

Dr n.med. Tomasz Boczek

Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Wydział Nauk o Zdrowiu
Katedra Biochemii Medycznej
Zakład Neurochemii Molekularnej

AUTOREFERAT

/załącznik nr 2 do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego/
Opis głównych osiągnięć naukowych



Łódź, 2018

1. Imię i Nazwisko

Tomasz Boczek

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

- 2006 magister inżynier
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
promotor: prof. dr hab. Grzegorz Bujacz
tytuł pracy magisterskiej: „*Protein Crystallization by Rational Surface Engineering: Tyrosine as a Potential Mediator of Crystal Contacts*” praca wykonana w Department of Molecular Physiology and Biological Physics, University of Virginia School of Medicine, USA – praca z wyróżnieniem
- 2011 doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej
Wydział Nauk o Zdrowiu
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
promotor: prof. dr hab. Ludmiła Żylińska
tytuł pracy doktorskiej: „Charakterystyka wybranych białek komórek PC12 w warunkach zaburzonej homeostazy wapniowej”
- 2013 specjalista z zakresu komercjalizacji badań naukowych
studia podyplomowe „*Manager BioTech Science*”
Wydział Zarządzania Uniwersytetu Łódzkiego we współpracy z University of Texas at Austin, USA.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 2006-2013 Asystent, Zakład Neurochemii Molekularnej, Katedra Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
- 2013 – obecnie Adiunkt, Zakład Neurochemii Molekularnej, Katedra Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
- 2017 – obecnie Academic Staff Researcher, Department of Ophthalmology, Stanford University School of Medicine, USA

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Monotematyczny cykl 5 publikacji pod tytułem „*Badania funkcjonalne nad rolą izoform 2 i 3 plazmatycznej Ca²⁺-ATPazy w różnicowaniu komórek PC12*”.

4.2. Wykaz publikacji

Sumaryczny wskaźnik *Impact Factor* publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wynosi 16,771, a punktacja MNiSW 160 pkt (wg odpowiednio ISI Journal Citation Report oraz Ujednoliconego Wykazu Czasopism naukowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego).

1. **Boczek T[#]**, Lisek M, Kowalski A, Pikula S, Niewiarowska J, Wiktorska M, Zylinska L. *Downregulation of PMCA2 or PMCA3 reorganizes Ca²⁺ handling systems in differentiating PC12 cells*. 2012, Cell Calcium, 52:433-44. doi: 10.1016/j.ceca.2012.08.002. **Wskaźnik IF: 4,327, MNiSW: 30**, [#] autor korespondencyjny
2. **Boczek T[#]**, Lisek M, Ferenc B, Kowalski A, Stepinski D, Wiktorska M, Zylinska L. *Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms composition regulates cellular pH homeostasis in differentiating PC12 cells in a manner dependent on cytosolic Ca²⁺ elevations*. 2014, PLoS One. 9:e102352. doi: 10.1371/journal.pone.0102352. **Wskaźnik IF: 3,234, MNiSW: 40**, [#] autor korespondencyjny
3. **Boczek T[#]**, Lisek M, Ferenc B, Kowalski A, Wiktorska M, Zylinska L. *Silencing of plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms 2 and 3 impairs energy metabolism in differentiating PC12 cells*. 2014, Biomed Res Int. 2014:735106. doi: 10.1155/2014/735106. **Wskaźnik IF: 1,579, MNiSW: 30** [#] autor korespondencyjny

4. **Boczek T[#]**, Ferenc B, Lisek M, Zylinska L. *Regulation of GAP43/calmodulin complex formation via calcineurin-dependent mechanism in differentiated PC12 cells with altered PMCA isoforms composition*. 2015, Mol Cell Biochem. 407:251-62. doi: 10.1007/s11010-015-2473-4. **Wskaźnik IF: 2,613, MNiSW: 20**,
autor korespondencyjny

5. **Boczek T[#]**, Lisek M, Ferenc B, Zylinska L. *Cross talk among PMCA, calcineurin and NFAT transcription factors in control of calmodulin gene expression in differentiating PC12 cells*. 2017, Biochim Biophys Acta. 1860:502-515. doi: 10.1016/j.bbagr.2017.01.012. **Wskaźnik IF: 5,018, MNiSW:40**, # autor korespondencyjny

4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

Wprowadzenie

Jony wapnia wpływają na prawie każdy aspekt życia. Będąc uniwersalnym nośnikiem informacji są one zaangażowane w regulację funkcjonowania komórek i tkanek, w której uczestniczą wyspecjalizowane białka i szlaki sygnalizacyjne, same podlegające Ca^{2+} - zależnej modulacji. Oprócz fundamentalnych procesów związanych z kontrolą ekspresji genów, regulacją procesów bioenergetycznych, początkiem życia w momencie zapłodnienia, aż do jego zakończenia w procesie apoptozy, prawie każda tkanka ma szczególną rolę, która jest specyficznie kontrolowana przez wapń. W odróżnieniu od innych przekaźników drugiego rzędu sygnał wapniowy podlega autoregulacji np. systemy białkowe kontrolujące homeostazę wapniową mogą podlegać regulacji przez Ca^{2+} , zarówno na poziomie transkrypcyjnym jak i post-transkrypcyjnym. Sygnalizacyjna rola jonów wapnia jest szczególnie istotna w tkance nerwowej. Precyzyjna kontrola stężenia Ca^{2+} niezbędna jest m.in. do prawidłowego przebiegu procesów transmisji synaptycznej, wydzielania neuroprzekaźników oraz regulacji ekspresji specyficznych genów, które determinują wyższe funkcje mózgowie takie jak uczenie się, zapamiętywanie i konsolidacja pamięci. Dlatego też funkcjonowanie neuronów, w przypuszczalnie znacznie większym stopniu niż pozostałych komórek eukariotycznych, zależy od czasowej i przestrzennej regulacji sygnału wapniowego.

W procesie ewolucyjnego wyboru Ca^{2+} jako nośnika informacji komórki musiały wykształcić odpowiednie mechanizmy chelatowania, kompartmentacji i usuwania jego nadmiaru do środowiska zewnętrznego, tak aby utrzymywać jego stężenie w cytozolu ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) na niskim poziomie. Pomimo odkrycia setek białek zdolnych do buforowania wapnia, główną rolę w kontroli jego stężenia przypisuje się białkom błonowym transportującym Ca^{2+} z użyciem ATP poza obręb komórki lub do wewnątrzkomórkowych magazynów. W tkance nerwowej przywrócenie wywołanego pobudzeniem wzrostu $[\text{Ca}^{2+}]_c$ do wartości spoczynkowych jest szczególnie istotne, a błonowe systemy usuwania Ca^{2+} odgrywają w tym procesie krytyczną rolę. Oprócz wymiennika sodowo-wapniowego, który charakteryzuje się jednak niskim powinowactwem ale wysoką wydajnością działania, główną rolę w reagowaniu na subtelne zmiany stężenia Ca^{2+} w zakresie nanomolowym odgrywa plazmatyczna ATPaza wapniowa (*Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase*, PMCA).

Występują cztery główne izoformy PMCA (PMCA1-PMCA4), które wykazują podobną budowę pomimo niskiej homologii na poziomie składu aminokwasowego. W zależności od typu komórki i tkanki mogą występować różne warianty PMCA, które powstają na drodze alternatywnego składania pierwotnego transkryptu. PMCA1 i PMCA4 zaliczane są do tzw. form konstytutywnych i ulegają ekspresji w przeważającej licznie komórek [1]. Obecność PMCA2 i PMCA3 jest ograniczona prawie wyłącznie do komórek pobudliwych, a ze względu na ich wysoką koncentrację w mózgu określa się je mianem neuro-specyficznych. Nie jest znana dokładna przyczyna istnienia czterech odmiennych izoform PMCA, choć przypuszcza się, że mogą one w istotny sposób determinować odpowiedź komórki na bodziec fizjologiczny. Zależność tej odpowiedzi od składu izoform PMCA może wynikać z samych różnic w parametrach kinetycznych poszczególnych izoform. PMCA2 i PMCA3 mają wysoką aktywność podstawową i większe powinowactwo do kalmoduliny (CaM), będącej naturalnym aktywatorem PMCA, i dlatego też określa się je mianem izoform szybkich. PMCA1 i PMCA4 działają znacznie wolniej, choć są w większym stopniu stymulowane przez CaM [2]. PMCA, poprzez interakcje z wieloma partnerami białkowymi [3], może być włączana w szlaki sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, co sugeruje że może ona odgrywać rolę znacznie istotniejszą, niż tylko klasycznie przypisywana jej funkcja transportera wapniowego.

Pomimo znacznego postępu w poznaniu fizjologicznej roli PMCA1 i PMCA4, wciąż niewiele wiadomo na temat neuro-specyficznych izoform PMCA. Identyfikacja mutacji w genach *ATP2B2* (PMCA2) i *ATP2B3* (PMCA3) oraz ich korelacja z procesami neurodegeneracyjnymi wskazują na istotny udział w regulacji sygnalizacji wapniowej w mózgu. PMCA2 występuje obficie w części apikalnej komórek włoskowatych ucha wewnętrznego, natomiast PMCA3 na obszarze splotu naczyńkowego (*choroid plexus*) oraz w niektórych strukturach mózgu. Mutacja w obrębie miejsca katalitycznego PMCA2 (G283S) skutkowałą głuchotą oraz zaburzeniami motorycznymi u myszy [4]. Podobną zależność stwierdzono też u ludzi [5]. Ostatnie badania wykazały ponadto związek pomiędzy zaburzeniem funkcjonowania PMCA2 a autyzmem [6]. Pomimo, że choroba ta może mieć wielogenową etiologię to odkrycie, że zmieniona ekspresja *ATP2B2* może wpływać na morfologię komórek Purkinje'go, rozwój mózdzku oraz biogenezę synaps sugeruje udział tej izoformy w rozwoju i funkcjonowaniu systemu nerwowego. Punktowa mutacja w obrębie domeny wiążącej CaM w PMCA3 była z kolei związana z występowaniem ataksji mózdkowo-rdzeniowej skojarzonej z chromosomem X [7]. Badania molekularne trzech mutantów PMCA2 związanych z występowaniem głuchoty wykazały, że w każdym przypadku obniżała się zdolność do usuwania Ca^{2+} oraz znacznemu wydłużeniu ulegał czas potrzebny na powrót $[Ca^{2+}]_c$ do wartości spoczynkowych. Efekt ten nie był jednak dramatyczny w kontekście homeostazy jonowej komórki, co wskazuje raczej na związek pomiędzy fenotypem choroby a defektami w sygnalizacji wapniowej.

Oprócz przytoczonych powyżej badań nie są znane żadne inne przesłanki odnośnie roli neuro-specyficznych izoform PMCA w procesie różnicowania komórek nerwowych. Zaobserwowano natomiast wzrost ich ekspresji podczas różnicowania linii *neuroblastoma* IMR-32 [8], co daje podstawy by sądzić, że mogą istnieć powiązania pomiędzy ekspresją PMCA2 i PMCA3, a przebiegiem procesu różnicowania także innych typów komórek. Wiadomym jest, że proces ten wiąże się ze szczególnie istotnymi zmianami w metabolizmie Ca^{2+} . Obserwowany jest m.in. znaczny jego napływ przez błonę komórkową w efekcie wzmożonej ekspresji kanałów wapniowych, który jest niezbędnym etapem w drodze do nabywania przez komórki cech dojrzałych neuronów. Precyzyjna kontrola stężeniach tego jonu jest kluczowa dla prawidłowego przebiegu neurytogenezy, formowania i elongacji aksonów, a także tworzenia wypustek dendrytycznych. Mając na uwadze powyższe przesłanki naukowe oraz istotną rolę PMCA2

i PMCA3 w regulacji homeostazy wapniowej należy przypuszczać, że istnieje związek pomiędzy błonową kompozycją izoform PMCA a zależnym od Ca^{2+} procesem różnicowania.

Weryfikacji tej hipotezy dokonano poprzez realizację następujących celów:

- 1. Określenie wpływu PMCA2 i PMCA3 na przebieg procesu różnicowania oraz ich roli w regulacji homeostazy wapniowej komórek**
- 2. Zbadanie czy PMCA2 lub PMCA3 mogą uczestniczyć w regulacji wewnątrzkomórkowego pH oraz wpływać na efektywność procesów bioenergetycznych w zróżnicowanych komórkach**
- 3. Analizę zależnych od Ca^{2+} mechanizmów komórkowych, które mogą być potencjalnie regulowane przez PMCA2 lub PMCA3**

Do realizacji tych celów wykorzystano linię komórek PC12 wyizolowaną z guza chromochłonnego nadnerczy szczura. Pod wpływem czynników różnicujących np. pochodnych cyklicznego adenozylo-3',5'-monofosforanu bądź czynnika wzrostu nerwów (*nerve growth factor*, NGF) obserwuje się zmiany morfologiczne, zatrzymanie podziałów oraz formowanie długich i często rozgałęzionych wypustek, a także syntezę wielu białkowych markerów neuronalnych. Zróżnicowane komórki PC12 wykazują pobudliwość elektryczną, zwiększoną wrażliwość na acetylocholiny oraz wzmożoną ekspresję bramkowanych napięciem kanałów sodowych i wapniowych [9,10]. Wszystkie te cechy oraz wspólne pochodzenie komórek rdzenia nadnerczy i neuronów układu współczulnego sprawiają, że linia PC12 jest szeroko stosowanym modelem do badań nad procesami zachodzącymi w tkance nerwowej. Wykorzystanie antysensowego RNA w celu wyciszenia ekspresji PMCA2 lub PMCA3 w modelu stabilnej transfekcji pozwoliło na badanie funkcji, jaką te izoformy mogą pełnić w procesie różnicowania.

Omówienie wyników badań

Publikacja nr 1 pt. „*Downregulation of PMCA2 or PMCA3 reorganizes Ca²⁺ handling systems in differentiating PC12 cells*” przedstawia charakterystykę modelu badawczego oraz wskazuje rolę jaką pełnią PMCA2 i PMCA3 w regulacji homeostazy wapniowej komórek PC12.

W toku badań wykazano, że obniżenie ekspresji PMCA2 lub PMCA3 w zróżnicowanych dibutyrylo-cAMP komórkach PC12 skutkowało intensyfikacją procesu różnicowania oraz tworzeniem dłuższych i nierzadko bardziej rozgałęzionych neurytów. Barwienia fluorescencyjne białek markerowych stożków wzrostu wykazały brak centralnej struktury otoczonej przez bogate w F-aktynę filopodia i lamelipodia oraz silną kondensację tego białka w zakończeniach neurytów wskazując, że stożki wzrostu mogą znajdować się w fazie retrakcji. Jedną z bezpośrednich konsekwencji częściowej utraty każdej z izoform, która niewątpliwie może wiązać się z odmienną morfologią komórek, jest wzrost spoczynkowego stężenia Ca²⁺. Utrzymywanie równowagi jonowej ma kluczowy wpływ dla prawidłowego przebiegu procesów komórkowych, a jej zaburzenie prowadzi do indukcji szeregu stanów patologicznych. Obniżenie ekspresji PMCA2 powodowało zwiększenie odsetka komórek będących w fazie późnej apoptozy, co potwierdził test różnicujący z zastosowaniem aneksyny V i jodku propidyny oraz fragmentacja DNA będąca zjawiskiem charakterystycznym dla programowanej śmierci komórki. Co istotne, zmiany takie nie występowały w linii PC12 z obniżoną ekspresją PMCA3 sugerując indukcję odpowiedzi ochronnej. Jednym z mechanizmów chroniących przed cytotoksycznym działaniem Ca²⁺ wydaje się być adaptacyjna zmiana w obrębie izoformy PMCA1 obserwowana w obu liniach oraz PMCA4 charakterystyczna tylko dla komórek z obniżoną ekspresją PMCA3. Niemniej jednak, podwyższone stężenie [Ca²⁺]_c wskazuje, że kompensacyjne zwiększenie ilości tych izoform jest niewystarczające do pełnej substytucji utraconej funkcji PMCA2 lub PMCA3. Jest to zgodne z twierdzeniem o unikatowej roli, jaką pełnią poszczególne izoformy w regulacji homeostazy wapniowej w komórkach pobudliwych. Izofornie 4 przypisuje się istotną funkcję ochronną i dlatego też, zwiększenie jej ilości obserwowane w linii z obniżoną ekspresją PMCA3 może w sposób efektywny przeciwdziałać Ca²⁺-zależnej indukcji apoptozy.

Dodatkowym mechanizmem zapobiegającym nadmiernemu wzrostowi [Ca²⁺]_c może być obserwowane zwiększenie ilości transkryptu i poziomu białka izoform 2 i 3 pompy sarko(endo)plazmatycznej (SERCA) odpowiedzialnej za ATP-zależny transport Ca²⁺ do siateczki

śródpłazmatycznej. Badanie przyrostu stężenia Ca^{2+} po zastosowaniu inhibitora SERCA – tapsygarginy – potwierdziło zwiększoną akumulację tego jonu w magazynach wewnątrzkomórkowych w liniach z obniżoną ekspresją PMCA2 lub PMCA3. Jednocześnie nie obserwowano zmian w pojemnościowym napływie Ca^{2+} (SOCE), choć widoczne było istotne statystycznie obniżenie ekspresji genów *Trpc3* i *Trpc6* (ang. *Transient Receptor Potential Channel*) kodujących kanały jonowe (odpowiednio TRPC3 i TRPC6) biorące udział w tym procesie.

Dalsza analiza wpływu obniżonej ekspresji PMCA2 lub PMCA3 na kinetykę usuwania Ca^{2+} wykazała znacznie nasilony napływ oraz wydłużenie czasu potrzebnego na powrót $[\text{Ca}^{2+}]_c$ do wartości spoczynkowych po depolaryzacji indukowanej KCl. W takich warunkach za wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_c$ odpowiadają głównie bramkowane napięciem kanały wapniowe (ang. *Voltage Gated Calcium Channels*), z których cztery typy: N, L, P/Q oraz T obecne są w komórkach PC12. Profilowanie ekspresji tych kanałów wykazało wzrost poziomu transkryptu kodującego typy P/Q oraz L w obu liniach oraz typu T tylko w linii z obniżoną ekspresją PMCA2. Równoległe ze wzrostem ekspresji zwiększał się udział poszczególnych kanałów w całkowitym napływie Ca^{2+} indukowanym KCl, co potwierdziły badania z wykorzystaniem specyficznych inhibitorów. Na podstawie tych danych można przypuszczać, że zwiększenie amplitudy wzrostu $[\text{Ca}^{2+}]_c$ podczas depolaryzacji odbywa się dzięki obecności większej ilości funkcjonalnych kanałów wapniowych. Aktywacja poszczególnych kanałów, dzięki sprzężeniu ich funkcji z różnymi szlakami sygnalizacji komórkowej, może indukować odmienną odpowiedź np. w postaci modulowania ekspresji specyficznych genów, poprzez co wpływać na przebieg procesu różnicowania. Takich przesłanek dostarczają niedawne badania nad powiązaniem pomiędzy kanałami wapniowymi a ekspresją genów w neuronach [11].

Podsumowując, wyniki prezentowane w tej pracy potwierdzają udział izoform PMCA2 i PMCA3 w procesie różnicowania, a odmienny jego przebieg może być konsekwencją zmiany sygnału wapniowego w komórce. Ponadto, zaburzona ekspresja kanałów wapniowych w odpowiedzi na manipulacje w poziomie pomp wapniowych silnie sugeruje transkrypcyjne powiązanie pomiędzy tymi dwoma przeciwstawnymi systemami transportu Ca^{2+} .

Publikacja nr 2 pt. „*Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms composition regulates cellular pH homeostasis in differentiating PC12 cells in a manner dependent on cytosolic Ca²⁺ elevations*” opisuje udział izoform PMCA2 i PMCA3 w regulacji wewnątrzkomórkowego pH.

W warunkach spoczynkowych w komórkach z obniżoną ekspresją PMCA2 lub PMCA3 zaobserwowano wyższe wartości pH w mitochondrium (pH_{mito} odpowiednio 7.78 ± 0.01 oraz 7.62 ± 0.01) i cytozolu (pH_{cyto} odpowiednio 7.56 ± 0.02 oraz 7.49 ± 0.02) w porównaniu do komórek kontrolnych (pH_{mito} 7.53 ± 0.02 ; pH_{cyto} 7.41 ± 0.03). W rezultacie gradient pH w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej ($\Delta\text{pH} = \text{pH}_{\text{mito}} - \text{pH}_{\text{cyto}}$) był zwiększony w komórkach z obniżoną ekspresją PMCA2.

Równoległe pomiary pH_{mito} i $[\text{Ca}^{2+}]_c$ wykazały wzrost zakwaszenia macierzy mitochondrialnej spowodowany depolaryzacją błony, a zmiany pH_{mito} były odwrotnie proporcjonalne do wielkości napływu Ca^{2+} . Podczas każdorazowej stymulacji KCl, spadek wartości pH_{mito} i pH_{cyto} , w przeciwieństwie do ΔpH , był znacznie mniejszy w komórkach z obniżoną ekspresją PMCA2 lub PMCA3. Z uwagi na fakt, że PMCA usuwa Ca^{2+} na zasadzie antyportu z H^+ , nawet częściowe pozbawienie komórki szybko działających PMCA2 lub PMCA3 skutkuje zmniejszeniem ilości H^+ napływających przez błonę plazmatyczną. Może to wpływać na wartość pH_{mito} , jak obserwowano w warunkach spoczynkowych, i zmniejszać stopień zakwaszenia cytoplazmy podczas indukowanego depolaryzacją napływu Ca^{2+} . Mniejsze spadki pH_{mito} obserwowane w modyfikowanych liniach mogą także odzwierciedlać różną zdolność komórki do buforowania H^+ , która szczególnie w warunkach zwiększonej alkalizacji macierzy mitochondrialnej wpływa na formowanie gradientu pH. Po każdorazowej stymulacji KCl obserwowano ustalanie się nowego spoczynkowego $[\text{Ca}^{2+}]_c$ oraz ΔpH na poziomie wyższym niż sprzed stymulacji, co było szczególnie wyraźne w linii z obniżoną ekspresją PMCA2. Efekt ten można przypisać częściowej utracie funkcji PMCA, która w połączeniu ze zwiększoną ilością bramkowanych napięciem kanałów wapniowych (jak wykazano w pracy z pozycji nr 1) może w znaczący sposób upośledzać proces usuwania Ca^{2+} oraz potęgować jego napływ i upakowanie w organellach komórkowych. Zwiększone uwalnianie Ca^{2+} spowodowane rozprzęgnięciem gradientu elektrochemicznego obserwowano w komórkach z obniżoną ekspresją PMCA2 lub PMCA3, co świadczy o wzroście akumulacji tego jonu przez mitochondria. Podobną zależność

między składem izoform PMCA a stężeniem Ca^{2+} w magazynach wewnątrzkomórkowych opisano także w pracy z pozycji nr 1.

Indukowana Ca^{2+} alkalizacja/zakwaszenie macierzy mitochondrialnej wymaga akumulacji tego jonu przez mitochondria, która regulowana jest przez potencjał błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$). Dalsze badania z zastosowaniem sond fluorescencyjnych wykazały brak zmian $\Delta\Psi_m$ oraz zwiększoną depolaryzację błony plazmatycznej w komórkach z obniżoną ekspresją PMCA2 lub PMCA3. Rozprężanie gradientu elektrochemicznego, oprócz znacznej depolaryzacji mitochondriów, powodowało istotny statystycznie wzrost wartości potencjału błony plazmatycznej ($\Delta\Psi_p$). Sugeruje to, że w badanych liniach $\Delta\Psi_p$ nie powstaje w wyniku działania pomp protonowych, a obserwowana hiperpolaryzacja może wiązać się z przemieszczaniem się H^+ na zewnątrz błony w wyniku działania czynnika rozprężającego. Zastosowanie oligomycyny, blokującej powrót H^+ do macierzy mitochondrialnej przez kanał syntazy ATP, powodowało nieznaczną hiperpolaryzację błony mitochondrialnej oraz brak zmian pH_{mito} , co wskazuje na spoczynkowy stan mitochondriów (stan 4). Hamowanie oksydazy cytochromowej lub dehydrogenazy NADH-koenzym Q potwierdziło, że podczas stymulacji KCl zależny od PMCA napływ protonów do macierzy mitochondrialnej odbywa się przy udziale łańcucha oddechowego.

Zgodnie z twierdzeniem, że pobór Ca^{2+} przez mitochondria powinien skutkować zanikiem gradientu elektrochemicznego obserwowano depolaryzację błony mitochondrialnej w komórkach z obniżoną ekspresją PMCA2 w odpowiedzi na napływ Ca^{2+} indukowany KCl. Jak wykazały dalsze badania efekt ten znoszony był przez cyklosporynę A i kwas bongkrekowy sugerując udział zależnego od wapnia megakanalu mitochondrialnego (mPTP). Nie obserwowano jednak katastroficznych dla komórki skutków związanych z aktywacją tego kanału co wskazuje na zdolność łańcucha oddechowego do odbudowy $\Delta\Psi_m$. Fakt, że zwiększone zakwaszenie macierzy mitochondrialnej blokuje otwieranie kanału mPTP może tłumaczyć brak rozprężania $\Delta\Psi_m$ w linii kontrolnej oraz z obniżoną ekspresją PMCA3.

Jednoczesne zastosowanie inhibitorów SOCE, pompy SERCA oraz wymiennicza $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ nie wpływało na przebieg zmian $[\text{Ca}^{2+}]_c$ oraz pH_{mito} , co wskazuje na brak ich udziału w obserwowanym zależnym od Ca^{2+} zakwaszeniu mitochondriów. W warunkach blokowania pozostałych transporterów szybkość usuwania Ca^{2+} jest proporcjonalna do aktywności PMCA. Hamowanie tej aktywności przez La^{3+} skutkowało alkalizacją macierzy mitochondrialnej nawet

przy niskich stężeniach K^+ w środowisku zewnątrzkomórkowym. Podobny efekt obserwowano przy pH buforu 9. Dodatkowo, wysokie pH całkowicie znosiło indukowany KCl spadek pH_{mito} . W warunkach obniżonego zewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} ustalanie się nowego stanu równowagi pH w komórkach częściowo pozbawionych PMCA2 lub PMCA3 było opóźnione do momentu osiągnięcia przez $[Ca^{2+}]_c$ stanu spoczynkowego. Dane te wskazują, że PMCA jest głównym dokomórkowym transporterem H^+ podczas indukowanego KCl napływu Ca^{2+} , a odmienną odpowiedź pH na zmiany $[Ca^{2+}]_c$ można przypisać PMCA2 lub PMCA3.

W pracy tej wykazano, że PMCA2 i PMCA3 są odpowiedzialne za dynamiczną regulację komórkowego pH. Rola tych izoform może mieć zatem ogromne znaczenie w metabolizmie energetycznym, co było przedmiotem badań opublikowanych w pracy z pozycji nr 3.

Publikacja nr 3 pt. „*Silencing of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoforms 2 and 3 impairs energy metabolism in differentiating PC12 cells*” przedstawia wpływ izoform PMCA2 i PMCA3 na procesy bioenergetyczne.

Wykorzystując bioluminescencyjny pomiar z użyciem kompleksu lucyferyna/lucyferaza wykazano wyższy poziom ATP w warunkach spoczynkowych w komórkach z obniżoną ekspresją PMCA2. Równocześnie nie odnotowano zmian w aktywności syntazy cytrynianowej, liczbie mitochondriów, ich ultrastrukturze oraz stosunku ich objętości do objętości cytoplazmy. Zastosowanie chelatora jonów wapnia – BAPTA-AM – skutkowało obniżeniem spoczynkowego $[Ca^{2+}]_c$ z 149 ± 17 nM do 100 ± 11 nM i powodowało równoczesny spadek poziomu ATP. Dostępne dane literaturowe sugerują zależność pomiędzy Ca^{2+} , metabolizmem ATP a neurogenezą [12,13]. Niewiele jest natomiast prac dotyczących udziału głównych szlaków generujących energię w procesie różnicowania.

Celem zbadania tego zagadnienia komórki inkubowano najpierw w medium z pirogronianem ale bez obecności glukozy. W warunkach tych obserwowano gwałtowny (około 3.5-krotny) spadek poziomu ATP w liniach kontrolnej oraz z obniżoną ekspresją PMCA3, który występował także po zastosowaniu inhibitora heksokinazy. Hamowanie oksydazy cytochromowej bądź syntazy ATP skutkowało około 20% spadkiem poziomu ATP w tych liniach, podczas gdy w komórkach z obniżoną ekspresją PMCA2 spadek ten wynosił aż 70%. W komórkach tych

ochronny wpływ pirogronianu przed utratą ATP w nieobecności glukozy wraz z powyższymi obserwacjami wskazuje na preferencyjne wykorzystanie fosforylacji oksydacyjnej jako źródła energii. Dane te sugerują ponadto zależny od pirogronianu system transportu elektronów na łańcuch oddechowy, który może być przypisany aktywności neuronalnego czółenka glicerolo-3-fosforanowego bezpośrednio przekazującego elektrony na koenzym Q. Niemniej jednak w obu modyfikowanych liniach obserwowano wzrost konsumpcji glukozy połączony z większym wydzielaniem mleczanu, które było dodatkowo potęgowane w obecności oligomycyny. Fakt ten może świadczyć o kompensacyjnej produkcji ATP w procesie glikolizy beztlenowej, a dane eksperymentalne wskazują ten system produkcji energii jako preferencyjny dla komórek kontrolnych oraz z obniżoną ekspresją PMCA3.

Za wykorzystaniem fosforylacji oksydacyjnej do produkcji ATP przez komórki z obniżoną ekspresją PMCA2 przemawiają wyniki pomiarów oddychania mitochondrialnego oraz aktywności kompleksów łańcucha oddechowego. W komórkach tych zaobserwowano bowiem wzrost zużycia tlenu oraz niższy poziom NAD(P)H w warunkach spoczynkowych, które spowodowane były większą aktywnością kompleksów będących pompami protonowymi (kompleks I, III i IV). Dlatego też, szybkość fosforylacji oksydacyjnej w warunkach zmienionej ekspresji PMCA2 może być kontrolowana na poziomie aktywności białek łańcucha oddechowego. W dłuższej perspektywie czasu utrzymanie takiej równowagi wymagałoby ciągłej stymulacji produkcji NADH, co raczej wyklucza niezmieniona w badanym modelu eksperymentalnym aktywność enzymów cyklu Krebsa: syntazy cytrynianowej oraz dehydrogenazy bursztynianowej. Możliwa jest jednak przejściowa stymulacja tego cyklu przez podwyższony poziom $[Ca^{2+}]_i$ i/lub przyspieszony transport NADH do mitochondriów.

Hamowanie heksokinazy, nawet w obecności pirogronianu, skutkowało znaczną indukcją nekrozy, a w komórkach z obniżoną ekspresją PMCA2 lub PMCA3 obserwowano także zwiększony odsetek komórek apoptotycznych. Inkubacja z oligomycyną przez 3 godziny nasilała śmiertelność komórek we wszystkich badanych liniach poprzez indukcję apoptozy, natomiast pomiary dokonane po 48 godzinach wykazały silną nekrozę, której poziom był jednak statystycznie niższy w komórkach częściowo pozbawionych PMCA2 lub PMCA3. Dane te sugerują, że generowanie energii tylko przez glikolizę lub tylko fosforylację oksydacyjną jest niewystarczające do zapewnienia ciągłości procesów życiowych zróżnicowanych komórek PC12.

Korelacja pomiędzy śmiercią neuronów a poziomem ATP jest wciąż przedmiotem debaty. Jedne badania wskazują na obniżony ładunek energetyczny komórki jako przełącznik pomiędzy apoptozą a nekrozą, natomiast inne wyniki dowodzą, że neurony są w stanie przeżyć w warunkach bardzo niskiego stężenia ATP [14,15]. Przyjmując hipotezę, że utrzymywanie homeostazy jonowej może być wspomagane przez ATP lokalnie wytwarzane w procesie glikolizy, nawet tak niewielkie uszczuplenie puli ATP jak obserwowane pod wpływem inhibicji heksokinazy w linii z obniżoną ekspresją PMCA2 może zaburzać proces wymiany jonowej i inicjować sygnał śmierci komórki. Pomimo, że usuwanie Ca^{2+} pochłania jedynie ~15% neuronalnych zasobów ATP [16], są one istotne ze względu na potencjalną cytotoksyczność jonów wapnia. Dlatego też, komórka jest w stanie przeciwstawiać się napływowi Ca^{2+} dopóki stężenie ATP utrzymywane jest na odpowiednim poziomie. Przeprowadzone badania sugerują, że taki krytyczny poziom może w dużej mierze determinować przybliżona konsumpcja ATP zależna od składu izoform PMCA.

Wyniki tej pracy pokazują, że zmiany w poziomie ATP są ściśle powiązane z sygnalizacją wapniową podczas procesu różnicowania. W zależności od tego czy przedłużony sygnał wapniowy jest wynikiem obniżenia ekspresji PMCA2 czy PMCA3, komórki wykorzystują różne szlaki generujące energię ażeby utrzymać poziom ATP powyżej progu niezbędnego do przeżycia. Zwiększona produkcja ATP, współistniejąca z podwyższonym stężeniem $[\text{Ca}^{2+}]_c$, może być szczególnie istotna dla homeostazy jonowej w sytuacji częściowej utraty PMCA2. Ta, względnie niewielka zmiana w spoczynkowym stężeniu jonów wapnia (opisana w pracy z pozycji nr 1) może znacząco wpływać na metabolizm mitochondrialny, a w konsekwencji prowadzić do rozwoju patologii komórkowych. W tym świetle, szybko działające izoformy PMCA2 i PMCA3 mogą być postrzegane jako istotne elementy systemu chroniącego przed przeładowaniem wapniem i dysfunkcją mitochondriów.

W pracach z pozycji nr 1-3 wykazano zmienioną aktywność bioenergetyczną mitochondriów oraz intensyfikację procesu różnicowania, u podłoża których leży podwyższone stężenie $[\text{Ca}^{2+}]_c$ będące efektem obniżenia ekspresji PMCA2 lub PMCA3. W kolejnych pracach skupiono się na próbie poznania mechanizmów tych zmian.

Publikacja nr 4 pt. „Regulation of GAP43/calmodulin complex formation via calcineurin-dependent mechanism in differentiated PC12 cells with altered PMCA isoforms composition” opisuje nowy sposób regulacji tworzenia kompleksu GAP43/kalmodulina poprzez mechanizm zależny od Ca^{2+} , PMCA oraz aktywności fosfatazowej kalcyneuryny.

Opierając się na obserwacjach różnic morfologicznych w budowie stożków wzrostu opisanych w pracy z pozycji nr 1 zadano pytanie o wpływ redukcji poziomu PMCA2 lub PMCA3 na neuronalne białka, których ekspresja skorelowana jest z tworzeniem i wydłużaniem neurytów. Jednym z takich białek, będącym także markerem różnicujących neuronów, jest GAP43 (*Growth associated protein 43*). Szczególnie wysoką koncentrację tego białka stwierdzono w stożkach wzrostu, gdzie przypuszczalnie pełni ono rolę rezerwuaru CaM. Nieufosforylowany GAP43 wiąże CaM przy niskim stężeniu Ca^{2+} , natomiast uwalnia w wyniku fosforylacji Ser-41 przez kinazę białkową C. Pozwala to na dynamiczną regulację poziomu dostępnej CaM nawet w warunkach malejącego stężenia wtórnych przekaźników.

W toku badań wykazano, że w liniach częściowo pozbawionych PMCA2 lub PMCA3 następowało zwiększenie poziomu mRNA oraz nieufosforylowanej formy białka GAP43, przy jednoczesnym obniżeniu immunoreaktywności jego formy ufosforylowanej (p-GAP43). Wzrost poziomu fosforylacji do wartości obserwowanych w linii kontrolnej, bez zauważalnych zmian w ekspresji, następował po zastosowaniu cyklosporyny A – inhibitora fosfatazy białkowej 2B (kalcyneuryny, CaN). Potwierdza to wnioski innych badaczy o udziale tej fosfatazy w procesie defosforylacji GAP43 [17] oraz wskazuje na brak powiązania pomiędzy szlakami zależnymi od CaN a regulacją ekspresji genu *Gap43*. Ponadto, zależność CaN od stężenia Ca^{2+} może sugerować, że procesy fosforylacji i defosforylacji GAP43 mogą być modulowane przez nawet nieznaczne wahania $[\text{Ca}^{2+}]_c$, głównie wynikające z lokalnej kompozycji izoform PMCA.

GAP43 może być kotwiczony w bogatych w cholesterol strukturach błony plazmatycznej zwanych tratwami lipidowymi [18], w których stwierdzono również występowanie PMCA [19]. Przeprowadzone przeze mnie barwienia fluorescencyjne nie wykazały jednak zwiększonej kolokalizacji pomiędzy PMCA, GAP43 lub p-GAP43 sugerując brak bezpośredniego powiązania pomiędzy tymi białkami w modelu doświadczalnym komórek PC12. W liniach z obniżoną ekspresją PMCA2 lub PMCA3 obserwowano natomiast znacznie silniejsze współwystępowanie

sygnału fluorescencyjnego pochodzącego od przeciwciał specyficznych dla GAP43 oraz kalmoduliny (CaM). Zastosowanie cyklosporyny A powodowało spadek intensywności tego sygnału. Mając na uwadze funkcję GAP43 jako magazynu CaM w neuronach można przypuszczać, że uzyskane wyniki wskazują na intensywniejsze tworzenie kompleksu GAP43/CaM, które zostało potwierdzone techniką ko-immunoprecypitacji. Dalsze badania z wykorzystaniem cyklosporyny A dowiodły, że intensywniejsze formowanie tego kompleksu w modyfikowanych liniach regulowane jest aktywnością CaN. Co więcej, zwiększona kolokalizacja GAP43 z CaM oraz spadek poziomu fosforylacji GAP43 wskazują na mniejszą dostępność niewiązanej CaM. W takiej sytuacji tworzenie kompleksu Ca^{2+}/CaM może być zaburzone nawet w sytuacji zwiększonego stężenia $[Ca^{2+}]_c$, jaka ma miejsce w liniach z obniżoną ekspresją PMCA2 lub PMCA3. Krytycznym czynnikiem decydującym o regulacji zależnych od Ca^{2+}/CaM procesów będzie zatem różnica w powinowactwie potencjalnych efektorów tego kompleksów. Biorąc jednak pod uwagę, że kompleks Ca^{2+}/CaM jest aktywatorem CaN i PMCA, nie tylko ilość i aktywność obu enzymów, ale także dostępność CaM może być istotnym czynnikiem decydującym o losie komórki.

W kolejnym etapie sprawdzono czy PMCA2 lub PMCA3 mogą wpływać na ekspresję i aktywność kalcyneuryny. Wykorzystując technikę PCR w czasie rzeczywistym wykazano wzrost poziomu mRNA o około 60% i około 85% odpowiednio w liniach z obniżoną ekspresją PMCA2 lub PMCA3. Zmiany te przekładały się na poziom białka oraz zwiększoną aktywność fosfatazową CaN.

Kilka zespołów badawczych stwierdziło istnienie interakcji pomiędzy CaN a PMCA2 i PMCA4, która skutkuje hamowaniem aktywności CaN [20]. W omawianym tutaj modelu eksperymentalnym podobna ilość kompleksów CaN/PMCA2 występowała w linii kontrolnej oraz z obniżoną ekspresją PMCA3 natomiast była ona znacznie zmniejszona w konsekwencji redukcji poziomu PMCA2. Intersującą obserwacją był istotny spadek ilości kompleksu CaN/PMCA4 w obu modyfikowanych liniach, co w połączeniu z powyższym sugeruje większą ilość CaN niezwiązanej z PMCA. To z kolei może prowadzić do stwierdzenia, że obniżenie ekspresji PMCA zwiększa pulę aktywnej CaN, a PMCA2 i PMCA3 mogą znacząco przyczyniać się do lokalnej regulacji jej aktywności. Istnieją przesłanki sugerujące zależność pomiędzy długością neurytów a aktywnością CaN, i co ciekawe nie przypisuje się podobnych właściwości innym fosfatazom serynowo-treoninowym [21]. Dlatego też, Ca^{2+} -zależna regulacja wydłużania

i rozrostu neurytów w liniach z obniżoną ekspresją PMCA2 lub PMCA3 może wymagać zwiększonej ekspresji białka GAP43 i kontroli jego fosforylacji przez CaN. Wysoka aktywność CaN może również indukować proces apoptozy [22], zatem zmniejszenie aktywności fosfatazowej wydaje się istotne z punktu widzenia przeżywalności komórek. Opisane zaburzenia w dynamicznej zależności pomiędzy dostępnością CaM, poziomem fosforylacji GAP-43 oraz ilością endogenego inhibitora CaN jakim jest PMCA2, mogą zatem wpływać na rozmiar apoptozy w linii z obniżoną ekspresją PMCA2.

Wyniki przedstawione w tej pracy wskazują na zależny od CaN mechanizm poprzez który PMCA2 i PMCA3 mogą regulować dostępność CaM. Kluczowym elementem tego mechanizmu wydaje się być białko GAP43, którego zwiększony poziom w liniach częściowo pozbawionych tych izoform może regulować przybliżoną pulę CaM, a tym samym wpływać na szlaki sygnalizacji wapniowej. Niewykluczonym jest również, że w warunkach zaburzonej homeostazy wapniowej zmiany te mają charakter adaptacyjny i pozwalają komórkom zachować zdolność do wzrostu i różnicowania.

Publikacja nr 5 pt. „*Cross talk among PMCA, calcineurin and NFAT transcription factor in control of calmodulin gene expression in differentiating PC12 cells*” wskazuje nowy mechanizm zależny od szlaku kalcyneuryna/NFAT poprzez, który PMCA2 i PMCA3 wpływają na ekspresję swojego naturalnego aktywatora- kalmoduliny

Wczesne badania na komórkach PC12 sugerowały odwrotną zależność pomiędzy poziomem CaM a wydłużaniem neurytów w odpowiedzi na sygnał różnicowania [23]. Celem potwierdzenia czy podobna korelacja istnieje w komórkach z obniżoną ekspresją PMCA2 lub PMCA3, w których obserwowano intensyfikację procesu różnicowania (opisaną w pracy z pozycji nr 1) w pierwszym etapie oznaczono całkowity poziom białka CaM. Wyniki wskazują znacznie obniżoną immunoreaktywność tego białka w badanych liniach. U szczura (*Rattus norvegicus*) CaM kodowana jest przez trzy niealleliczne geny: *Calm1*, *Calm2* oraz *Calm3*. Wykorzystując metodę PCR w czasie rzeczywistym wykazano, że u podłoża zmian w białku CaM może leżeć obniżenie ekspresji *Calm1* i *Calm2* w obu liniach oraz *Calm3* w linii częściowo pozbawionej izoformy PMCA2.

Poszukując mechanizmu mogącego leżeć u podstaw PMCA-zależnej ekspresji genów kalmodulinowych przeprowadzono mikromacierzowe profilowanie ekspresji czynników transkrypcyjnych, których aktywność związana jest z Ca^{2+} . Większość zaobserwowanych zmian była charakterystyczna tylko dla jednej linii, za wyjątkiem izoformy c2 jądrowego czynnika aktywowanych komórek T (*nuclear factor of activated T cells*, NFAT), której wzrost na poziomie transkrypty odnotowano w obu liniach. NFAT jest jednym z najważniejszych efektorów, którego działanie uzależnione jest od Ca^{2+} i CaN. Mając na względzie zwiększoną aktywność tej fosfatazy w komórkach z obniżoną ekspresją PMCA2 lub PMCA3 (jak opisano w pracy z pozycji nr. 4) zasadnym jest przypuszczać, że NFAT może odgrywać rolę kluczowego regulatora ekspresji genów w omawianym modelu doświadczalnym.

Celem weryfikacji tej hipotezy w pierwszej kolejności wykazano zwiększoną akumulację NFATc2 w jądrze komórkowym, bez równoczesnych zmian w całkowitym poziomie białka. Transport tego czynnika przez pory jądrowe uzależniony jest od uprzedniej defosforylacji przez CaN, stąd zastosowanie cyklosporyny A powodowało gwałtowny eksport do cytozolu oraz spadek zwiększonej w modyfikowanych liniach endogennej aktywności transkrypcyjnej NFAT. Sugeruje to, że stosunkowo niewielki wzrost spoczynkowego stężenia $[Ca^{2+}]_c$ obserwowany w liniach ze zmienionym poziomem PMCA2 lub PMCA3 był wystarczający do indukcji translokacji NFAT. Jest to zgodne z wykazaniem w pracy z pozycji nr 4 wzrostem ekspresji i aktywności CaN, który jak dowiedli inni badacze, może częściowo zastępować wymóg udziału Ca^{2+} w aktywacji tego czynnika [24]. Jednocześnie w liniach tych zaobserwowano wzrost immunoreaktywności CaM do wartości obserwowanej w linii kontrolnej, co było spowodowane indukcją ekspresji genów *Calm2* i *Calm3* w obu tych liniach. Aby wykazać ostatecznie udział szlaku CaN/NFAT w regulacji ekspresji genów kalmodulinowych zbadano wpływ nadekspresji mutantu CaN charakteryzującego się niezależną od Ca^{2+} aktywnością konstytutywną. W komórkach ze zmienionym składem izoform powodowało to wzrost aktywności promotora NFAT, akumulację NFATc2 w jądrze komórkowym oraz nasilenie represji genów *Calm2* i *Calm3* bez wpływu na poziom transkrypty genu *Calm1*. Dane te podkreślają kluczową rolę CaN w zależnej od Ca^{2+} aktywacji czynników NFAT w modyfikowanych liniach oraz sugerują udział NFATc2 w kontroli transkrypcyjnej genów kalmodulinowych.

Analiza *in silico* rejonu 5' niepodlegającego translacji (5'-UTR) wykazała istnienie miejsc wiązania czynników NFAT w obszarze promotorowym genów *Calm2* i *Calm3*, ale nie *Calm1*. Na tej podstawie zadano pytanie o potencjalne wiązanie NFATc2 do tych miejsc. Wykonując immunoprecypitację chromatyny stwierdzono zwiększoną asocjację tego czynnika do rejonów promotorowych obu genów, co sugeruje że relatywnie większa ilość NFATc2 może być konstytutywnie związana do tych obszarów DNA. Nasiloną translokacją NFATc2 do jądra komórkowego oraz wzrost aktywności transkrypcyjnej NFAT w liniach z obniżoną ekspresją PMCA2 lub PMCA3 wydają się potwierdzać te obserwacje. Dlatego też, wykorzystując siRNA wyciszono specyficznie ekspresję tego czynnika z obserwowaną efektywnością na poziomie białka powyżej 65%. Skutkowało to wzrostem poziomu transkryptu genu *Calm2* o około 30% w obu liniach oraz *Calm3* o około 40% w linii z obniżoną ekspresją PMCA2. Wyniki te w powiązaniu z wcześniejszymi obserwacjami sugerują, że NFATc2 może działać jako represor transkrypcji *Calm2* i *Calm3*.

W oparciu o przedstawione dane należy wnioskować, że zmieniony skład izoform PMCA jest czynnikiem indukującym zależną od szlaku CaN/NFAT odmienną ekspresję genów *Calm2* i *Calm3*. Regulatorowy wpływ izoform PMCA2 i PMCA3 może mieć charakter bezpośredni poprzez wiązanie i hamowanie aktywności CaN, oraz pośredni poprzez zmianę sygnału wapniowego wynikającą z zaburzenia homeostazy Ca^{2+} w komórce.

Podsumowanie wyników badań oraz wnioski końcowe

Badania przeprowadzone na modelu komórek PC12 wykazały znaczący udział izoform PMCA2 i PMCA3 w procesie różnicowania. Do najważniejszych osiągnięć swojej pracy zaliczam wykazanie po raz pierwszy, że zmieniony skład izoform PMCA wiąże się z:

1. Intensyfikacją procesu różnicowania
2. Adaptacyjnymi zmianami funkcjonalnymi w obrębie bramkowanych napięciem kanałów wapniowych oraz systemów odpowiedzialnych za transport Ca^{2+} do system siateczki śródplazmatycznej
3. Zaburzoną regulacją wewnątrzkomórkowego pH

4. Zmianami w procesach bioenergetycznych komórki
5. Regulacją dostępności kalmoduliny poprzez zależny od Ca^{2+} i kalcyneuryny mechanizm tworzenia kompleksu z białkiem GAP43
6. Obniżonym poziomem kalmoduliny oraz transkrypcyjną regulacją genów *Calm2* i *Calm3* przez czynnik NFATc2

Uzyskane dane wskazują potencjalne mechanizmy mogące leżeć u podstaw zmian zachodzących w starzejącym się mózgu, w którym obserwuje się postępującą utratę aktywności PMCA, oraz w niektórych stanach patologicznych np. uszkodzeniu rdzenia kręgowego, zachodzących z wyraźnym obniżeniem ekspresji PMCA2 i PMCA3. Widocznym efektem nawet częściowego zmniejszenia ilości tych izoform jest zwiększony napływ wapnia przez błonę plazmatyczną, co może negatywnie wpływać na pobudliwość neuronów, skutkować zaburzeniem transmisji synaptycznej oraz prowadzić do śmierci komórki i inicjowania procesów neurodegeneracyjnych. Dlatego też, poznanie mechanizmów regulatorowych, w które zaangażowana jest PMCA jest istotne dla zrozumienia fizjologicznych przyczyn dysfunkcji neuronalnych związanych z utratą zdolności do regulacji gospodarki jonowej komórek, w czym upatruje się jedną z molekularnych przyczyn procesu starzenia się mózgu.

Literatura

1. Strehler EE, Zacharias DA (2001) Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev.* 81: 21–50.
2. Brini M, Carafoli E (2009) Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev.* 89:1341-78.
3. Lopreiato R, Giacomello M, Carafoli E (2014) The plasma membrane calcium pump: new ways to look at an old enzyme. *J Biol Chem.* 289:10261-8.
4. Street VA, McKee-Johnson JW, Fonseca RC, Tempel BL, Noben-Trauth K (1998) Mutations in a plasma membrane Ca^{2+} -ATPase gene cause deafness in deafwaddler mice. *Nat Genet.* 19:390-4.
5. Schultz JM, Yang Y, Caride AJ, Filoteo AG, Penheiter AR, Lagziel A, Morell RJ, Mohiddin SA, Fananapazir L, Madeo AC, Penniston JT, Griffith AJ (2005) Modification of human hearing loss by plasma-membrane calcium pump PMCA2. *N Engl J Med.* 352:1557-64.
6. Hu VW, Nguyen A, Kim KS, Steinberg ME, Sarachana T, Scully MA, Soldin SJ, Luu T, Lee NH (2009) Gene expression profiling of lymphoblasts from autistic and nonaffected sib pairs: altered pathways in neuronal development and steroid biosynthesis. *PLoS One.* 4:e5775.
7. Zanni G, Cali T, Kalscheuer VM, Ottolini D, Barresi S, Lebrun N, Montecchi-Palazzi L, Hu H, Chelly J, Bertini E, Brini M, Carafoli E (2012) Mutation of plasma membrane Ca^{2+} ATPase isoform 3 in a family with X-linked congenital cerebellar ataxia impairs Ca^{2+} homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:14514-9.

8. Usachev YM, Toutenhoofd SL, Goellner GM, Strehler EE, Thayer SA (2001) Differentiation induces up-regulation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase and concomitant increase in Ca²⁺ efflux in human neuroblastoma cell line IMR-32. *J Neurochem* 76: 1756-65.
9. Huber K, Kalcheim C, Unsicker K (2009) The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest. *Auton Neurosci.* 151: 10-6.
10. Greene LA and Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73: 2424-2428.
11. Barbado M, Fablet K, Ronjat M, De Waard M (2009) Gene regulation by voltage-dependent calcium channels. *Biochim Biophys Acta.*1793:1096-104.
12. Voccoli V, Colombaioni L. Mitochondrial remodeling in differentiating neuroblasts (2009) *Brain Res.* 1252:15-29.
13. Rosenberg SS, Spitzer NC. Calcium signaling in neuronal development (2011) *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a004259.
14. Nicotera P, Melino G (2004) Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene.* 23:2757-65.
15. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:552-65
16. Lenny P (2003) The cost of cortical computation. *Curr Biol.* 13:493-7.
17. Zakharov VV, Mosevitsky MI (2001) Site-specific calcium-dependent proteolysis of neuronal protein GAP-43. *Neurosci Res* 39: 447-453.
18. Arni S, Keilbaugh SA, Ostermeyer AG, Brown DA (1998) Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues. *J Biol Chem.* 273:28478-85.
19. Sepúlveda MR, Berrocal-Carrillo M, Gasset M, Mata AM (2006) The plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 4 is localized in lipid rafts of cerebellum synaptic plasma membranes. *J Biol Chem.* 281:447-53.
20. Holton M, Yang D, Wang W, Mohamed TM, Neyses L, Armesilla AL (2007) The interaction between endogenous calcineurin and the plasma membrane calcium-dependent ATPase is isoform specific in breast cancer cells. *FEBS Lett* 581: 4115-9.
21. Lautermilch NJ, Spitzer NC (2000) Regulation of calcineurin by growth cone calcium waves controls neurite extension. *J Neurosci.* 20: 315-25.
22. Asai A, Qiu J, Narita Y, Chi S, Saito N, Shinoura N, Hamada H, Kuchino Y, Kirino T (1999) High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *J Biol Chem.* 274: 34450-8.
23. Davidkova G, Zhang SP, Nichols RA, Weiss B (1996) Reduced level of calmodulin in PC12 cells induced by stable expression of calmodulin antisense RNA inhibits cell proliferation and induces neurite outgrowth. *Neuroscience.* 75:1003-19.
24. Clipstone NA, Crabtree GR (1992) Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature.* 357:695-7.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1. Podsumowanie dorobku naukowego

Sumaryczny impact factor według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **50,1 (462 pkt. MNiSW)**

w tym **29,701 (271 pkt. MNiSW)** przypada na pierwszoautorskie prace oryginalne

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science: **169**

według bazy Scopus: 180

Indeks Hirscha według bazy Web of Science: 6

według bazy Scopus: 6

5.2. Tematyka prowadzonych prac badawczych

I. Metoda redukcji entropii powierzchniowej jako nowe narzędzie do efektywnej produkcji kryształów białek

Moja praca badawcza rozpoczęła się w momencie gdy wyjechałem na roczny staż na University of Virginia, School of Medicine w Stanach Zjednoczonych, gdzie wykonywałem część doświadczalną swojej pracy magisterskiej. Prace w zespole do którego dołączyłem skupiały się na inżynierii powierzchni białka przy użyciu metody redukcji entropii powierzchniowej. Uważa się, że aminokwasy takie jak lizyna, glutamina i glutaminian mogą skutecznie obniżać zdolności krystalizacyjne białek w wyniku wysokiej bariery entropii, która musi być pokonana aby reszty te mogły znajdować w miejscach kontaktów krystalicznych. Zastąpienie tych aminokwasów alaniną skutkowało znacznie większą skłonnością do tworzenia kryształów, aczkolwiek wpływało na rozpuszczalność białka [1]. Badania, w których brałem udział miały za zadanie odpowiedzieć na pytanie czy małe ale bardziej polarne aminokwasy takie jak seryna i treonina, bądź takie o ograniczonej swobodzie ruchów konformacyjnych (histrydina i tyrozyna) będą równie skutecznie jak alanina wpływać na zdolności krystalizacyjne modelowego białka RhoGDI (*Rho GDP-dissociation inhibitor*). W tym celu wybrano dziewięć klasterów zawierających dwie lub trzy reszty lizyny i/lub glutaminianu/glutaminy: (A) K99, Q100, (B) K105, E106, (C) K135, K138, K141, (D) K138, K141, (E) E154, E155, (F) E155, E157, (G) E163, E164, (H) K199, K200, (I) K98, K99 i przy pomocy ukierunkowanej mutagenyzy zamieniono je na alaninę, histydynę, serynę, treoninę lub tyrozinę.

Spośród 40 mutantów białka RhoGDI, które użyto w badaniach, 32 tworzyło kryształy gdy poddano je skринingowi z zastosowaniem komercyjnych zestawów testujących 96 różnych rezerwuarów. Największą efektywność zaobserwowano dla wariantów tyrozynowych, następnie alaninowych i treoninowych, natomiast najniższą dla histydynowych i serynowych. Podobne zależności występowały gdy zastosowano tzw. alternatywny rezerwuar w postaci 1.5 M NaCl, choć znacznie zwiększała się ilość warunków, w których następowało tworzenie form krystalicznych. Uzyskane wyniki wskazywały na istnienie korelacji pomiędzy rodzajem aminokwasu, a kontekstem strukturalnym, w którym został on umieszczony. Dla przykładu wprowadzenie mutacji alaninowych, serynowych, treoninowych czy histydynowych w klasterze D nie skutkowało znaczącą poprawą zdolności krystalizacyjnych, podczas gdy tyrozyna w sposób spektakularny zwiększała ilość warunków, w których obecne były kryształy. Preferencyjność taka obserwowana była także dla klasterów K98T, K99T, E155A, E157A, K135T, K138T, K141T, K199A, K200A, K199Y, K200Y oraz E163Y, E164Y. Ponadto, dla większości mutantów istniała korelacja

pomiędzy rodzajem aminokwasu a określonym rezerwuarem. Jedynym wyjątkiem był klaster F, dla którego warianty FH, FS oraz FT krystalizowały w tych samych warunkach co FA.

Pomimo znacznej ilości przebadanych warunków i mutantów, analiza mikroskopowa wykazała ograniczone spektrum form morfologicznych sugerując niewielką różnorodność tworzonych form krystalicznych. Przy pomocy pomiarów dyfraktometrycznych zidentyfikowano 7 nowych form: 5 monoklinicznych, 1 ortorombiczną i 1 trygonalną, a także pozostałe poprzednio opisane dla białka RhoGDI. W większości przypadków, wprowadzone mutacje obecne były bezpośrednio bądź w najbliższym sąsiedztwie miejsc tworzenia kontaktów krystalicznych. Co więcej, 12 mutantów tworzyło unikatowe formy, które nie były obserwowane w przypadku pozostałych wariantów. Niektóre rodzaje upakowania np. *R32* oraz *P3₂21* powtarzały się odpowiednio w klaserach EA, FH, FS, FA oraz CA, CH i FH. Wprowadzenie mutacji zwiększało również zdolność dyfrakcyjną kryształów, a dla mutantów E155H, E157H widoczne były refleksy o rozdzielczości 1.6 Å, podczas gdy w typie dzikim białka najwyższa uzyskana rozdzielczość wynosiła 2.4 Å. Powyższe dane wskazują, że zamiana obecnych na powierzchni białka aminokwasów o wysokiej entropii na te, które znacznie efektywniej uczestniczą w tworzeniu kontaktów międzycząsteczkowych może stanowić nowe narzędzie do produkcji wysokiej jakości kryształów do badań strukturalnych. Ponadto, zakres warunków, w których obserwuje się wzrost kryształów może być w prosty sposób poszerzony dzięki zastosowaniu 1.5 M NaCl jako alternatywnego rezerwuaru.

Stosując metodę redukcji entropii powierzchniowej otrzymano kryształy białka będącego produktem genu *yphP*. Gen ten koduje przedstawiciela nadrodziny prokariotycznych białek (DUF1094) o nieznanym celu, choć modelowanie ich struktury czwartorzędowej wskazuje na silne podobieństwo do kanonicznego motywu charakterystycznego dla tioredoksyn. Porównanie układu aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym obu rodzin wykazało obecność sekwencji CGC (cysteina-glicyna-cysteina) w miejscu analogicznym do centrum aktywnego tioredoksyn, zawierającego silnie konserwowany motyw CXXC. Wykonane analizy rentgenostrukturalne wykazały obecność 4 cząsteczek w jednostce asymetrycznej komórki elementarnej, w której większość kontaktów krystalicznych inicjowana była w obrębie N-końcowej α helisy unikatowej dla białka YphP. Kontakty te tworzone były bezpośrednio w obrębie sekwencji aminokwasów o niskiej entropii powstałej w wyniku mutacji Q100A, E101A.

Analizy funkcjonalne wykazały potencjał redukcyjny na poziomie -130 ± 5 mV, co w porównaniu z potencjałem oksydoreduktaz zawierających motyw CXXC (od -270 mV do -122 mV) [2,3] wskazuje bardziej na przynależność YphP do izomeraz/oksydaz niż do reduktaz. Wydaje się zatem, że zmniejszenie liczby aminokwasów pomiędzy reaktywnymi cysteinami z dwóch (CXXC) do jednego (CXC) może być efektywną zmianą pozwalającą na zwiększenie potencjału redukcyjnego oksydoreduktaz disiarczkowych. Wgląd w strukturę białka pozwolił także na zaproponowanie mechanizmu katalitycznego. W formie zredukowanej, Cys53 pełni rolę nukleofilowego czynnika atakującego aktywowanego przez Arg121, która jest aminokwasem silnie konserwowanym w rodzinie DUF1094. Gdy wytworzy się stabilne wewnątrzcząsteczkowe wiązanie disiarczkowe, Cys55, również aktywowana przez Arg121, pozwala na oddysocjowanie YphP, które przypuszczalnie wymaga przejściowego oddziaływania Cys53-Cys55. Co ciekawe, zastąpienie Cys53 lub Cys55 alaniną nie hamowało aktywności katalitycznej, na co może

wskazywać sam mechanizm izomeryzacji. W formie dzikiej białka, Cys53 jest bowiem tą resztą, która znajduje się bliżej Arg121 i ma większy kontakt z rozpuszczalnikiem. Niemniej jednak, w nieobecności Cys53 np. w mutancie C53A, Arg121 wciąż ma możliwość rotacji w kierunku Cys55, która jest w wystarczającym stopniu odsłonięta aby zostać aktywowana. Dane te wskazują, że w przeciwieństwie do tioredoksyn, enzymy z rodziny DUF1094 mogą pełnić rolę komórkowych czynników utleniających, a w warunkach *in vivo* katalizować oksydacyjne fałdowanie się białek.

Po obronie pracy magisterskiej w 2006 r. rozpocząłem pracę jako asystent, a następnie od 2011 r. jako adiunkt, w Zakładzie Neurochemii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, z którym związany jestem do chwili obecnej. Moje zainteresowania badawcze skupiały się wokół trzech głównych wątków:

II. Rola mikrosomalnej transferazy glutationowej (Mgst1)

Mikrosomalna transferaza glutationowa 1 (Mgst1) dzięki aktywności transferazy i peroksydazy glutationowej odgrywa kluczową rolę w procesach detoksykacji ksenobiotyków, oporności na leczenie przeciwnowotworowe oraz bierze udział w szlakach sygnalizacyjnych indukowanych przez reaktywne formy tlenu (ROS) [4,5]. Nadprodukcja wolnych rodników lub zmniejszona aktywność transferaz glutationowych mogą inicjować peroksydację lipidów błonowych skutkującą powstawaniem toksycznych związków elektrofilowych. Zaburzenia te mogą mieć wielopoziomowe konsekwencje począwszy od bezpośredniego wpływu na procesy bioenergetyczne komórki po modyfikację profilu ekspresji genów.

W toku badań nad funkcją Mgst1 w niezróżnicowanej linii PC12 o cechach nowotworu *pheochromocytoma* wykazano, że obniżenie ekspresji tej transferazy o około 60% przy zastosowaniu antysensowego RNA wpływało na morfologię komórek, zmniejszało ich adhezję do podłoża, indukowało spontaniczny wzrost neurypodobnych wypustek i skutkowało około 30% śmiertelnością na drodze nekrozy. Ocena potencjału metastatycznego potwierdziła podobną szybkość migracji na podłożu kontrolnym, natomiast komórki częściowo pozbawione Mgst1 wykazywały ponad trzykrotnie niższe tempo migracji na lamininie.

W kolejnym etapie oceniono wpływ redukcji Mgst1 na poziom glutationu będącego najważniejszym nieenzymatycznym czynnikiem antyoksydacyjnym, jakim dysponuje komórka. W modyfikowanej linii PC12 obserwowano statystycznie istotny wzrost stężenia glutationu całkowitego, podczas gdy stosunek formy utlenionej (GSSG) do zredukowanej (GSH), który jest wskaźnikiem potencjału redoks, był prawie dwukrotnie niższy niż w linii kontrolnej. Może to sugerować obniżoną konsumpcję glutationu bądź jego zwiększoną syntezę *de novo*. Ponadto, dane te wskazują na dodatkowe rezerwy antyoksydacyjne, co może być adaptacyjną zmianą pozwalającą na przeżycie około 70% komórek w warunkach zmniejszonej ekspresji badanej transferazy. Modyfikacje w poziomie Mgst1 wywierały swoje konsekwencje także względem całkowitej aktywności cytozolowych transferaz glutationowych, którą oceniano przy użyciu 1-chloro-2,4-nitrobenzenu. W obecności tego związku aktywność transferazowa była obniżona o około 20% w porównaniu do linii kontrolnej. Nasuwa to przypuszczenie o braku możliwości kompensacji

częściowo utraconej aktywności Mgst1 przez inne transferazy, co podkreśla unikalną funkcję tego enzymu jako integralnego elementu dynamicznego systemu obronnego komórki.

Opierając się na obserwowanych zmianach morfologicznych i biochemicznych, dokonano charakterystyki aktywności kinaz aktywowanych mitogenami (*mitogen activated kinases*, MAP). Białka te biorą udział w odpowiedzi na egzo- i endogenne sygnały, odgrywają kluczową rolę w reakcji na stres komórkowy, uczestniczą w regulacji proliferacji, różnicowania, migracji, apoptozy oraz transformacji nowotworowej. W komórkach z obniżoną ekspresją *Mgst1* spadał całkowity poziom białka kinaz p38 oraz ERK1 i ERK2 (*extracellular signalling-regulated kinase*, ERK) przy jednoczesnym wzroście poziomu fosforylacji, co wskazuje na ich silną aktywację. Nieznaczne zmiany występowały również w przypadku kinazy JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), aczkolwiek nie były one statystycznie istotne. Jak wykazało profilowanie ekspresji genów przy użyciu mikromacierzy, zmianom w aktywacji kinaz MAP towarzyszył wzrost poziomu transkryptu ośmiu genów (*Nrtn*, *Rtn4*, *NcoA6*, *Myh10*, *S100a6*, *Stmn1*, *Mtch1*, *Gpi*) oraz spadek jedenastu (*Kcnip2*, *Chrm1*, *Pax2*, *Rasgrf1*, *Bax*, *Limk1*, *Fmr1*, *Efnal*, *Ywhah*, *Ngfr*, *Cdk5*). Analiza ta dostarczyła kilku interesujących przesłanek odnośnie potencjalnych przyczyn obserwowanych zmian fenotypowych. Dla przykładu, spadek potencjału migracyjnego komórek ze zmniejszonym poziomem *Mgst1* może wiązać się z zanikiem ekspresji *Limk1*, gdyż kinaza ta odgrywa kluczową rolę w fosforylacji białek rodziny ADF-kofiliny. Nadekspresja *Limk1* korelowała ze zwiększonym poziomem fosforylacji tych białek i wzrostem tempa migracji w komórkach raka piersi i prostaty [6,7]. Wzrost ekspresji *S100a6* (kalcyklina) może z kolei wskazywać na większą zdolność do obrony przed stresem oksydacyjnym [8], a także w powiązaniu z zaburzoną ekspresją pro-apoptotycznych białek z rodziny *Bax*, wpływać na sygnały regulujące śmierć komórki.

Kontynuując badania na rolę *Mgst1* zdecydowano się następnie na podjęcie tematu udziału tej transferazy w systemie obrony antyoksydacyjnej w warunkach zaburzonej homeostazy jonów Ca^{2+} . Wiadomo bowiem, że wiele stanów patologicznych wywołanych stresem oksydacyjnym ma u swojego źródła zmienioną sygnalizację wapniową. Do badań tych wykorzystano zweryfikowany wcześniej model komórek PC12 z obniżoną ekspresją PMCA2 lub PMCA3. Pierwszą obserwacją był podwyższony poziom GSH w linii częściowo pozbawionej izoformy 2 PMCA, choć stosunek GSSG/GSH pozostawał niezmienny w obu modyfikowanych liniach. Jednocześnie w liniach tych znacznie obniżał się poziom wewnątrzkomórkowego ATP. Biorąc pod uwagę, że synteza GSH wymaga znacznych ilości ATP, spadek ten może oznaczać zależne od Ca^{2+} zwiększenie nakładów energetycznych związane z uzupełnieniem rezerwuaru niebiałkowych grup tiolowych. Brak symptomów apoptozy i nekrozy może świadczyć o efektywności tego potencjalnego mechanizmu adaptacyjnego w ochronie przed indukowaną wapniem śmiercią komórki. Badania z wykorzystaniem N-etylomaleimidu, specyficznego aktywatora *Mgst1*, wykazały zwiększoną aktywność tej transferazy w obu modyfikowanych liniach sugerując jej udział w ochronie przed negatywnymi skutkami zmienionej homeostazy wapniowej. Wniosek ten wydają się potwierdzać dane wskazujące na podwyższoną ekspresję genu *Mgst1* w komórkach z obniżoną ekspresją PMCA2 lub PMCA3.

Wyniki innych grup wskazują, że *Mgst1* może tworzyć formy multimeryczne w warunkach zwiększonego narażenia komórki na stres oksydacyjny, a obecność dimerów i trimerów obserwowano także w strukturach krystalograficznych [9,10]. Badanie immunoreaktywności

z zastosowaniem przeciwciał rozpoznających epitop wspólny dla cytozolowych transferaz glutationowych potwierdziło obecność form oligomerycznych we wszystkich badanych liniach. Najsilniejsza intensywność obserwowana była w linii kontrolnej na wysokości około 55 kDa odpowiadającej formie tetramerycznej, a około 30-40% spadek odnotowano w liniach z obniżoną ekspresją izoform PMCA. Co interesujące, gdy do barwienia wykorzystano przeciwciała specyficznym rozpoznające Mgst1 następowała znacząca redukcja immunoreaktywności, za wyjątkiem formy heksamerycznej. Obecność tej formy, w przeciwieństwie do tych o masie poniżej 50 kDa, była widoczna nawet w warunkach zwiększonej ekspozycji na nadtlendioazotyn, będący silnym biologicznym utleniaczem. Można zatem sądzić, że tworzenie form oligomerycznych daje możliwość ochrony białka przed działaniem reaktywnych form tlenu/azotu, co przypuszczalnie pozwala na zachowanie przynajmniej częściowej aktywności Mgst1. Nitrozyllacja bądź nitracja struktur monomerycznych zwiększa podatność modyfikowanych białek na degradację proteolityczną, a ich usuwanie może być postrzegane jako mechanizm chroniący przed konsekwencjami stresu komórkowego.

Cykl badań nad Mgst1 kończy ocena jej funkcji w zróżnicowanych komórkach PC12, które są szeroko rozpowszechnionym modelem do analizy procesów zachodzących w tkance nerwowej. Rola tej transferazy wydaje się być szczególnie istotna w tej tkance, w której generowanie i akumulacja ROS znacznie zwiększają ryzyko procesów neurodegeneracyjnych. W liniach z obniżoną ekspresją *Mgst1* różnicowanie miało intensywniejszy przebieg objawiający się zwiększeniem ciała komórki, formowaniem często wielokrotnie rozgałęzionych neurytów, jak również wyższym odsetkiem komórek tworzących wypustki neuronalne. W przeciwieństwie do komórek niezróżnicowanych obserwowano jednoczesne nasilenie procesów nekrotycznych w linii częściowo pozbawionej tej transferazy. Z uwagi na fakt szeroko opisywanego udziału czynnika CREB (*cAMP response element binding protein*) w procesie różnicowania [11,12] sprawdzono poziom jego ekspresji i fosforylacji kluczowej reszty Ser-133. Pomimo, że w modyfikowanej linii zwiększał się całkowity poziom białka, to stopień jego ufosforylowania był zbliżony do wartości kontrolnych, co wskazuje na brak bezpośredniego powiązania pomiędzy Mgst1, a aktywacją CREB. Niewykluczonym jest, że odmienny przebieg różnicowania może być indukowany łagodnym stresem oksydacyjnym będącym konsekwencją manipulacji w ekspresji *Mgst1*. Jest to szczególnie istotne w przypadku komórek PC12, w których generowanie ROS wymagane jest do stymulowanego NGF-em rozrostu neurytów [13].

Zwiększoną obecność stresu komórkowego w badanym modelu doświadczalnym potwierdza podwyższony poziom GSSG oraz wzmożona peroksydacja lipidów błonowych połączona ze spadkiem stężenia ATP. Oprócz zmian w GSSG widoczny był także wzrost poziomu GSH co może, przynajmniej częściowo, tłumaczyć uszczuplenie puli ATP wynikające z ponoszenia większych nakładów energetycznych na jego syntezę *de novo*. Analiza ekspresji oraz immunoreaktywności białek biorących udział w syntezie glutationu oraz redukcji GSSG wykazała zwiększoną ilość syntetazy γ -glutamylcysteinowej oraz reduktazy glutationowej w warunkach obniżonej ekspresji *Mgst1*. Wskazuje to na rolę GSH jako pierwszej linii ochrony w warunkach stresowych, co przypuszczalnie ogranicza dalszą produkcję nadtlendioazotynów lipidowych.

Transkrypcja genów obu tych enzymów znajduje się pod kontrolą czynnika Nrf2 (*nuclear and erythroid 2-related factor*), którego ubikwitynacja i degradacja w proteasomach zależna jest

od białka Keap1 (*Kelch-like ECH-associating protein1*) [14,15]. Redukcja Mgst1 wiązała się z niemal czterokrotnym wzrostem ekspresji *Nrf2*, lecz nie *Keap1*, choć poziom białka *Nrf2* obniżał się o około 15% w stosunku do komórek kontrolnych. Może to sugerować spadek tempa translacji, bądź zwiększoną szybkość degradacji. Opierając się na wynikach ekspresji genów kodujących enzymy uczestniczące w syntezie GSH nie można jednak wykluczyć przejściowego wzrostu poziomu i aktywności *Nrf2*, co pozwoliłoby na uruchomienie transkrypcji *Nrf2*-zależnych genów i zwiększenie ilości ich mRNA przez dłuższy okres czasu. Badania te wskazują na istnienie powiązania pomiędzy poziomem Mgst1 a zależnymi od *Nrf2* mechanizmami protekcyjnymi. W kontekście tej zależności, wzrost peroksydacji lipidów może pobudzać sygnał do produkcji większej ilości enzymów regulujących wewnątrzkomórkowy poziom GSH, co może stanowić pewną formę adaptacji pozwalającą komórkom na wzrost i różnicowanie.

III. Wpływ błonowej kompozycji izoform PMCA na szlak *GABA shunt*

W kolejnym podjętym temacie wykorzystane zostały szczurze komórki izolowane z przedniego płata przysadki (linia GH3), które są szeroko stosowanym modelem do badań procesów zachodzących w pobudliwych komórkach endokrynych. Dzięki zdolności do syntezy γ -aminomaślanu (GABA) posłużyły one do odpowiedzi na pytanie o regulatorowy wpływ izoform PMCA na enzymy uczestniczące w metabolizmie tego neurotransmitera. Jak wiadomo GABA powstaje w wyniku reakcji dekarboksylacji glutaminianu katalizowanej przez dekarboksylazę glutaminianową (występującą w dwóch izoformach 65 kDa i 67 kDa, odpowiednio GAD65 i GAD67), a oba te związki mogą być metabolizowane do bursztynianu w szlaku zwanym *GABA shunt*. Katabolizm GABA obejmuje jego przekształcenie do semialdehydu bursztynowego przez aminotransferazę GABA (GABA-T), a następnie do intermediatu cyklu Krebsa przez dehydrogenazę semialdehydu bursztynowego (SSADH). Szlak ten ma istotne znaczenie szczególnie w tkance nerwowej, gdyż pozwala na włączenie glutaminianu do głównych przemian metabolicznych bez tworzenia toksycznego amoniaku.

Jak wykazano, supresja izoform PMCA2 lub PMCA3 miała podobny wpływ na homeostazę wapniową, do tego jaki opisano dla komórek PC12 (praca z poz. nr 1 wchodząca w skład osiągnięcia naukowego). W linii częściowo pozbawionej PMCA2 nie zanotowano zmian w ekspresji oraz białku GAD65 i GAD67, aczkolwiek znacznemu obniżeniu ulegała całkowita aktywność GAD. Podobną zależność obserwowano dla aktywności GABA-T. Z kolei redukcja PMCA3 wiązała się ze zwiększonym poziomem transkryptu GAD65, co przekładało się na ilość białka. Jednakże aktywność enzymatyczna GAD pozostawała niższa niż w kontroli. W żadnej z modyfikowanych linii nie wykazano wpływu supresji PMCA na poziom białka i aktywność SSADH. Pomimo odmiennej regulacji posttranskrypcyjnej i posttranslacyjnej przypuszczalnie leżącej u podstaw obserwowanych zmian, uzyskane wyniki sugerują, że obie izoformy PMCA mogą wpływać na syntezę GABA. Ponadto, zwiększone stężenie $[Ca^{2+}]_i$ będące efektem obniżenia ekspresji PMCA2 lub PMCA3 wpływa na hamowanie szlaku *GABA shunt*, co w znacznym stopniu uniemożliwia wykorzystanie GABA do celów energetycznych.

IV. Wpływ ketaminy na homeostazę wapniową oraz metabolizm GABA w wybranych obszarach mózgowia szczura (*Rattus norvegicus*)

Ketamina, niekompetycyjny inhibitor receptora *N*-metylo-D-asparagianu (NMDA), pomimo początkowo obiecującego zastosowania w medycynie i weterynarii klasyfikowana jest jako dysocjant psychodeliczny o silnych właściwościach psychozomimetycznych. Badania z udziałem ludzi wykazały, że podawanie ketaminy w dawkach subanestetycznych wywołuje objawy behawioralne, których spektrum obejmuje zarówno wytwórcze jak i ubytkowe symptomy towarzyszące schizofrenii [16]. Z racji jej udokumentowanych zdolności do wzbudzania odmiennych stanów świadomości o charakterze psychoz, stała się ona w ostatnich latach związkiem wykorzystywanym do modelowania zmian zachodzących w tej chorobie. Obserwacje towarzyszące blokowaniu kanału receptora NMDA przez ketaminę pozwoliły na wysunięcie hipotezy o udziale glutaminianu i GABA w powstawaniu zaburzeniach psychotycznych oraz umożliwiły stworzenie modelu opartego o hipofunkcję NMDA. Model ten został przeze mnie wykorzystany w pracach mających na celu zbadanie wpływu ketaminy na gospodarkę wapniową oraz wydzielanie neuroprzekaźników w mózgowiu szczura.

Pomimo wielu przesłanek sugerujących szczególną wrażliwość receptorów NMDA zlokalizowanych na interneuronach na działanie ketaminy oraz nadpobudliwość neuronów piramidowych w korze mózgowej związaną z osłabieniem neurotransmisji GABAergicznej, niewiele jest danych dotyczących wpływu tego związku na metabolizm GABA. W toku przeprowadzonych badań wykazałem, że podawanie ketaminy w dawce 30 mg/kg przez 5 kolejnych dni, oprócz obserwowanych przez inne zespoły zaburzeń motorycznych i stereotypowych, powodowało spadek ekspresji GAD67 w korze, mózdzku i hipokampie. W strukturze tej następował równoczesny wzrost poziomu transkryptu izoformy GAD65, podczas gdy spadek widoczny był w prążkowie. Wskazuje to na obszarowo specyficzną regulację ekspresji GAD w odpowiedzi na działanie ketaminy, która może być częścią mechanizmu długofalowej adaptacji neuronów do hipofunkcji receptora NMDA.

Zmiany w ekspresji i poziomie białka GAD67 w korze i mózdzku oraz GAD65 w prążkowie przekładały się na obniżoną aktywność enzymatyczną GAD, bezpośrednio sugerującą niższą zdolność do syntezy GABA. Zgodnie z tym stwierdzeniem, stężenie tego neuroprzekaźnika w zakończeniach synaptycznych izolowanych z tych struktur było niższe niż w analogicznej grupie kontrolnej. W przeciwieństwie to tych obszarów mózgowia, wzrost aktywności enzymatycznej GAD następował w prążkowie, co przypuszczalnie ma związek ze zwiększoną ekspresją GAD65 i może być postrzegane jako próba zachowania fizjologicznego stężenia GABA w odpowiedzi na spadek ekspresji GAD67. Kolejnym sposobem pozwalającym na kontrolę dostępności GABA w zależności od potrzeb komórki może być jego kierowanie na potrzeby neurosekrecji zamiast zużycia na cele energetyczne, za co odpowiada m.in. szlak *GABA shunt*. Dalsze badania potwierdziły spadek aktywności enzymów tego szlaku w wyniku traktowania ketaminą. Szczególnie istotna wydaje się być zmniejszona aktywność SSADH, co powoduje wzrost ilości semialdehydu bursztynowego, który uruchamia odwrotny tryb GABA-T przyczyniając się do hamowania degradacji GABA.

Pomimo obniżonej zdolności do syntezy GABA w korze i mózdzku wywołanej działaniem ketaminy nie obserwowano zmian w zależnej od Ca^{2+} sekrecji tego neuroprzekaźnika. Spadek synaptycznego wydzielania GABA odnotowano natomiast w synaptosomach izolowanych z prądkowia. Wyniki znakowania fluorescencyjnego sugerują, że przyczyną tego zjawiska jest mniejsza ilość obecnych w błonie plazmatycznej zależnych od napięcia kanałów typu L (*L-type VDCCs*), co w konsekwencji mogło wpływać na wielkość napływu Ca^{2+} . Hipotezę tę potwierdzają wyniki dodatkowych badań, w których ketaminę aplikowano *in vitro*. W korze i mózdzku obniżało się z kolei niesynaptyczne wydzielanie GABA, mierzone w nieobecności zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , które zależne jest od odwrotnego trybu działania błonowego transportera GABA (*sodium- and chloride-dependent GABA transporter 1, GAT-1*). W wyniku działania ketaminy obniżał się poziom białka GAT-1 w tych strukturach, co w warunkach *in vivo* może bezpośrednio wpływać na szybkość zwrotnego wychwytu GABA. W kontekście wywołanej ketaminą obniżonej aktywności interneuronów, zmiana taka może być postrzegana jako próba zwiększenia stężenia tego neuroprzekaźnika w przestrzeni międzysynaptycznej. Uzyskane wyniki wskazują, że unikalne zmiany w metabolizmie GABA w funkcjonalnie odmiennych rejonach mózgowia mogą leżeć u podstaw psychozomimetycznych właściwości ketaminy, a kora i mózdzek wydają się szczególnie wrażliwe na jej działanie.

Wapń odgrywa istotną rolę w regulacji uwalniania neurotransmiterów, dlatego też w kontekście obserwowanych zmian w wydzielaniu GABA zasadnym stało się określenie wpływu ketaminy na komórkową homeostazę tego jonu. Zastosowanie dawki 30 mg/kg powodowało wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_c$ we wszystkich badanych strukturach mózgowia, przy czym największy przyrost występował w prądkowiu. W strukturze tej, podobnie jak w korze, istniała dodatnia korelacja pomiędzy wartościami $[\text{Ca}^{2+}]_c$ a hiperaktywnością motoryczną. Stan podwyższonego stężenia Ca^{2+} mógł wynikać z samego mechanizmu działania ketaminy. Wiadomo bowiem, że inhibicja receptora NMDA zlokalizowanego na interneuronach osłabia uwalnianie GABA znosząc hamowanie szlaków pobudzających. Jednym z efektów jest napływ Ca^{2+} drogami niezależnymi od glutaminianu oraz jego wyrzut z cystern siateczki śródplazmatycznej [17]. Możliwy jest także kompensacyjny napływ Ca^{2+} przez pozostałe receptory glutaminianowe – kwasu α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazoloopropianowego (AMPA) i kainowego [17].

Neuronalna homeostaza wapniowa opiera się na przeciwstawnie działających mechanizmach regulujących napływ – *system on* – i usuwanie Ca^{2+} poza obręb komórki – *system off*. Profilowanie ekspresji genów kodujących elementy tych mechanizmów wykazało zmiany we wszystkich badanych strukturach mózgowia, co potwierdza negatywny wpływ ketaminy na wewnątrzkomórkową regulację $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Istnienie korelacji pomiędzy podwyższonym stężeniem $[\text{Ca}^{2+}]_c$ a poziomem transkryptyu PMCA2, PMCA4, SERCA3 oraz VDCC typu L (*Cacna1c*) obserwowano w korze; PMCA1, PMCA3 oraz VDCC typu L (*Cacna1d*) w mózdzku; PMCA3, SERCA3 oraz izoformy 3 wymiennicza sodowo-wapniowego (NCX3) w hipokampie i PMCA1, PMCA3, SERCA3 w prądkowiu. Większość z opisywanych zmian dotyczyła genów kodujących białka uczestniczące w procesie usuwania Ca^{2+} , co może wskazywać na próbę przywrócenia spoczynkowego stężenia $[\text{Ca}^{2+}]_c$. W świetle danych literaturowych szczególną rolę ochronną przed przeładowaniem wapniem należy przypisać PMCA1, PMCA4 oraz pompie SERCA, których współdziałanie pozwala na efektywne obniżenie $[\text{Ca}^{2+}]_c$ [18]. Interesującą obserwacją było

obniżenie poziomu mRNA tzw. szybkich izoform PMCA – PMCA3 w mózdku, hipokampie i prążkowie, a PMCA2 w korze. Badania *in vitro* na hodowlach neuronalnych sugerują, że redukcja poziomu tych białek pozbawia komórki zdolności do regulacji homeostazy wapniowej i może prowadzić do obumierania neuronów motorycznych u myszy [19,20]. Niewykluczonym jest zatem, że wzrost $[Ca^{2+}]_i$ obserwowany pod wpływem ketaminy wiąże się ze zmienionym składem izoform PMCA. Jak dowiodły kolejne badania, deregulacja gospodarki jonów wapnia może wynikać także z bezpośredniego hamowania aktywności synaptosomalnej PMCA przez ketaminę. Prace na oczyszczonym enzymie wykazały bowiem istnienie dwóch potencjalnych miejsc wiązania tego związku, jedno w obrębie domeny autoinhibitorowej, a drugie w największej pętli cytozolowej w sąsiedztwie miejsca katalitycznego.

PMCA i receptory NMDA mogą współpracować ze sobą dzięki obecności w wysoce wyspecjalizowanych mikrodomenach zwanych wapniowymi sygnalozomami. Szczególnie istotna rola tej interakcji wydaje się mieć miejsce w neuronach glutaminergicznych, w których NMDA i PMCA mogą tworzyć kompleksy trimeryczne poprzez białko gęstości postsynaptycznej o masie 95 kDa (*postsynaptic density protein 95*, PSD95). Dzięki obecności domen PDZ, PSD95 może indukować klasterowanie molekuł PMCA2 i PMCA4, a kompleks PSD95/PMCA dodatkowo mobilizuje jednostki receptora NMDA – NMDAR1 i NMDAR2A [21,22]. Nasuwa się zatem przypuszczenie, że hipofunkcja tego receptora może zaburzać interakcje PMCA z partnerami białkowymi w obrębie mikrodomen wapniowych.

Badania na strukturach mózgowia wykazały wzrost poziomu białka PSD95 w korze, mózdku i hipokampie. Jednocześnie stwierdzono swoiste obszarowo zmiany w intensywności tworzenia kompleksów PSD95/NMDAR. Nasiloną interakcją PSD95/NMDAR1 obecna była w korze i hipokampie, PSD95/NMDAR2A w mózdku, hipokampie i prążkowie, natomiast spadek PSD95/NMDAR2B obserwowany był w prążkowie. Szczególnie interesujący był jednoczesny wzrost ilości PSD95/NMDAR1 i PSD95/PMCA4 w korze, co sugeruje formowanie lokalnych gęstości NMDAR1/PSD95/PMCA4. Skupianie PMCA4 w takich strukturach może stanowić próbę równoważenia zwiększonego napływu Ca^{2+} . Najnowsze badania pokazujące PSD95-zależną asocjację PMCA4 do tratw lipidowych [23] i połączoną z tym oligomeryzację pompy skutkującą wzrostem jej aktywności katalitycznej [24] wydają się potwierdzać powyższe przypuszczenia. Dlatego też, skupianie PMCA4 w klasterach obserwowane w korze, mózdku i hipokampie mogło powodować znacznie sprawniejsze usuwanie Ca^{2+} , a brak nasilonej interakcji PSD95/PMCA4 w prążkowie stać się przyczyną najwyższego, ze wszystkich badanych rejonów, spoczynkowego stężenia Ca^{2+} . Z drugiej strony, hamowanie aktywności enzymatycznej PMCA przez ketaminę może wpływać na jej przyłączanie do układu PSD95/receptor NMDA i znacznie osłabiać zdolność komórki do regulacji homeostazy wapniowej. Konsekwencją tego jest nienaturalnie przedłużony sygnał wapniowy skutkujący nadprodukcją neuromodulatorów odpowiedzialnych za wsteczną sygnalizację synaptyczną. Ma ona miejsce, gdy do neuronu postsynaptycznego nie dociera sygnał hamujący w postaci GABA z zakończenia presynaptycznego i neuron zostaje pobudzony. Zaburzenia te mogą wpływać na zwiększoną produkcję i sekrecję glutaminianu do przestrzeni międzysynaptycznej.

W ostatnim etapie badań nad wpływem ketaminy na wydzielanie neuroprzekaźników podjęto próbę zbadania powyższego zagadnienia. Zastosowanie subanestecznych dawek tego

związku nie wpływało na stężenie glutaminianu i glutaminy w hipokampie, mózdzku i prążkowi. Jednakże po depolaryzacji synaptosomów otrzymanych z kory i prążkowiec obserwowano nasiloną, zależną od Ca^{2+} uwalnianie glutaminianu na drodze egzocytozy. Sekrecja tego przekaźnika wymaga uprzedniego upakowania do pęcherzyków synaptycznych za co odpowiada pęcherzykowy transporter glutaminianu (*vesicular glutamate transporter*, VGLUT), występujący w synapsach glutaminergicznych w dwóch izoformach – VGLUT1 i VGLUT2. W obu tych strukturach zwiększał się poziom mRNA i białka tego transportera. Co ciekawe, w neuronach prążkowiec nie wykryto obecności żadnej z tych izoform [25,26], co może w rzeczywistości odzwierciedlać zmiany zachodzące w innych szlakach np. w glutaminergicznych neuronach kory mózgowej pobudzających interneurony prążkowiec. Choć, nasiloną neurotransmisja glutaminergiczna wiąże się zwykle z nadpodażą glutaminianu w przestrzeni międzysynaptycznej, to może mieć ona swoje podłoże nie tylko w zwiększonej sekrecji ale również w nieprawidłowym usuwaniu tego neuroprzekaźnika. W dorosłym mózgu za około 90% wychwytu odpowiada transporter aminokwasów pobudzających 2 (*excitatory amino acid transporter 2*, EAAT2) [27]. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały spadek poziomu tego transportera w korze, co w połączeniu ze zmianami w ekspresji VGLUT może sugerować kompensacyjny, ale zarazem patologiczny, mechanizm mający na celu zwiększenie stężenia glutaminianu, tak aby zrównoważyć dysfunkcyjność receptora NMDA.

Uzyskane wyniki wskazują, że hamowanie aktywności PMCA może w sposób globalny wpływać na deregulację homeostazy wapniowej w mózgowiu szczura, a specyficzne obszarowo zmiany w oddziaływaniu PMCA, PSD95, NMDA receptor modulować lokalną sygnalizację Ca^{2+} w odpowiedzi na traktowanie ketaminą. Nieprawidłowa obróbka sygnału wapniowego w części postsynaptycznej przypuszczalnie wpływa na wyzwolenie odpowiedzi zwrotnej prowadzącej do zwiększonego presynaptycznego uwalniania glutaminianu. Nasiloną transmisja glutaminergiczna może z kolei być jedną z przyczyn psychozomimetycznego działania ketaminy.

Literatura

1. Longenecker KL, Garrard SM, Sheffield PJ, Derewenda ZS (2001) Protein crystallization by rational mutagenesis of surface residues: Lys to Ala mutations promote crystallization of RhoGDI. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 57:679-88.
2. Grauschopf U, Winther JR, Korber P, Zander T, Dallinger P, Bardwell JC (1995) Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell.* 83:947-55.
3. Aslund F, Berndt KD, Holmgren A. Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria (1997) *J Biol Chem.* 272:30780-6.
4. Siritantikorn A, Johansson K, Åhlen K, Rinaldi R, Suthiphongchai T, Wilairat P, Morgenstern R (2007) Protection of cells from oxidative stress by Microsomal glutathione transferase 1. *Biochem Biophys Res Commun* 355: 592–596.
5. Johansson K, Åhlen K, Rinaldi R, Sahlander K, Siritantikorn A and Morgenstern R (2007) Microsomal glutathione transferase 1 in anticancer drug resistance. *Carcinogenesis* 28: 465–470.
6. Davila M, Frost AR, Grizzle WE, Chakrabarti R (2003) LIM Kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells. *J Biol Chem* 278: 36868–36875.

7. Bagheri-Yarmand R, Mazumdar A, Sahin AA, Kumar R (2006) LIM kinase 1 increases tumor metastasis of human breast cancer cells via regulation of the urokinase-type plasminogen activator system. *Int J Cancer* 118: 2703–2710.
8. Filipek A, Michowski W, Kuznicki J (2007) Involvement of S100A6 (calcyclin) and its binding partners in intracellular signaling pathways. *Advan Enzyme Regul* 48: 225–239.
9. Holm PJ, Bhakat P, Jegerschöld C, Gyobu N, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y, Morgenstern R, Hebert H (2006) Structural basis for detoxification and oxidative stress protection in membranes. *J Mol Biol.* 360:934-45.
10. Hossain QS, Ulziikhishig E, Lee KK, Yamamoto H, Aniya Y (2009) Contribution of liver mitochondrial membrane-bound glutathione transferase to mitochondrial permeability transition pores. *Toxicol Appl Pharmacol.* 235:77-85.
11. Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron.* 35:605-23.
12. Mayr BM, Canettieri G, Montminy MR (2001) Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:10936-41.
13. Suzukawa K, Miura K, Mitsushita J, Resau J, Hirose K, Crystal R, Kamata T (2000) Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 275:13175-8.
14. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB (2009) The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 284:13291-5.
15. Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW (2003) Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J Biol Chem.* 278:8135-45.
16. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB Jr, Charney DS (1994) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry.* 51:199-214.
17. Lidow MS (2003) Calcium signaling dysfunction in schizophrenia: a unifying approach. *Brain Res Rev.* 43:70–84.
18. Brini M, Bano D, Manni S, Rizzuto R, Carafoli E (2000) Effects of PMCA and SERCA pump overexpression on the kinetics of cell Ca(2+) signalling. *EMBO J.* 19:4926–4935.
19. Fernandes D, Zaidi A, Bean J, Hui D, Michaelis ML (2007) RNA-induced silencing of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase 2 in neuronal cells: effects on Ca²⁺ homeostasis and cell viability. *J Neurochem.* 102:454–465.
20. Kurnellas MP, Nicot A, Shull GE, Elkabes S (2005) Plasma membrane calcium ATPase deficiency causes neuronal pathology in the spinal cord: a potential mechanism for neurodegeneration in multiple sclerosis and spinal cord injury. *FASEB J.* 19:298–300.
21. DeMarco SJ, Strehler EE (2001) Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms 2b and 4b interact promiscuously and selectively with members of the membrane-associated guanylate kinase family of PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domain-containing proteins. *J Biol Chem.* 276: 21594–600.
22. Garside ML, Turner PR, Austen B, Strehler EE, Beesley PW, Empson RM (2009) Molecular interactions of the plasma membrane calcium ATPase PMCA2 at pre- and post-synaptic sites in rat cerebellum. *Neuroscience.* 162:383–395.
23. Sepúlveda MR, Berrocal-Carrillo M, Gasset M, Mata AM (2006) The plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 4 is localized in lipid rafts of cerebellum synaptic plasma membranes. *J Biol Chem.* 281: 447–453.
24. Kosk-Kosicka D, Wawrzynow A, Roszczynska G (1994) Stabilizing and destabilizing effects on plasma membrane Ca²⁺-ATPase activity. *Mol Cell Biochem.* 139:1–9.
25. Freneau RT, Jr Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron.* 31:247–260.

26. Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C (2001). The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci.* 21:RC181.
27. Kanai Y, Hediger MA (2003) The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *Eur J Pharmacol.* 479:237–247.

Toussier Boudier