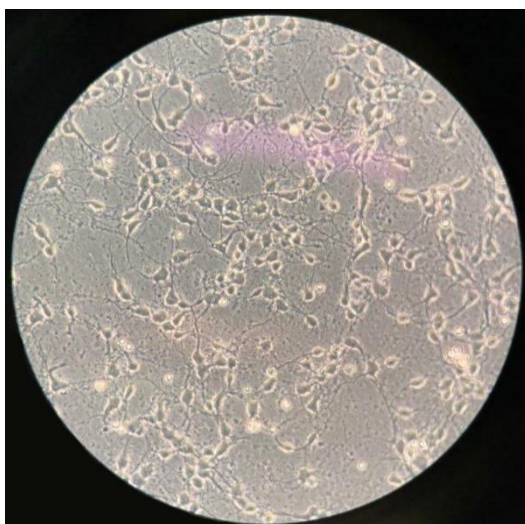
3.2.1 Pierwotna hodowla neuronów kory mózgu szczura

Do zakładania pierwotnych hodowli neuronów kory mózgu wykorzystywano 19-dniowe embriony szczurów szczepu Wistar. Ciężarne samice hodowano w zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej imienia M. Mossakowskiego PAN (IMDiK, PAN). Komórki pozyskiwano według metody opisanej w publikacji [Klejman i wsp., 2009]. Po dekapitacji embrionów izolowano mózgi, a następnie kory mózgu, które przenoszono do wzbogaconego buforu HBSS (Tabela 3). Tkankę trawiono 0,2% trypsyną przez 37 minut w temperaturze 37°C i rozdysocjowywano mechanicznie przez pipetowanie. Komórki zawieszano w pożywce Neurobasal wzbogaconej w 2% B27, 0,5 mM glutaminę, 12,5 µM glutaminian oraz antybiotyki (100 IU/ml penicylinę G i 100 µg/ml streptomycynę) i wysiewano zgodnie ze schematem przedstawionym w Tabeli 4. Hodowle prowadzono przez 10 dni w 37°C, w atmosferze 5% CO₂ i 95% powietrza, w inkubatorze Heracell™ 150i CO₂ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Tabela 4. Schemat wysiewania komórek w zależności od rodzaju eksperymentu.

Rodzaj eksperymentu	Gęstość	Naczynie hodowlane
Koimmunoprecypitacja Biotynylacja białek powierzchniowych	10×10^6 komórek/szalę	szalki o średnicy 10 cm pokrywane PDL
Izolowanie białek synaptosomalnych Przygotowanie lizatów komórkowych	$1,2 \times 10^6$ komórek/dołek	płytki 6-dołkowe pokrywane PDL
ELISA	$3,0 \times 10^5$ komórek/dołek	płytki 24-dołkowe pokrywane PDL
Barwienia immunofluorescencyjne Whole cell patch-clamp	$2,2 \times 10^5$ komórek/dołek	szkiełka nakrywkowe o średnicy 13 mm pokrywane PDL (37,5 µg/ml) i lamininą (1,25 µg/ml) w płytkach 24- dołkowych

W celu ograniczenia wzrostu komórek glejowych, trzeciego dnia hodowli, połowę pożywki wymieniano na pożywkę bez glutaminianu zawierającą inhibitor proliferacji komórek nieneuronalnych — CultureOne Supplement. Na podstawie barwień immunofluorescencyjnych białek markerowych neuronów i gleju (odpowiednio MAP2 oraz GFAP), przeprowadzonych w naszej pracowni, określono, że 90% komórek takiej hodowli stanowiły neurony [Wojtyniak i wsp., 2022].



Rycina 6. Przykładowa fotografia w świetle przechodzącym przedstawiająca morfologię pierwotnych hodowli neuronów kory mózgu szczura. Powiększenie 40x.

Pokrywanie szkiełek poli-D-lizyną i lamininą

Aby zwiększyć przyczepność i przeżywalność neuronów powierzchnię szkiełek używanych do pierwotnych hodowli powlekano związkiem syntetycznym zwiększającym adhezję komórek do podłoża – poli-D-lizyną (PDL) oraz białkiem macierzy zewnątrzkomórkowej – lamininą. Procedurę wykonywano w warunkach sterylnych z użyciem komory z laminarnym przepływem powietrza oraz sterylnych odczynników. Szkiełka nakrywkowe o średnicy 13 mm umieszczano w dołkach płytki 24-dołkowej, zalewano roztworem 37,5 $\mu\text{g/ml}$ PDL i 1,25 $\mu\text{g/ml}$ lamininy w buforze boranowym (Tabela 3) i powlekano przez noc w temperaturze pokojowej, bez dostępu do światła. Następnego dnia szkiełka płukano sterylną, ultraczystą wodą dejonizowaną (Milli-Q) i suszono. Płytki ze szkiełkami przechowywano w temperaturze 4°C, bez dostępu do światła do momentu użycia.

3.3 Hodowle bakteryjne

3.3.1 Przygotowanie bakterii kompetentnych

Do produkcji plazmidów wykorzystywano kompetentne bakterie *Escherichia coli* szczepu TOP 10F' (Invitrogen), które otrzymywano poprzez inkubację komórek w zimnym roztworze 100 mM CaCl₂, stosując procedurę zamieszczoną w podręczniku „Molecular Cloning” [Sambrook i wsp., 1989]. Zgodnie z tą procedurą, komórki były wysiewane na stałe podłoże LB (Tabela 6) z dodatkiem streptomycyny (Tabela 2) i inkubowane w 37°C przez noc. Drugiego dnia 10 ml płynnej pożywki LB z antybiotykiem zaszczipiano jedną kolonią bakteryjną i inkubowano przez noc w 37°C, wytrząsając 160 rpm. Trzeciego dnia 1 ml zawiesiny bakteryjnej dodawano do 100 ml płynnej pożywki LB z antybiotykiem i inkubowano w 37°C przez 3h do otrzymania wartości gęstości optycznej w przedziale 0,3-0,5. Następnie komórki inkubowano na lodzie przez 10 minut i wirowano 1300 x g, 10 minut w 4°C. Osad komórkowy zawieszano w schłodzonym, sterylnym 100 mM CaCl₂, inkubowano 30 minut na lodzie i ponownie odwirowywano w tych samych warunkach. Osad komórkowy zawieszano w 100 mM CaCl₂ z 15% glicerolem i zamrażano w ciekłym azocie.

3.3.2 Transformacja bakterii kompetentnych

Do przeprowadzenia transformacji bakterii kompetentnych stosowano metodę szoku termicznego. W tym celu 1 µl plazmidu o stężeniu 0,1-5 µg/µl dodawano do 35 µl bakterii i inkubowano przez 30 minut na lodzie, a następnie w bloku grzewczym ThermoStat™ C (Eppendorf, Hamburg, Niemcy) przez 1 minutę w 42°C i 5 minut na lodzie. Dodawano 1 ml płynnej pożywki LB i wytrząsano 200 rpm (60 minut, 37°C). Komórki wirowano 10 000 x g przez 3 minuty w temperaturze pokojowej, następnie zawieszano w części supernatantu i wysiewano na stałe podłoże LB z odpowiednim antybiotykiem (dla scrRNA, shStim1 i shStim2 – 34 µg/ml chloramfenikol, dla VSVG i Δ8.9 – 100 µg/ml ampicylina) i inkubowano w 37°C przez noc. Drugiego dnia 5 ml płynnej pożywki LB z antybiotykiem zaszczipiano jedną kolonią bakteryjną i wytrząsano z prędkością 160 rpm w 37°C przez 6 godzin. Po tym czasie zawiesinę bakteryjną dodawano do 500 ml płynnej pożywki LB z antybiotykiem i wytrząsano w 37°C przez noc. Trzeciego dnia zbierano osad bakteryjny, wirując 6000 x g, 15 minut w 4°C.

Tabela 5. Wektory lentiwirusowe.

Nazwa	Producent	Opis
shStim1	ORIGENE, TL707032	4 unikalne 29-merowe konstrukty shRNA w wektorach lentiwirusowych z metką GFP, zawierające gen oporności na chloramfenikol
shStim2	ORIGENE, TL704348	4 unikalne 29-merowe konstrukty shRNA w wektorach lentiwirusowych z metką GFP, zawierające gen oporności na chloramfenikol
scrRNA	ORIGENE, TR30021	29-merowa, niefunkcjonalna sekwencja shRNA w wektorze lentiwirusowym z metką GFP, zawierająca gen oporności na chloramfenikol
pMD2.G-VSVG (VSVG)	Didier Trono, Addgene, 12259	Wektor pakujący, który koduje białko otoczki wirusa VSV-G, zawiera gen oporności na ampicylinę
pCMV- Δ R8.91 (Δ 8.9)	Didier Trono, Addgene, 22036	Wektor pakujący, zawiera gen oporności na ampicylinę

Tabela 6. Podłoża bakteryjne.

Płynne podłoże LB	1% tryptonu, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt drożdżowy
Stałe podłoże LB	1% tryptonu, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt drożdżowy, 1,5% agar

3.3.3 Izolowanie i oczyszczanie plazmidowego DNA

Plazmidowe DNA z hodowli bakteryjnych izolowano przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Stosowano zmodyfikowaną metodę lizy alkalicznej, po której następowało wiązanie plazmidowego DNA ze złożem jonowymiennym w warunkach niskiego pH i niskiej zawartości soli. Następnie RNA, białka, barwniki oraz zanieczyszczenia drobnocząsteczkowe usuwano poprzez płukania buforami o średniej zawartości soli. Plazmidowe DNA eluowano buforem o wysokiej zawartości soli, a następnie zagęszczano i wytrącano przy użyciu izopropanolu.

Zgodnie z protokołem producenta zestawu osad bakteryjny zawieszano w 10 ml buforu P1, dodawano 10 ml buforu P2, mieszano i inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Dodawano 10 ml schłodzonego buforu P3, mieszano i inkubowano przez 20 minut, po czym wirowano 20 000 x g, 30 minut w 4°C. Kolumnę ze złożem jonowymiennym przemywano 10 ml buforu QBT i dodawano supernatant zawierający plazmidowe DNA. Złoże płukano dwukrotnie 30 ml buforu QC i plazmidowe DNA eluowano przy pomocy 15 ml buforu QF oraz wytrącano w 10,5 ml izopropanolu. Następnie zawiesinę wirowano 15 000 x g, 30 minut w 4°C, osad przemywano 5 ml 70% etanolu oraz wirowano 15 000 x g, 10 minut. Suchy osad

zawieszano w 200 µl sterylnej Milli-Q. Stężenie wyizolowanego, plazmidowego DNA mierzono przy pomocy spektrofotometru do pomiaru mikroobjętości DS 11 FX+ (De Novix, Wilmington, USA) na podstawie absorbancji próbek przy długości fali 260 i 280 nm.

3.4 Produkcja lentiwirusów i transdukcja neuronów

Komórki HEK 293T/17 (ATCC, USA) hodowano w pożywce DMEM (z 4 mM L-glutaminą, 4500 mg/L glukozą i pirogronianem sodu) wzbogaconej w 10% FBS i antybiotyki (100 IU/ml penicylinę G i 100 µg/ml streptomycynę) w 37°C, w atmosferze 5% CO₂ i 95% powietrza w inkubatorze Heracell™ 150i CO₂. W dniu transfekcji komórki osiągały 70-80% konfluencji. Wirusy przygotowywano metodą transfekcji z użyciem fosforanu wapnia. W tym celu do probówek typu eppendorf o pojemności 1,5 ml dodawano określone objętości plazmidowego DNA (2,5 µg VSVG, 7,5 µg Δ8.9 i 10 µg scrRNA/shStim1/shStim2). Następnie dodawano po 500 µl 0,25 M CaCl₂ oraz kroplami, cały czas mieszając, 500 µl 2x stężonego buforu HEBS i mieszano przez kolejne 5 sekund na wytrząsarce typu vortex. Tak przygotowaną mieszaniną transfekowano komórki.

Drugiego dnia pożywkę hodowlaną wymieniano na pożywkę przeznaczoną do pierwotnych hodowli neuronów (Neurobasal wzbogacony). Czwartego dnia wydajność transfekcji określano na podstawie intensywności fluorescencji GFP przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX71 (Olympus, Tokio, Japonia), następnie zbierano pożywkę hodowlaną z wirusem i wirowano 1000 x g, 5 minut w temperaturze pokojowej. Supernatant przesączano przez filtry o średnicy 0,45 µm o niskim powinowactwie do białek i zagęszczano z użyciem koncentratorów wirówkowych Vivaspin (masa cząsteczkowa odcięcia 100 kDa) poprzez serię wirowań 3000 x g, 30 minut, 4°C. Zagęszczone medium z wirusem porcjowano i przechowywano w -80°C do czasu użycia. Miano wirusa oznaczano poprzez zastosowanie serii rozcieńczeń zagęszczonego medium zawierającego wirusy, transdukcję pierwotnych hodowli neuronów kory mózgu i selekcję, korzystając z techniki western blot.

Piątego dnia hodowli przeprowadzano transdukcję. W tym celu do pożywki Neurobasal dodawano odpowiednie objętości zagęszczonego medium zawierającego wektory lentiwirusowe. Po 6 godzinach pożywkę wymieniano na Neurobasal wzbogacony i hodowlę kontynuowano przez kolejne 5 dni w 37°C, w atmosferze 5% CO₂ i 95% powietrza, do czasu przeprowadzenia eksperymentów. Aby wyciszyć ekspresję genów kodujących białka STIM, stosowano dostępne komercyjnie 29-merowe konstrukty RNA o krótkiej strukturze spinki do

włosów (*ang. short hairpin RNA*, shRNA) w wektorach lentiwirusowych z metką GFP (Tabela 5). Spośród czterech unikalnych shRNA dla każdego z białek STIM, do eksperymentów wybrano po dwa konstrukty wyciszające (shStim C i shStim D) w oparciu o zadowalającą skuteczność wyciszenia ekspresji genów kodujących białka STIM. W eksperymentach stosowano zatem cztery konstrukty (shStim1 C, shStim1 D, shStim2 C, shStim2 D), o następujących sekwencjach: GGAT AATG GCTC TATT GGTG AGGA GACA GACA G (shStim1 C), CTTC CAAT GGTA GCCA TCGG CTGA TTGA G (shStim1 D), TTAG CCAG AAGC AGTA GTTT ATGC CGCT C (shStim2 C), AGTC TGGA AGCA CTTC AGAC AATA CATA A (shStim2 D). Jako kontrolę dla komórek transdukowanych stosowano 29-merowe konstrukty zawierające niefunkcjonalne sekwencje shRNA z metką GFP (*ang. scrambled RNA*, scrRNA) o sekwencji GCAC TACC AGAG CTAA CTCA GATA GTAC T.

3.5 Warunki aktywacji endocytozy NMDAR

Dziesiątego dnia hodowli w celu wywołania endocytozy NMDAR neurony poddawano 15-minutowemu traktowaniu 50 μM NMDA i 100 μM glicyną w buforze do stymulacji, w temperaturze 37°C [Nong i wsp., 2003; Fang, 2011]. Aby zapobiec uszkodzeniu komórek wskutek silnej aktywacji NMDAR, K^+ i Cl^- zostały zastąpione przez Cs^+ i SO_4^{2-} [Fang, 2011]. Czas trwania i siłę bodźca dobrano na podstawie danych literaturowych [Nong i wsp., 2003; Lopez-Menendez i wsp., 2019].

3.5.1 Ocena przeżywalności neuronów

Przeżywalność komórek badano przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu CytoTox-ONE Homogenous Membrane Integrity Assay, za pomocą którego określano poziom dehydrogenazy mleczanowej (*ang. lactate dehydrogenase*, LDH) uwalnianej z uszkodzonych lub martwych komórek. W tym celu pobierano 100 μl bufor do stymulacji, którym traktowane były komórki i przenoszono do płytki 96-dołkowej, po czym dodawano 100 μl odczynnika CytoTox-ONE™ Reagent i wytrząsano przez 30 sekund. Po 10-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej dodawano 50 μl odczynnika Stop Solution i wytrząsano przez 10 sekund. Następnie mierzono fluorescencję przy długości fali wzbudzenia $\lambda = 560 \text{ nm}$ i długości fali emisji $\lambda = 590 \text{ nm}$. Ilość LDH uwalnianej przez neurony transdukowane normalizowano do ilości uwalnianej z komórek typu dzikiego. Natomiast ilość LDH uwalnianej przez neurony traktowane NMDA i glicyną normalizowano do ilości uwalnianej z komórek nietraktowanych.

3.6 Analiza białek metodą immunoblotting (western blot)

3.6.1 Przygotowanie lizatów komórkowych

W celu uzyskania lizatów komórkowych używano buforu do lizy o składzie przedstawionym w Tabeli 3. Bezpośrednio przed doświadczeniem do buforu dodawano 1 mM PMSF oraz inhibitory proteaz. Wszystkie etapy eksperymentu prowadzono na lodzie. Komórki płukano, dodawano 0,5 ml PBS, odwirowywano 1500 x g, 5 minut, 4°C, po czym do osadu dodawano 50 µl buforu do lizy i inkubowano 30 minut. Lizat komórkowy poddawano krótkiej, 20-sekundowej sonikacji w homogenizatorze ultradźwiękowym Vibra-Cell™ VCX 130 (SONICS, Newtown, USA). Następnie wirowano z prędkością 17 000 x g, 15 minut, 4°C, po czym mierzono stężenie białka w supernatancie.

3.6.2 Pomiar stężenia białka metodą Bradforda

Stężenie białka w lizatach komórkowych, frakcji białek powierzchniowych oraz frakcji białek synaptosomalnych mierzono metodą Bradforda. W metodzie tej stężenie białka oznacza się, mierząc absorbancję kompleksu białka z barwnikiem Coomassie brilliant blue G250. Barwnik ten w środowisku kwaśnym tworzy kompleksy z białkami i zmienia barwę z brązowej na niebieską. Intensywność tej barwy jest proporcjonalna do ilości białka w próbce.

Analizowane próbki rozcieńczano wodą Milli-Q w stosunku 1:14 i inkubowano z odczynnikiem Bradforda przez 5 min w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem 300 rpm. Absorbancję mierzono przy $\lambda = 595$ nm korzystając ze spektrofotometru INFINITE M1000 PRO (Tecan Group Ltd, Männedorf, Szwajcaria). Aby obliczyć stężenie białka, korzystano z krzywej wzorcowej otrzymanej na podstawie pomiarów uzyskanych dla serii rozcieńczeń roztworu o znanym stężeniu białka. Jako białko wzorcowe używano BSA.

3.6.3 Biotynylacja białek powierzchniowych

W neuronach typu dzikiego białka powierzchniowe oznaczano przy pomocy niezdolnej do przenikania przez błonę komórkową biotyny, korzystając z komercyjnie dostępnego zestawu Cell Surface Protein Isolation Kit (Abcam, ab206998). Wszystkie etapy eksperymentu prowadzono na lodzie. Komórki płukano buforem PBS, a następnie inkubowano ze świeżo przygotowanym roztworem Sulfo-NHS-SS-Biotyny przez 30 minut w 4°C. Nadmiar biotyny wiązano poprzez dodanie buforu wiążącego biotynę. Komórki skrobano i wirowano 2000 x g, 5 minut, 4°C. Osad płukano buforem TBS i ponownie wirowano w tych samych warunkach.

Komórki poddawano lizie przez 30 minut. Lizat wirowano 10 000 x g, 2 minuty w temperaturze pokojowej. Supernatant przenoszono do nowych probówek, oznaczano stężenie białka, a następnie takie same ilości białka nakładano na kulki opłaszczone streptawidyną i inkubowano na rotatorze obrotowym przez dwie godziny w 4°C. Po tym czasie frakcje białek niezwiązanych oddzielano, a kulki ze streptawidyną płukano trzykrotnie buforem do przemywania, po każdym płukaniu wirowano 800 x g przez 1 minutę w 4°C. Białka powierzchniowe wmywano przy pomocy 0,1 M DTT w buforze PBS.

3.6.4 Izolowanie białek synaptosomalnych

Białka synaptosomalne izolowano przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu Syn-
PER™ Synaptic Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific). Wszystkie etapy eksperymentu prowadzono na lodzie. Komórki płukano buforem PBS, dodawano 50 µl odczynnika do izolowania synaptosomów z 1 mM PMSF oraz inhibitorami proteaz i komórki zeskrobywano. Po odwirowaniu 1200 x g, 10 minut, 4°C, zachowywano supernatant, który wirowano 15 000 x g, 20 minut, 4°C. Osad zawieszano w 40 µl odczynnika do izolowania synaptosomów i oznaczano stężenie białka.

3.6.5 Koimmunoprecypitacja

Lizaty komórkowe wirowano 15 000 x g, 15 minut w 4°C, następnie w celu usunięcia białek, które niespecyficznie wiążą się ze złożem, supernatant inkubowano z połączonym z agarozą białkiem G. Oczyszczony lizat komórkowy nakładano na złożę z odpowiednim przeciwciałem i inkubowano na rotatorze obrotowym, przez noc w 4°C. Równolegle, w ten sam sposób przygotowywano próbki z kontrolą negatywną, którą stanowiło przeciwciało skierowane przeciw króliczemu IgG. (Przeciwciała wykorzystywane do immunoprecypitacji białek przedstawiono w Tabeli 7.) Kolejnego dnia oddzielano nadsącz od złoża, które płukano trzykrotnie buforem do lizy. Po każdym płukaniu próbki wirowano 1000 x g, 2 minuty, 4°C. Immunoprecypitaty wmywano ze złoża 2x stężonym buforem Laemmliego.

3.6.6 Elektroforeza w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) i elektrotransfer

Białka denaturowano w buforze Laemmliego przez 5 minut w temperaturze 95°C. Następnie na 10% żele poliakrylamidowe (Tabela 3) o grubości 1,5 mm nakładano po 20 µg białka. Aby zidentyfikować wielkość prążków po rozdziale elektroforetycznym, na żel wraz z próbkami nakładano marker masy molekularnej PageRuler Prestained Protein Ladder 10-180

kDa. Elektroforezę prowadzono w buforze do elektroforezy (Tabela 3), w temperaturze pokojowej przy napięciu 70 V (gdy próbki znajdowały się w żelu zagęszczającym), a następnie 120 V (gdy próbki znajdowały się w żelu rozdzielającym) w aparacie Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA). Po rozdziale elektroforetycznym białka przenoszono na membranę nitrocelulozową o wielkości porów 0,45 µm Amersham Protran Supported (GE Healthcare). Elektrotransfer mokry prowadzono w buforze do elektrotransferu (Tabela 3) przy natężeniu 400 mA, przez 90 minut, na lodzie. Aby potwierdzić skuteczność transferu i równość nakładania białka w każdej ścieżce wykonywano barwienie Ponceau S.

3.6.7 Detekcja białek z użyciem przeciwciał

Membranę nitrocelulozową płukano w buforze TBST (Tabela 3) a następnie, aby zapobiec niespecyficznemu wiązaniu się przeciwciał, blokowano przy pomocy 5% odłuszczonego mleka w TBST (bufor blokujący) przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie membranę inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi (Tabela 7) w buforze blokującym w temperaturze 4°C przez noc. Kolejnego dnia membranę płukano i inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową (Tabela 8), skierowanymi przeciwko mysim (1:4000) lub króliczym (1:5000) IgG. Inkubację prowadzono w buforze blokującym przez 60 minut w temperaturze pokojowej i ponownie płukano. Wizualizacji białek na membranie dokonywano przy użyciu gotowego zestawu do reakcji chemiluminescencji ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham) w aparacie Fusion FX (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Francja). Aby zbadać kolejne białka na tej samej membranie, przeciwciała pierwszorzędowe i drugorzędowe związane z membraną usuwano przy pomocy buforu do strippingu, membranę płukano, po czym ponownie blokowano i inkubowano z innymi przeciwciałami.

Densytometryczną analizę ilościową białek wykonano za pomocą programu Image Studio Lite, wersja 5.2. Wyniki normalizowano względem całkowitej ilości białka, uzyskanej przy pomocy barwienia Ponceau S tej samej ścieżki, przeliczanej przy użyciu programu ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) [Comajoan i wsp., 2018; Thacker i wsp., 2016]. Ze względu na otrzymywanie niewielkiej ilości białka w przypadku biotynylacji wyniki normalizowano względem sygnału otrzymanego dla białek referencyjnych, α -tubuliny dla lizatu komórkowego i N-kadheryny dla białek powierzchniowych. Natomiast wyniki koimmunoprecypitacji normalizowano względem białek precypitowanych.

Tabela 7. Charakterystyka przeciwciał pierwszorzędowych wykorzystywanych w pracy.

Antygen (Izotyp)	Pochodzenie	Producent	Masa antygeny (kDa)	Używane rozcieńczenie lub ilość
IgG	królik	Merck, 12-370	-	3 µg, co-IP
GluN1 (IgG2a)	mysz	Thermo Fisher Scientific, 32-0500	130	1:200 WB 1:50 IF
GluN1	kawia domowa	Alomone, AGP-046	-	1:100 ELISA
GluN1	królik	Abcam, ab17345	-	1:50 IF
GluN2A	królik	Alomone, AGC-002	120	1:200 WB 1:50 IF 3 µg, co-IP
GluN2A (IgG2a)	mysz	Abcam, ab240884	-	1:100 ELISA 1:50 IF
GluN2B	królik	Proteintech, 21920-1-AP	180	1:200 WB 3 µg, co-IP
GluN2B	królik	Alomone, AGC-003	-	1:100 ELISA 1:50 IF
GluN2B (IgG)	mysz	Abcam, ab93610	-	1:50 IF
STIM1	królik	Proteintech, 11565-1-AP	90	1:200 WB 1:50 IF
STIM2	królik	Proteintech, 21192-1-AP	100	1:200 WB
STIM2	królik	Alomone, ACC-064	-	1:50 IF
EEA1 (IgG)	mysz	BD, GT10811	170	1:200 WB 1:50 IF
PSD95	królik	Alomone, APZ-009	95	1:200 WB
PSD95	królik	Cell signalling, 2507S	95	1:200 WB
kalneksyna	królik	Proteintech, 10427-2-AP	100	1:0000 WB
MAP2	kura	Thermo Fisher Scientific, PA1-16751	-	1:500 IF
N- kadheryna	królik	Proteintech, 22018-1-AP	130	1:2000 WB
α-tubulina	królik	Proteintech, 11224-1-AP	55	1:200 000 WB
LDH	królik	Proteintech, 14824-1-AP	35	1:1000 WB
ATPaza Na ⁺ /K ⁺	królik	Proteintech, 14418-1-AP	110	1:0000 WB

Zastosowane skróty: co-IP – koimmunoprecypitacja, IF – barwienia immunofluorescencyjne, WB – western blot, ELISA – test immunoenzymatyczny ELISA.

Tabela 8. Charakterystyka przeciwciał drugorzędowych wykorzystywanych w pracy.

Przeciwciało	Antygen	Producent	Używane rozcieńczenie
Przeciwciało z peroksydazą chrzanową (z kozy)	IgG mysie	Sigma-Aldrich, A9044	1:4000 WB 1:2000 ELISA
Przeciwciało z peroksydazą chrzanową (z kozy)	IgG królicze	Proteintech, SA0000I-2	1:5000 WB 1:2000 ELISA
Przeciwciało z peroksydazą chrzanową (z kozy)	IgG kawii domowej	Proteintech, SA0000I-12	1:2000 ELISA
Przeciwciało z barwnikiem fluorescencyjnym AlexaFluor 488 (z kozy)	IgG mysie	Thermo Fisher Scientific, A21131	1:500 IF
Przeciwciało z barwnikiem fluorescencyjnym AlexaFluor 488 (z kozy)	IgG2a mysie	Thermo Fisher Scientific, A32723	1:500 IF
Przeciwciało z barwnikiem fluorescencyjnym AlexaFluor 568 (z kozy)	IgY kurze	Thermo Fisher Scientific, A11041	1:500 IF
Przeciwciało z barwnikiem fluorescencyjnym AlexaFluor 647 (z kozy)	IgG królicze	Thermo Fisher Scientific, A21245	1:500 IF

Zastosowane skróty: IF – barwienia immunofluorescencyjne, WB – western blot, ELISA – test immunoenzymatyczny ELISA.

3.7 Oznaczanie białek powierzchniowych – test immunoenzymatyczny ELISA

Ponieważ do biotynylacji białek powierzchniowych wymagana jest duża ilość materiału badanego (Tabela 4), co wiązałoby się z dużym zużyciem lentiwirusów, w neuronach transdukowanych scrRNA lub shStim, białka powierzchniowe oznaczano przy pomocy testu immunoenzymatycznego ELISA (*ang. enzyme-linked immunosorbent assay*) zgodnie z procedurą opisaną w „Ionotropic Glutamate Receptor Technologies” [Horak i Ho Suh, 2016]. Komórki utrwalano w 4% roztworze PFA i 4% sacharozy przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie płukano i blokowano miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciał buforem blokującym zawierającym 5% BSA, pomijając etap permabilizacji. Komórki inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi (Tabela 7) w buforze blokującym przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. W eksperymentach używano przeciwciał wykrywających

N-końcowe, zewnątrzkomórkowe fragmenty badanych białek. Po płukaniu, komórki inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi znakowanymi peroksydazą chrzanową (Tabela 8) przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie komórki płukano, dodawano 300 μ l TMB, będącego substratem dla peroksydazy chrzanowej i inkubowano przez 30 minut bez dostępu światła. Reakcję zatrzymywano, dodając 300 μ l 1M H₂SO₄, po czym mierzono absorbancję przy długości fali 450 nm, korzystając ze spektrofotometru INFINITE M1000 PRO (Tecan Group Ltd, Männedorf, Szwajcaria). W celu normalizacji uzyskanych wyników wykonywano barwienie jąder komórkowych barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342 (1:10 000, 5 min). Fluorescencję mierzono przy długości fali wzbudzenia 358 nm i długości fali emisji 461 nm.

3.8 Barwienia immunofluorescencyjne

Komórki utrwalano 4% roztworem PFA i 4% sacharozy przez 15 minut, płukano i inkubowano 10 minut w roztworze zawierającym 0,05% saponiny w celu permabilizacji błon komórkowych. Miejsca niespecyficznego wiązania przeciwciał blokowano poprzez 60-minutową inkubację z buforem blokującym zawierającym 2% NGS. Następnie komórki inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi (Tabela 7) w buforze blokującym z 0,05% saponiną przez 120 minut w temperaturze pokojowej. Komórki płukano, a następnie inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z barwnikami fluorescencyjnymi (Tabela 8) przez 45 minut, bez dostępu światła. Jądra komórkowe barwiono znacznikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342 (1:10 000, 5 minut). Preparaty płukano wodą Milli-Q, osuszano i nakładano na szkiełka podstawowe, zamykając je w odczynniku ProLong™ Gold Antifade Mountant i pozostawiano do wyschnięcia przez noc. Preparaty przechowywano w ciemności w temperaturze 4°C.

Preparaty oglądano w Środowiskowym Laboratorium Laserowych Techniek Mikroskopowych IMDiK PAN z wykorzystaniem konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego LSM 780/Elyra PS.1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Niemcy). Zdjęcia wykonano za pomocą obiektywu immersyjnego 63×Alpha Plan-Apochromat. Rozdzielczość obrazu wynosiła 1024×1024 pikseli. Do wzbudzania barwników fluorescencyjnych stosowano: laser argonowy (488 nm) do wzbudzenia Alexa Fluor 488, laser ciała stałego (561 nm) do wzbudzenia Alexa Fluor 568, laser helowo-neonowego (633 nm) do wzbudzenia Alexa Fluor 647 i diodę 405 nm do wzbudzenia barwnika Hoechst.

Obrazy analizowano za pomocą oprogramowania ZEN 3.0 (blue edition) oraz ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) z wykorzystaniem rozszerzenia „Manders Coefficient”. Do oceny stopnia kolokalizacji badanych białek wykorzystywano współczynnik kolokalizacji Mandersa (*ang. Manders' co-localization coefficient*, M1) [Manders i wsp., 1993]. Zdjęcia były poddawane dekonwolucji w programie ImageJ z zastosowaniem rozszerzenia „Deconvolution”, „Diffraction PSF 3D” oraz „Iterative Deconvolution”.

3.9 Pomiary elektrofizjologiczne metodą whole cell patch-clamp

Całkowity prąd jonowy płynący przez NMDAR znajdujące się w błonie komórkowej pojedynczego neuronu rejestrowano przy użyciu techniki whole cell patch-clamp. Komórki oglądano pod mikroskopem świetlnym odwróconym Olympus IX71 (Olympus America Inc, Center Valley, PA, USA) połączonym z kamerą cyfrową Optikam B3 – 4083.B3 (Optika Italy, Ponteranica, Włochy). Mikroskop i mikromanipulator ROE-200 (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) znajdowały się na stole antywibracyjnym. Całość osłonięta była miedzianą siatką ekranującą, która pełniła funkcję klatki Faradaya. Szklane mikropipety, w których umieszczano elektrodę, przygotowywano w dniu eksperymentu, korzystając z wyciągarki do mikropipet P-87 Flaming/Brown Micropipette Puller (Sutter Instrument, Novato, CA, USA) w taki sposób, aby ich opór wynosił około 3 M Ω . Wnętrze mikropipety wypełniano następnie roztworem wewnątrzkomórkowym (Tabela 3) o składzie zbliżonym do płynu wewnątrzkomórkowego. Badania prowadzono zgodnie z procedurą opisaną w publikacji [Nong i wsp., 2003]. W czasie eksperymentów szkiełka z komórkami umieszczano w komorze i zanurzano w roztworze zewnątrzkomórkowym (Tabela 3) doprowadzanym przez manualnie sterowany system do perfuzji. Prędkość przepływu wynosiła średnio 1 ml/minutę. Następnie przy pomocy mikromanipulatora zbliżano pipetę z elektrodą do wybranej komórki. Po uzyskaniu konfiguracji „cell-attached” (połączenie pipety z błoną komórkową) czekano, aż opór pipety osiągnie wartość ponad 1 G Ω , a następnie uzyskiwano konfigurację „whole-cell” przez przerwanie błony komórkowej ($R < 10$ M Ω). Aby zarejestrować całkowity prąd jonowy płynący przez NMDAR roztwór zewnątrzkomórkowy z 50 μ M NMDA i 100 μ M glicyną aplikowano do komory z komórkami przez cztery 4-sekundowe podania w odstępach 5-minutowych i rejestrowano oddzielnie dla każdej komórki. Endocytozę NMDAR indukowano poprzez 4-sekundowe podanie NMDA i glicyny poprzedzone 5-minutową inkubacją komórek w roztworze zewnątrzkomórkowym z 100 μ M glicyną. Aby zablokować endocytozę NMDAR, do roztworu zewnątrzkomórkowego dodawano dodatkowo antagonistę NMDAR o wysokim

powinowactwie do miejsca wiązania glicyny (5 μ M MDL29951). Pomiaru prowadzono w temperaturze pokojowej, przy potencjale odniesienia równym -60 mV. Sygnały pomiarowe prądu jonowego NMDAR rejestrowano przy użyciu wzmacniacza Axopatch 1-D. Dane zdigitalizowano z wykorzystaniem programu DigiData1200A, sygnał filtrowano za pomocą filtra dolnoprzepustowego o częstotliwości granicznej 2 kHz i uzyskiwano za pomocą programu pClamp10.6, a następnie analizowano w programie Clampfit 10.7. Doświadczenia wykonano w Katedrze i Zakładzie Farmakoterapii i Opieki Farmaceutycznej WUM.

3.10 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Prism 10.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną z odchyleniem wyrażonym jako błąd standardowy średniej (\pm SEM) z 3 do 7 niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną określono za pomocą niesparowanego lub sparowanego testu *t*-Studenta (przy porównywaniu dwóch grup). Gdy porównywano więcej niż dwie grupy, istotność statystyczną określano przy pomocy jedno- lub dwuczynnikowej analizy wariancji (one-way/two-way ANOVA) z zastosowaniem testu *post hoc* Tukeya. Przedziały istotności oznaczano w sposób następujący: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

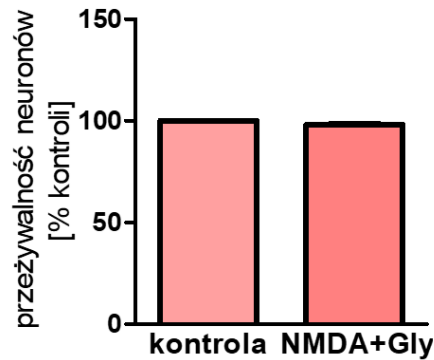
4 Wyniki

4.1 Badanie endocytozy NMDAR po krótkotrwałej, silnej aktywacji tego receptora

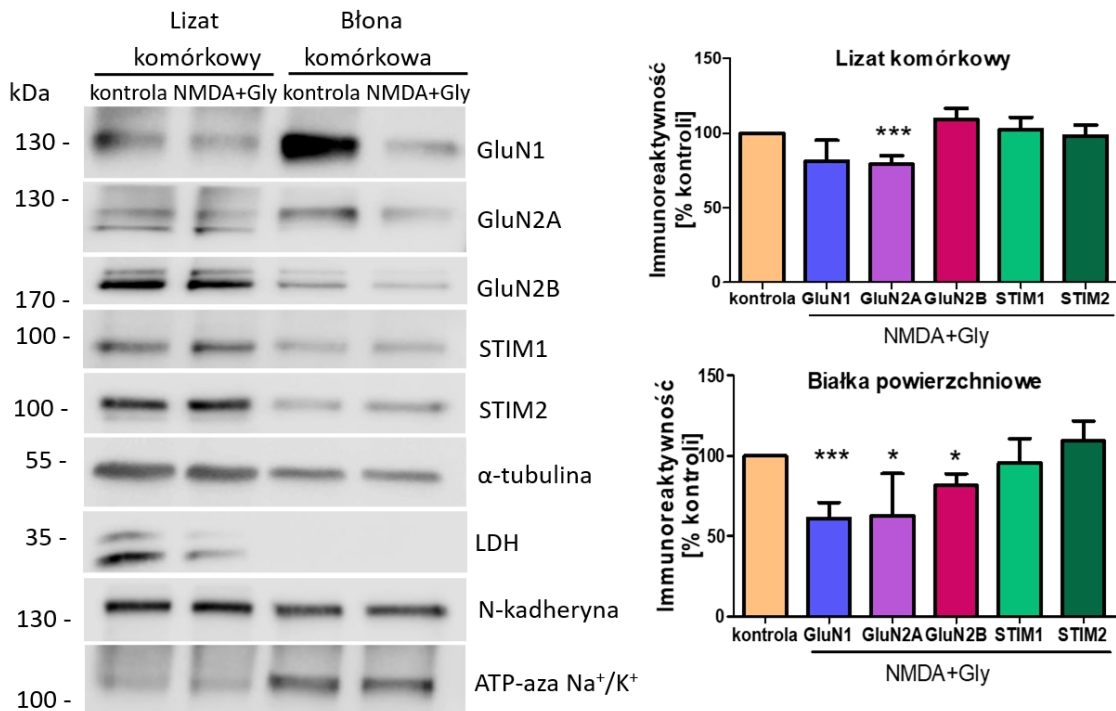
Liczne doniesienia dowiodły, że traktowanie szczurzych neuronów korowych i hipokampalnych NMDA i glicyną w wysokich stężeniach prowadzi do endocytozy NMDAR w modelach *in vitro* [Nong i wsp., 2003; Fang, 2011; Lopez-Menendez i wsp., 2019]. Dlatego też celem pierwszej części pracy było potwierdzenie tych wyników i sprawdzenie, czy 15-minutowe traktowanie neuronów kory mózgu szczura 50 μM NMDA i 100 μM glicyną prowadzi do endocytozy NMDAR. Sprawdzone też, że wybrane warunki aktywacji endocytozy NMDAR nie wpływały na żywotność neuronów (Rycina 7).

4.1.1 Oznaczanie immunoreaktywności GluN1, GluN2A, GluN2B i białek STIM w lizatach komórkowych i w błonie komórkowej

Do oznaczania immunoreaktywności podjednostek NMDAR oraz białek STIM w błonie komórkowej neuronów stosowano metodę znakowania białek powierzchniowych za pomocą biotyny. Po zakończeniu biotynylacji i wypłukaniu nadmiaru odczynnika przygotowywano lizaty komórkowe. Immunoreaktywność białek we frakcji powierzchniowej i w lizatach komórkowych analizowano z wykorzystaniem techniki western blot (Rycina 8). Czystość frakcji białek powierzchniowych potwierdzano brakiem obecności markera frakcji cytoplazmatycznej – LDH oraz obecnością białek charakterystycznych dla błony komórkowej – N-kadheryny oraz ATP-azy Na^+/K^+ . Zaobserwowano, że 15-minutowe traktowanie neuronów 50 μM NMDA i 100 μM glicyną skutkuje obniżeniem immunoreaktywności GluN1 i GluN2B odpowiednio do $61,02\% \pm 9,86\%$ ($p = 0,0008$) oraz $81,61\% \pm 7,22\%$ ($p = 0,0181$), podczas gdy całkowity poziom tych białek w lizatach komórkowych nie zmienił się (Rycina 8). Wyniki te mogą świadczyć o internalizacji NMDAR zbudowanych z GluN1 i GluN2B (GluN2B-NMDAR). Immunoreaktywność GluN2A w lizatach komórkowych zmniejszyła się o $20,75\% \pm 5,62\%$ ($p = 0,0003$) a na powierzchni błony komórkowej zmalała o $37,31\% \pm 15,71\%$ ($p = 0,0448$). Wyniki te mogą wskazywać, że poza internalizacją, niewielka część NMDAR zbudowanych z GluN1 i GluN2A (GluN2A-NMDAR) ulega degradacji. Immunoreaktywność białek STIM1 i STIM2 zarówno w lizatach komórkowych, jak i we frakcji białek powierzchniowych pozostała niezmienną. Wyniki te pokazują, że krótkotrwałe, silne pobudzenie NMDAR zwiększa internalizację GluN2A-NMDAR i GluN2B-NMDAR, nie wpływając na lokalizację białek STIM.



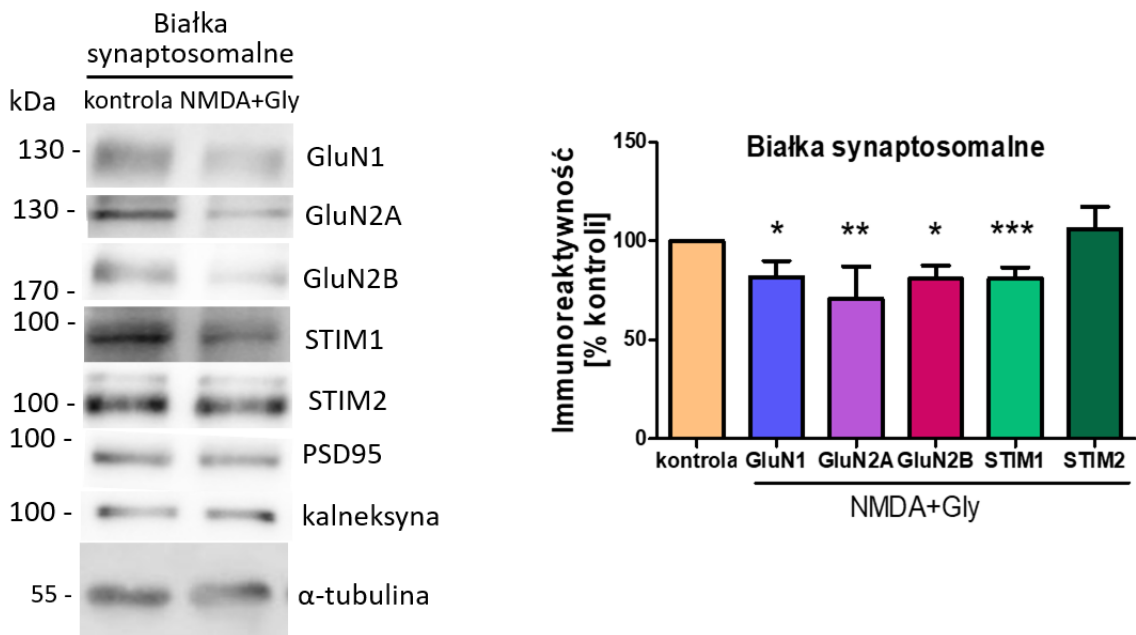
Rycina 7. Krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR nie wpływa na żywotność neuronów *in vitro*. Wykres przedstawiający uwalnianie LDH z neuronów kontrolnych i neuronów traktowanych 50 μ M NMDA i 100 μ M glicyną przez 15 minut. Wyniki normalizowano względem neuronów kontrolnych i przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM z czterech niezależnych powtórzeń biologicznych.



Rycina 8. Krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR prowadzi do internalizacji GluN1, GluN2A i GluN2B z błony komórkowej. Reprezentatywne obrazy western blot i analiza densytometryczna immunoreaktywności podjednostek NMDAR (GluN1, GluN2A, GluN2B) i białek STIM w lizacie komórkowym oraz we frakcji białek powierzchniowych izolowanych z neuronów kontrolnych i neuronów traktowanych 50 μ M NMDA i 100 μ M glicyną przez 15 minut. W eksperymentach stosowano kontrole ładowania takie jak α -tubulina (dla lizatów komórkowych) oraz N-kadheryna (dla frakcji białek powierzchniowych). Jako białko markerowe frakcji cytoplazmatycznej i frakcji białek powierzchniowych używano odpowiednio LDH oraz ATP-azy Na^+/K^+ . Wyniki normalizowano względem neuronów kontrolnych i przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną określano za pomocą niesparowanego testu t-Studenta; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.1.2 Oznaczenie immunoreaktywności GluN1, GluN2A, GluN2B i białek STIM w synaptosomach

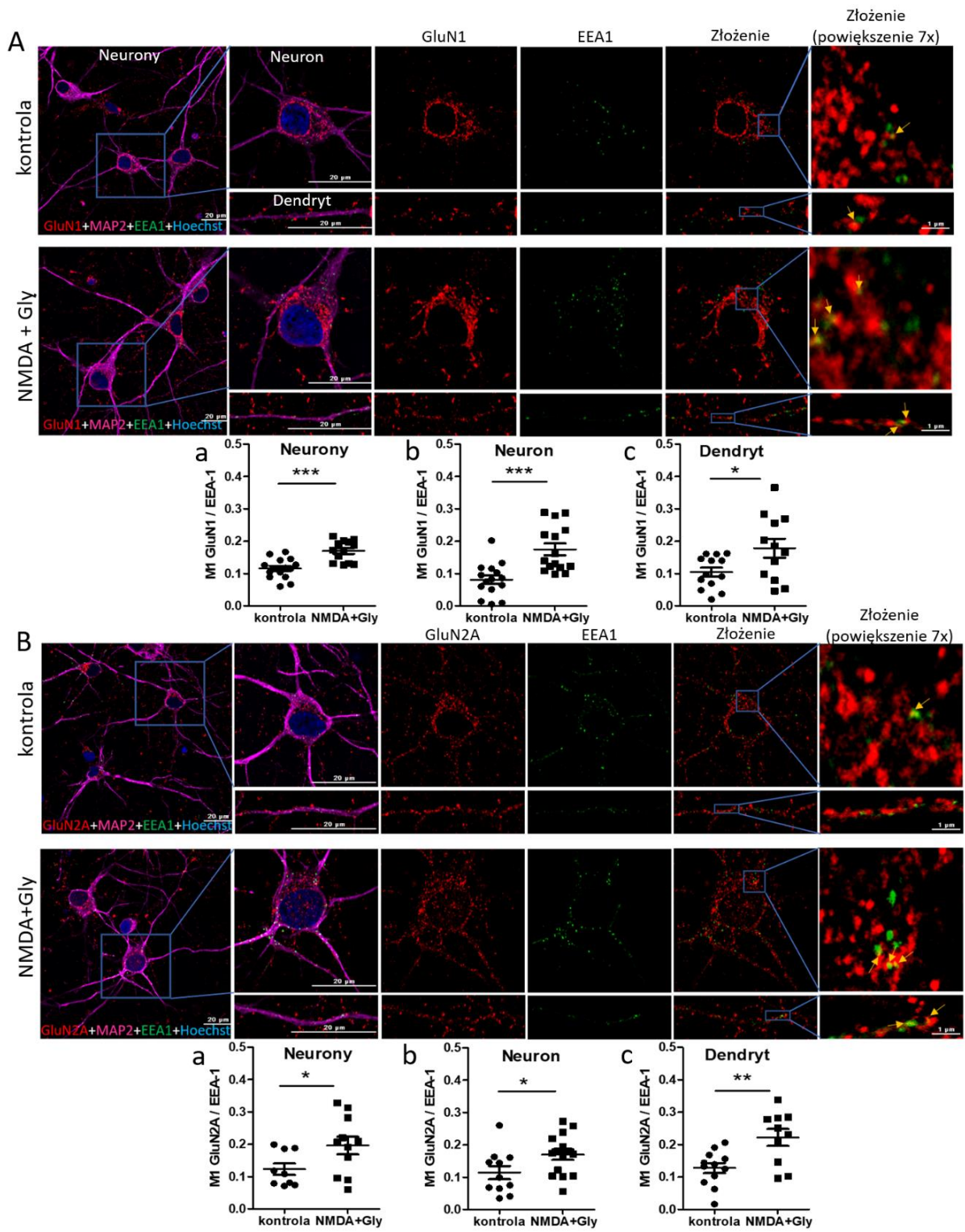
Następnie zbadano w jaki sposób krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR wpływa na poziom badanych białek we frakcji synaptosomalnej (Rycina 9), w skład której wchodzi zarówno białka błony presynaptycznej, jak i postsynaptycznej. Podobnie jak we frakcji białek powierzchniowych, we frakcji białek synaptosomalnych obserwowano obniżenie immunoreaktywności GluN1, GluN2A oraz GluN2B odpowiednio do $81,84\% \pm 8,06\%$ ($p = 0,0161$), $70,64\% \pm 16,43\%$ ($p = 0,0072$) oraz $80,96\% \pm 6,77\%$ ($p = 0,0107$). Wyniki te mogą świadczyć o tym, że w wybranych warunkach eksperymentalnych dochodzi do internalizacji synaptosomalnych NMDAR. Podobnie jak w przypadku frakcji białek powierzchniowych, we frakcji białek synaptosomalnych nie obserwowano zmian w immunoreaktywności białka STIM2. Natomiast obniżenie poziomu białka STIM1 do $81,12\% \pm 5,51\%$ ($p = 0,0008$) we frakcji białek synaptosomalnych, przy braku różnic we frakcji białek powierzchniowych, może sugerować przemieszczenie się tego białka z synaptosomów do obszarów pozasynaptycznych.

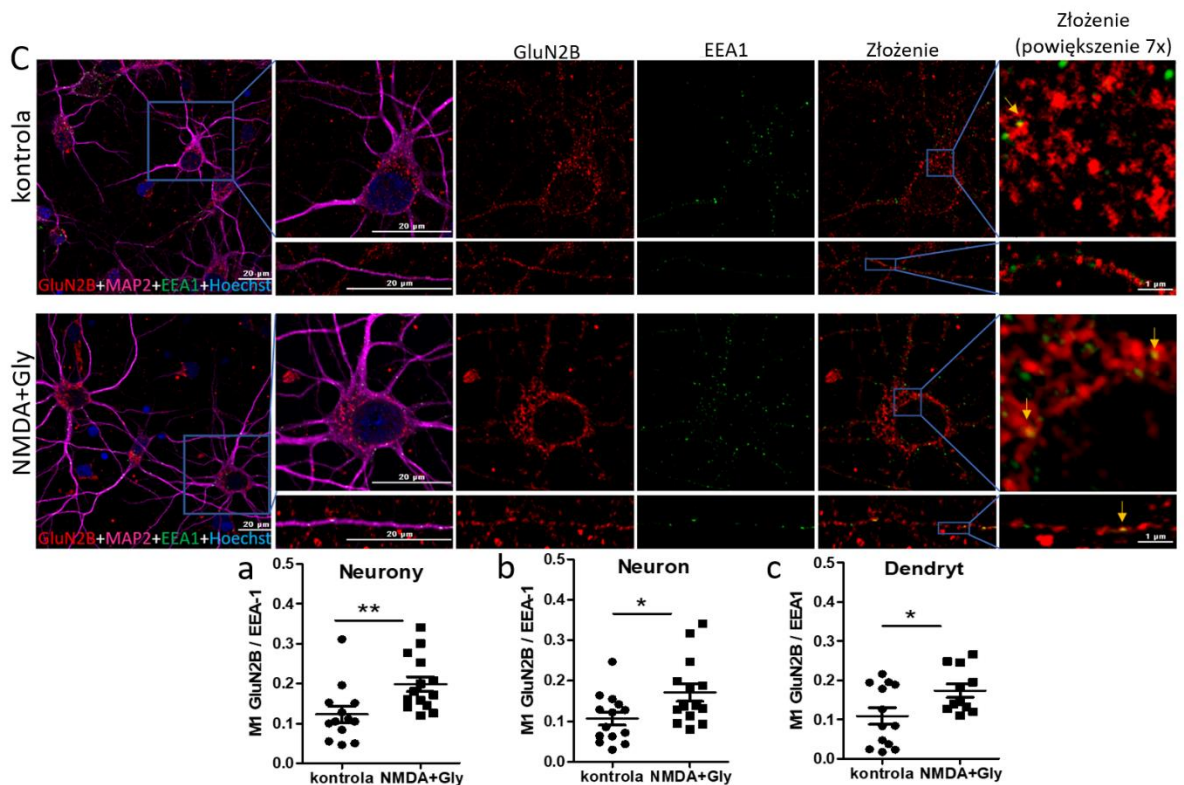


Rycina 9. Krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR prowadzi do internalizacji GluN1, GluN2A i GluN2B z synaptosomów. Reprezentatywne obrazy western blot oraz analiza densytmetryczna immunoreaktywności podjednostek NMDAR (GluN1, GluN2A, GluN2B) i białek STIM we frakcji białek synaptosomalnych izolowanej z neuronów kontrolnych i neuronów traktowanych 50 μ M NMDA i 100 μ M glicyną przez 15 minut. Jako białko markerowe zagęszczeń postsynaptycznych i ER używano odpowiednio PSD95 i kalneksyny. Wyniki przeliczano na całkowitą ilość białka określaną przy pomocy barwienia Ponceau S (Materiały i metody, 3.6.7), normalizowano względem neuronów kontrolnych i przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM z czterech do sześciu niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną określano za pomocą niesparowanego testu t-Studenta; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.3 Analiza kolokalizacji GluN1, GluN2A, GluN2B z białkiem markerowym wczesnych endosomów (EEA1)

W celu sprawdzenia, czy w wyniku krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR ulegają endocytozie, wykonywano barwienia immunofluorescencyjne GluN1, GluN2A i GluN2B z białkiem markerowym wczesnych endosomów (EEA1), a następnie określano stopień kolokalizacji tych białek za pomocą współczynnika kolokalizacji M1 (Rozdział 3.8). Aby zidentyfikować neurony, wykonywano znakowanie markera zaawansowanego zróżnicowania neuronalnego, białka związanego z mikrotubulami 2 (*ang. Microtubule-Associated Protein 2*, MAP2). W warunkach kontrolnych wartość M1 dla kompleksów GluN1-EEA1, GluN2A-EEA1 i GluN2B-EEA1 wynosiła odpowiednio $0,115 \pm 0,008$, $0,123 \pm 0,018$ i $0,123 \pm 0,020$ (Rycina 10Aa, 10Ba, 10Ca). Co oznacza, że odpowiednio 11,5%, 12,3% i 12,3% czerwonych pikseli kolokalizowało z zielonymi pikselami [Zinchuk i wsp., 2007]. Po krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR zaobserwowano istotny wzrost wartości współczynnika kolokalizacji M1 dla każdej z badanych par białek, a różnice były widoczne zarówno w ciele komórkowym, jak i dendrytach (Rycina 10). Po traktowaniu komórek NMDA i glicyną wartość M1 dla badanych par białek wzrosła odpowiednio do $0,170 \pm 0,009$ ($p = 0,0001$), $0,196 \pm 0,027$ ($p = 0,0459$) i $0,200 \pm 0,018$ ($p = 0,0094$). Oznacza to, że odpowiednio 17,0%, 19,6% i 20,0% czerwonych pikseli kolokalizowało z zielonymi pikselami. Tym samym wartość współczynnika M1 wzrosła o 47,83%, 59,35% i 62,60% odpowiednio dla GluN1-EEA1, GluN2A-EEA1 i GluN2B-EEA1. Wyniki te pokazują, że GluN2A-NMDAR oraz GluN2B-NMDAR ulegają endocytozie do endosomów wczesnych już po 15 minutach silnej aktywacji NMDAR.

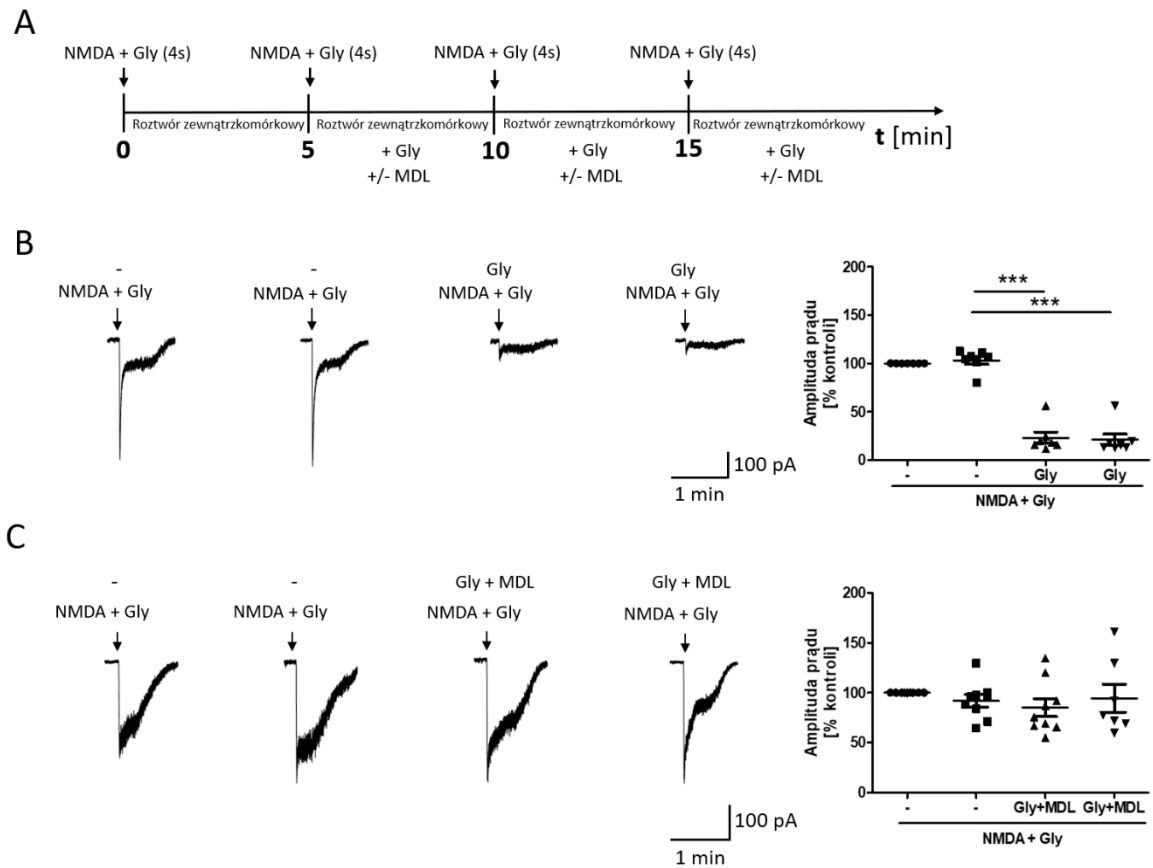




Rycina 10. Krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR zwiększa kolokalizację GluN1, GluN2A i GluN2B z białkiem markerowym wczesnych endosomów (EEA1). (A, B, C) Reprezentatywne barwienia immunofluorescencyjne oraz wykresy prezentujące stopień kolokalizacji określony przy pomocy współczynnika kolokalizacji Mandersa (M1) podjednostek NMDAR (GluN1, GluN2A, GluN2B) i EEA1 dla neuronów kontrolnych i neuronów traktowanych 50 μM NMDA i 100 μM glicyną przez 15 minut. Komórki barwiono przeciwciałami anti-GluN1, anti-GluN2A i anti-GluN2B (czerwony), anti-EEA1 (zielony), anti-MAP2 (różowy) oraz barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst, który wybarwia jądra komórkowe (niebieski). W celu identyfikacji neuronów wykonywano barwienia swoistego markera neuronalnego - MAP2. W przedostatniej kolumnie przedstawiono złożenie barwienia (A) GluN1, (B) GluN2A, (C) GluN2B z barwieniem EEA1, a w ostatniej jego 7-krotne powiększenie. Strzałkami zaznaczono miejsca kolokalizacji podjednostek NMDAR z EEA1. Wszystkie zdjęcia zostały wykonane przy użyciu mikroskopu konfokalnego, pochodzą z pojedynczej płaszczyzny optycznej, przechodzącej przez środek jądra komórkowego i zostały poddane dekonwolucji. Skala: 20 μm i 1 μm. Współczynnik M1 obliczano z (a) kilku neuronów (Neurony), (b) pojedynczego neuronu (Neuron) oraz (c) dendrytu (Dendryt). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną ± SEM z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną określano za pomocą niesparowanego testu t-Studenta; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

4.1.4 Pomiar całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR

Aby dodatkowo potwierdzić, że NMDAR ulegają endocytozie wskutek krótkotrwałej, silnej aktywacji mierzono całkowity prąd jonowy płynący przez te receptory. Ponieważ technika whole cell patch-clamp jest czuła na desensytyzację NMDAR, protokół został dobrany w taki sposób, aby ograniczyć występowanie tego zjawiska (Rycina 11A). W czasie eksperymentów szkiełka z komórkami umieszczano w komorze i zanurzano w roztworze zewnątrzkomórkowym doprowadzanym przez manualnie sterowany system do perfuzji. Aby zarejestrować całkowite prądy jonowe płynące przez NMDAR w warunkach, w których nie dochodzi do desensytyzacji NMDAR, do komory z komórkami aplikowano roztwór zewnątrzkomórkowy z 50 μM NMDA i 100 μM glicyną w czterech 4-sekundowych podaniach w odstępach 5-minutowych. Endocytozę NMDAR indukowano poprzez wcześniejszą inkubacją komórek w roztworze zewnątrzkomórkowym ze 100 μM glicyną. Endocytozę NMDAR blokowano poprzez dodawanie do roztworu zewnątrzkomórkowego antagonisty NMDAR o wysokim powinowactwie do miejsca wiązania glicyny (5 μM MDL29951). Całkowity czas eksperymentu wynosił 15 minut. Jak pokazano na Rycinie 11B, kolejne podawanie NMDA i glicyny nie powodowało obniżenia amplitudy prądu jonowego płynącego przez NMDAR ($t = 0$ min, $t = 5$ min). Jeżeli jednak podanie NMDA i glicyny zostało poprzedzone 5-minutową inkubacją komórek w roztworze z glicyną, skutkowało to obniżeniem amplitudy prądu do $23,00\% \pm 5,71\%$ ($p < 0,0001$) w porównaniu do wartości początkowej (Rycina 11B, $t = 10$ min). Podobną wartość natężenia prądu otrzymywano również przy kolejnym podaniu NMDA i glicyny (Rycina 11B, $t = 15$ min). Efektu tego nie obserwowano natomiast po zastosowaniu MDL29951 (Rycina 11C). Amplituda całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR pozostawała wówczas niezmienną ($91,86\% \pm 6,20\%$, $p = 0,5480$). Ponieważ przyłączenie glicyny jest niezbędne do wywołania zależnej od klatryny endocytozy NMDAR (co opisano bardziej szczegółowo w rozdziale 1.3.3.4), wyniki te potwierdzają, że wskutek krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR dochodzi do endocytozy tego receptora.



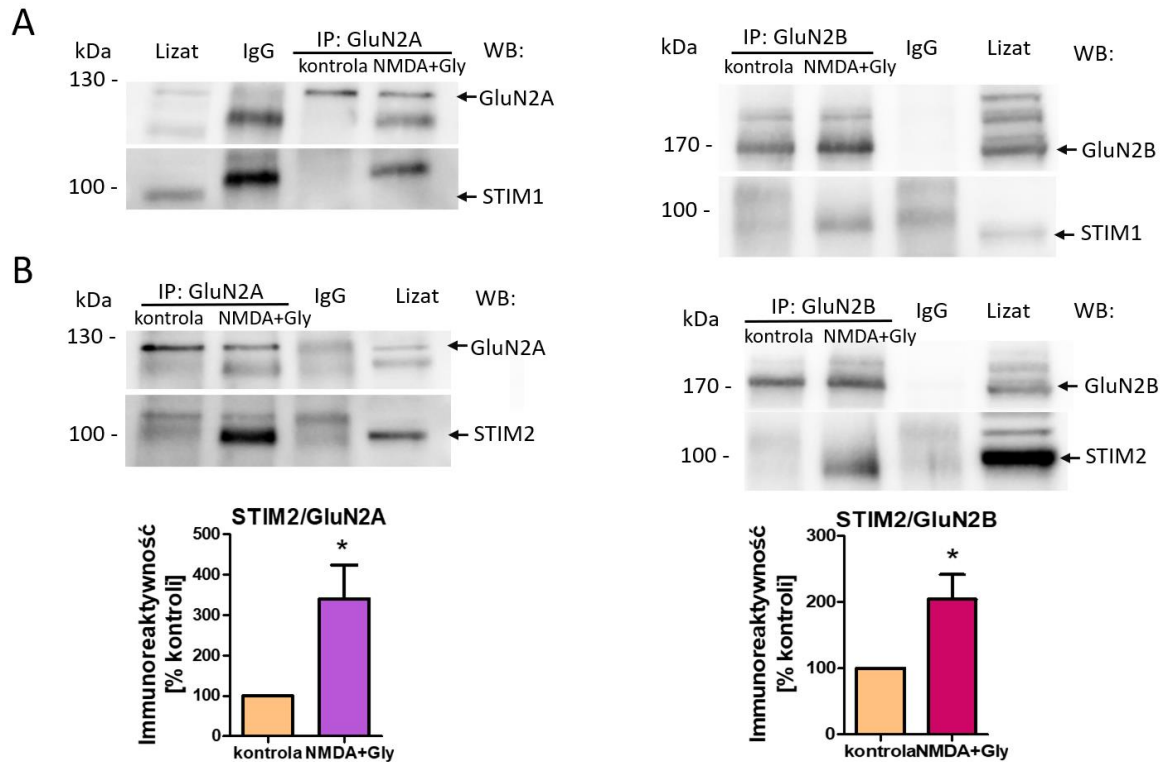
Rycina 11. Krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR obniża amplitudę całkowitego prądu jonowego płynącego przez te receptory. (A) Schemat eksperymentu whole-cell patch clamp. **(B, C)** Reprezentatywne przebiegi całkowitego prądu jonowego NMDAR zarejestrowane dla pojedynczych komórek oraz wykresy przedstawiające znormalizowaną amplitudę tego prądu w neuronach 4-krotnie traktowanych 50 μ M NMDA i 100 μ M glicyną (NMDA + Gly) przez 4 sekundy, płukanych uprzednio roztworem zewnątrzkomórkowym lub roztworem zewnątrzkomórkowym z dodatkiem 100 μ M glicyny, lub roztworem zewnątrzkomórkowym z dodatkiem 100 μ M glicyny i 5 μ M MDL29951. Amplitudy prądów jonowych NMDAR normalizowano do wartości szczytowej prądu uzyskanej w wyniku pierwszego podania NMDA i glicyny dla danej komórki. Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, z 7-9 komórek dla każdej grupy. Istotność statystyczną określano za pomocą sparowanego testu t-Studenta; *** $p < 0,001$.

4.2 Wpływ endocytozy NMDAR na oddziaływania białek STIM z NMDAR

Badania wykonane przez dr hab. Gruszczyńską-Biegała wykazały występowanie fizycznych oddziaływań między białkami STIM i podjednostkami NMDAR (GluN2A i GluN2B) w pierwotnych hodowlach neuronów kory mózgu szczura *in vitro* [Gruszczyńska-Biegała i wsp., 2020]. Oddziaływania te miały charakter dynamiczny i zależały od stopnia wypełniania magazynów wapniowych w ER. Dlatego też kolejnym etapem niniejszej pracy było sprawdzenie występowania bezpośrednich oddziaływań białek STIM z NMDAR w nowych warunkach eksperymentalnych oraz zbadanie wpływu endocytozy NMDAR na te oddziaływania. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem metody koimmunoprecypitacji białek oraz barwień immunofluorescencyjnych.

4.2.1 Analiza koimmunoprecypitacji białek STIM z GluN2A i GluN2B

Analiza wyników koimmunoprecypitacji białek STIM z GluN2A i GluN2B w warunkach kontrolnych nie wykazała obecności kompleksów STIM1 z GluN2A i GluN2B. Natomiast oddziaływania STIM2 z GluN2A i GluN2B były znikome (Rycina 12). Krótkotrwała silna aktywacja NMDAR nie wpływała na oddziaływania STIM1 z GluN2A, ani GluN2B (Rycina 12A), ale powodowała znaczny wzrost oddziaływań STIM2 z GluN2A ($339,9\% \pm 84,14\%$, $p = 0,0464$) i STIM2 z GluN2B ($204,2\% \pm 37,22\%$, $p = 0,0188$) (Rycina 12B).



Rycina 12. Krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR zwiększa oddziaływania STIM2 (ale nie STIM1) z GluN2A i GluN2B. (A, B) Reprezentatywne obrazy western blot oraz analiza densytometryczna oddziaływań białka STIM2 z GluN2A i GluN2B w neuronach kontrolnych i neuronach traktowanych 50 μ M NMDA i 100 μ M glicyną przez 15 minut. Do immunoprecypitacji używano przeciwciał anti-GluN2A, anti-GluN2B, anti-IgG. Wyniki analizy densytometrycznej przedstawiono jako immunoreaktywność koimmunoprecypitowanych białek podzieloną przez immunoreaktywność precypitowanych białek, normalizowano względem neuronów kontrolnych i przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech do czterech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną określano za pomocą niesparowanego testu t-Studenta; * $p < 0,05$. Zastosowane skróty: IP – immunoprecypitat, WB – western blot

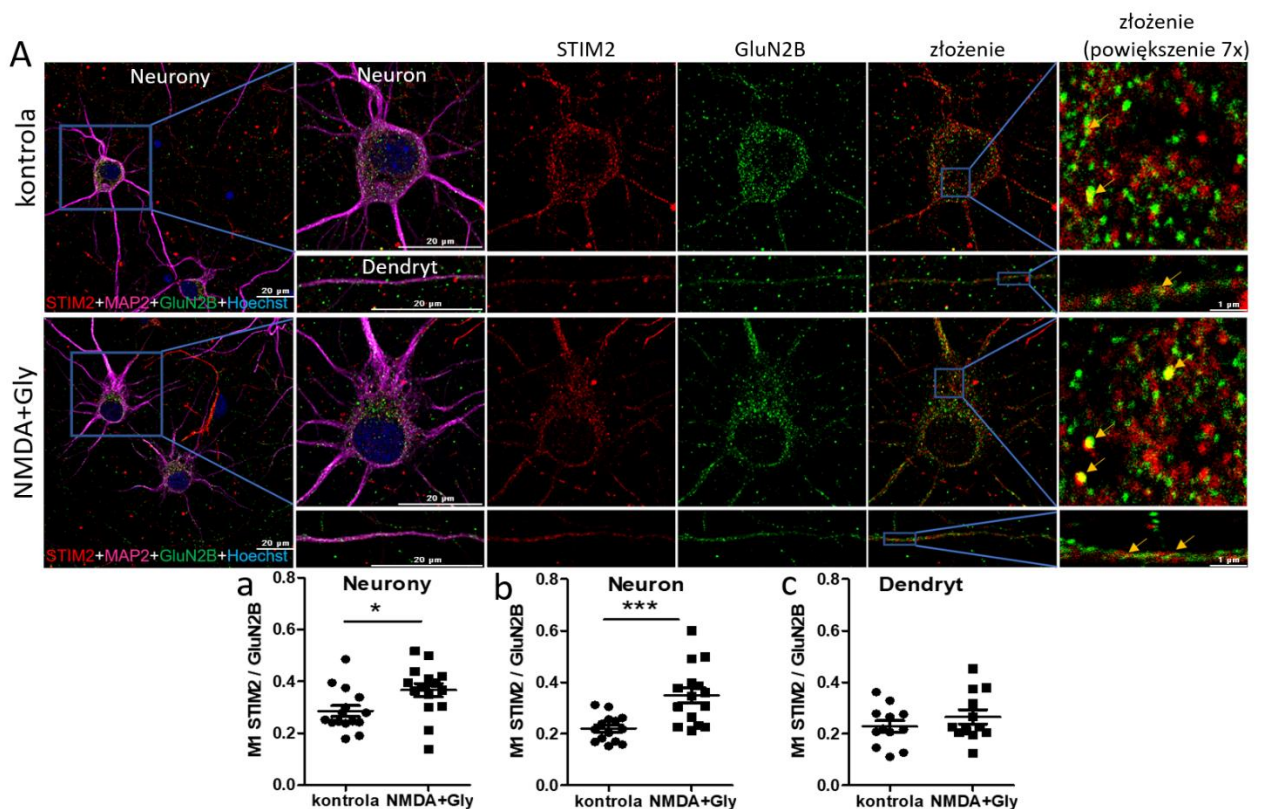
4.2.2 Analiza kolokalizacji białka STIM2 z GluN2A i GluN2B

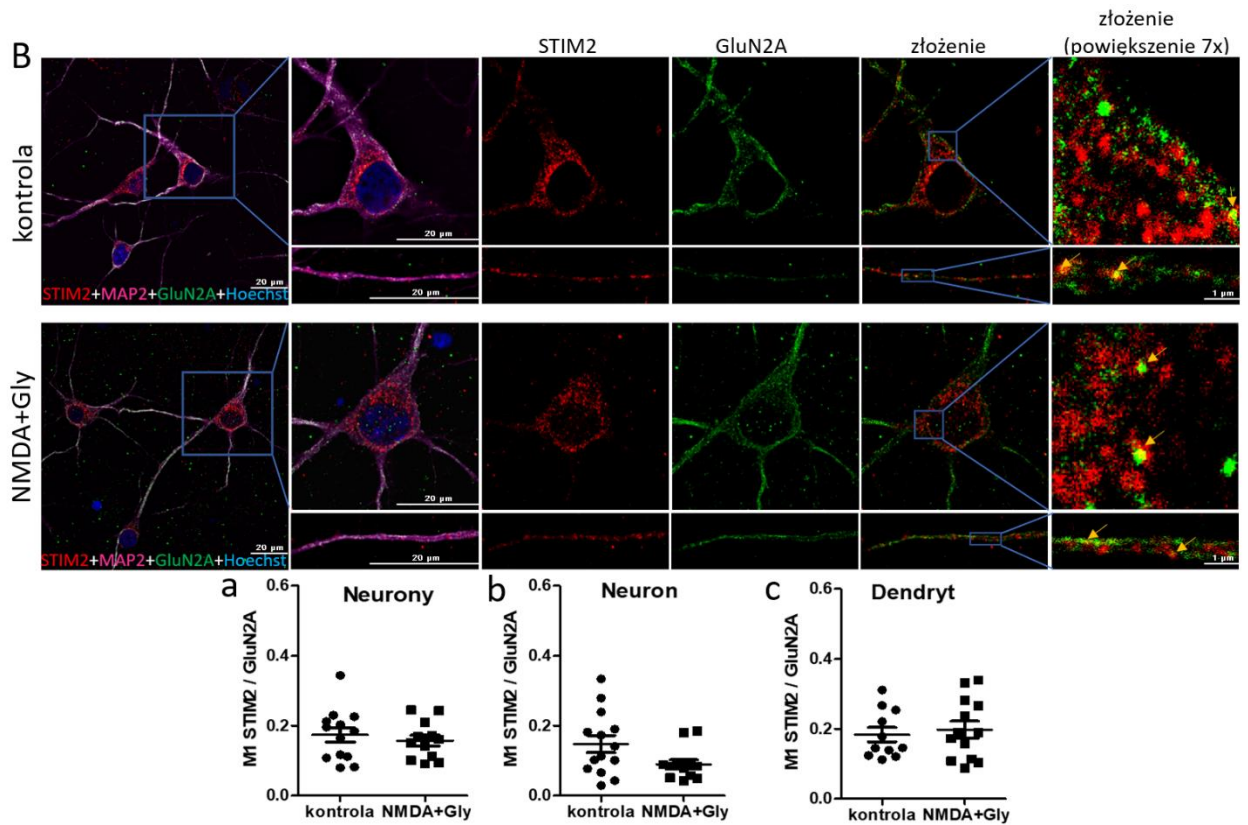
W celu potwierdzenia uzyskanych wyżej wyników wykonywano barwienia immunofluorescencyjne, w których porównywano stopień kolokalizacji białka STIM2 z GluN2A i GluN2B w neuronach kontrolnych oraz neuronach traktowanych NMDA i glicyną (Rycina 13). Analiza obrazów mikroskopowych wykazała, że w warunkach kontrolnych STIM2 w niewielkim stopniu kolokalizuje z GluN2A i GluN2B, co potwierdza występowanie kompleksów STIM2-GluN2A i STIM2-GluN2B już w warunkach kontrolnych (Rycina 13A, B).

Co więcej, po wywołaniu endocytozy NMDAR wartość współczynnika kolokalizacji M1 dla STIM2 i GluN2B wzrosła o 27,6% z $0,29 \pm 0,02$ do $0,37 \pm 0,03$ ($p = 0,0223$) (Rycina

13Aa), co świadczy o zwiększeniu oddziaływań między tymi białkami oraz potwierdza wyniki uzyskane metodą koimmunoprecypitacji białek. Ponadto różnicę obserwowano w ciele komórkowym (wzrost z $0,22 \pm 0,01$ do $0,35 \pm 0,03$, $p = 0,0007$) (Rycina 13Ab), lecz nie w dendrytach (Rycina 13Ac). Analiza koimmunoprecypitacji białek oraz barwienia immunofluorescencyjnego jednoznacznie wykazała zatem, że krótkotrwała silna aktywacja NMDAR zwiększa oddziaływania STIM2 z GluN2B.

Nie obserwowano natomiast zwiększonej kolokalizacji STIM2 i GluN2A w warunkach endocytozy NMDAR (brak zmian wartości współczynnika M1, Rycina 13B), co uwidoczniło metodą koimmunoprecypitacji białek. Rozbieżność ta może wynikać z zastosowania różnych detergentów (1% NP-40 w koimmunoprecypitacji oraz 0,05% saponina w barwieniach immunofluorescencyjnych) i przeciwciał wiążących się z różnymi epitopami.





Rycina 13. Krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR zwiększa kolokalizację STIM2 z GluN2B i nie wpływa na kolokalizację STIM2 z GluN2A. (A, B) Reprezentatywne barwienia immunofluorescencyjne oraz wykresy prezentujące stopień kolokalizacji określony przy pomocy współczynnika kolokalizacji Mandersa (M1) białka STIM2 i podjednostek NMDAR (GluN2A, GluN2B) dla neuronów kontrolnych i neuronów traktowanych 50 μ M NMDA i 100 μ M glicyną przez 15 minut. Komórki barwiono przeciwciałami anti-STIM2 (czerwony), anti-GluN2A/GluN2B (zielony), anti-MAP2 (różowy) oraz barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst, który wybarwia jądra komórkowe (niebieski). W celu identyfikacji neuronów wykonywano barwienia swoistego markera neuronalnego – MAP2. W przedostatniej kolumnie przedstawiono złożenie barwienia STIM2 z barwieniem (A) GluN2B lub (B) GluN2A a w ostatniej jego 7-krotne powiększenie. Strzałkami zaznaczono miejsca kolokalizacji STIM2 z GluN2A lub GluN2B. Wszystkie zdjęcia zostały wykonane przy użyciu mikroskopu konfokalnego, pochodzą z pojedynczej płaszczyzny optycznej, przechodzącej przez środek jądra komórkowego i zostały poddane dekonwolucji. Skala: 20 μ m i 1 μ m. Współczynnik M1 obliczano z (a) kilku neuronów (Neurony), (b) pojedynczego neuronu (Neuron) i (c) dendrytu (Dendryt). Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech do czterech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną określano za pomocą niesparowanego testu t-Student; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

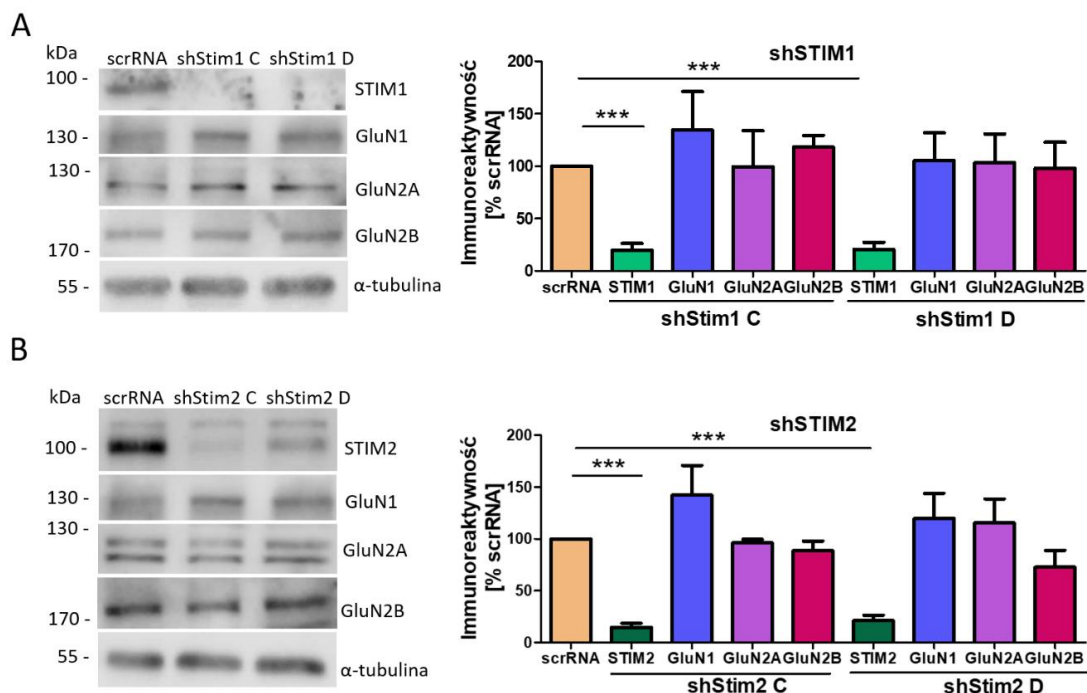
4.3 Wpływ białek STIM na proces endocytozy NMDAR

W warunkach endocytozy NMDAR zwiększały się oddziaływania białka STIM2 z NMDAR, dlatego też w kolejnym etapie pracy badano wpływ wyciszenia ekspresji genu *Stim2* na ten proces. Dodatkowo sprawdzano również efekt wyciszenia genu *Stim1*.

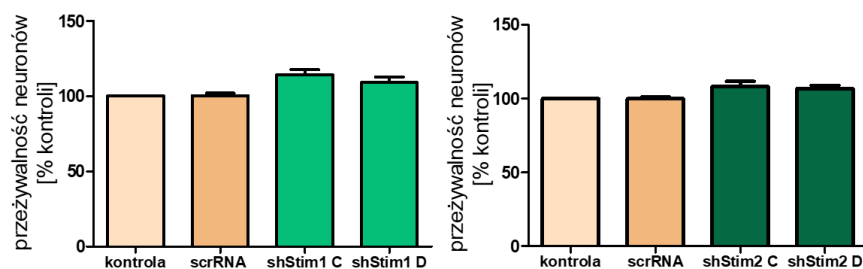
4.3.1 Oznaczanie immunoreaktywności GluN1, GluN2A, GluN2B w lizatach komórkowych

W pierwszej kolejności zbadano wpływ wyciszenia ekspresji genów kodujących białka STIM na zawartość poszczególnych podjednostek NMDAR w lizatach komórkowych. Aby wyciszyć białka STIM neurony transdukowano wektorami lentiwirusowymi zawierającymi konstrukty shRNA skierowane przeciwko mRNA dla STIM1 (shStim1 C i shStim1 D) lub STIM2 (shStim2 C i shStim2 D). Wyniki przeliczano względem neuronów transdukowanych wektorem lentiwirusowym zawierającym konstrukt shRNA o sekwencji niehomologicznej do żadnego z poznanych genów (scrRNA). Skuteczność wyciszenia ekspresji genów *Stim1* i *Stim2* sprawdzano na poziomie białka, przy pomocy techniki western blot (Rycina 14). Konstrukty shStim1 C i shStim1 D obniżały poziom białka STIM1 w lizatach komórkowych odpowiednio o $80,23\% \pm 7,66\%$ ($p = 0,0001$) i $79,58\% \pm 8,13\%$ ($p = 0,0002$), a shStim2 C i shStim2 D obniżały poziom białka STIM2 o $85,31\% \pm 5,70\%$ ($p < 0,0001$) i $78,89\% \pm 7,72\%$ ($p < 0,0001$). Oba białka STIM zostały zatem wyciszone z wysoką skutecznością. Dodatkowo wyciszenie ekspresji genów *Stim1* i *Stim2* nie wpływało na poziom badanych podjednostek NMDAR w lizatach komórkowych (Rycina 14).

Równolegle badano również wpływ transdukcji lentiwirusowej i wyciszenia ekspresji genów kodujących białka STIM na żywotność neuronów *in vitro*. W tym celu porównywano uwalnianie LDH przez komórki typu dzikiego (kontrola), komórki transdukowane wirusem kontrolnym (scrRNA) i komórki transdukowane wirusem wyciszającym ekspresję genu *Stim1* lub *Stim2* (Rycina 15). Analiza otrzymanych wyników wykazała, że ani transdukcja lentiwirusami, ani wyciszenie ekspresji genów *Stim1* i *Stim2* nie wpływały na żywotność neuronów w badanym modelu eksperymentalnym.



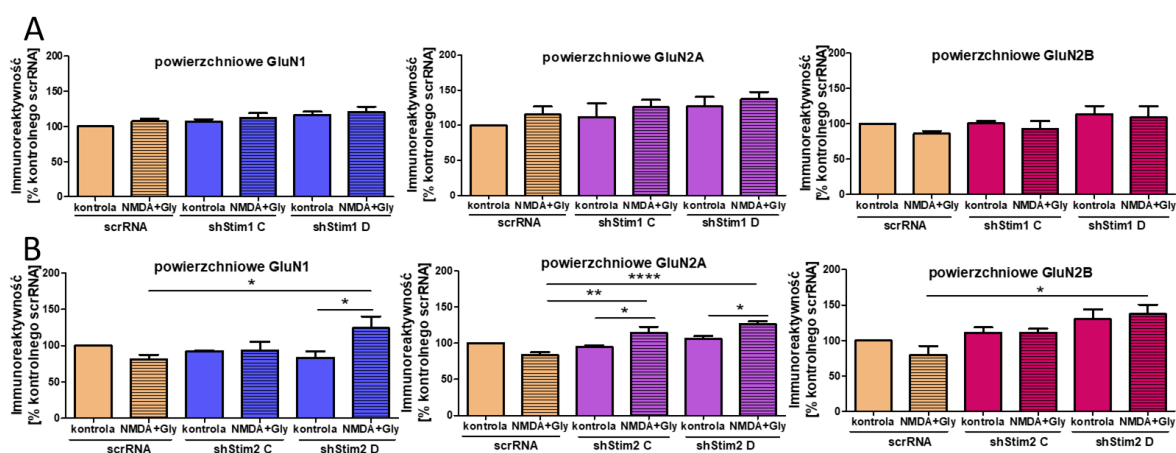
Rycina 14. Wyciszenie ekspresji genu *Stim1* lub *Stim2* nie wpływa na immunoreaktywność GluN1, GluN2A i GluN2B w lizatach komórkowych. (A, B) Reprezentatywne obrazy western blot oraz analiza densytometryczna immunoreaktywności podjednostek NMDAR (GluN1, GluN2A, GluN2B) oraz białek STIM w lizatach komórkowych izolowanych z neuronów transdukowanych wirusem kontrolnym (scrRNA), wirusem wyciszającym ekspresję genu *Stim1* (shStim1 C, shStim1 D) lub wirusem wyciszającym ekspresję genu *Stim2* (shStim2 C, shStim2 D). Wyniki przeliczono na całkowitą ilość białka określaną przy pomocy barwienia Ponceau S (Materiały i metody, 3.6.7), normalizowano względem neuronów transdukowanych wirusem kontrolnym (scrRNA) i przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech do czterech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną określano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem *post hoc* Tukeya; *** $p < 0,001$.



Rycina 15. Transdukcja lentiwirusowa i wyciszenie ekspresji genu *Stim1* lub *Stim2* nie wpływają na żywotność neuronów *in vitro*. Wykresy przedstawiające uwalnianie LDH z neuronów typu dzikiego (kontrola), neuronów transdukowanych wirusem kontrolnym (scrRNA), neuronów transdukowanych wirusem wyciszającym ekspresję genu *Stim1* (shStim1 C, shStim1 D) lub wirusem wyciszającym ekspresję genu *Stim2* (shStim2 C, shStim2 D). Wyniki normalizowano względem neuronów typu dzikiego (kontrola) i przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM z pięciu do sześciu niezależnych powtórzeń biologicznych.

4.3.2 Oznaczanie immunoreaktywności GluN1, GluN2A, GluN2B w błonie komórkowej

Wpływ wyciszenia ekspresji genów *Stim1* i *Stim2* na immunoreaktywność NMDAR w błonie komórkowej w warunkach endocytozy NMDAR określano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA. Do oznaczania immunoreaktywności podjednostek NMDAR znajdujących się w błonie komórkowej używano przeciwciał wykrywających epitopy zlokalizowane w N-końcowej, zewnątrzkomórkowej domenie receptora, pomijając etap permabilizacji błony komórkowej. Jak pokazano na Rycinie 16B, krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR w neuronach transdukowanych wirusem kontrolnym (scrRNA) wydaje się obniżać poziom powierzchniowych GluN1, GluN2A i GluN2B odpowiednio do $81,01\% \pm 6,43\%$ ($p = 0,0690$), $83,61\% \pm 3,88\%$ ($p = 0,0782$) i $79,36\% \pm 12,70\%$ ($p = 0,0884$), jednak nie osiągając istotności statystycznej. Otrzymane tendencje spadkowe są zgodne z wynikami uzyskanymi dla komórek typu dzikiego (Rycina 8) i mogą sugerować internalizację NMDAR. Wyciszenie ekspresji genu *Stim1* nie wpływało na poziom podjednostek NMDAR na błonie komórkowej w warunkach endocytozy receptora (Rycina 16A). W neuronach po wyciszeniu ekspresji genu *Stim2* poziom powierzchniowych GluN1 i GluN2B nie zmieniał się (shStim2 C), natomiast poziom powierzchniowych GluN2A (shStim2 C) oraz GluN1, GluN2A i GluN2B (shStim2 D) wzrastał odpowiednio do $113,9\% \pm 8,58\%$ ($p = 0,0023$), $124,0\% \pm 15,99\%$ ($p = 0,0383$), $126,8\% \pm 3,38\%$ ($p = 0,0001$) i $137,5\% \pm 13,09\%$ ($p = 0,0270$) (Rycina 16B). Wyniki te sugerują, że wyciszenie ekspresji genu kodującego białko STIM2, ale nie STIM1, hamuje internalizację NMDAR po krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR.

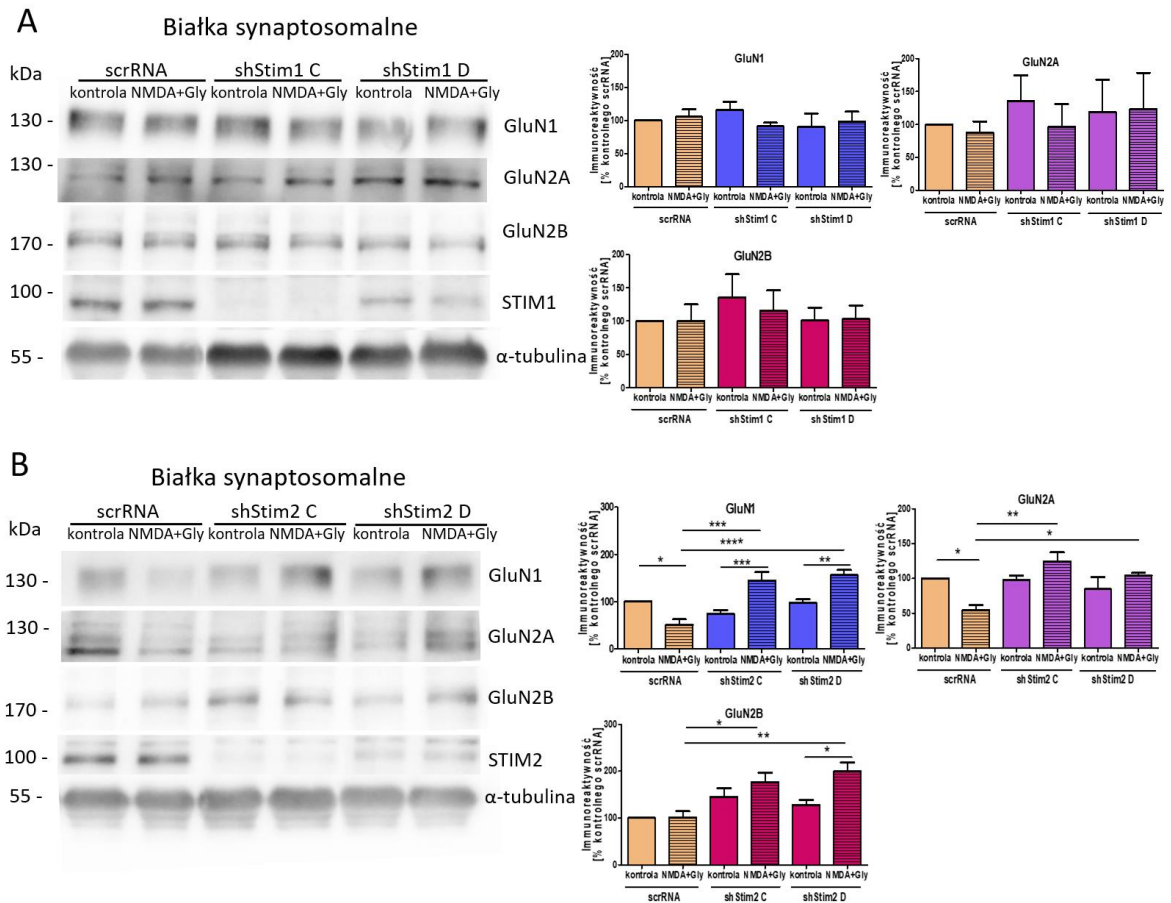


Rycina 16. Wyciszenie ekspresji genu *Stim2* (ale nie *Stim1*) hamuje internalizację GluN1, GluN2A i GluN2B z błony komórkowej po krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR. (A, B) Wykresy prezentujące immunoreaktywność GluN1, GluN2A i GluN2B w błonie komórkowej neuronów kontrolnych i neuronów traktowanych 50 μ M NMDA i 100 μ M glicyną przez 15 minut, transdukowanych wirusem kontrolnym (scrRNA), wirusem wyciszającym ekspresję genu *Stim1* (shStim1 C, shStim1 D) lub wirusem wyciszającym ekspresję genu *Stim2* (shStim2 C, shStim2 D). Powierzchniowe GluN1, GluN2A i GluN2B oznaczano przy użyciu przeciwciał wykrywających ich N-końców, zewnątrzkomórkowe fragmenty, korzystając z techniki ELISA. Wyniki normalizowano względem neuronów transdukowanych wirusem kontrolnym (scrRNA) i przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech do siedmiu niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną określano za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem *post hoc* Tukeya; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.3.3 Oznaczanie immunoreaktywności GluN1, GluN2A, GluN2B w synaptosomach

W kolejnym etapie badań, korzystając z techniki western blot, sprawdzano wpływ wyciszenia ekspresji genów *Stim1* i *Stim2* na immunoreaktywność NMDAR w synaptosomach w warunkach endocytozy tego receptora. W tym celu izolowano białka synaptosomalne z neuronów kontrolnych i neuronów traktowanych NMDA i glicyną, transdukowanych wirusem kontrolnym (scrRNA), wirusem wyciszającym ekspresję genu *Stim1* (shStim1 C, shStim1 D) lub *Stim2* (shStim2 C, shStim2 D). Zaobserwowano, że krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR w komórkach transdukowanych scrRNA skutkowała zmniejszeniem immunoreaktywności GluN1 i GluN2A odpowiednio do $50,43\% \pm 12,19\%$ ($p = 0,0399$) i $54,38\% \pm 7,76\%$ ($p = 0,0178$) (Rycina 17B), co jest zgodne z wynikami otrzymanymi dla komórek typu dzikiego (Rycina 9). Natomiast poziom GluN2B pozostawał niezmienny (Rycina 17B). Wyciszenie ekspresji genu *Stim1* nie wpływało na immunoreaktywność GluN1, GluN2A, GluN2B w synaptosomach (Rycina 17A). Natomiast wyciszenie ekspresji genu *Stim2* hamowało internalizację NMDAR wywołaną krótkotrwałą, silną aktywacją tego receptora

i dodatkowo zwiększało poziom GluN1, GluN2A oraz GluN2B w synaptosomach do $144,73\% \pm 17,82\%$, ($p = 0,0009$); $124,48\% \pm 13,08\%$, ($p = 0,0078$) i $176,36\% \pm 20,34\%$, ($p = 0,0366$) dla shStim2 C oraz $156,21\% \pm 10,90\%$, ($p = 0,0001$), $104,22\% \pm 2,69\%$, ($p = 0,0288$) i $199,67\% \pm 22,96\%$, ($p = 0,0088$) dla shStim2 D. Analiza uzyskanych wyników wskazuje na to, że wyciszenie ekspresji genu *Stim2*, ale nie *Stim1*, może hamować internalizację GluN2A-NMDAR i GluN2B-NMDAR z synaptosomów.



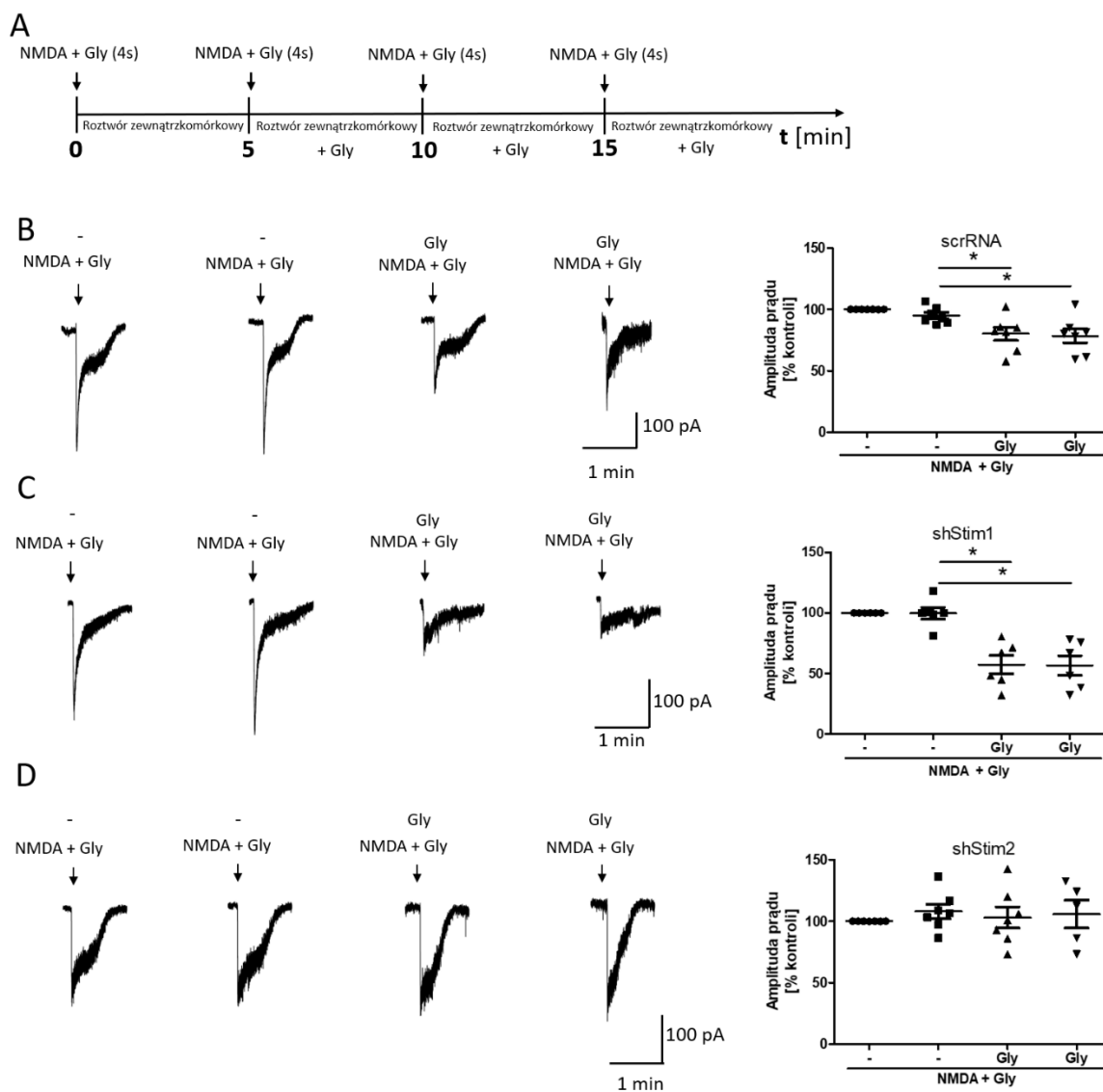
Rycina 17. Wyciszenie ekspresji genu *Stim2* (ale nie *Stim1*) hamuje internalizację GluN1, GluN2A i GluN2B z synaptosomów po krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR. (A, B) Reprezentatywne obrazy western blot oraz analiza densytometryczna immunoreaktywności podjednostek NMDAR (GluN1, GluN2A, GluN2B) i białek STIM we frakcji białek synaptosomalnych izolowanej z neuronów kontrolnych i neuronów traktowanych 50 μ M NMDA i 100 μ M glicyną przez 15 minut, transdukowanych wirusem kontrolnym (scrRNA), wirusem wyciszającym ekspresję genu *Stim1* (shStim1 C, shStim1 D) lub wirusem wyciszającym ekspresję genu *Stim2* (shStim2 C, shStim2 D). Wyniki przeliczono na całkowitą ilość białka określaną przy pomocy barwienia Ponceau S (Materiały i metody, 3.6.7), normalizowano względem neuronów transdukowanych wirusem kontrolnym (scrRNA) i przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech do czterech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczną określano za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem *post hoc* Tukeya; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.4 Pomiar całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR

Aby zbadać efekt funkcjonalny wyciszenia ekspresji genów kodujących białka STIM mierzono całkowity prąd jonowy płynący przez NMDAR w wyniku krótkotrwałej, silnej aktywacji tego receptora w neuronach transdukowanych wirusem kontrolnym (scrRNA), neuronach transdukowanych wirusem wyciszającym ekspresję genu *Stim1* (shStim1 D) lub wirusem wyciszającym ekspresję genu *Stim2* (shStim2 D).

Zgodnie z wynikami uzyskanymi dla neuronów typu dzikiego (Rycina 11), w przypadku neuronów transdukowanych scrRNA, kolejne podanie NMDA i glicyny nie obniżało amplitudy całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR ($t = 0$ min, $t = 5$ min) (Rycina 18). Jeżeli jednak podanie NMDA i glicyny było poprzedzone 5-minutową inkubacją komórek w roztworze z glicyną, skutkowało to obniżeniem amplitudy całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR do $70,49\% \pm 7,31\%$ ($p = 0,0306$), (Rycina 18B, $t = 10$ min) w stosunku do wartości początkowej. Podobny rezultat obserwowano również po kolejnym podaniu NMDA i glicyny (Rycina 18B, $t = 15$ min). Wynik ten potwierdza występowanie endocytozy NMDAR w neuronach transdukowanych scrRNA. Fakt, że różnica uzyskana dla komórek transdukowanych scrRNA była mniejsza niż dla komórek typu dzikiego, może świadczyć o tym, że transdukcja lentiwirusami w niewielkim stopniu wpływa na endocytozę NMDAR. Dlatego też, wyniki uzyskane po krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR neuronów transdukowanych wirusem wyciszającym ekspresję genu *Stim1* lub *Stim2* porównywano z wynikami uzyskanymi dla neuronów transdukowanych scrRNA (a nie neuronów typu dzikiego).

Po wyciszeniu ekspresji genu *Stim2*, kolejne podawanie NMDA i glicyny nie powodowało obniżenia amplitudy prądu jonowego płynącego przez NMDAR ($t = 0$ min, $t = 5$ min) (Rycina 18D). Jeżeli podanie NMDA i glicyny było poprzedzone wcześniejszą, 5-minutową inkubacją komórek w roztworze z glicyną, to w odróżnieniu od neuronów typu dzikiego, neuronów transdukowanych scrRNA i neuronów transdukowanych shStim1, amplituda całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR nie ulegała zmianie (Rycina 18D, $t = 10$ min, $t = 15$ min). Wyniki te sugerują, że STIM2, w przeciwieństwie do STIM1, może regulować wartość całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR, wpływając na endocytozę tego receptora.



Rycina 18. Wyciszenie ekspresji genu *Stim2* nie powoduje obniżenia amplitudy całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR w warunkach endocytozy tego receptora. (A) Schemat eksperymentu whole-cell patch clamp. **(B, C, D)** Reprezentatywne przebiegi całkowitego prądu jonowego NMDAR zarejestrowane dla pojedynczych komórek oraz wykresy przedstawiające znormalizowaną amplitudę tego prądu w **(B)** neuronach transdukowanych wirusem kontrolnym (scrRNA), **(C)** wirusem wyciszającym ekspresję genu *Stim1* lub **(D)** wirusem wyciszającym ekspresję genu *Stim2*, 4-krotnie traktowanych 50 μ M NMDA i 100 μ M glicyną (NMDA + Gly) przez 4 sekundy, płukanych uprzednio roztworem zewnątrzkomórkowym lub roztworem zewnątrzkomórkowym z dodatkiem 100 μ M glicyny. Amplitudy prądów jonowych NMDAR normalizowane były do wartości szczytowej prądu uzyskanej w wyniku pierwszego podania NMDA i glicyny dla danej komórki. Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, z 6-7 komórek dla każdej grupy. Istotność statystyczną określano za pomocą niesparowanego testu t-Studenta; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

5 Dyskusja

Zgodnie z hipotezą ekscytotoksyczności w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych kluczową rolę odgrywa podwyższony poziom glutaminianu w przestrzeni pozakomórkowej, którego skutkiem jest przedłużona depolaryzacja błony komórkowej neuronów i nadmierne pobudzenie jonotropowych receptorów glutaminianergiczných. Rezultatem jest niekontrolowany napływ Ca^{2+} , który prowadzi do zaburzenia transdukcji wapniowych sygnałów komórkowych i śmierci neuronów. Do uszkodzenia komórek nerwowych dochodzi głównie za pośrednictwem NMDAR, które charakteryzują się wysoką przepuszczalnością dla jonów wapnia i powolną dezaktywacją. Obecnie postuluje się, że białka, które mogłyby bezpośrednio oddziaływać z nadmiernie aktywowanymi NMDAR i ograniczać napływ Ca^{2+} do neuronów mogłyby w przyszłości stanowić potencjalny punkt uchwytu leków stosowanych w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Jednymi z takich białek mogłyby być białka STIM. W badaniach przeprowadzonych przez dr. hab. Joannę Gruszczynską-Biegała na neuronach kory mózgu szczura *in vitro* wykazano bowiem występowanie bezpośrednich oddziaływań białek STIM i NMDAR oraz pokazano, że inhibitory SOCE oraz wyciszenie ekspresji genów *Stim1* i *Stim2* zwiększają napływ Ca^{2+} przez NMDAR, natomiast nadekspresja tych genów zmniejsza napływ Ca^{2+} przez te receptory [Gruszczynska-Biegala i wsp., 2020]. Ze względu na brak dostatecznej wiedzy na temat mechanizmu, za pomocą którego białka STIM mogłyby ograniczać napływ Ca^{2+} przez NMDAR, celem niniejszej pracy była weryfikacja hipotezy badawczej o roli białek STIM w procesie endocytozy NMDAR, będącym jednym z głównych mechanizmów regulujących ilość NMDAR w błonie komórkowej. Zakłada ona, że rola białek STIM może być związana ze zwiększaniem endocytozy NMDAR, co skutkowałoby ograniczonym napływem Ca^{2+} przez te receptory. Dlatego w niniejszej pracy skupiono się na zbadaniu endocytozy NMDAR i jej wpływu na oddziaływania białek STIM z NMDAR, a także na sprawdzeniu, czy i w jaki sposób wyciszenie ekspresji genów *Stim1* i *Stim2* wpływa na ten proces. Badania przeprowadzone zostały w modelu *in vitro* na pierwotnych hodowlach neuronów kory mózgu szczura. Doświadczenia zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej dowodzą, że spośród dwóch badanych homologów białek STIM, jedynie STIM2 może bezpośrednio regulować endocytozę NMDAR wywołaną krótkotrwałą, silną aktywacją tych receptorów.

5.1 Endocytoza NMDAR

Występowanie endocytozy NMDAR w odpowiedzi na działanie jego endogennych agonistów zostało po raz pierwszy opisane przez Westbrook i współpracowników na początku XXI wieku [Vissel i wsp., 2001]. W badaniach tych wykazano, że w wyniku wielokrotnego podawania 1 mM glutaminianu i 100 μ M glicyny wartość całkowitego prądu jonowego płynącego przez GluN2A-NMDAR maleje. Takie warunki traktowania komórek prowadzą do defosforylacji tyrozyny w miejscu 842 (Tyr842) w GluN2A, która umożliwia przyłączenie białka adaptorowego AP2 do NMDAR i aktywuje endocytozę zależną od klatryny [Vissel i wsp., 2001]. Podobne wyniki uzyskano w innych pracach, w których pokazano, że krótkotrwałe (5–30-minutowe) traktowanie neuronów korowych i hipokampalnych 50-1000 μ M NMDA i 10-100 μ M glicyną prowadzi do endocytozy NMDAR w tym samym mechanizmie [Nong i wsp., 2003; Fang, 2011]. Dodatkowo kolejne badania wykazały, że zastosowanie glicyny lub D-seryny przed podaniem NMDA i glicyny sprzyja endocytozie NMDAR [Nong i wsp., 2003; Han i wsp., 2013; Cappelli i wsp., 2022]. Han i współpracownicy udowodnili ponadto, że endocytoza ta dotyczy zarówno GluN2A-NMDAR, jak i GluN2B-NMDAR [Han i wsp., 2013].

Wyniki przedstawione w ramach niniejszej pracy potwierdzają, że krótkotrwała (15-minutowa), silna (50 μ M NMDA i 100 μ M glicyna) aktywacja NMDAR w neuronach kory mózgu szczura *in vitro* prowadzi do endocytozy GluN2A-NMDAR oraz GluN2B-NMDAR. Występowanie tego procesu udowodniono wykazując: (i) obniżenie immunoreaktywności podjednostek NMDAR (GluN1, GluN2A i GluN2B) w błonie komórkowej i synaptosomach (str. 56-57, Rycina 8 i 9), co zbadano przy pomocy biotynylacji białek powierzchniowych i wyizolowania białek synaptosomalnych oraz techniki western blot, (ii) zwiększenie kolokalizacji GluN1, GluN2A i GluN2B z białkiem markerowym wczesnych endosomów (EEA1) (str. 59-60, Rycina 10), co pokazano przy pomocy barwień immunofluorescencyjnych, a także (iii) obniżenie amplitudy całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR (str. 62, Rycina 11), co wykazano przy pomocy techniki whole-cell patch clamp. W technice whole-cell patch clamp, w odróżnieniu od metod biochemicznych endocytozę NMDAR wywoływano stosując 4-sekundowe podania 50 μ M NMDA i 100 μ M glicyny poprzedzone 5-minutową inkubacją ze 100 μ M glicyną. Zastosowanie nieco innych protokołów aktywacji endocytozy NMDAR w metodach biochemicznych i metodzie elektrofizjologicznej podyktowane było tym, że technika whole-cell patch clamp, w przeciwieństwie do zastosowanych metod

biochemicznych, jest czuła na desensytyzację NMDAR. Protokół dobrano zatem w taki sposób, aby zminimalizować występowanie tego zjawiska.

W niniejszej rozprawie pokazano, że stopień internalizacji NMDAR z błony komórkowej jest większy niż z synaptosomów. W związku z powyższym można postulować, że w wybranych warunkach eksperymentalnych endocytozie ulegają zarówno synaptyczne, jak i pozasynaptyczne NMDAR (str. 56 i 57, Rycina 8 i 9). Obserwacja ta jest zbieżna z wcześniejszymi badaniami prowadzonymi na szczurzych neuronach hipokampalnych *in vitro*, które pokazały, że w wyniku krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR dochodzi do endocytozy zarówno synaptycznych, jak i pozasynaptycznych NMDAR [Nong i wsp., 2003]. Co więcej, jak wspomniano we wstępie, przyłączenie glicyny w miejscu wiązania liganda endogennego w GluN1 prowadzi do zmian konformacyjnych NMDAR umożliwiających przyłączenie AP2 i zainicjowanie endocytozy zależnej od klatryny [Nong i wsp., 2003, 2004]. Dlatego zastosowanie kompetycyjnych antagonistów miejsca wiązania glicyny, takich jak MDL29951 lub L689560, uniemożliwia przyłączenie AP2 i rozpoczęcie procesu endocytozy NMDAR. Zablockowanie endocytozy NMDAR wywołanej krótkotrwałą, silną aktywacją NMDAR poprzez zastosowanie MDL29951 potwierdzono również w niniejszej pracy (str. 62, Rycina 11). Ponieważ MDL29951 blokuje zależną od klatryny endocytozę NMDAR, możemy przypuszczać, że w naszych warunkach eksperymentalnych endocytoza zachodzi w tym mechanizmie. Aby jednak potwierdzić te przypuszczenia, należałoby przeprowadzić dalsze badania w tym zakresie. Interesującym byłoby sprawdzenie fosforylacji tyrozyny w miejscu 1472 (Tyr1472) w podjednostce GluN2B. Zwiększona fosforylacja Tyr1472 prowadzi bowiem do stabilizacji GluN2B-NMDAR w błonie postsynaptycznej i tym samym uniemożliwia przyłączenie AP2 i zapoczątkowanie zależnej od klatryny endocytozy NMDAR [Schweitzer i wsp., 2017; Wu i wsp., 2017].

Warto również wspomnieć, że wybrane warunki krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR nie powodowały zwiększonej śmiertelności komórek, o czym świadczy brak zmian w uwalnianiu LDH (str. 56, Rycina 7). Ponadto, brak obniżenia immunoreaktywności GluN1 i GluN2B w lizatach komórkowych może wskazywać na to, że w wybranych warunkach eksperymentalnych nie dochodziło również do degradacji GluN2B-NMDAR (str. 56, Rycina 8). Jedynie w przypadku GluN2A wykazano obniżenie immunoreaktywności w lizatach, jednak różnica ta była mniejsza niż stopień internalizacji GluN2A-NMDAR z błony komórkowej i synaptosomów. Obserwacja ta może sugerować, że niektóre z endocytowanych

GluN2A-NMDAR uległy degradacji. Nie jest to jednak wynik zaskakujący, gdyż zgodnie z obecnym stanem wiedzy GluN2A-NMDAR z wczesnych endosomów kierowane są do endosomów późnych i lizosomów, gdzie ulegają degradacji [Vieira i wsp., 2020].

5.2 Wpływ endocytozy NMDAR na lokalizację białek STIM w błonie komórkowej i synaptosomach

Ponieważ nasza hipoteza badawcza zakładała, że białka STIM mogą bezpośrednio oddziaływać ze znajdującymi się w błonie komórkowej i synaptosomach NMDAR oraz zwiększać ich endocytozę w czasie krótkotrwałej, silnej aktywacji tych receptorów, w niniejszej pracy badano również wpływ endocytozy NMDAR na lokalizację białek STIM. Biotynylacja białek powierzchniowych i izolacja białek synaptosomalnych oraz analiza tych frakcji przy pomocy techniki western blot wykazały obecność obu homologów białek STIM we frakcji błony komórkowej oraz frakcji synaptosomalnej (str. 56 i 57, Rycina 8 i 9).

Występowanie STIM1 w błonie komórkowej zostało opisane we wcześniejszych pracach, zarówno w komórkach niebudliwych [Spasova i wsp., 2006; Hewavitharana i wsp., 2008; Thompson i Shuttleworth, 2013], jak i pobudliwych takich jak sznurce neurony korowe i hipokampalne [Keil i wsp., 2010]. Ze względu na motyw retencyjny KKXX w domenie C-końcowej [Soboloff i wsp., 2006], lokalizacja białka STIM2 ograniczona jest prawdopodobnie jedynie do ER. Zidentyfikowano co prawda białko preSTIM2 o lokalizacji cytoplazmatycznej, które może łączyć się z wewnętrzną częścią dwuwarstwy fosfolipidowej błony komórkowej, jednak nie jest to białko wbudowane w błonę komórkową [Graham i wsp., 2011]. Obecność STIM2 we frakcji białek powierzchniowych może zatem wynikać z faktu, że białko to jest związane z błoną komórkową. Chociaż metoda biotynylacji białek powierzchniowych zakładała izolację białek wbudowanych w błonę komórkową, we frakcji białek powierzchniowych zidentyfikowano także niewielkie ilości α -tubuliny, będącej białkiem cytoszkieletu, które również łączy się z błoną komórkową (str. 56, Rycina 8) [Wolff, 2009]. Uzyskane wyniki wskazują zatem, że frakcja ta poza białkami wbudowanymi w błonę komórkową prawdopodobnie zawierała również białka związane z błoną komórkową.

We wcześniejszych pracach wykazano występowanie białek STIM zarówno w kolcach dendrytycznych [Korkotian i wsp., 2017; Zhang i wsp., 2016; Garcia-Alvarez i wsp., 2015; Pchitskaya i wsp., 2017; Wu i wsp., 2018; Sun i wsp., 2014; Dittmer i wsp., 2017], jak i w zakończeniach aksonalnych sznurczych i mysich neuronów hipokampa i prądkowia

[Chanaday i wsp., 2021; Juan-Sanz i wsp., 2017]. Znajdujące się w kolcach dendrytycznych białka STIM aktywując SOCE, utrzymują stały poziom kompleksów $\text{Ca}^{2+}/\text{CaMKII}$ i stabilizują kolce dendrytyczne [Zhang i wsp., 2016]. Natomiast białka STIM zlokalizowane w zakończeniach aksonalnych, poprzez aktywację SOCE, mogą uczestniczyć w spontanicznym uwalnianiu glutaminianu do szczeliny synaptycznej [Chanaday i wsp., 2021]. Wykazana w niniejszej rozprawie obecność białek STIM w synaptosomach (str. 57, Rycina 9) jest zatem zgodna z danymi literaturowymi.

Wyniki przedstawione w ramach niniejszej pracy po raz pierwszy pokazały, że wskutek krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR, dochodzi do obniżenia immunoreaktywności STIM1 w synaptosomach, chociaż immunoreaktywność tego białka w błonie komórkowej i lizatach komórkowych nie zmienia się (str. 56 i 57, Rycina 8 i 9). Zaobserwowane zmiany mogą świadczyć o przemieszczeniu się STIM1 z obszarów synaptycznych do obszarów pozasynaptycznych. Hipoteza ta wymaga jednak dalszej weryfikacji. Nie obserwowano natomiast wpływu krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR na immunoreaktywność STIM2 w błonie komórkowej, synaptosomach ani lizatach komórkowych. Wynik ten może wskazywać na to, że krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR nie wpływa na lokalizację STIM2.

5.3 Oddziaływania białek STIM i NMDAR

Większość dotychczasowych badań dotyczących oddziaływań STIM i NMDAR, skupiała się głównie na zależnościach funkcjonalnych, związanych z regulacją homeostazy Ca^{2+} w ER. W badaniach tych pokazano, że depolaryzacja neuronów piramidowych hipokampa powoduje napływ Ca^{2+} przez NMDAR i VGCC typu L, co skutkuje obniżeniem stężenia Ca^{2+} w ER, oligomeryzacją i translokacją STIM1 do połączeń ER z błoną komórkową oraz aktywacją SOCE [Simpson i wsp., 1995; Emptage, 1999; Baba i wsp., 2003; Dittmer i wsp., 2017]. Co więcej, obecnie wiadomo również, że inhibitory SOCE hamują napływ Ca^{2+} przez NMDAR oraz LTP w szczurzych neuronach piramidowych hipokampa [Baba i wsp., 2003]. Z kolei antagoniści NMDAR osłabiają SOCE w neuronach kory mózgu szczura [Gruszczynska-Biegała i wsp., 2020]. STIM2 odgrywa również istotną rolę w aktywowanym przez NMDA LTD [Yap i wsp., 2017]. Dodatkowo w innej pracy pokazano również, że w neuronach kory mózgu szczura *in vitro* inhibitory SOCE oraz wyciszenie ekspresji genów kodujących białka STIM zwiększają napływ Ca^{2+} przez NMDAR, podczas gdy nadekspresja tych genów zmniejsza napływ Ca^{2+} przez NMDAR [Gruszczynska-Biegała i wsp., 2020]. Dane

te sugerują, że w neuronach kory mózgu szczura białka STIM mogą zmniejszać napływ Ca^{2+} przez NMDAR.

Występowanie bezpośrednich oddziaływań białek STIM i NMDAR zaobserwowano po raz pierwszy w pierwotnych hodowlach neuronów kory mózgu szczura *in vitro* [Gruszczynska-Biegała i wsp., 2020]. Oddziaływania te miały charakter dynamiczny i zmieniały się w wyniku aktywacji SOCE. W niniejszej pracy, przy pomocy koimmunoprecypitacji białek oraz barwień immunofluorescencyjnych potwierdzono występowanie fizycznych interakcji STIM2 z GluN2A i GluN2B w ciele komórkowym i dendrytach, chociaż były one niewielkie. Nie obserwowano natomiast bezpośrednich oddziaływań STIM1 z GluN2A ani GluN2B. Ponadto w tej rozprawie po raz pierwszy opisano jak krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR prowadząca do endocytozy NMDAR wpływa na oddziaływania białek STIM z NMDAR. Chociaż endocytoza NMDAR nie wpływała na tworzenie się kompleksów STIM1 z GluN2A ani GluN2B, skutkowałą zwiększeniem oddziaływań STIM2 z GluN2B w ciele komórkowym, ale nie w dendrytach (str. 64-66; Rycina 12 i 13). Natomiast wyniki uzyskane dla kompleksu STIM2-GluN2A były niejednoznaczne. Metodą koimmunoprecypitacji białek wykazano zwiększenie bezpośrednich oddziaływań STIM2 z GluN2A w warunkach endocytozy NMDAR, w barwieniach immunofluorescencyjnych nie obserwowano jednak zwiększonej kolokalizacji tych białek. Rozbieżność ta może wynikać ze stosowania przeciwciał wiążących się z różnymi epitopami i/lub różnych detergentów (1% NP-40 w koimmunoprecypitacji oraz 0,05% saponiny w barwieniach immunofluorescencyjnych). Do badania koimmunoprecypitacji białek stosowano bowiem przeciwciało poliklonalne anti-STIM2, a do barwień immunofluorescencyjnych przeciwciało monoklonalne, którego epitopem był C-końcowy, cytoplazmatyczny fragment białka STIM2. Brak różnic w kolokalizacji może być tłumaczony faktem, że w efekcie tworzenia się kompleksów białkowych STIM2 z GluN2A, dochodziło do zmian konformacyjnych, w wyniku których dostęp przeciwciała anti-STIM2 do epitopu był ograniczony. Dlatego jednym rozwiązaniem tego problemu mogłoby być zastosowanie tego samego przeciwciała do koimmunoprecypitacji oraz barwień immunofluorescencyjnych. Jednak dostępność przeciwciał, które można by było zastosować w tych dwóch technikach, była ograniczona. Alternatywnym rozwiązaniem byłoby zastosowanie innego detergentu do permabilizacji błony komórkowej w barwieniach immunofluorescencyjnych. Chociaż saponina (podobnie jak NP-40) jest detergentem niejonowym, który nie powinien wpływać na oddziaływania białko-białko, zastosowanie innego detergentu niejonowego, np. Tritonu X-100,

wyeliminowałyby potencjalny wpływ saponiny na badane oddziaływania. Kolejnym sposobem jednoznacznego określenia wpływu krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR na interakcje STIM2 z GluN2A wydaje się przeprowadzenie badań z wykorzystaniem innych metod biochemicznych, np. metody PLA (ang. *Proximity Ligation Assay*), która charakteryzuje się wysoką czułością i specyficznością.

5.4 Wpływ białek STIM na endocytozę NMDAR

Jak wspomniano we wstępie (Rozdział 1.2.4) białka STIM mogą bezpośrednio oddziaływać i regulować napływ Ca^{2+} nie tylko przez kanały CRAC i TRPC, lecz również przez inne kanały i receptory zlokalizowane w błonie komórkowej. Skutkiem bezpośredniego oddziaływania STIM1 z kanałami VGCC typu L jest zmniejszenie częstotliwości otwarć tych kanałów podczas depolaryzacji błony komórkowej neuronu oraz zwiększenie ich internalizacji a w konsekwencji obniżenie napływu Ca^{2+} do komórki [Wang i wsp., 2010; Park i wsp., 2010]. Z kolei białko STIM2 może bezpośrednio oddziaływać z AMPAR i poprzez wpływ na procesy endocytozy i egzocytozy, regulować ich ilość na błonie komórkowej oraz zwiększać napływ Ca^{2+} przez te receptory [Garcia-Alvarez i wsp., 2015; Gruszczynska-Biegała i wsp., 2016]. Co więcej, Yap i współpracownicy wykazali, że STIM2 zwiększa transport AMPAR w kierunku błony komórkowej podczas LTP [Yap i wsp., 2017]. Ponadto wyniki ostatnich badań pokazały, że białka STIM mogą bezpośrednio oddziaływać z NMDAR oraz zmniejszać napływ Ca^{2+} przez te receptory [Gruszczynska-Biegała i wsp., 2020] jednak mechanizm tego działania nie został do tej pory poznany. Ponieważ, jak pokazano w niniejszej pracy, oddziaływania STIM2 z GluN2B wzrastały w warunkach endocytozy NMDAR, w kolejnym etapie badań sprawdzano jak wyciszenie ekspresji genów kodujących białka STIM wpływa na ten proces.

W pierwszej kolejności wykazano, że ekspresja genu *Stim1* i *Stim2* została wyciszona z odpowiednią skutecznością (str. 68, Rycina 14). Ponadto transdukcja lentiwirusowa i wyciszenie ekspresji genów kodujących białka STIM nie wpływały na żywotność komórek (str. 68, Rycina 15). Następnie stosując technikę western blot dowiedziono, że wyciszenie ekspresji genów kodujących białka STIM nie zmienia immunoreaktywności podjednostek NMDAR (GluN1, GluN2A, GluN2B) w lizatach komórkowych (str. 68, Rycina 14). Rezultaty te są spójne z wynikami przedstawionymi przez inną grupę badawczą, w których pokazano, że wyciszenie ekspresji genu *Stim2* nie zmienia immunoreaktywności GluN1 w szczurzych neuronach hipokampalnych [Garcia-Alvarez i wsp., 2015]. Ponadto w niniejszej pracy, korzystając z przeciwciał skierowanych na N-końcowe, zewnątrzkomórkowe fragmenty

badanych podjednostek NMDAR oraz testu immunoenzymatycznego ELISA przeprowadzonego z pominięciem permabilizacji błony komórkowej wykazano, że wyciszenie ekspresji genów kodujących białka STIM nie zmienia immunoreaktywności GluN1, GluN2A ani GluN2B w błonie komórkowej (str. 70, Rycina 16). Co więcej, analiza wyników uzyskanych z frakcji białek synaptosomalnych i metody western blot również nie wykazała wpływu wyciszenia ekspresji genu *Stim1* lub *Stim2* na immunoreaktywność GluN1, GluN2A i GluN2B w synaptosomach (str. 71, Rycina 17). Obserwacje te potwierdzają badania przeprowadzone przez Garcia-Alvarez i współautorów, w których pokazano brak wpływu wyciszenia ekspresji genu *Stim2* na fizyczne oddziaływania GluN2A z białkiem zagęszczeń postsynaptycznych - PSD95 w neuronach kory mózgu szczura *in vitro* [Garcia-Alvarez i wsp., 2015].

W niniejszej rozprawie po raz pierwszy podjęto próbę zbadania roli białek STIM w procesie endocytozy NMDAR. W tym celu sprawdzano wpływ wyciszenia ekspresji genów kodujących białka STIM na immunoreaktywność podjednostek NMDAR w błonie komórkowej oraz synaptosomach w warunkach endocytozy NMDAR za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA i analizy białek synaptosomalnych metodą western blot. Zaobserwowano, że krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR w neuronach transdukowanych wirusem kontrolnym (scrRNA) wydawała się obniżać immunoreaktywności GluN1, GluN2A i GluN2B zarówno w błonie komórkowej (str. 70, Rycina 16), jak i w synaptosomach (str. 71, Rycina 17), co jest zgodne z wynikami otrzymanymi dla neuronów typu dzikiego (str. 56 i 57, Rycina 8 i 9). W neuronach transdukowanych scrRNA stopień internalizacji NMDAR był jednak niższy niż w neuronach typu dzikiego, co może sugerować, że transdukcja lentiwirusowa w niewielkim stopniu wpływa na proces endocytozy NMDAR. Wyciszenie ekspresji genu *Stim1* nie wpływało na immunoreaktywność podjednostek NMDAR w błonie komórkowej ani synaptosomach w warunkach endocytozy NMDAR (str. 70 i 71, Rycina 16 i 17). Jednak w przeciwieństwie do wyników otrzymanych dla neuronów typu dzikiego, neuronów transdukowanych scrRNA i neuronów transdukowanych wirusem wyciszającym ekspresję genu *Stim1*, w komórkach z wyciszoną ekspresją genu *Stim2* nie obserwowano obniżenia immunoreaktywności GluN1, GluN2A i GluN2B ani w błonie komórkowej, ani w synaptosomach. Wyniki te sugerują, że STIM2 (ale nie STIM1) może regulować endocytozę GluN2A-NMDAR i GluN2B-NMDAR. Dodatkowym argumentem na poparcie tej hipotezy są wyniki barwienia immunofluorescencyjnego GluN1, GluN2A i GluN2B z EEA1 w neuronach

transdukowanych scrRNA i neuronach z wyciszoną ekspresją genu *Stim1* lub *Stim2*, przeprowadzone w naszej pracowni. Wyniki tych eksperymentów wykazały, że wyciszenie ekspresji genu *Stim2* wiąże się ze zmniejszeniem kolokalizacji GluN1, GluN2A i GluN2B z EEA1 w dendrytach, chociaż kolokalizacja w ciałach komórkowych nie ulegała zmianie. Nie obserwowano natomiast wpływu wyciszenia ekspresji genu *Stim1* na kolokalizację tych białek [Serwach i wsp., 2023 – artykuł w przygotowaniu do ponownego wysłania po recenzjach].

Co więcej, aby zbadać efekt funkcjonalny wyciszenia ekspresji genu *Stim1* lub *Stim2* mierzono całkowity prąd jonowy płynący przez NMDAR za pomocą techniki whole-cell patch clamp. Podobnie jak w przypadku neuronów typu dzikiego, w neuronach transdukowanych scrRNA oraz w neuronach z obniżoną ekspresją genu *Stim1*, obserwowano obniżenie natężenia całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR w warunkach endocytozy receptora. Natomiast po wyciszeniu ekspresji genu *Stim2*, amplituda tego prądu nie zmieniała się (str. 73, Rycina 18). Obserwacja ta może świadczyć o tym, że STIM2 wpływa na całkowity prąd jonowy płynący przez te receptory poprzez regulację endocytozy NMDAR. Wynik ten może tłumaczyć badania dr hab. Gruszczyńskiej-Biegały, które pokazały, że wyciszenie ekspresji genu *Stim2* zwiększa napływ Ca^{2+} przez NMDAR w neuronach kory mózgu szczura *in vitro*, natomiast nadekspresja tego genu zmniejsza napływ Ca^{2+} przez NMDAR [Gruszczyńska-Biegała i wsp., 2020].

Podsumowując, wyniki przedstawione w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej są istotne, gdyż poszerzają dostępną w literaturze wiedzę na temat roli białek STIM i zależności między białkami STIM a NMDAR. Jak pokazano we wcześniejszych pracach, depolaryzacja błony komórkowej neuronów prowadzi do aktywacji NMDAR, czego rezultatem jest obniżenie stężenia Ca^{2+} w ER i aktywacja zależnego od STIM1 procesu SOCE, który odgrywa kluczową rolę w plastyczności synaptycznej [Simpson i wsp., 1995; Emptage, 1999; Baba i wsp., 2003; Dittmer i wsp., 2017]. Dodatkowo w niniejszej pracy wykazano brak fizycznych interakcji między STIM1 i NMDAR (str. 64, Rycina 12). Zależności między STIM1 i NMDAR mają zatem charakter pośredni, zależny od stopnia wypełnienia ER jonami wapnia. Jak dowiedziono w niniejszej pracy, STIM2 w przeciwieństwie do STIM1, oddziałuje z GluN2A i GluN2B w sposób bezpośredni a oddziaływania te zwiększają się w warunkach endocytozy NMDAR (str. 64-66, Rycina 12 i 13). Co więcej, STIM2 zwiększa endocytozę GluN2A-NMDAR i GluN2B-NMDAR po krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR (str. 70-71, Rycina 16 i 17) co powoduje obniżenie amplitudy całkowitego prądu jonowego płynącego przez te receptory (str.

73, Rycina 18) i tym samym hamuje nadmierny napływ Ca^{2+} do komórki [Gruszczynska-Biegala i wsp., 2020]. Ponieważ w przebiegu wielu chorób neurodegeneracyjnych dochodzi do nadmiernej aktywacji NMDAR i w konsekwencji do niekontrolowanego napływu Ca^{2+} do komórki, białko STIM2 jako regulator endocytozy nadmiernie aktywowanych NMDAR mogłoby w przyszłości stanowić potencjalny punkt uchwytu leków stosowanych w terapii chorób neurodegeneracyjnych.

6 Podsumowanie

Wyniki przedstawione w ramach niniejszej pracy wykazały, że:

1. Krótkotrwała (15-minutowa), silna (50 μ M NMDA + 100 μ M glicyna) aktywacja NMDAR w neuronach kory mózgu szczura *in vitro* prowadzi do:
 - a) obniżenia immunoreaktywności GluN1, GluN2A i GluN2B w błonie komórkowej i w synaptosomach,
 - b) zwiększenia kolokalizacji GluN1, GluN2A i GluN2B z EEA1,
 - c) obniżenia amplitudy całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR.
2. STIM1 nie koimmunoprecypituje ani nie kolokalizuje z GluN2A, ani GluN2B. STIM2 koimmunoprecypituje oraz kolokalizuje z GluN2A i GluN2B. Oddziaływania STIM2 z GluN2B zwiększają się w warunkach krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR.
3. Wyciszenie ekspresji genów kodujących białka STIM nie wpływa na immunoreaktywność GluN1, GluN2A, GluN2B w lizatach komórkowych, w błonie komórkowej ani w synaptosomach.
4. Krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR w neuronach z wyciszoną ekspresją genu *Stim2*, w przeciwieństwie do neuronów typu dzikiego, neuronów transdukowanych scrRNA i neuronów z wyciszoną ekspresją genu *Stim1* nie prowadzi do:
 - a) obniżenia immunoreaktywności GluN1, GluN2A i GluN2B w błonie komórkowej i w synaptosomach,
 - b) obniżenia amplitudy całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR.

7 Wniosek

STIM2, w przeciwieństwie do STIM1, zwiększa endocytozę GluN2A-NMDAR i GluN2B-NMDAR wywołaną nadmierną aktywacją tych receptorów w neuronach kory mózgu szczura *in vitro*.

Bibliografia

- Alberini C. M., Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol. Rev.* 2009, 89, 121–145.
- Baba A., Yasui T., Fujisawa S., Yamada R.X.; Yamada M.K.; Nishiyama N., et al. Activity-Evoked Capacitative Ca^{2+} Entry: Implications in Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* 2003, 23, 7737–7741.
- Baba Y., Hayashi K., Fujii Y., Mizushima A., Watarai H., Wakamori M., et al. Coupling of STIM1 to store-operated Ca^{2+} entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(45), 16704–9.
- Baranska J., Ca^{2+} jako wtórny przekaźnik informacji. *KOSMOS*, 1993,42(3/4), 557–564.
- Barria A., Malinow R., Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. *Neuron*, 2002, 35, 345–353.
- Baughman J. M., Perocchi F., Girgis H. S., Plovanich M., Belcher-Timme C.A., Sancak Y., et al., Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 2011, 476(7360):341–345.
- Berna-Erro A., Braun A., Kraft R., Kleinschnitz C., Schuhmann M.K., Stegner, D., et al. STIM2 Regulates Capacitive Ca^{2+} Entry in Neurons and Plays a Key Role in Hypoxic Neuronal Cell Death. *Sci. Signal.* 2009, 2, 67.
- Blanpied T. A., Scott D. B., Ehlers M. D. Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron*, 2002, 36, 435–449.
- Brandman O., Liou J., Park W. S., Meyer, T. STIM2 Is a Feedback Regulator that Stabilizes Basal Cytosolic and Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} Levels. *Cell*, 2007, 131(7), 1327–1339.
- Brenman J. E., Christopherson K. S., Craven S. E., McGee A. W., Bredt D. S; Cloning and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *J Neurosci.* 1996, Dec 1;16(23):7407-15.
- Brini M., Cali T., Ottolini D., Carafoli E., Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014, 71, 2787–2814.
- Cappelli, J., Khacho, P., Wang, B., Sokolovski, A., Bakkar, W., Raymond, S., et al. Glycine-induced NMDA receptor internalization provides neuroprotection and preserves vasculature following ischemic stroke. *iScience*, 2022, 25(1), 103539.
- Chanaday N. L., Nosyreva E., Shin O. H., Zhang H., Aklan I., Atasoy D., et al., Presynaptic store-operated Ca^{2+} entry drives excitatory spontaneous neurotransmission and augments endoplasmic reticulum stress. *Neuron*, 2021, 109, 1314-1332.

- Choi D. W., Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1988, 1:623–634,
- Choi, D. W., Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 1987, 7, 369–379.
- Choi D. W., Maulucci-Gedde M., Kriegstein A. R., Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *Journal of Neuroscience*, 1987, 7, 357–368.
- Clapham D.E., Calcium signaling. *Cell*, 2007, 131, 1047–1058.
- Collins H. E., Zhang D., Chatham J. C., STIM and Orai Mediated Regulation of Calcium Signaling in Age-Related Diseases, *Front. Aging*, 2022, 3:876785.
- Comajoan P., Gubern C., Huguet G., Serena J., Kádár E., Castellanos M., Evaluation of common housekeeping proteins under ischemic conditions and/or rt-PA treatment in bEnd.3 cells. *J Proteomics*, 2018, 184, 10-15
- Cull-Candy S. G., Leszkiewicz D. N. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE*, 2004(255):re16.
- De Stefani D., Raffaello A., Teardo E., Szabo I., Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 2011, 476(7360):336–340.
- Debanne D.; Daoudal G.; Sourdet V.; Russier M. Brain plasticity and ion channels. *J. Physiol.* 2003, 97, 403–414.
- Dittmer P. J.; Wild A. R.; Dell’Acqua M. L.; Sather W. A. STIM1 Ca²⁺ Sensor Control of L-type Ca²⁺-Channel-Dependent Dendritic Spine Structural Plasticity and Nuclear Signaling. *Cell Rep.* 2017, 19, 321–334.
- Dupuis J. P., Ladepeche L., Seth H., Bard L., Varela J., Mikasova L., et al. Surface dynamics of GluN2B-NMDA receptors controls plasticity of maturing glutamate synapses. *EMBO Journal*, 2014, 33, 842–861.
- Elias G. M., Elias L. A., Apostolides P. F., Kriegstein A. R., Nicoll R. A. Differential trafficking of AMPA and NMDA receptors by SAP102 and PSD-95 underlies synapse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105, 20953–20958.
- Emptage N., Single synaptic events evoke NMDA receptor-mediated release of calcium from internal stores in hippocampal dendritic spines. *Neuron*, 1999, 22: 115-124.
- Emptage N. J., Reid C. A., Fine A. Calcium Stores in Hippocampal Synaptic Boutons Mediate Short-Term Plasticity, Store-Operated Ca²⁺ Entry, and Spontaneous Transmitter Release. *Neuron*, 2001, 29, 197–208
- Fahrner M., Grabmayr H., Romanin Ch. Mechanism of STIM activation, *Curr Opin Physiol.*, 2020, 17, 74-79.

- Fang X. Q., 2011, The Regulation of NMDA Receptor Function by NMDA Receptor Endocytosis, Electronic Theses, Treatises and Dissertations, *Florida State University Libraries*
- Ferreira J. S., Papouin T., Ladépêche L., Yao A., Langlais V. C., Bouchet D., et al. Co-agonists differentially tune GluN2B-NMDA receptor trafficking at hippocampal synapses. *eLife*, 2017, 6, e25492.
- Garcia-Alvarez G., Lu B., Yap K. A., Wong L. C., Thevathasan J. V., Lim L., et al. STIM2 regulates PKA-dependent phosphorylation and trafficking of AMPARs. *Mol. Biol. Cell.*, 2015, 26, 1141–1159.
- Gazda K., Kuznicki J., Wegierski T., Knockdown of amyloid precursor protein increases calcium levels in the endoplasmic reticulum, *Scientific reports*, 2017, 14512, 2.
- Gopurappilly R., Deb B. K., Chakraborty P., Hasan G. Stable STIM1 knockdown in self-renewing human neural precursors promotes premature neural differentiation. *Front. Mol. Neurosci.* 2018, 11:178.
- Graham S. J., Dziadek M. A., Johnstone L. S., A cytosolic STIM2 preprotein created by signal peptide inefficiency activates ORAI1 in a store-independent manner. *J Biol Chem*, 2011, 286, 16174-16185.
- Grieve A. G., Rabouille C., Golgi bypass: Skirting around the heart of classical secretion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2011, 3, 1–15.
- Groc L., Heine M., Cousins S. L., Stephenson F. A., Lounis B., Cognet L., et al. NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103, 18769–18774.
- Gruszczynska-Biegala J., Strucinska K., Maciag F., Majewski L., Sladowska M., Kuznicki J. STIM Protein-NMDA2 receptor interaction decreases NMDA-dependent calcium levels in cortical neurons. *Cells*, 2020, 9:160.
- Gruszczynska-Biegala J., Kuznicki J. Native STIM2 and ORAI1 proteins form a calcium-sensitive and thapsigargin-insensitive complex in cortical neurons. *J. Neurochem.* 2013, 126, 727–738.
- Gruszczynska-Biegala J., Pomorski P., Wisniewska M. B., Kuznicki J. Differential Roles for STIM1 and STIM2 in Store-Operated Calcium Entry in Rat Neurons. *PLoS ONE*, 2011, 6, e19285.
- Gruszczynska-Biegala J., Sladowska M., Kuznicki J. AMPA Receptors Are Involved in Store-Operated Calcium Entry and Interact with STIM Proteins in Rat Primary Cortical Neurons. *Front. Cell. Neurosci.* 2016, 10, 251.
- Gu Y., Huganir R. L. Identification of the SNARE complex mediating the exocytosis of NMDA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113, 12280–12285.

- Gudlur A., Zeraik A. E., Hirve N., Rajanikanth V., Bobkov A. A., Ma G. et al. Calcium sensing by the STIM1 ER-luminal domain, *Nat Commun*, 2018, 31;9(1):4536.
- Guillaud L., Setou M., Hirokawa N. KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 2003, 23, 131–140.
- Han L., Campanucci V. A., Cooke J., Salter M. W. Identification of a single amino acid in GluN1 that is critical for glycine-primed internalization of NMDA receptors. *Mol. Brain*. 2013, 6, 36.
- Hardingham G. E., Arnold F. J., Bading H. Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat Neurosci*. 2001, 4(3):261–267.
- Hartmann J., Karl R. M., Alexander R. P., Adelsberger H., Brill M. S., Rühlmann C., et al. STIM1 controls neuronal Ca²⁺ signaling, mGluR1-dependent synaptic transmission, and cerebellar motor behavior. *Neuron* 2014, 82, 635–644.
- Hedegaard M. K., Hansen K. B., Andersen K. T. Bräuner-Osborne H., Traynelisa S. F. Molecular pharmacology of human NMDA receptors, *Neurochem Int*. 2012 Sep; 61(4): 601–609.
- Hewavitharana T., Deng X., Wang Y., Ritchie M. F., Girish G. V., Soboloff J., et al. Location and function of STIM1 in the activation of Ca²⁺ entry signals. *J Biol Chem*, 2008, 283, 26252–26262.
- Horak M., Ho Suh Y., Counting NMDA Receptors at the Cell Surface, Popescu G. K. (editor), Springer Protocols, *Humana Press*, 2016, 31–44.
- Horak M., Wenthold R. J. Different roles of C-terminal cassettes in the trafficking of full-length NR1 subunits to the cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284, 9683–9691.
- Horak M., Chang K., Wenthold R. J. Masking of the endoplasmic reticulum retention signals during assembly of the NMDA receptor. *Journal of Neuroscience*, 2008, 28, 3500–3509.
- Horak M., Petralia R. S., Kaniakova M., Sans N. ER to synapse trafficking of NMDA receptors. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8, 394.
- Hou X., Pedi L., Diver M. M., Long S. B. Crystal Structure of the Calcium Release-Activated Calcium Channel Orai, *Science*, 2012, 338(6112), 1308–1313.
- Ishchenko Y., Carrizales M. G., Koleske A. J. Regulation of the NMDA receptor by its cytoplasmic domains: (how) is the tail wagging the dog? *Neuropharmacology*. 2021 September 01;195:108634.
- Jeyifous O., Waites C. L., Specht C. G., Fujisawa S., Schubert M., Lin E. I., et al. N. SAP97 and CASK mediate sorting of NMDA receptors through a previously unknown secretory pathway. *Nature Neuroscience*, 2009, 12, 1011–1019.

- Juan-Sanz J., Holt G. T., Schreiter E. R., Juan F., Kim D. S., Ryan T. A., Axonal endoplasmic reticulum Ca(2+) content controls release probability in CNS nerve terminals. *Neuron*, 2017, 93, 867-881.
- Keil J. M., Shen Z., Briggs S. P., Patrick G. N., Regulation of STIM1 and SOCE by the ubiquitin-proteasome system (UPS). *PLoS One*, 2010, 5, e13465.
- Kellermayer B., Ferreira J. S., Dupuis J., Levet F., Grillo-Bosch D., Bard L., et al. Differential nanoscale topography and functional role of GluN2-NMDA receptor subtypes at glutamatergic synapses. *Neuron*, 2018, 100, 106–119.
- Kettenmann H. R., Bruce R. Neuroglia. Oxford: *Oxford University Press*, 2013; 10.1093/med/9780199794591.001.0001
- Kim E., Cho K. O., Rothschild A., Sheng M. Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron*, 1996, 17, 103–113.
- Klejman M. E., Gruszczynska-Biegala J., Skibinska-Kijek A., Wisniewska M. B., Misztal K., Blazejczyk M., et al. Expression of STIM1 in brain and puncta-like co-localization of STIM1 and ORAI1 upon depletion of Ca(2+) store in neurons. *Neurochem. Int.* 2009, 54, 49–55.
- Korkotian E., Oni-Biton E., Segal M., The role of the store-operated calcium entry channel Orai1 in cultured rat hippocampal synapse formation and plasticity. *J Physiol*, 2017, 595, 125-140.
- Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B., & Seeburg, P. H. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, 1995, 269, 1737–1740. <https://doi.org/10.1126/science.7569905>
- Kraft, R. STIM and ORAI proteins in the nervous system. *Channels* 2015, 9, 245–252.
- Krizbai I. A., Deli M. A., Pestenacz A., Siklos L., Szabo C. A., Andras I., et al. Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *J. Neurosci. Res.*, 1998, 54(6): 814–819.
- Ladepêche L., Dupuis J. P., Groc L. Surface trafficking of NMDA receptors: Gathering from a partner to another. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2014, 27, 3–13.
- Lalo U., Pankratov Y., Kirchhoff F., North R. A., Verkhratsky A. NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 2006, 26(10): 2673–2683.
- Lalonde J., Saia G., Gill G. Store-operated calcium entry promotes the degradation of the transcription factor Sp4 in resting neurons. *Sci. Signal.* 2014,7:ra51. 10.1126/scisignal.2005242
- Laude A. J., Simpson A. W. M. Compartmentalized signalling: Ca²⁺ compartments, microdomains and the many facets of Ca²⁺ signalling. *FEBS journal*, 2009, 276(7), 1800–16.

- Lavezzari G., McCallum J., Dewey C. M., Roche K. W. Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis. *Journal of Neuroscience*, 2004, 24, 6383–6391.
- Liou J., Fivaz M., Inoue T. Meyer T. Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion, *Biological Sciences*, 2007, 104 (22), 9301-9306.
- Liou J., Kim M. L., Won D. H., Jones J. T., Myers J. W., Ferrell J. E., et al. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store- depletion-triggered Ca²⁺ influx', *Current Biology*, 2005, 15(13), 1235–1241.
- Lipton S. A., Rosenberg P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N.Engl.J.Med.*, 1994, 330(9):613–622.
- Lisman J., Yasuda R., Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews Neuroscience*, 2012, 13,169–182.
- López E., Salido G. M., Rosado J. A., Berna-Erro A. Unraveling STIM2 function, *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2012, 619–633.
- López-Menéndez, C., Simón-García A., Gamir-Morralla A., Pose-Utrilla J., Luján R., Mochizuki N. et al., Excitotoxic targeting of Kidins220 to the Golgi apparatus precedes calpain cleavage of Rap1-activation complexes. *Cell Death Dis*, 2019. 10(535).
- Majewski L., Kuznicki J. SOCE in neurons: Signaling or just refilling? *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2015, 1853, 1940–1952.
- Manders E. M. M., Verbeek F. J., Aten J. A. Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images, *Journal of Microscopy. Blackwell Publishing Ltd*, 1993, 169(3), 375–382.
- McIlhinney, R. A., Le Bourdelles, B., Molnar, E., Tricaud, N., Streit, P., & Whiting, P. J.. Assembly intracellular targeting and cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1a and NR2A in transfected cells. *Neuropharmacology*, 1998, 37, 1355–1367.
- Moccia F., Zuccolo E., Soda T., Tanzi F., Guerra G., Mapelli L., et al. Stim and Orai proteins in neuronal Ca(2+) signaling and excitability. *Front. Cell Neurosci.* 2015. 9:153.
- Molnár T., Yarishkin O., Iuso A., Barabas P., Jones B., Marc R. E., et al. Store-operated calcium entry in Müller Glia is controlled by synergistic activation of TRPC and orai channels. *J. Neurosci.* 2016, 36, 3184–3198.
- Monyer H., Burnashev N., Laurie D. J., Sakmann B., Seeburg P. H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 1994, 12, 529–540.
- Müller B. M., Kistner U., Veh R. W., Cases-Langhoff C., Becker B., Gundelfinger E. D., et al. Molecular characterization and spatial distribution of SAP97, a novel presynaptic protein

- homologous to SAP90 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein, *J Neurosci.* 1995 Mar;15(3 Pt 2):2354–66.
- Müller T., Grosche J., Ohlemeyer C., Kettenmann H. NMDA-activated currents in Bergmann glial cells. *Neuroreport*, 1993, 4: 671–674.
- Müller, B. M., Kistner, U., Kindler, S., Chung, W. J., Kuhlendahl, S., Fenster, S. D., et al. SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. *Neuron*, 1996, 17, 255–265.
- Nguyen N., Biet M., Simard E., Béliveau E., Francoeur N., Guillemette G., et al. STIM1 participates in the contractile rhythmicity of HL-1 cells by moderating T-type Ca(2+) channel activity. *Biochim.Biophys. Acta*, 2013, 1833, 1294–1303.
- Nicoll R. A., Roche K. W. Long-term potentiation: Peeling the onion. *Neuropharmacology*, 2013, 74, 18–22.
- Niethammer M., Kim E., Sheng M. Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *Journal of Neuroscience*, 1996, 16, 2157–2163.
- Nong Y., Huang Y. Q., Salter M. W. NMDA receptors are moving. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2004, 14, 353–361.
- Nong Y., Huang Y-Q, Ju W., Kalia L. V., Ahmadian G., Wang Y. T., et al., Glycine binding primes NMDA receptor internalization, *Nature*. 2003 Mar 20;422(6929):302–7.
- Palty R., Silverman W. F., Hershinkel M., Caporale T., Sensi S. L., Parnis J., NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(1):436–441
- Palygin O., Lalo U., Pankratov Y. Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* 2011, 163(8): 1755-1766.
- Paoletti P., Bellone C., Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci*, 2013, 14, 383–400.
- Park C. Y., Shcheglovitov A., Dolmetsch R. The CRAC Channel Activator STIM1 Binds and Inhibits L-Type Voltage-Gated Calcium Channels. *Science*, 2010, 330, 101–105.
- Pascual-Caro C., Berrocal M., Lopez-Guerrero A. M., Alvarez-Barrientos A., Pozo-Guisado E., Gutierrez-Merino C., Mata A. N., Martin-Romero F. J. STIM1 deficiency is linked to Alzheimer's disease and triggers cell death in SH-SY5Y cells by upregulation of L-type voltage-operated Ca²⁺ entry. *J Mol Med (Berl)*, 2018, 96 (10):1061-1079.
- Pchitskaya E., Kraskovskaya N., Chernyuk D., Popugaeva E., Zhang H., Vlasova O., et al. Stim2-Eb3 association and morphology of dendritic spines in hippocampal neurons. *Sci. Rep.* 2017, 7:17625.

- Petralia R. S., Wang Y. X., Wenthold R. J. Internalization at glutamatergic synapses during development. *European Journal of Neuroscience*, 2003, 18, 3207–3217.
- Prakriya M., Lewis R. S., Store-Operated Calcium Channels, *Physiol Rev.* 2015, 95(4), 1383–1436
- Ramirez O. A., Couve A. The endoplasmic reticulum and protein trafficking in dendrites and axons. *Trends Cell Biol*, 2011, 21(4):219-27.
- Roche K. W., Standley S., McCallum J., Dune Ly C., Ehlers M. D., Wenthold R. J. Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nature Neuroscience*, 2001, 4, 794–802.
- Roos J., DiGregorio P. J., Yeromin A. V., Ohlsen K., Lioudyno M., Zhang S., et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function, *Journal of Cell Biology*, 2005, 169(3), 435–445.
- Sambrook J., Fritsch E. F. Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor laboratory press, New York*. 1989, doi: 574.873224 1/1989.
- Samtleben S., Wachter B., Blum R. Store-operated calcium entry compensates fast ER calcium loss in resting hippocampal neurons. *Cell Calcium* 2015, 58, 147–159.
- Sans N., Petralia R. S., Wang Y. X., Blahos J., Hell J. W., Wenthold R. J. A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *Journal of Neuroscience*, 2000, 20, 1260–1271.
- Sans N., Prybylowski K., Petralia R. S., Chang K., Wang Y. X., Racca C., et al. NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex. *Nature Cell Biology*, 2003, 5, 520–530.
- Sans N., Wang P. Y., Du Q., Petralia R. S., Wang Y. X., Nakka S., et al. mPins modulates PSD-95 and SAP102 trafficking and influences NMDA receptor surface expression. *Nature Cell Biology*, 2005, 7, 1179–1190.
- Sanz-Clemente A., Nicoll R. A., Roche K. W. Diversity in NMDA receptor composition: Many regulators, many consequences. *Neuroscientist*, 2013, 19, 62–75.
- Schweitzer B., Singh J., Fejtova A., Groc L., Heine M., Frischknecht R., Hyaluronic acid based extracellular matrix regulates surface expression of GluN2B containing NMDA receptors, *Scientific Reports*, 2017, 7: 10991
- Scott D. B., Blanpied T. A., Swanson G. T., Zhang C., Ehlers M. D. An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *Journal of Neuroscience*, 2001, 21, 3063–3072.
- Scott D. B., Michailidis I., Mu Y., Logothetis D., Ehlers M. D. Endocytosis and degradative sorting of NMDA receptors by conserved membrane-proximal signals. *Journal of Neuroscience*, 2004, 24,7096–7109.

- Serwach K., Gruszczynska-Biegala J., STIM Proteins and Glutamate Receptors in Neurons: Role in Neuronal Physiology and Neurodegenerative Diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(9), 2289
- Serwach K., Gruszczynska-Biegala J., Target Molecules of STIM Proteins in the Central Nervous System, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2020, 13:617422.
- Sharp C. D., Hines I., Houghton J., Warren A., Jackson T. H., Jawahar A., et al. Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through activation of NMDA receptor. *Am. J. Physiol.* 2003, 285(6), 2592–2598.
- Sheng M., Cummings J., Roldan L. A., Jan Y. N., Jan L. Y. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature*, 1994, 368, 144–147.
- Simpson P. B., Challiss R. A., Nahorski S. R., Neuronal Ca²⁺ stores: activation and function. *Trends Neurosci*, 1995, 18 (7), 299-306.
- Skibinska-Kijek A., Wisniewska M. B., Gruszczynska-Biegala J., Methner A., Kuznicki J. Immunolocalization of STIM1 in the mouse brain. *Acta Neurobiol. Exp.* 2009, 69, 413–428.
- Skowronska K., Obara-Michlewska M., Czarnecka A., Dąbrowska K., Zielińska M., Albrecht J. Persistent overexposure to N-methyl-D-aspartate (NMDA) calcium-dependently downregulates glutamine synthetase, aquaporin 4 and Kir4.1 channel in mouse cortical astrocytes. *Neurotox Res.* 2019, 35(1): 271-280
- Skowronska K., Obara-Michlewska M., Zielińska M., Albrecht J. NMDA receptors in astrocytes: in search for roles in neurotransmission and astrocytic homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20(2): 309
- Smyth J. T., Hwang S. Y., Tomita T., DeHaven W. I., Mercer J. C., Putney J. W., Activation and regulation of store-operated calcium entry, *J Cell Mol Med* 14, 2010, 2337-2349.
- Soboloff J., Rothberg B. S., Madesh M., Gill D. L. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012, 13, 549–565.
- Soboloff J., Spassova M. A., Dziadek M. A., Gill D. L., Calcium signals mediated by STIM and Orai proteins-a new paradigm in inter-organelle communication. *Biochim Biophys Acta* 2006, 1763, 1161-1168.
- Somasundaram A., Shum A. K., McBride H. J., Kessler J. A., Feske S., Miller R. J., et al. Store-operated CRAC channels regulate gene expression and proliferation in neural progenitor cells. *J. Neurosci.* 2014, 34, 9107–9123
- Spassova M. A., Soboloff J., He L. P., Xu W., Dziadek M. A., Gill D. L. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 14, 103(11):4040-5.
- Standley S., Roche K. W., McCallum J., Sans N., Wenthold R. J. PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron*, 2000, 28, 887–898.

- Stathopoulos P. B., Zheng L., Ikura M., Stromal interaction molecule (STIM) 1 and STIM2 calcium sensing regions exhibit distinct unfolding and oligomerization kinetics, *J Biol Chem*, 2009, 284, 728-732.
- Steinbeck J. A., Henke N., Opatz J., Gruszczynska-Biegala J., Schneider L., Theiss S., et al. Store-operated calcium entry modulates neuronal network activity in a model of chronic epilepsy. *Exp. Neurol.* 2011, 232, 185–194.
- Strehlow V., Heyne H. O., Lemke J. R. The spectrum of GRIN2A-associated disorders. *Epileptologie*, 2015, 32(3): 147-151.
- Sudhof T. C., Rothman J. E. Membrane fusion: Grappling with SNARE and SM proteins. *Science*, 2009, 323, 474–477.
- Sun S., Zhang H., Liu J., Popugaeva E., Xu N., Feske S., et al. Reduced Synaptic STIM2 Expression and Impaired Store-Operated Calcium Entry Cause Destabilization of Mature Spines in Mutant Presenilin Mice. *Neuron*, 2014, 82, 79–93.
- Szumilo M., Rahden-Staron I., Fosfolipaza C zależna od fosfatydyloinozytolu w komórkach ssaków – budowa, właściwości i funkcja, *Postepy Hig Med Dosw.* 2008; 62: 47–54
- Thacker J. S., Yeung D. H., Staines W. R., Mielke J. G. Total protein or high-abundance protein: Which offers the best loading control for Western blotting? *Anal Biochem*, 2016, 496, 76–8.
- Thompson J. L., Shuttleworth T. J., Molecular basis of activation of the arachidonate-regulated Ca²⁺ (ARC) channel, a store-independent Orai channel, by plasma membrane STIM1. *J Physiol*, 2013, 591, 3507–3523.
- Tovar K. R., Westbrook, G. L. Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron*, 2002, 34, 255–264.
- Traynelis S. F., Wollmuth L. P., McBain C. J., Menniti F. S., Vance K. M., Ogden K. K., et al. Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacological Reviews*, 2010, 62, 405–496.
- Verkhatsky A., Parpura V. Store-operated calcium entry in neuroglia. *Neurosci. Bull*, 2014, 30, 125–133.
- Vieira M., Yong X. L. H., Roche K. W., Anggono V. Regulation of NMDA glutamate receptor functions by the GluN2 subunits, *J Neurochem*, 2020, 154(2), 121-143.
- Vissel B., Krupp J. J., Heinemann S. F., Westbrook G. L. A use-dependent tyrosine dephosphorylation of nmda receptors is independent of ion flux. *Nat. Neurosci.*, 2001, 4(6):587–596.
- Wang C., Pralong W. F., Schulz M. F., Rougon G., Aubry J. M., Pagliusi S., et al. Functional N-methyl-D-aspartate receptors in O-2A glial precursor cells: a critical role in regulating

- polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression and cell migration. *J. Cell Biol.* 1996, 135: 1565–1581.
- Wang Y., Deng X., Mancarella S., Hendron E., Eguchi S., Soboloff J., et al. The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science* 2010, 330, 105–109.
- Wegierski T., Kuznicki J. Neuronal calcium signaling via store-operated channels in health and disease. *Cell Calcium* 2018, 74, 102–111.
- Williams R. T., Manji S. S., Parker N. J., Hancock M. S., Van Stekelenburg L., Eid J. P., et al. Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins, *Biochem J*, 2001, 357, 673-685.
- Wojtyniak P., Boratynska-Jasinska A., Serwach K., Gruszczynska-Biegala J., Zablocka B., Jaworski J., et al. Mitofusin 2 Integrates Mitochondrial Network Remodelling, Mitophagy and Renewal of Respiratory Chain Proteins in Neurons after Oxygen and Glucose Deprivation, *Mol Neurobiol.* 2022 Oct;59(10):6502-6518.
- Wolff J., Plasma membrane tubulin. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788, 1415-1433.
- Wu J., Ryskamp D., Birnbaumer L., Bezprozvanny I., Inhibition of TRPC1-Dependent Store-Operated Calcium Entry Improves Synaptic Stability and Motor Performance in a Mouse Model of Huntington's Disease, *J Huntingtons Dis*, 2018, 7, 35-50.
- Wojda U., Salinska E., Kuznicki J., Calcium Ions in Neuronal Degeneration, *IUBMB Life*, 2008, 60(9): 575-590
- Wu Y., Chen C., Yang Q., Jiao M., Qiu S. Endocytosis of GluN2B-containing NMDA receptors mediates NMDA-induced excitotoxicity, *Mol Pain*, 2017, 13, 1-13
- Yap K. A., Shetty M. S., Garcia-Alvarez G., Lu B., Alagappan D., Oh-Hora M., et al. STIM2 regulates AMPA receptor trafficking and plasticity at hippocampal synapses. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2017, 138, 54–61.
- Zhang X. M., Yan X. Y., Zhang B., Yang Q., Ye M., Cao W. et al. Activity-induced synaptic delivery of the GluN2A-containing NMDA receptor is dependent on endoplasmic reticulum chaperone Bip and involved in fear memory. *Cell Res*, 2015, 25, 818–836.
- Zhang H., Sun S., Wu L., Pchitskaya E., Zakharova O., Fon Tacer K., et al. Store-Operated Calcium Channel Complex in Postsynaptic Spines: A New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease Treatment. *J. Neurosci.* 2016, 36, 11837–11850.
- Zinchuk V., Zinchuk O., Okada T., Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem*, 2007, 40, 101–111.

Spis rycin

Rycina 1. Najważniejsze białka i cząsteczki odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy Ca^{2+} w neuronach.....	20
Rycina 2. Budowa białek STIM.	22
Rycina 3. Mechanizm SOCE.	23
Rycina 4. Schemat budowy NMDAR z uwzględnieniem struktury podjednostek GluN1 i GluN2.....	28
Rycina 5. Transport NMDAR z ER do synapsy.....	33
Rycina 6. Przykładowa fotografia w świetle przechodzącym przedstawiająca morfologię pierwotnych hodowli neuronów kory mózgu szczura.	42
Rycina 7. Krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR nie wpływa na żywotność neuronów <i>in vitro</i>	56
Rycina 8. Krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR prowadzi do internalizacji GluN1, GluN2A i GluN2B z błony komórkowej.....	56
Rycina 9. Krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR prowadzi do internalizacji GluN1, GluN2A i GluN2B z synaptosomów.	57
Rycina 10. Krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR zwiększa kolokalizację GluN1, GluN2A i GluN2B z białkiem markerowym wczesnych endosomów (EEA1).	60
Rycina 11. Krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR obniża amplitudę całkowitego prądu jonowego płynącego przez te receptory.....	62
Rycina 12. Krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR zwiększa oddziaływania STIM2 (ale nie STIM1) z GluN2A i GluN2B.	64
Rycina 13. Krótkotrwała, silna aktywacja NMDAR zwiększa kolokalizację STIM2 z GluN2B i nie wpływa na kolokalizację STIM2 z GluN2A.....	66
Rycina 14. Wyciszenie ekspresji genu <i>Stim1</i> lub <i>Stim2</i> nie wpływa na immunoreaktywność GluN1, GluN2A i GluN2B w lizatach komórkowych.....	68
Rycina 15. Transdukcja lentiwirusowa i wyciszenie ekspresji genu <i>Stim1</i> lub <i>Stim2</i> nie wpływają na żywotność neuronów <i>in vitro</i>	68
Rycina 16. Wyciszenie ekspresji genu <i>Stim2</i> (ale nie <i>Stim1</i>) hamuje internalizację GluN1, GluN2A i GluN2B z błony komórkowej po krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR.	70
Rycina 17. Wyciszenie ekspresji genu <i>Stim2</i> (ale nie <i>Stim1</i>) hamuje internalizację GluN1, GluN2A i GluN2B z synaptosomów po krótkotrwałej, silnej aktywacji NMDAR.....	71

Rycina 18. Wyciszenie ekspresji genu *Stim2* nie powoduje obniżenia amplitudy całkowitego prądu jonowego płynącego przez NMDAR w warunkach endocytozy tego receptora.73

Spis tabel

Tabela 1. Wielkość [aa] podjednostek NMDAR u człowieka.	26
Tabela 2. Odczynniki i materiały stosowane w eksperymentach.	37
Tabela 3. Skład roztworów, buforów, żeli i pożywek stosowanych w eksperymentach.	40
Tabela 4. Schemat wysiewania komórek w zależności od rodzaju eksperymentu.	41
Tabela 5. Wektory lentiwusowe.	44
Tabela 6. Podłoża bakteryjne.	44
Tabela 7. Charakterystyka przeciwciał pierwszorzędowych wykorzystywanych w pracy.	50
Tabela 8. Charakterystyka przeciwciał drugorzędowych wykorzystywanych w pracy.	51