

## **Badanie oddziaływań pomiędzy endogennymi białkami STIM a receptorami NMDA w neuronach kory mózgu szczura *in vitro***

Karolina Serwach, Barbara Zabłocka, Joanna Gruszczyńska-Biegała

Pracownia Biologii Molekularnej

Białka STIM (STIM1 i STIM2) są sensorami stężenia jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ) w siateczce śródplazmatycznej, które uczestniczą w pojemnościowym napływie jonów wapnia (SOCE). Chociaż głównymi partnerami białek STIM są kanały Orai, wyniki naszych wcześniejszych badań pokazały, że białka te mogą oddziaływać również z receptorami NMDA (NMDAR). Funkcjonalne NMDAR to tetrametry zbudowane z dwóch obligatoryjnych podjednostek GluN1 oraz dwóch podjednostek GluN2 lub GluN3. W warunkach fizjologicznych odgrywają one kluczową rolę w procesach uczenia się i pamięci. Jednak nadmierna aktywacja NMDAR oraz następująca po niej endocytoza receptora przyczyniają się do uszkodzenia neuronów w ostrych neuropatologiach (niedokrwienie mózgu, urazowe uszkodzenie mózgu) oraz przewlekłych chorobach neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimerera, Parkinsona).

Celem moich dotychczasowych doświadczeń było zbadanie oddziaływań pomiędzy białkami STIM a NMDAR w warunkach endocytozy NMDAR oraz sprawdzenie czy i w jaki sposób białka STIM wpływają na ten proces.

Badania prowadzone są na pierwotnych neuronach korowych izolowanych z embrionów szczurzych z 19-ego dnia życia płodowego. Eksperymenty przeprowadzono 10 dnia hodowli na neuronach kontrolnych oraz neuronach, w których aktywowano endocytozę NMDAR przy pomocy  $50\mu\text{M}$  NMDA i  $100\mu\text{M}$  glicyny, przez 15 minut. W badaniach wykorzystano metody barwienia immunofluorescencyjnego GluN1 z markerem wczesnych endosomów (EEA1), frakcjonowanie subkomórkowe (na frakcję cytoplazmatyczną, frakcję wszystkich błon komórkowych oraz frakcję zewnętrznej błony komórkowej), biotynylację białek powierzchniowych komórki, ko-immunoprecypitację (z przeciwciałami przeciw STIM1, STIM2, GluN1, GluN2B). W celu zbadanie wpływu białek STIM na proces endocytozy NMDAR wyciszano również ekspresję STIM1/STIM2 przy pomocy shRNA i lentiwirusów.

Na podstawie wyników barwienia immunofluorescencyjnego zaobserwowano wzrost kolokalizacji EEA-1 z GluN1 po stymulacji neuronów  $50\mu\text{M}$  NMDA oraz  $100\mu\text{M}$  glicyną, co może wskazywać na występowanie endocytozy NMDAR. Następnie, przy pomocy frakcjonowania subkomórkowego oraz biotynylacji pokazano, że w tych warunkach zmniejsza się immunoreaktywność GluN1 oraz GluN2B w błonie komórkowej, co potwierdza wystąpienie endocytozy. Zastosowane warunki skutkują także zmniejszeniem immunoreaktywności białek STIM w błonie komórkowej. Badania ko-immunoprecypitacji potwierdziły występowanie oddziaływań pomiędzy STIM1 i STIM2 a GluN2B, które ulegały wzmocnieniu po endocytozie NMDAR. Chociaż w pierwszych doświadczeniach sprawdzających efekt wyciszenia ekspresji STIM1/STIM2 immunoreaktywność GluN1 oraz GluN2B w ekstraktach komórkowych nie była zmieniona, zaobserwowano obniżenie immunoreaktywności pCaMKII oraz PSD95, co może wskazywać na redukcję zagęszczeń postsynaptycznych w tym układzie doświadczalnym.

Wyniki moich dotychczasowych badań potwierdziły występowanie oddziaływań pomiędzy białkami STIM a GluN2B oraz pokazały, że interakcje te zachodzą we frakcjach błon wewnątrzkomórkowych i zwiększają się po wywołaniu endocytozy receptora. Wskazują one również na udział białek STIM w tworzeniu/reorganizacji zagęszczeń postsynaptycznych.