

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 neuroprotekcyjnie. 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.