

Aleksandra Mielnicka

Mechanizmy regulacji egzocytozy w astrocytach

Praca doktorska

wykonana w Pracowni Neurobiologii

Centrum Badań Plastyczności Neuronalnej

i Chorób Mózgu BRAINCITY

Instytutu Biologii Doświadczalnej

im. M. Nenckiego PAN

PROMOTOR:

Prof. dr hab. Leszek Kaczmarek

PROMOTOR POMOCNICZY:

Dr Piotr Michaluk

Warszawa, 2024

Panu Doktorowi Piotrowi Michalukowi

składałam podziękowania za możliwość rozwoju naukowego, ukierunkowanie moich zainteresowań oraz cenne uwagi, które były niezwykle pomocne w trakcie przygotowywania tej rozprawy.

**Panu Profesorowi Doktorowi Habilitowanemu
Leszkowi Kaczmarkowi**

dziękuję za możliwość przeprowadzenia badań w Laboratorium Neurobiologii oraz za inspirujące rozmowy, które motywowały mnie do konsekwentnego dążenia do celu.

Pani Doktor Emilii Rejmak-Kozickiej

dziękuję za merytoryczną pomoc w zakresie praktycznym oraz za wprowadzenie mnie w technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ.

Koleżankom i kolegom z Laboratorium Neurobiologii

dziękuję za wspólnie spędzony czas oraz owocną współpracę.

**Moim najbliższym, rodzicom, bratu i przyjaciółom,
a w szczególności Jakubowi Ramianowi
i Danielowi Dziobowi**

dziękuję za wiarę w moje możliwości, ogromne wsparcie w chwilach, gdy miałam się poddać, oraz za sprawienie, że jestem tym, kim zawsze chciałam być.

Badania naukowe przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały przeprowadzone dzięki finansowemu wsparciu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu SONATA 13, numer grantu: 2017/26/D/NZ3/01017.



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Spis treści

Wykaz skrótów	8
1. Streszczenie	12
2. Abstract	13
3. Wstęp	14
3.1. Podstawowe funkcje astrocytów w mózgu.....	14
3.2. Wypustki astrocytów jako część synapsy - model „synapsy trójdzielnej”	15
3.3. Astrocytarny proces uwalniania glioprzekazników: mechanizm regulowanej egzocytozy w astrocytach.....	19
3.4. Egzocytoza w astrocytach: identyfikacja niejasności w obszarze badań	25
3.5. Różnorodność podtypów astrocytów w różnych obszarach mózgu.....	26
4. Cel pracy.....	30
5. Materiały i metody	31
5.1. Klonowanie molekularne DNA: projekt i konstrukcja plazmidu do obrazowania przebiegu procesu egzocytozy w astrocytach.....	31
5.1.1. Trawienie restrykcyjne wektora plazmidowego i plazmidu zawierającego wstawkę.....	31
5.1.2. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym.....	32
5.1.3. Izolacja DNA z żelu agarozowego	33
5.1.4. Ligacja fragmentów DNA - wstawki z wektorem	33
5.1.5. Transformacja kompetentnych komórek <i>Escherichia coli</i> szczepu DH5α przy użyciu szoku cieplnego.....	34
5.1.6. Zakładanie płynnej hodowli bakterii z pojedynczej kolonii bakteryjnej kompetentnych komórek <i>Escherichia coli</i> po procesie transformacji.....	35
5.1.7. Izolacja plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej.....	35
5.1.8. Oznaczanie stężenia oraz czystości plazmidowego DNA	36
5.1.9. Analiza restrykcyjna plazmidowego DNA pod względem obecności i orientacji wstawki w wektorze plazmidowym.....	36

5.2.	Dysocjowana pierwotna hodowla komórek nerwowych i glejowych hipokampa oraz kory nowej szczurzych osesków P0 (<i>ang. postnatal day 0</i>) Wistar	37
5.2.1.	Preparacja szkiełek nakrywkowych do hodowli neuronalno-astrocytarnej..	38
5.2.2.	Preparacja anatomiczna mózgu szczurzego oseska z uwzględnieniem hipokampów i kory nowej	39
5.2.3.	Izolacja komórek nerwowych i glejowych z hipokampów oraz kory nowej	40
5.3.	Hodowla szczurzych astrocytów hipokampa i kory nowej	41
5.4.	Transfekcja astrocytów <i>in vitro</i>	42
5.4.1.	Transfekcja hodowli neuronalno-astrocytarnej konstruktami genetycznymi	42
5.4.2.	Transfekcja hodowli astrocytarnej plazmidowym DNA	43
5.5.	Immunofluorescencyjne barwienie astrocytów w hodowlach astrocytarnych oraz neuronalno-astrocytarnych	43
5.6.	Analiza transkryptomu różnych typów hodowli astrocytów oraz pojedynczych astrocytów w kontekście ekspresji genu <i>Unc13c</i>	44
5.6.1.	Izolacja całkowitego RNA	44
5.6.2.	Odwrotna transkrypcja RNA oraz ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy	45
5.6.3.	Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i>	46
5.7.	Przygotowanie hodowli komórek nerwowych i glejowych hipokampa oraz kory nowej do pomiarów z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej całkowitego wewnętrznego odbicia	48
5.8.	Konfiguracja układu pomiarowego do poklatkowej rejestracji procesu egzocytozy w astrocytach	50
5.9.	Komputerowa analiza poklatkowych rejestracji obrazu mikroskopowego	51
5.9.1.	Suite2p jako narzędzie do przetwarzania danych w postaci plików rastrowych z obrazowania astrocytarnego procesu egzocytozy przekazników	51

5.10.	Analiza fenotypu astrocytów w hodowli komórek <i>in vitro</i>	52
5.11.	Metody prezentacji danych i analiza statystyczna otrzymanych wyników	53
6.	Wyniki	55
6.1.	Porównanie poziomu egzocytozy w hodowlach astrocytarnych oraz neuronalno-astrocytarnych hipokampa	55
6.2.	Częstotliwość egzocytozy wzrasta pod wpływem stymulacji elektrycznej	58
6.3.	Znaczenie udziału jonów Ca^{2+} uwalnianych z siateczki śródplazmatycznej w egzocytozie astrocytów	62
6.4.	Określenie, czy zewnątrzkomórkowy wapń (Ca^{2+}) ma wpływ na częstotliwość egzocytozy w astrocytach	65
6.5.	Zróżnicowanie astrocytów hipokampa i kory nowej ze względu na częstotliwość egzocytozy	69
6.6.	Wpływ blokowania aktywności neuronalnej na częstotliwość egzocytozy w astrocytach korowych	71
6.7.	Ocena częstotliwości egzocytozy astrocytów korowych w kontekście zewnątrzkomórkowego źródła sygnałów Ca^{2+}	74
6.8.	Ewaluacja transkryptomu astrocytów hipokampa i kory nowej pod względem poziomu mRNA dla genu <i>Unc13c</i>	76
7.	Dyskusja	78
7.1.	Astrocyty w hodowli neuronalno-glejowej mają znacząco niższą częstotliwość spontanicznej egzocytozy niż astrocyty w hodowlach astrocytarnych	80
7.2.	Astrocyty w hodowli hipokampalnej reagują wzrostem wydajności egzocytozy na zwiększoną aktywność komórek nerwowych wywołaną elektryczną stymulacją, a blokowanie aktywności neuronalnej znosi ten efekt	81
7.3.	Częstotliwość egzocytozy w hodowli hipokampalnej nie zależy od jonów Ca^{2+} uwalnianych z siateczki śródplazmatycznej	82
7.4.	Całkowite zbuforowanie wewnątrzkomórkowego wapnia (Ca^{2+}) powoduje zanik egzocytozy w astrocytach hodowli hipokampalnej i korowej	84
7.5.	Częstotliwość egzocytozy w hodowli hipokampalnej zależy od zewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} oraz od aktywacji receptorów AMPA	85

7.6.	Częstotliwość egzocytozy w astrocytach w hodowli korowej wzrasta w wyniku stymulacji elektrycznej, nawet w warunkach blokowania potencjałów czynnościowych przez TTX	86
7.7.	Poziom mRNA dla <i>Unc13c</i> jest zbliżony w hodowlach hipokampalnych i korowych, chociaż astrocyty w hodowli hipokampalnej mają wyższy poziom mRNA <i>Unc13c</i> niż astrocyty w hodowli korowej.....	87
7.8.	Przyszłe kierunki badań	88
8.	Podsumowanie i wnioski końcowe	89
9.	Wykaz wykorzystanych programów i zasobów internetowych	91
10.	Spis literatury.....	92
11.	Zestawienie własnych publikacji.....	108

Wykaz skrótów

AMPARs	– (<i>ang. α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors</i>) jonotropowe receptory glutaminianu selektywnie aktywowane przez kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy
ANP	– (<i>ang. atrial natriuretic peptide</i>) przedsionkowy peptyd natriuretyczny
2-APB	– (<i>ang. 2-Aminoethoxydiphenyl borate</i>) boran 2-aminoetylodifenylowy, antagonist receptorów trifosforanu inozytolu
ATP	– (<i>ang. adenosine triphosphate</i>) adenozy-5'-trifosforan, przenośnik energii w komórce
BDNF	– (<i>ang. brain-derived neurotrophic factor</i>) neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego
Cy3	– (<i>ang. Cyanine3</i>) cyjanina 3, barwnik fluorescencyjny
DAG	– (<i>ang. diacylglycerol</i>) diacyloglicerol
DCV	– (<i>ang. dense-core vesicle</i>) pęcherzyk z gęstym elektronowo rdzeniem
DIV	– (<i>ang. day in vitro</i>) dzień hodowli <i>in vitro</i>
DM	– (<i>ang. dissociation medium</i>) pożywka do anatomicznej preparacji struktur mózgu, wodny roztwór soli
DM - Ky/Mg	– (<i>ang. dissociation medium with kynurenic acid and magnesium ions</i>) roztwór DM z dodatkiem kwasu kynureninowego i jonów magnezu (Mg^{2+})
DMEM/FBS	– (<i>ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium with fetal bovine serum</i>) pożywka do pierwotnej hodowli astrocytów
ES	– (<i>ang. Extracellular solution</i>) roztwór pozakomórkowy
FBS	– (<i>ang. fetal bovine serum</i>) płodowa surowica bydlęca

FISH	– (<i>ang. fluorescent in situ hybridization</i>) fluorescencyjna hybrydyzacja in situ
FKPM	– (<i>ang. fragment per million mapped fragments</i>) fragment na tysiąc par zasad na milion zmapowanych fragmentów
GFP	– (<i>ang. Green fluorescent protein</i>) zielone białko fluorescencyjne
GLAST (EAAT1)	– (<i>ang. excitatory amino acid transporter 1</i>) transporter dla glutaminianu GLAST
GLT-1	– (<i>ang. glutamate transporter-1</i>) transporter dla glutaminianu 1
GPCR	– (<i>ang. G protein coupled receptor</i>) receptor metabotropowy związany z białkami G
HEPES	– (<i>ang. N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid</i>) bufor fosforanowy
IP3	– (<i>ang. inositol 1,4,5-trisphosphate</i>) inozytolo-(1,4,5)-trifosforan
IP3R2	– (<i>ang. type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor</i>) receptor dla inozytolo-(1,4,5)-trifosforanu typu 2
MEM/FBS	– (<i>ang. Minimum Essential Medium with fetal bovine serum</i>) pożywka do wysiewania komórek nerwowych oraz glejowych hipokampa, kory nowej szczurzych osesków
mGluR5	– (<i>ang. metabotropic glutamate receptor 5</i>) metabotropowy receptor glutaminianu 5
mGluRs	– (<i>ang. metabotropic glutamate receptors</i>) metabotropowe receptory glutaminianu
NB-A/B-27	– (<i>ang. Neurobasal-A with B-27 Supplement</i>) pożywka do długotrwałego wzrostu komórek nerwowych
NBQX	– (<i>ang. 2,3 - Dioxo - 6 - nitro - 1,2,3,4 - tetrahydrobenzo[f]quinoxaline - 7 - sulfonamide</i>) 2,3 - diokso -

	6 - nitro - 1,2,3,4 - tetrahydrobenzo[f]chinoksalino - 7 - sulfonamid, kompetycyjny antagonist receptorów AMPA
NMDARs	– (<i>ang. N-methyl-D-aspartate receptors</i>) receptory N-metylo-D-asparaginowe dla glutaminianu
NPCs	– (<i>ang. neural progenitor cells</i>) neuronalne komórki progenitorowe
NPY	– (<i>ang. neuropeptide Y</i>) neuropeptyd Y
NSF	– (<i>ang. N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>) białko NSF, fosfohydrolaza ATP
PBS	– (<i>ang. phosphate buffered saline</i>) zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
PCR	– (<i>ang. polymerase chain reaction</i>) łańcuchowa reakcja polimerazy
PFA	– (<i>ang. paraformaldehyde</i>) paraformaldehyd
ROI	– (<i>ang. region of interest</i>) region zainteresowania
RT-qPCR	– (<i>ang. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>) ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkrypcją
Ry	– (<i>ang. Ryanodine</i>) rianodyna, bloker receptorów rianodynowych
(S)-3,5-DHPG	– (<i>ang. (S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine</i>) (S)-3,5-dihydroksyfenyloglicyna, agonista metabotropowych receptorów dla glutaminianu grupy I
SAP	– (<i>ang. Shrimp Alkaline Phosphatase</i>) fosfataza alkaliczna z krewetek
SEM	– (<i>ang. Standard error of measurements</i>) standardowy błąd pomiaru

SEP	– (<i>ang. superecliptic pHluorin</i>) pHluoryna, zmodyfikowane białko zielonej fluorescencji wrażliwe na zmiany pH
SL	– (<i>ang. secretory lysosome</i>) lizosom wydzielniczy
SLMV	– (<i>ang. synaptic-like microvesicle</i>) mikropęcherzyk podobny do pęcherzyka synaptycznego
SM proteins	– (<i>ang. Sec1/Munc18-like proteins</i>) białka podobne do Sec1/Munc18
SNAP	– (<i>ang. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein</i>) rozpuszczalne białko przyłączające czynnik wrażliwy na N-etylomaleimid
SNARE	– (<i>ang. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>) ewolucyjnie konserwowane białka transbłonowe
TIRF	– (<i>ang. total internal reflection fluorescence</i>) całkowite wewnętrzne odbicie fluorescencji
TTX	– (<i>ang. tetrodotoxin citrate</i>) cytrynian tetrodotoksyny, bloker potencjałozależnych kanałów sodowych (Na ⁺)
VAMP2	– (<i>ang. vesicle-associated membrane protein 2</i>) synaptobrewina, białko związane z błoną pęcherzyka
vGluts	– (<i>ang. vesicular glutamate transporters</i>) pęcherzykowe transportery glutaminianu

1. Streszczenie

Dwukierunkowa komunikacja pomiędzy siecią połączeń neuronalnych a wypustkami astrocytarnymi zapoczątkowała nowe podejście do dotychczas neurocentrycznego postrzegania mechanizmów regulacji przekazywania synaptycznego. W latach 90. zdefiniowano koncept „synapsy trójdzielnej” w odpowiedzi na zgromadzone dowody aktywnego kontaktu komórek nerwowych i glejowych, opierający się na założeniu, że neuroprzekaźniki, aktywując metabotropowe receptory na powierzchni astrocytów, prowadzą do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} w ich cytoplazmie oraz uwolnienia glioprzekaźników.

Do tej pory nie jest do końca jasne, jaka jest dynamika oraz właściwy mechanizm przekazywania jonów Ca^{2+} w astrocytach i czy prowadzi on do uwalniania glioprzekaźników poprzez regulowaną egzocytozę. Dodatkowo niewiele wiadomo o funkcjonalnej różnorodności astrocytów w różnych obszarach mózgu, szczególnie w kontekście glioprzekazywania.

W niniejszej pracy użyto mieszanych hodowli neuronalno-glejowych i mikroskopii całkowitego wewnętrznego odbicia (TIRF) do zbadania mechanizmów regulujących egzocytozę w astrocytach. Wykazano, że obecność neuronów w hodowli znacząco zmniejsza poziom spontanicznej egzocytozy w astrocytach. Ponadto wykazano, że aktywność neuronalna reguluje częstotliwość egzocytozy w astrocytach, a proces ten zależy w dużej mierze od zewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} . Ustalono również, że w przeciwieństwie do hodowli hipokampalnej, proces egzocytozy wywołany elektrostymulacją nie ulega zahamowaniu w obecności TTX w hodowli korowej. Koreluje to ze zmniejszonym poziomem mRNA genu *Unc13c* w astrocytach w hodowli korowej w stosunku do hodowli hipokampalnej, co zbadano za pomocą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH, ang. fluorescent in situ hybridization).

Podsumowując, przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki badań opisują pewne mechanizmy regulacji egzocytozy w astrocytach, które wymagają jednak dalszych badań.

2. Abstract

The bidirectional communication between the neuronal connection network and astrocytic protrusions initiated a new approach to the previously neurocentric view of the regulation mechanisms of synaptic transmission. In the 1990s, the concept of a ‘tripartite synapse’ was defined in response to accumulated evidence of active contact between neural and glial cells, based on the idea that neurotransmitters, by activating metabotropic receptors on the surface of astrocytes, lead to an increase in the intracellular Ca^{2+} ion concentration in their cytoplasm and the release of gliotransmitters.

To date, it is not entirely clear what the dynamics and the specific mechanism of Ca^{2+} ion transmission in astrocytes is and whether it leads to the release of gliotransmitters through regulated exocytosis. Additionally, little is known about the functional diversity of astrocytes in different brain areas, particularly in the context of gliotransmission.

In this study, mixed neuronal-glial cultures and total internal reflection fluorescence microscopy (TIRF) were used to investigate the mechanisms regulating exocytosis in astrocytes. It was shown that the presence of neurons in the culture significantly reduces the level of spontaneous exocytosis in astrocytes. Furthermore, neuronal activity was found to regulate the frequency of exocytosis in astrocytes, a process that largely depends on extracellular Ca^{2+} ions. It was also established that, unlike in hippocampal cultures, the exocytosis process induced by electrical stimulation is not inhibited in cortical cultures by the presence of TTX. This correlates with a reduced level of mRNA for the *Unc13c* gene in astrocytes from cortical cultures compared to those from hippocampal cultures, as investigated using fluorescent in situ hybridization (FISH).

In summary, the findings presented in this dissertation describe certain mechanisms of exocytosis regulation in astrocytes, which require further investigation.

3. Wstęp

3.1. Podstawowe funkcje astrocytów w mózgu

Pragnąc wyjaśnić procesy zachodzące w mózgu, bardzo wiele uwagi poświęcono komunikacji pomiędzy neuronami. Jak wiadomo, mózg składa się nie tylko z komórek nerwowych, ale i z komórek glejowych, które stanowią około połowy komórek w tym organie. Nazwa „glej” została wprowadzona przez Rudolfa Virchowa w artykule z 1864 r. [Virchow, 1864] i odnosi się ona do „substancji/tkanki łącznej” spajającej komórki nerwowe, co niejako spowodowało postrzeganie komórek glejowych jako „kleju” utrzymującego neurony razem [Somjen, 1988; Verkhratsky, 2006; Allen i Lyons, 2018]. Wśród komórek glejowych możemy wyróżnić trzy podstawowe typy: astrocyty, mikroglej i oligodendrocyty [von Bartheld i wsp., 2016; Allen i Lyons, 2018], z czego astrocyty są najliczniejszą grupą.

Astrocyty swoją nazwę zawdzięczają Mihályowi von Lenhossékowi, który zaproponował ją w 1895 r. [Montgomery, 1994] ze względu na ich gwieździsty kształt oraz drobne, rozgałęzione wypustki. Stanowią one kluczowy typ komórek glejowych w ośrodkowym układzie nerwowym [Kettenmann i Ransom, 2005; Gradisnik i Velnar, 2023].

Morfologicznie możemy wyróżnić dwa podstawowe typy astrocytów: astrocyty protoplazmatyczne oraz włókniste. Astrocyty protoplazmatyczne znajdują się głównie w istocie szarej i charakteryzują się małym ciałem komórkowym, z którego rozchodzą się krótkie, silnie rozgałęzione wypustki, które w miarę oddalania się od somy stają się coraz drobniejsze. Wypustki te przylegają do ścian naczyń krwionośnych oraz do opony miękkiej. Zawierają one również większą liczbę organelli, co wspiera ich funkcje metaboliczne i interakcje z neuronami. Z kolei astrocyty włókniste są zlokalizowane głównie w istocie białej, posiadają długie, nierozgałęzione wypustki i mniej organelli w porównaniu do astrocytów protoplazmatycznych.

Do głównych funkcji astrocytów należy formowanie bariery krew-mózg, gdzie ich „stopki” (*ang. endfeet*) pokrywają około 90% powierzchni ścian naczyń włosowatych, pełniąc rolę łączników pomiędzy ścianką naczynia włosowatego a neuronami. Co ważne, astrocyty transportują substancje zarówno z naczyń do neuronów, jak i z neuronów do naczyń [Löscher i Potschka, 2005; Barres, 2008; Cauli i Hamel, 2018]. Ponadto astrocyty utrzymują homeostazę jonów, w szczególności potasu (K^+), oraz wody [Zhang i Barres,

2010]. Ze względu na przekąźnictwo neuronalne i potrzebę utrzymywania stałego potencjału błonowego mózg jest organem wyjątkowo energochłonnym, a to właśnie astrocyty zapewniają wsparcie metaboliczne neuronom. Nie tylko dostarczają mleczan jako źródło energii, ale odgrywają istotną rolę w regulacji stresu oksydacyjnego [Chen i wsp., 2020; Horvat i wsp., 2021; Beard i wsp., 2022]. Jedną z głównych funkcji astrocytów jest usuwanie nadmiaru neuroprzekazników z przestrzeni międzykomórkowej. Jest to szczególnie istotne nie tylko dla zachowania prawidłowo funkcjonującego przekąźnictwa neuronalnego, ale także dlatego, że niektóre neuroprzekazniki, takie jak np. glutaminian, mogą doprowadzić do nadmiernej stymulacji neuronów, tzw. ekscytotoksyczności, a w efekcie do śmierci komórek [Gross, 2006; Lee i Pow, 2010; Mahmoud i wsp., 2019]. Astrocyty są również niezmiernie ważne w samym rozwoju mózgu i synaptogenezie - procesie powstawania połączeń neuronalnych [He i Sun, 2007]. Co ciekawe, neurogeneza poprzedza astrogenezę (powstawanie astrocytów); jednak synapsy powstają masowo dopiero po wytworzeniu astrocytów. Szczyt dojrzewania synaps przypada u gryzoni w około 14 dni po urodzeniu i pokrywa się ze szczytem zmian w strukturze i składzie molekularnym astrocytów [Faust i wsp., 2024].

3.2. Wypustki astrocytów jako część synapsy - model „synapsy trójdzielnej”

Astrocyty odgrywają kluczową rolę w przekazywaniu informacji między komórkami nerwowymi presynaptycznymi i postsynaptycznymi. Szacuje się, że pojedynczy astrocyt może nawiązać kontakt z około 100 000 synaps w korze mózgowej myszy oraz niemal 2 000 000 synaps w korze mózgowej człowieka [Bushong i wsp., 2002; Perea i wsp., 2009; Allen i Eroglu, 2017]. Co więcej, komórki glejowe, a w szczególności astrocyty, komunikują się za pośrednictwem połączeń szczelinowych, tworząc rodzaj funkcjonalnego syncytium. Umożliwia to wymianę małych cząsteczek i jonów w obrębie tej sieci, co ma istotne znaczenie dla synchronizacji sygnałów neuronalnych na znacznych odległościach [Spray, 1996; Fróes i wsp., 1999].

Astrocyty, podobnie jak pozostałe komórki glejowe, są „niepobudliwe”, co jest rozumiane jako brak możliwości przewodzenia potencjałów czynnościowych [Augusto-Oliveira i wsp., 2020]. Cecha ta przyczyniła się do utrwalenia założeń dotyczących jedynie biernej, wspomagającej roli komórek glejowych. Jednak we wczesnych latach 90. zaczęto do badań astrocytów używać techniki mikroskopii fluorescencyjnej

umożliwiającej obrazowanie zmian wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} [Jensen i Chiu, 1990].

To w tamtym okresie grupa Stephena Smitha scharakteryzowała odpowiedź astrocytów w hodowli na cząsteczkę neuroprzekaźnika (glutaminianu), w postaci wahań wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} [Cornell-Bell i wsp., 1990]. Te zmiany w stężeniu jonów Ca^{2+} oddziałują na sąsiednie astrocyty i prowadzą do powstania fal wapniowych [Dani i wsp., 1992]. Natomiast zespół badawczy Michaela Sandersona, poprzez stymulację pojedynczego astrocytu i propagację sygnału wapniowego, wykazał, że astrocyty tworzą funkcjonalną sieć, która wspomaga powstawanie fal wapniowych [Cornell-Bell i wsp., 1990; Charles i wsp., 1991; Halassa i wsp., 2007]. Sposób propagacji sygnału Ca^{2+} w tej sieci wynika z charakterystyki połączeń pomiędzy astrocytami przy udziale połączeń szczelinowych, jak również sygnalizacji parakrynnnej, co pozwala na przekazywanie sygnału na znacznych odległościach [Giaume i Venance, 1998]. W przypadku fal wapniowych, występujących lokalnie, sygnał Ca^{2+} jest przekazywany dzięki połączeniom szczelinowym lub przez uwalnianie glioprzekaźników [Finkbeiner, 1992]. Powyższe obserwacje pozwoliły stwierdzić, że astrocyty są swego rodzaju komórkami pobudliwymi, które spontanicznie lub w odpowiedzi na bodziec stymulujący zwiększają wewnątrzkomórkowe stężenie jonów Ca^{2+} , głównie poprzez mobilizację jonów Ca^{2+} zmagazynowanych w siateczce śródplazmatycznej [Perea i wsp., 2009; Khakh i McCarthy, 2015].

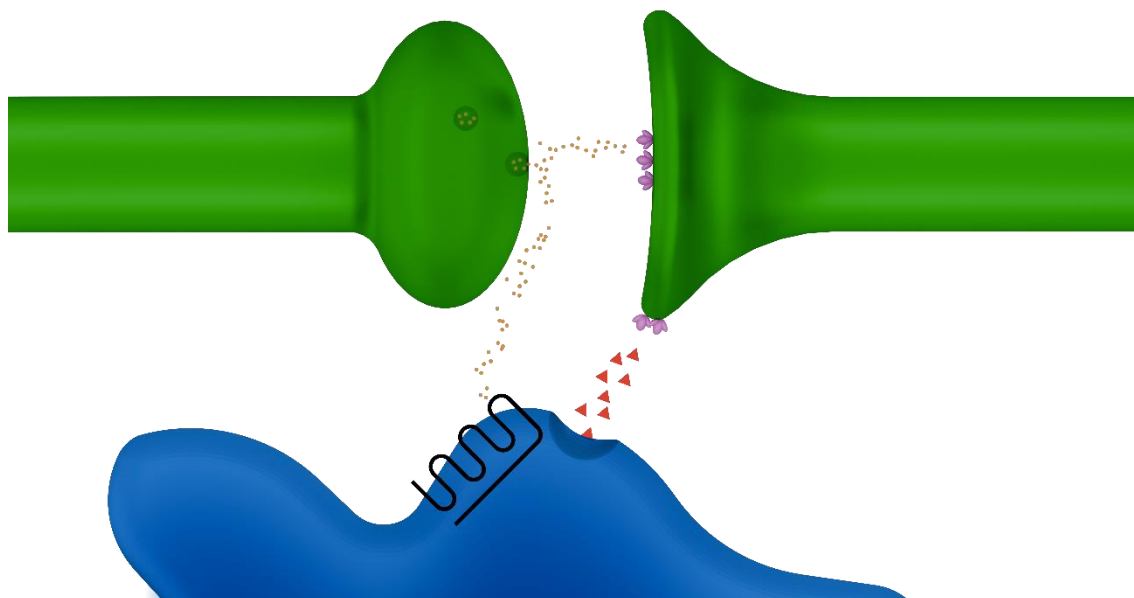
Niemniej jednak, wraz z postępem technik mikroskopowych w badaniach naukowych, uzyskano nowe spojrzenie na sygnały Ca^{2+} , które są różnie demonstrowane w czasie i przestrzeni, zarówno w kontekście pojedynczego astrocytu, jak i całej sieci astrocytarnej. Zwrócono uwagę, że liczne sygnały Ca^{2+} występują wyłącznie w obszarze mikrodomen astrocytarnych wypustek i są wynikiem napływu jonów Ca^{2+} z środowiska zewnątrzkomórkowego przez błonę komórkową [Rungta i wsp., 2016]. To zjawisko zachodzi w związku ze wzrostem stężenia Na^+ podczas wychwytu neuroprzekaźników przez wymiennik sodowo-wapniowy lub aktywację receptorów jonotropowych dla jonów Ca^{2+} oraz kanałów potencjału przejściowego (TRP, *ang. transient receptor potential*), a nie w wyniku uruchomienia zasobów jonów Ca^{2+} zgromadzonych w siateczce śródplazmatycznej [Shigetomi i wsp., 2013; Goenaga i wsp., 2023].

W wyniku wielu badań wykazano, że astrocyty mogą reagować na następujące neuroprzekaźniki: glutaminian, kwas γ -aminomasłowy (GABA, *ang. gamma-aminobutyric acid*), ATP (*ang. adenosine triphosphate*), acetylocholina, serotonina, dopamina, endokannabinoidy itp. [Fellin i Carmignoto, 2004]. Kiedy astrocyty odbierają te sygnały, dochodzi do wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} w ich cytoplazmie. Ten wzrost stężenia jonów Ca^{2+} działa jako sygnał komórkowy, który prowadzi do uwolnienia przez astrocyty cząsteczek przekaźnikowych. Proces ten, mający istotne znaczenie dla komunikacji między astrocytami a neuronami, nazywamy gliotransmisją [Teleanu i wsp., 2022]. Różnorodność sygnałów neuronalnych, które są rozpoznawane i nieliniowo łączone przez astrocyty, zapewnia zmienność i wszechstronność ich odpowiedzi. Dzieje się tak dzięki szerokiej gamie receptorów astrocytarnych dla neuroprzekaźników. Endogenne cząsteczki chemiczne, takie jak neuroprzekaźniki, odgrywają strategiczną rolę w transmisji informacji, przekazując i intensyfikując sygnały w obrębie ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Umożliwiają one komunikację nie tylko pomiędzy komórkami nerwowymi, ale także z innymi typami komórek w tych układach [Noriega-Prieto i Araque, 2021].

Zjawisko uwalniania glioprzekaźników przez astrocyty, które zachodzi w wyniku wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} w odpowiedzi na aktywność neuronalną, oraz fakt istnienia dwukierunkowej komunikacji pomiędzy komórkami nerwowymi a astrocytami składają się na koncept określany mianem „synapsy trójdzielnej” [Araque i wsp., 1999; Araque i wsp., 2014]. Model ten zakłada, że astrocyty są aktywnymi uczestnikami synapsy, przetwarzającymi, regulującymi i modulującymi aktywność synaptyczną, komunikując się z elementami synaptycznymi komórek nerwowych. W uproszczeniu model ten zakłada, że neuroprzekaźniki uwalniane z części presynaptycznej łączą się z receptorami dla tych cząsteczek związanych z białkami G (GPCRs, *ang. G protein coupled receptors*). Większość receptorów astrocytarnych dla cząsteczek przekaźnikowych uwalnianych przez neurony należy właśnie do tej grupy.

Wiązanie neuronalnych cząsteczek sygnałowych z receptorami obecnymi w błonie komórkowej astrocytów, związanymi głównie z białkiem G_q GPCRs, prowadzi do aktywacji fosfolipazy C (PLC, *ang. phospholipase C*) i wytworzenia wtórnych przekaźników: diacyloglicerolu (DAG, *ang. diacylglycerol*) oraz inozytolo-(1,4,5)-trifosforanu (IP_3 , *ang. inositol 1,4,5-trisphosphate*). Z kolei IP_3 wiąże się z receptorami znajdującymi się na siateczce śródplazmatycznej, co prowadzi do wzrostu

wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie astrocytów. To z kolei prowadzi do uwolnienia astrocytarnych cząsteczek przekaźnikowych - glioprzekaźników [Pasti i wsp., 1997; Porter i McCarthy, 1997; Hisatsune i wsp., 2005].



Rycina 1. Schemat modelu „synapsy trójdzielnej”. Glutaminian (żółte kropki) uwolniony z neuronu presynaptycznego powoduje depolaryzację neuronu postsynaptycznego poprzez receptory NMDARs i AMPARs (różowe symbole). Jednocześnie aktywuje on receptory GPCRs na wypustkach astrocytów, co skutkuje wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie astrocytów i uwolnieniem glioprzekaźników (czerwone trójkąty), które uczestniczą w regulacji pobudliwości pobliskich neuronów poprzez aktywację ich receptorów NMDARs [na podstawie Cho i wsp., 2016].

Pomimo obecnego stanu wiedzy, naukowcy nadal odkrywają nowe aspekty mechanizmów sygnalizacji wapniowej i uwalniania glioprzekaźników przez astrocyty. Zjawisko to jest szeroko dyskutowane i analizowane w kontekście przekaźnictwa synaptycznego, co podkreśla jego znaczenie dla zrozumienia funkcjonowania układu nerwowego.

Gliotransmisja w astrocytach może zachodzić na kilka różnych sposobów, a stopień ich zależności od jonów Ca^{2+} jest zróżnicowany [Parpura i Zorec, 2010; Savtchouk i Volterra, 2018]:

1. Egzocytoza zależna od jonów Ca^{2+} - polega na uwalnianiu cząsteczek przekaźnikowych za pomocą pęcherzyków [Parpura i wsp., 1994; Bezzi i wsp., 2004; Bowser i Khakh, 2007; Henneberger i wsp., 2010].
2. Kanały jonowe - na przykład kanał SWELL1, regulowany objętością (VRAC, *ang. volume-regulated anion channel*) [Kofuji i Araque, 2019; Yang i wsp., 2019],

oraz purynergiczny kanał P2X7 [Duan i wsp., 2003; Sahlender i wsp., 2014; Zhao i wsp., 2021; Zelentsova i wsp., 2022; Kesavan i wsp., 2024].

3. Transportery - takie jak antyporter cysteina/glutaminian, transporter anionów organicznych (OAT, *ang. organic anion transporter*) [Rosenberg i wsp., 1994], a także transporter aminokwasów [Szatkowski i wsp., 1990].
4. Mechanizmy związane z wychwytem neuroprzekaźników i jonów - regulacja wychwytu oraz sekrecji cząsteczek przekaźnikowych astrocytów odbywająca się poprzez zmiany w wewnątrzkomórkowym stężeniu jonów Na^+ [Li i wsp., 2015; Kirischuk i wsp., 2016].

3.3. Astrocytarny proces uwalniania glioprzekaźników: mechanizm regulowanej egzocytozy w astrocytach

Astrocyty komunikują się z komórkami nerwowymi na wiele różnych sposobów, co znajduje odzwierciedlenie w licznych mechanizmach uwalniania glioprzekaźników. Nie ulega wątpliwości, że te mechanizmy, których regulacja odbywa się za pośrednictwem jonów Ca^{2+} , mogą mieć istotne znaczenie w fizjologii ośrodkowego układu nerwowego. Dlatego tak wiele badań koncentruje się na mechanizmie regulowanej egzocytozy w astrocytach [Sahlender i wsp., 2014; Mielnicka i Michaluk, 2021].

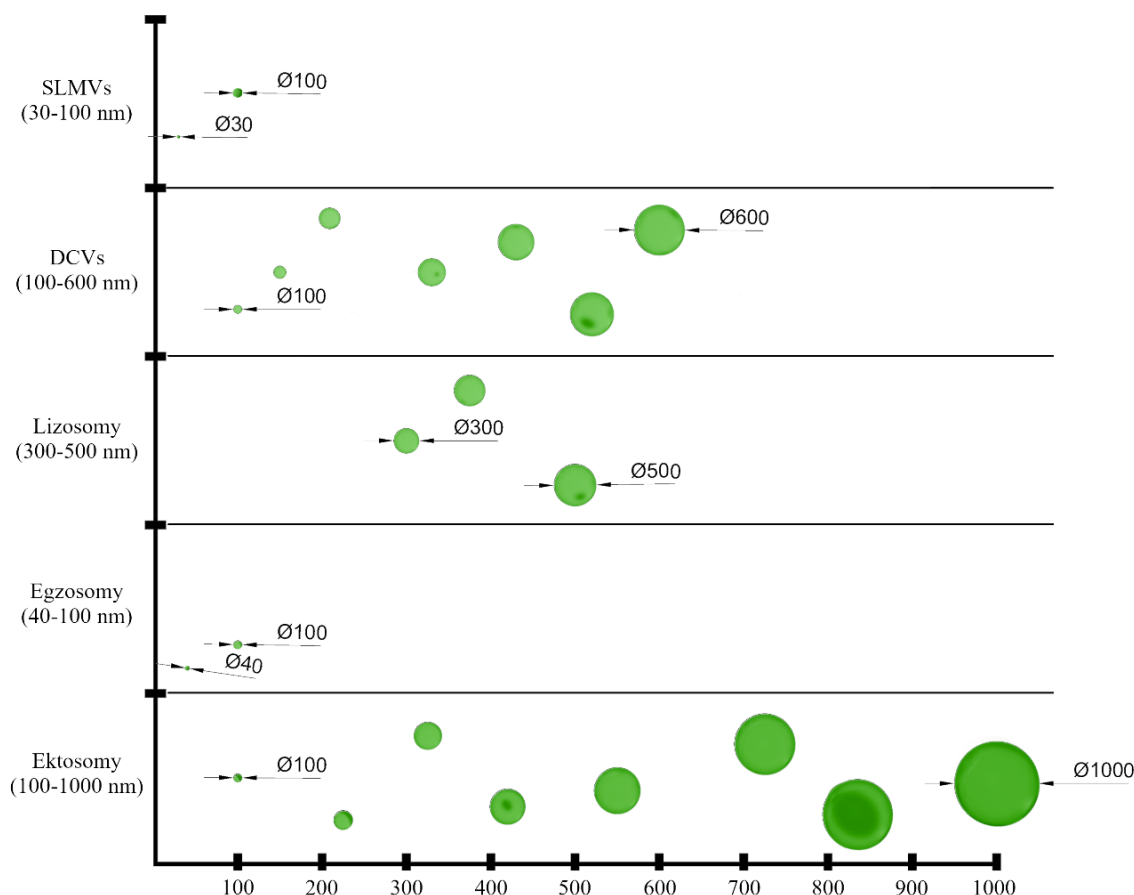
Astrocyty, podobnie jak inne komórki eukariotyczne, potrafią przeprowadzać proces egzocytozy. W jego trakcie substancje zawarte w pęcherzykach sekrecyjnych są transportowane wewnątrz komórki i uwalniane do środowiska zewnątrzkomórkowego za pomocą błony komórkowej. Proces ten jest możliwy dzięki wyspecjalizowanym przedziałom komórkowym, ograniczonym błoną wewnątrzkomórkową, takim jak siateczka śródplazmatyczna oraz systemowi błon wewnątrzkomórkowych, który tworzy organellum zwane aparatem Golgiego. Ponadto w astrocytach występują różne rodzaje pęcherzyków sekrecyjnych, w tym mikropęcherzyki podobne do mikropęcherzyków synaptycznych (SLMVs, *ang. synaptic-like microvesicles*) [Bezzi i wsp., 2004; Jourdain i wsp., 2007; Bergersen i Gundersen, 2009; Bergersen i wsp., 2012; Martineau i wsp., 2013], pęcherzyki z gęstym elektronowo rdzeniem (DCVs, *ang. dense-core vesicles*) [Calegari i wsp., 1999; Crippa i wsp., 2006; Hur i wsp., 2010; Prada i wsp., 2011], lizosomy (SLs, *ang. secretory lysosomes*) [Zhang i wsp., 2007; Li i wsp., 2008; Liu i wsp., 2011] oraz pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (Evs, *ang. extracellular vesicles*) [Frühbeis

i wsp., 2013; Gharbi i wsp., 2020], takie jak egzosomy i ektosomy [Cali i wsp., 2009]. Różnią się one wielkością, miejscem pochodzenia, niesionym ładunkiem oraz składem błony (tabela 1), co wpływa na dynamikę ich uwalniania oraz pełnione przez nie funkcje [Verkhatsky i wsp., 2016; Vardjan i wsp., 2019].

Tabela 1. Typy pęcherzyków sekrecyjnych uwalnianych przez astrocyty w procesie egzocytozy [na podstawie Mielnicka i Michaluk, 2021].

Rodzaj pęcherzyków sekrecyjnych	Średnica [nm]	Ładunek (zawartość)	Związane białka	
			Białko	Gen
Mikropęcherzyki podobne do mikropęcherzyków synaptycznych (SLMV)	30-100	Glutaminian D-seryna	vGlut1 vGlut2 vGlut3 VAMP2 VAMP3 Rab3a V-ATPaza	<i>Slc17a7</i> <i>Slc17a6</i> <i>Slc17a8</i> <i>Vamp2</i> <i>Vamp3</i> <i>Rab3a</i> <i>Atp6v0</i> , <i>Atp6v1</i>
Pęcherzyki z gęstym elektronowo rdzeniem (DCVs)	100-600	ANP ATP BDNF Sekretogranina II Sekretogranina III Chromogranina NPY	VAMP2 VAMP3 VNuT	<i>Vamp2</i> <i>Vamp3</i> <i>Slc17a9</i>
Lizosomy (SLs)	300-500	ATP Katepsyna B Katepsyna D Enzymy proteolityczne	VAMP7 (TI-VAMP) Rab7 CD63 LAMP1 Sialina VNuT	<i>Vamp7</i> <i>Rab7</i> <i>CD63</i> <i>Lamp1</i> <i>Slc17a5</i> <i>Slc17a9</i>

Warto zaznaczyć, że choć egzocytoza jest uważana za jeden z najszybszych procesów biologicznych, zachodzących w czasie milisekund, dotyczy to jedynie pęcherzyków wypełnionych ładunkiem, które są gotowe do uwolnienia do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Proces ten jest również uwarunkowany przez mechanizmy sygnalizacji przestrzenno-czasowej związane z jonami Ca^{2+} [Parpura i wsp., 2010].



Rycina 2. Rodzaje pęcherzyków sekrecyjnych w astrocytach. Wykres przedstawia zakres rozmiarów pęcherzyków należących do różnych grup, występujących w astrocytach. Rozmiary kół odpowiadają rozmiarom pęcherzyków powiększonych 1000 razy [na podstawie Verkhatsky i wsp., 2016].

Wyróżniamy dwa rodzaje egzocytozy [Kasai i wsp., 2012; Verkhatsky i wsp., 2016; Mielnicka i Michaluk, 2021]:

1. Nieregulowana egzocytoza (sekrecja konstytutywna)

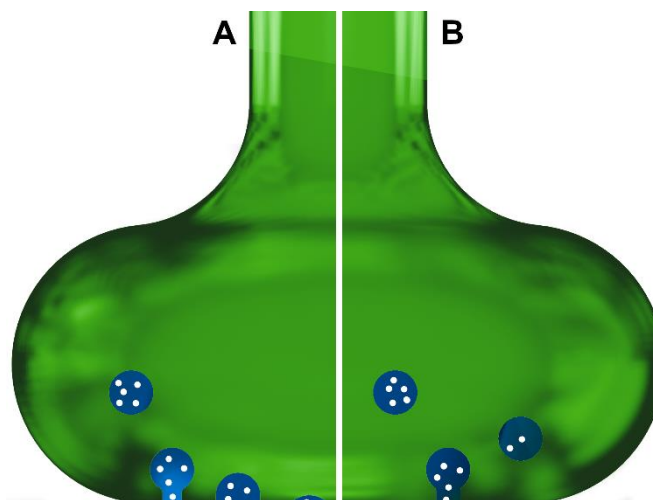
W tej formie wewnątrz komórki nieustannie powstają pęcherzyki sekrecyjne, które są pakowane i uwalniane przez błonę komórkową. Proces ten zachodzi w sposób ciągły i nie wymaga zewnętrznych bodźców.

2. Regulowana egzocytoza

W przypadku regulowanej egzocytozy gotowe pęcherzyki zawierające ładunek są przechowywane w komórce i uwalniane tylko w odpowiedzi na zewnątrzkomórkową stymulację.

Kompletny przebieg procesu egzocytozy w astrocytach obejmuje etapy cumowania, dokowania i fuzji, które pęcherzyk sekrecyjny musi przejść, aby jego zawartość mogła zostać uwolniona do środowiska zewnątrzkomórkowego. Etap

cumowania polega na przytwierdzeniu pęcherzyka do komórki poprzez połączenie z jej błoną komórkową. Następnie pęcherzyk sekrecyjny wkracza w fazę dokowania, podczas której jego błona zbliża się do obszaru błony komórkowej, gdzie nastąpi późniejsza sekrecja. W tym momencie sygnał w postaci wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} prowadzi do fuzji i ostatecznego uwolnienia zawartości pęcherzyka do środowiska zewnątrzkomórkowego. Fuzja, która kończy się sekrecją ładunku niesionego przez pęcherzyk, może przebiegać według dwóch wariantów. Pierwszy z nich prowadzi do całkowitego wbudowania błony pęcherzyka sekrecyjnego w błonę plazmatyczną, co wymaga późniejszego odzyskania pęcherzyka poprzez jego odtworzenie w procesie endocytozy. Drugi wariant, znany jako model „kiss-and-run”, definiuje krótkie połączenie błony pęcherzyka z błoną plazmatyczną za pomocą małego pora fuzyjnego, co umożliwia sekrecję małych cząsteczek zawartych w pęcherzyku bez wkomponowania jego błony do błony komórkowej [Chen i wsp., 2006; Sugita, 2008; Alabi i Tsien, 2013; Wu i wsp., 2014; Wen i wsp., 2017; Chanaday i wsp., 2019].



Rycina 3. Główne warianty fuzji pęcherzyków sekrecyjnych. **A** Pełna fuzja polega na utworzeniu pora fuzyjnego dającego początek tzw. stopie przedkolcowej (*ang. pre spike foot*), co prowadzi do całkowitej integracji błony pęcherzyka sekrecyjnego z błoną komórkową. W tym modelu błona pęcherzyka łączy się z błoną komórkową i następuje pełne połączenie, co skutkuje uwolnieniem całej zawartości pęcherzyka do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. **B** Model „kiss-and-run” charakteryzuje się tym, że po wytworzeniu pora fuzyjnego pęcherzyk sekrecyjny odrywa się od błony komórkowej, nie wbudowując swojej błony do błony plazmatycznej. W tym konkretnym przypadku pęcherzyk krótko kontaktuje się z błoną komórkową, uwalniając tylko część niesionego przez siebie ładunku, a następnie szybko się odłącza, co umożliwia jego ponowne wykorzystanie [na podstawie: Burgoyne i wsp., 2001; He i Wu, 2007; Cho i von Gersdorff, 2013].

Fuzja zachodząca wewnątrz komórki oraz moment uwalniania ładunku niesionego przez pęcherzyk sekrecyjny są uzależnione od ewolucyjnie konserwowanych białek transbłonowych (SNARE, *ang. soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*) [Söllner i wsp., 1993]. Fasshauer i wsp. [1998] dokonali

reklasyfikacji białek SNARE na białka R-SNARE i Q-SNARE, opierając się na analizie sekwencji w programie Clustal W [Thompson i wsp., 1994; Jahn i Scheller, 2006]. Kategoryzacja ta bazuje na reszcie aminokwasowej znajdującej się w centrum motywu SNARE, gdzie arginina (Arg/R) jest charakterystyczna dla R-SNARE, a glicyna (Gln/Q) dla Q-SNARE. Funkcjonalnie białka SNARE dzielimy na v-SNARE, związane z pęcherzykiem lub innymi formami transportu pośredniego, oraz t-SNARE, czyli białka docelowego kompartmentu [Hong, 2005]. Białka Q-SNARE (t-SNARE) obejmują integralne białka błonowe, takie jak syntaksyny, oraz białka związane z błoną komórkową, takie jak SNAP-23 i SNAP-25. Z kolei do białek R-SNARE (v-SNARE) zaliczamy VAMP2. W obliczu nadprogowego wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} , białko R-SNARE (VAMP2) w błonie pęcherzyka sekrecyjnego oraz białka Q-SNARE (syntaksyna i SNAP-25 lub SNAP-23) tworzą trójskładnikowy kompleks złożony z czterech α -helis, określany w języku angielskim mianem „SNAREpin” [Verkhratsky i wsp., 2016]. Jego powstanie jest kluczowe dla skutecznej fuzji błony pęcherzyka z błoną plazmatyczną, ponieważ umożliwia zbliżenie błon i ich połączenie [Sutton i wsp., 1998; Weber i wsp., 1998].

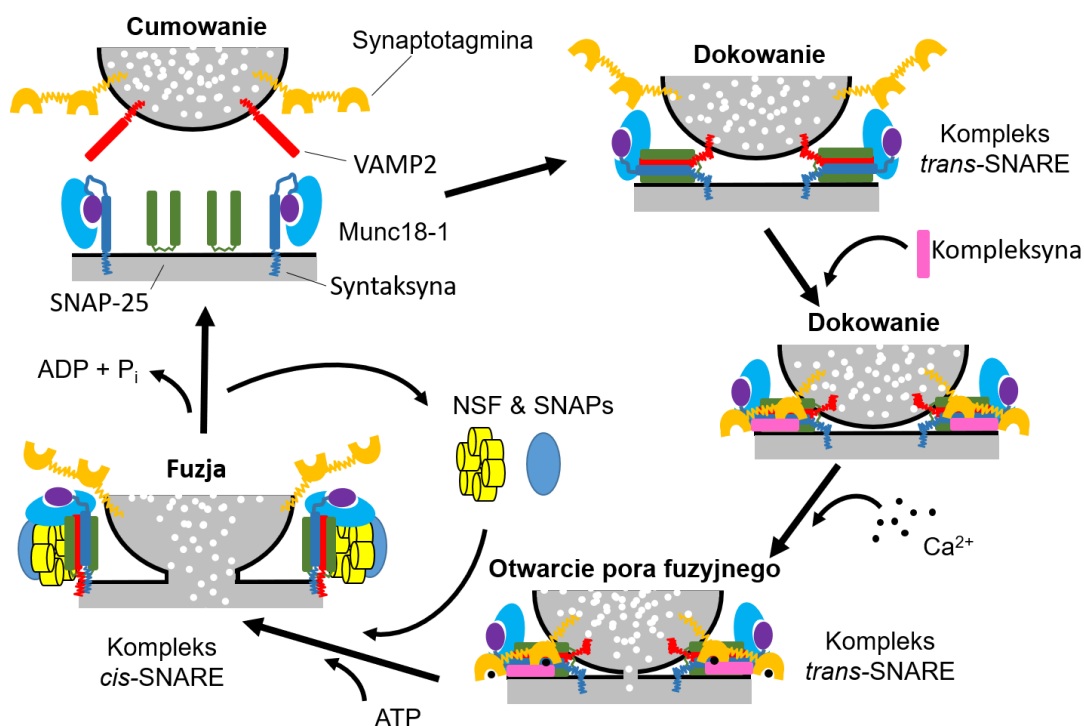
Nieodłącznym elementem tego kompleksu są białka SM (*ang. Sec1/Munc18-like proteins*), które aktywnie oddziałują z białkami SNARE poprzez asocjację i dysocjację w trakcie fuzji. Podczas cumowania białko SM (Munc18-1) wiąże się z pojedynczą synaptyczną podjednostką t-SNARE (syntaksyna 1) w zamkniętej konformacji, tworząc kompleks, który zawiera fragment motywu SNARE. To uniemożliwia powstawanie kompleksów *trans*-SNARE.

Niemniej jednak, białka SM nie powinny być rozpatrywane jedynie jako negatywni regulatorzy procesu egzocytozy [Südhof i wsp., 2009]. W rzeczywistości, są one niezbędne do prawidłowego przebiegu tego procesu, co potwierdza całkowity zanik egzocytozy po odwrotnej delecji Munc18-1, mimo braku zmian w formowaniu synaps [Verhage i wsp., 2000]. Białka SM odgrywają istotną rolę w fuzji pęcherzyka z błoną plazmatyczną, szczególnie podczas formowania kompleksów SNARE. W tym procesie białko Munc18-1 (N-koniec) wiąże się z sekwencją peptydową na N-końcu syntaksyny 1, co prowadzi do otwarcia konformacji syntaksyny 1. To z kolei umożliwia połączenie jednego białka v-SNARE z dwoma białkami t-SNARE w stosunku 1:1:1, tworząc stabilny kompleks.

W związku z położeniem białek v-SNARE i t-SNARE na przeciwległych błonach, kompleks ten określany jest mianem kompleksu *trans*-SNARE [Chen i Scheller, 2001;

Jahn i wsp., 2003; Südhof, 2004; Mielnicka i Michaluk, 2021]. Ten kompleks jest fundamentalny dla katalizowania procesu fuzji błon oraz otwarcia pora fuzyjnego, ponieważ energia wyzwolana podczas jego formowania przewyższa barierę energetyczną wynikającą z ujemnych ładunków grup fosfolipidowych wchodzących w skład błon. Otwarcie pora fuzyjnego oraz scalenie błony pęcherzyka z błoną plazmatyczną prowadzi do zmiany konfiguracji geometrycznej kompleksu SNARE z formy *trans* na *cis*. Następnie kompleks *cis*-SNARE ulega dysocjacji na monomery poprzez interakcję z białkami SNAP (*ang. soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein*) i NSF (*ang. N-ethylmaleimide-sensitive factor*) (fosfohydrolaza ATP). Wolne podjednostki v-SNARE ulegają endocytozie, natomiast t-SNARE są odzyskiwane z powrotem do odpowiednich kompartmentów błony plazmatycznej, gdzie mogą ponownie uczestniczyć w procesie egzocytozy [Hong, 2005; Mielnicka i Michaluk, 2021].

Wolne SNAREs



Rycina 4. Molekularny mechanizm uwalniania pęcherzyków sekrecyjnych w procesie egzocytozy astrocytów (cykl białek SNARE i SM). Podczas pierwszego etapu egzocytozy (cumowanie) białko Munc18-1 wiąże się z syntaksyną 1 w zamkniętej konformacji, w której jej domena Habc (fioletowy owal) blokuje motyw SNARE (granatowy prostokąt). Następnie dochodzi do otwarcia konformacji syntaksyny 1 przez związanie N-końca białka Munc18-1 z sekwencją peptydową na jej N-końcu, co ostatecznie prowadzi do powstania kompleksu *trans*-SNARE. Kiedy kompleks *trans*-SNARE jest już utworzony wiąże się z nim kompleksyna, co sprawia że jest on gotowy na sygnał w postaci jonów Ca²⁺. Jony Ca²⁺ z kolei wiążą się z synaptotagminą, co skutkuje oddziaływaniem synaptotagminy, białek SNARE i fosfolipidów błony plazmatycznej. Otwarcie pora fuzyjnego i scalenie błony pęcherzyka z błoną komórkową prowadzi do zmiany konfiguracji kompleksu SNARE z formy *trans* na *cis*. Ostatnim etapem egzocytozy jest dysocjacja

kompleksu SNARE poprzez oddziaływanie z białkami SNAP i NSF [na podstawie: Südhof, 2004; Mielnicka i Michaluk, 2021].

3.4. Egzocytaza w astrocytach: identyfikacja niejasności w obszarze badań

Rosnąca liczba badań dotyczących zależnej od jonów Ca^{2+} egzocytozy w astrocytach podkreśla znaczenie tego procesu w kontekście regulacji transmisji synaptycznej [Haydon i Carmignoto, 2006; Marchaland i wsp., 2008]. Choć model hodowli astrocytarnej, często określanej mianem „czystej” z uwagi na brak komórek innych niż astrocyty, jest nadal powszechnie wykorzystywany w badaniach, coraz więcej naukowców zwraca uwagę na istotność komponentu neuronalnego w hodowli komórek *in vitro* [Stoppelkamp i wsp., 2010]. Obecność komórek nerwowych w hodowli *in vitro* jest ważna nie tylko ze względu na rosnące zapotrzebowanie na modele badawcze, które lepiej odzwierciedlają warunki fizjologiczne (panujące w żywym organizmie), ale także w kontekście badań nad reaktywnością astrocytów w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera [Ray i wsp., 2014].

Ponadto cząsteczki zapalne, takie jak czynnik martwicy nowotworów (TNF α , *ang. tumor necrosis factor α*) (cytokina prozapalna), prostaglandyna E2 (PGE2, *ang. prostaglandin E2*) (mediator stanu zapalnego), oraz stromalny czynnik wzrostowy-1 α (SDF-1 α , *ang. stromal derived factor-1 α*) (chemotaktyczna cytokina), prowadzą do uwalniania glioprzekazników przez astrocyty. Mogą one powodować ekscytotoksyczność oraz sprzyjać procesom neurodegeneracyjnym w patologicznych warunkach w mózgu [Agulhon i wsp., 2012]. To tylko potwierdza potrzebę badań nad procesem regulowanej egzocytozy w astrocytach oraz zasadność stosowania modelu neuronalno-astrocytarnej hodowli komórek *in vitro*.

Od dawna wiadomo, że neurony indukują gwiazdzistą morfologię astrocytów, podobną do tej, jaką te komórki wykazują *in vivo* [Yang i wsp., 2013]. Ponadto neuronalne komórki progenitorowe (NPCs, *ang. neural progenitor cells*) mogą różnicować nie tylko w komórki nerwowe, ale z czasem także w astrocyty (około połowy ciąży) poprzez aktywację receptorów Notch ligandami dla Notch prezentowanymi na sąsiednich NPCs. To tłumaczy, dlaczego neurogeneza poprzedza proces powstawania astrocytów. Pokazuje to, że już na etapie rozwoju zarodkowego mózgu komórki nerwowe, a ściślej rzecz ujmując NPCs, są zaangażowane w regulację ekspresji genów specyficznych dla astrocytów [Namihira i wsp., 2009].

Liczne dowody potwierdzają, że profil ekspresji genów w hodowlach astrocytów różni się od tego prezentowanego w astrocytach *in vivo* [Foo i wsp., 2011]. W związku z fenotypowym podobieństwem astrocytów w neuronalno-astrocytarnych hodowlach komórek *in vitro* do astrocytów *in vivo*, również pod względem profilu funkcjonalnego, nasuwa się pytanie, czy obecność komórek nerwowych w hodowli determinuje transkryptom astrocytów *in vitro* i w jakim stopniu jest on zbieżny z tym prezentowanym przez astrocyty *in vivo* [Arizono i wsp., 2012; Wolfes i wsp., 2017]. Odpowiedzi na to pytanie dostarczyli w swoim artykule Hasel i wsp. [2017], którzy porównali profil ekspresji genów w astrocytach w hodowli astrocytarnej, z profilem ekspresji genów w hodowli neuronalno-astrocytarnej. Dokonali oni ponadto porównania profilu ekspresji genów w hodowli neuronalno-astrocytarnej z opublikowanymi wcześniej [Cahoy i wsp., 2008] profilami ekspresji genów astrocytów wyizolowanych z mózgu. Udowodnili tym samym, że komórki nerwowe są odpowiedzialne za indukcję wielu genów specyficznych dla astrocytów obecnych *in vivo*. To kolejny dowód na to, jak ważna jest obecność neuronów w modelu hodowli komórkowej *in vitro*.

Astrocyty są nieodłącznym elementem „synapsy trójdzielnej” i zajmują pozycję pomiędzy naczyniami a synapsami [Panatier i Robitaille, 2016]. Aktywacja metabotropowych receptorów dla glutaminianu, prezentowanych na ich powierzchni, szczególnie mGluR3 i mGluR5 (*ang. metabotropic glutamate receptor 3 and 5*), prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} , a w konsekwencji do uwolnienia glioprzekazników. To właśnie mGluR3 i mGluR5 są dominującymi typami receptorów dla glutaminianu ulegających ekspresji w astrocytach hipokampalnych [Schools i Kimelberg, 1999]. Ponadto mGluR5 jest często omawiany w kontekście regulacji i detekcji przekazywania synaptycznego oraz astrocytarnej odpowiedzi na pobudliwość neuronalną w postaci potencjałów czynnościowych.

3.5. Różnorodność podtypów astrocytów w różnych obszarach mózgu

Retrospektywnie, naukowcy rozpatrywali różnorodność astrocytów przede wszystkim pod względem zaobserwowanych różnic w ich morfologii. Na przełomie XIX i XX wieku, Camillo Golgi i Santiago Ramón y Cajal opisali heterogeniczność fenotypu astrocytów, zwracając szczególną uwagę na różnorodność ich kształtów [Kettenmann i Ransom, 2005]. Potwierdzają to liczne badania prowadzone *in vivo* [Bailey i Shipley, 1993] oraz *in vitro* [Raff i wsp., 1983; Hatten, 1985]. Z biegiem czasu stało się jednak

jasne, że astrocyty, które pełnią wiele różnych funkcji w ośrodkowym układzie nerwowym, oddziałując z innymi typami komórek glejowych oraz komórkami nerwowymi, wykazują także różnorodność w obrębie prezentowanego transkryptomu [Batiuk i wsp., 2020]. Przejawia się ona m.in. w specjalizacji astrocytów w obwodach neuronalnych hipokampa oraz prążkowie dorosłego mózgu myszy, które różnią się pod względem prezentowanej morfologii, właściwości oraz szlaków sygnalizacyjnych [Chai i wsp., 2017]. Co ciekawe, Chai i wsp. [2017] w swoim artykule zbadali potencjał dorosłych mysich astrocytów hipokampa i prążkowie do przeprowadzania zależnej od jonów Ca^{2+} egzocytozy glutaminianu. Odnoszą się oni sceptycznie do założenia, że mysie astrocyty w dorosłym mózgu posiadają podstawową molekularną maszynę do wspomagania procesu regulowanej jonami Ca^{2+} egzocytozy glutaminianu. Uzyskane przez nich wyniki analizy wartości fragmentu na tysiąc par zasad na milion zmapowanych fragmentów (FKPM, *ang. fragment per million mapped fragments*) dla genów zaangażowanych w zależną od jonów Ca^{2+} egzocytozę w porównaniu do analogicznych wartości FKPM dla markerów astrocytów, neuronów oraz genów utrzymujących porządek (metabolizmu podstawowego) (*ang. housekeeping genes*) w większości przypadków nie ujawniły istotnych statystycznie różnic. Warto podkreślić, że dorosłe mysie astrocyty zarówno hipokampa, jak i prążkowie nie wykazały istotnej statystycznie ekspresji RNA dla pęcherzykowych transporterów glutaminianu (vGluts, *ang. vesicular glutamate transporters*) (*Slc17a7*, *Slc17a6*, *Slc17a8*) oraz synaptotagmin (*Syt1*, *Syt2*, *Syt7*, *Syt10*) w porównaniu do kontroli [Chai i wsp., 2017].

Batiuk i wsp. [2020], wykorzystali metodę sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek (*ang. single-cell RNA sequencing*), wskazując i opisując pięć różniących się transkryptomem podtypów astrocytów w korze mózgowej oraz hipokampie dorosłych myszy. To tylko potwierdziło wcześniejsze doniesienia o różnorodności funkcjonalnej i molekularnej astrocytów w zależności od regionu mózgu [Khakh i Sofroniew, 2015; Ben Haim i Rowitch, 2017]. W swoim artykule Batiuk i wsp. [2020] wskazali geny eksprymowane w ponad 60% astrocytów związane m.in. z produkcją energii czy wychwytem glutaminianu, a także wyodrębnili geny charakterystyczne dla danego podtypu astrocytów.

Batiuk i wsp. [2020] wykonując analizę klasterową genów ulegających ekspresji w astrocytach wyróżnili pięć różnych podtypów astrocytów (AST1-5, *ang. astrocyte subtypes 1-5*) charakteryzujących się specyficznym profilem ekspresji genów. Podobnie

jak w innych pracach, astrocyty pochodzące z kory w znacznym stopniu różniły się od tych z hipokampa [Morel i wsp., 2017; Boisvert i wsp., 2018]. Astrocyty AST1 and AST4 znajdują się głównie w hipokampie, AST2 w korze, a AST3 i AST5 były równomiernie rozmieszczone w obu regionach. Dodatkowo astrocyty AST1-3 posiadały profil ekspresji genów wskazujący na to, że pełniły one funkcję dojrzałych astrocytów. Następnie autorzy zanalizowali geny markerowe, które pozwoliły na dokładniejsze zlokalizowanie danych podtypów astrocytów wykorzystując metodę hybrydyzacji fluorescencyjnej in situ (RNAscope). Metoda ta pozwala na kolokalizację mRNA kilku genów, wśród których znajdowało się: *Gfap* (kodujące białko filamentu pośredniego, zaangażowane w tworzenie cytoszkieletu), *Unc13c* (zaangażowane w egzocytozę), czy *Agt* (zaangażowane w regulację przepływu krwi w mózgu oraz przekazywanie synaptyczne). Z punktu widzenia egzocytozy w astrocytach szczególnie interesujące wydają się geny odróżniające astrocyty AST2 i AST3. Te pierwsze, są zlokalizowane głównie w warstwach 2/3 oraz 5 kory, a także w mniejszych ilościach w warstwach 1, 4 i 6, natomiast prawie nie występują w hipokampie. Ogólnie jednak AST2 nie występują licznie. Charakteryzują się wyższym niż średni poziomem ekspresji *Unc13c* oraz niskim poziomem ekspresji *Agt*. Z kolei, AST3 znajdowały się w dużych ilościach w całej korze i hipokampie z wyjątkiem warstwy leżącej bezpośrednio pod opnową, oraz w stratum lacunosum-moleculare w hipokampie, gdzie dominowały astrocyty przypisane do klastra AST1. Położenie astrocytów z grupy AST3 charakteryzowało się wysokim poziomem ekspresji *Agt*, oraz niskim, lub brakiem ekspresji *Unc13c* i *Gfap*.

Białka Munc13 są białkami charakterystycznymi dla mózgu, z wyjątkiem homologu Munc13-2 (wariant splicingowy), który występuje w wielu tkankach. Rodzina białek Munc13 składa się z trzech homologicznych białek: Munc13-1, Munc13-2 oraz Munc13-3, kodowanych przez geny *UNC13A*, *UNC13B* oraz *UNC13C* [Koch i wsp., 2000]. Wszystkie białka Munc13, w tym ubMunc13-2 (wszechobecny wariant) oraz bMunc13-2 (wariant w mózgu), posiadają wspólną domenę MUN na swoim C-końcu, która jest niezbędna i wystarczająca do pełnienia funkcji przygotowawczej pęcherzyków synaptycznych (etap cumowania). Te białka odgrywają istotną rolę w procesie uwalniania neuroprzekazników na drodze egzocytozy, co warunkuje prawidłowe funkcjonowanie synaps [Li i wsp., 2011; Lipstein i wsp., 2012; Liu i wsp., 2016].

Oprócz domeny MUN na C-końcu, niezbędnej na etapie cumowania, białka Munc13 posiadają na swoim N-końcu jednostkę regulatorową odpowiedzialną za

modulowanie aktywności procesu cumowania. Składa się ona z domeny C2B wiążącej Ca^{2+} /fosfolipidy, domeny C1, za pośrednictwem której następuje przyłączenie DAG, oraz z domeny CaM odpowiadającej za wiązanie Ca^{2+} /kalmoduliny. Taka budowa jednostki regulatorowej białek Munc13 jest niezwykle ważna w kontekście regulacji uwalniania neuroprzekazników przez Ca^{2+} , w co bezpośrednio zaangażowana jest domena C2B, a pośrednio odbywa się to przez domeny C1 i CaM [Lipstein i wsp., 2012]. Warto zaznaczyć, że białka Munc13 mogą połączyć się z VAMP2 i pomagać kotwiczyć pęcherzyk do błony dzięki oddziaływaniu domen C1-C2B z DAG i 4,5-bifosforanem fosfatydyloinozytolu (PIP2, *ang. phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) znajdujących się na błonie [Michelassi i wsp., 2017].

4. Cel pracy

Aktualny stan wiedzy coraz bardziej podkreśla rolę astrocytów w sieci połączeń neuronalnych w mózgu. Dotychczas przeważająca część badań dotyczących procesu regulowanej egzocytozy w astrocytach była przeprowadzana z wykorzystaniem hodowli astrocytarnych, co ogranicza naszą wiedzę na temat wpływu komórek nerwowych i ich aktywności na funkcje astrocytów. Astrocyty w hodowli astrocytarnej różnią się od tych w hodowli neuronalno-glejowej nie tylko morfologią, ale również profilem ekspresji genów, co przekłada się na różnice w proteomie.

Ponadto badania z ostatnich lat wykazały, że astrocyty przejawiają pobudliwość, reagując wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} na neuroprzekązniki uwalniane przez neurony, co prowadzi do uwalniania glioprzekąźników przez astrocyty. Jednakże nadal niejasny pozostaje sposób regulacji uwalniania cząsteczek przekąźnikowych przez astrocyty na drodze egzocytozy oraz źródło jonów Ca^{2+} , które bierze w niej bezpośredni udział.

Dlatego też głównym celem mojej pracy doktorskiej było zbadanie mechanizmów regulujących egzocytozę w astrocytach. W szczególności sformułowano następujące zadania badawcze:

1. Zbadanie, czy poziom egzocytozy w hodowli neuronalno-glejowej różni się od poziomu egzocytozy w hodowli astrocytarnej.
2. Ocena wpływu aktywności neuronalnej na wydajność procesu egzocytozy przeprowadzanego przez astrocyty.
3. Zbadanie konieczności udziału jonów Ca^{2+} pochodzących z siateczki śródplazmatycznej w procesie uwalniania cząsteczek przekąźnikowych przez astrocyty.
4. Zbadanie, czy proces egzocytozy zależy od napływu jonów Ca^{2+} z przestrzeni zewnątrzkomórkowej.
5. Porównanie wydajności procesu egzocytozy pomiędzy astrocytami hipokampa a kory nowej.
6. Ewaluacja wpływu aktywności neuronalnej i lokalizacji sygnałów Ca^{2+} na proces egzocytozy astrocytów kory nowej.
7. Porównanie poziomu mRNA genu *Unc13c* w astrocytach pochodzących z hodowli hipokampalnej i korowej.

5. Materiały i metody

5.1. Klonowanie molekularne DNA: projekt i konstrukcja plazmidu do obrazowania przebiegu procesu egzocytozy w astrocytach

Wariant białka zielonej fluorescencji (GFP, *ang. green fluorescent protein*) podatny na zmiany pH znany jako pHluoryna (SEP, *ang. superecliptic pHluorin*) wykorzystano jako znacznik fluorescencyjny białka związanego z procesem egzocytozy [Miesenböck i wsp., 1998; Sankaranarayanan i wsp., 2000; Martineau i wsp., 2017; Mahon, 2021].

Synaptobrewina 2 jest białkiem wchodzącym w skład błony pęcherzyka synaptycznego (VAMP2, *ang. vesicle-associated membrane protein 2*) i razem z przyłączoną na swoim C-końcu pHluoryną tworzą białko fuzyjne VAMP2-SEP [Malarkey i Parpura, 2011]. Sekwencja nukleotydów dla genów VAMP2 i SEP, kodujących właściwe białko fuzyjne (wstawkę), stanowi fragment sekwencji plazmidu pCMV_VAMP2-SEP (*Addgene, nr kat. 190151*) [Urbina i wsp., 2018].

Wektor plazmidowy pZac2.1gfaABC1D_MCS [Michaluk i wsp., 2021] z promotorem GfaABC1D, dla uzyskania selektywnej ekspresji VAMP2-SEP w astrocytach, oraz plazmid pCMV_VAMP2-SEP ze wstawką kodującą białko fuzyjne są własnością Laboratorium Neurobiologii w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk.

5.1.1. Trawienie restrykcyjne wektora plazmidowego i plazmidu zawierającego wstawkę

Plazmidy pZac2.1gfaABC1D_MCS, pCMV_VAMP2-SEP poddano trawieniu restrykcyjnemu enzymami FastDigest NheI (*Thermo Scientific, nr kat. FD0974*) i FastDigest NotI (*Thermo Scientific, nr kat. FD0593*) w buforze 10X FastDigest Green Buffer (*Thermo Scientific, nr kat. B72*). Do mieszaniny z wektorem plazmidowym pZac2.1gfaABC1D_MCS dodatkowo dodano fosfatazę alkaliczną USB® Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (*Applied Biosystems, nr kat. 78390500UN*) w celu usunięcia grup fosforanowych z końca 5' zlinearyzowanej formy plazmidu, co zapobiega ewentualności ponownej ligacji i powrotowi do formy kolistej cząsteczki DNA.

Skład mieszanin reakcyjnych do wykonania trawienia enzymami restrykcyjnymi przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Odczynniki i ich objętości niezbędne do reakcji trawienia restrykcyjnego wektora plazmidowego i plazmidu ze wstawką.

Skład	Wektor	Wstawka
Plazmid	pZac2.1gfaABC1D_MCS (0,29 µg/µl) 17,24 µl	pCMV_VAMP2-SEP (1,96 µg/µl) 5,1 µl
FastDigest Green Buffer (10X)	5 µl	5 µl
FastDigest NheI	1 µl	1,5 µl
FastDigest NotI	2 µl	2,5 µl
SAP	1 µl	-
H₂O	23,76 µl	35,9 µl

Reakcja trawienia restrykcyjnego wektora plazmidowego pZac2.1gfaABC1D_MCS zachodziła w temperaturze 37°C i trwała przez 1 godzinę i 45 min, natomiast plazmidu pCMV_VAMP2-SEP odbywała się w tej samej temperaturze przez 2 godziny i 45 min. Obie reakcje zakończono termiczną inaktywacją działania enzymów poprzez inkubację próbek w 80°C przez 7 min.

Całe objętości mieszanin reakcyjnych nałożono na żel agarozowy i przeprowadzono elektroforezę poziomą. Po zakończeniu elektroforetycznego rozdziału plazmidowego DNA po trawieniu restrykcyjnym żel umieszczono w ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) i przy pomocy skalpeli wycięto prążki o odpowiedniej wielkości.

Wyniki cięć restrykcyjnych plazmidów pZac2.1gfaABC1D_MCS oraz pCMV_VAMP2-SEP metodą *in silico* przy wykorzystaniu programu Clone Manager 7 zademonstrowano w tabeli 3.

Tabela 3. Wielkość fragmentów DNA uzyskanych *in silico* w wyniku cięcia enzymami restrykcyjnymi plazmidów.

Plazmid	Enzymy restrykcyjne	Wielkość fragmentów DNA [pz]
Wektor: pZac2.1gfaABC1D_MCS	NheI, NotI	96, 4431*
Wstawka: pCMV_VAMP2-SEP	NheI, NotI	1108**, 3923

* Fragment DNA będący wektorem przed wklonowaniem wstawki

** Odcinek DNA stanowiący sekwencję nukleotydów dla genów VAMP2 i SEP-wstawka

5.1.2. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Sporządzono 1% roztwór agarozy (BioShop[®], nr kat. AGA001) w 1 raz stężonym buforze TBE (1X TBE) powstałym przez rozcieńczenie 10 razy stężonego buforu (10X

TBE) (*BioShop*[®], nr kat. TBE444) w wodzie destylowanej. W trakcie przygotowywania roztwór agarozy podgrzewano w kuchence mikrofalowej do momentu całkowitego rozpuszczenia agarozy w buforze TBE, po czym schłodzono go do temperatury 60°C. Do ostudzonego roztworu agarozy dodano barwnika DNA Midori Green Advance DNA Stain (*NIPpon Genetics*, nr kat. MG04) w ilości 8 µl na 100 ml roztworu. Następnie całość roztworu przelano do tacki na żel z uprzednio umieszczonym w niej grzebieniem i pozostawiono w temperaturze pokojowej do czasu zastygnięcia żelu agarozowego. Próbkę nałożono na zastygnięty żel agarozowy zanurzony w 1 raz stężonym buforze TBE w komorze aparatu do elektroforezy. Elektroforezę poziomą prowadzono przy napięciu 90 V przez 45 min w aparacie Mini-Sub Cell GT Systems (*Bio-Rad*), a jej wyniki odczytano za pomocą ChemiDoc MP Imaging System.

5.1.3. Izolacja DNA z żelu agarozowego

Do izolacji DNA z prążków wyciętych z żelu agarozowego, odpowiadających sekwencji DNA wektora oraz wstawki, zastosowano zestaw odczynników Syngen Gel/PCR Mini Kit (*Syngen Biotech Sp. z o. o.*, nr kat. SY201010). Całość procedury wykonano według instrukcji dla użytkownika zapewnionej przez producenta. Na końcu procedury otrzymano DNA o wysokim stopniu czystości i stężeniach 14,5 ng/µl dla fragmentu plazmidu pZac2.1gfaABC1D_MCS o wielkości 4431 par zasad (pz) oraz 18,9 ng/µl dla odcinka plazmidu pCMV_VAMP2-SEP o wielkości 1108 pz.

5.1.4. Ligacja fragmentów DNA - wstawki z wektorem

Reakcję ligacji przygotowano w celu połączenia dwóch fragmentów DNA o lepkich końcach: 1) odcinka wektora plazmidowego pZac2.1gfaABC1D_MCS o wielkości 4431 pz powstałego w rezultacie cięcia enzymami restrykcyjnymi FastDigest *NheI* i FastDigest *NotI*, 2) fragmentu DNA (wstawki) o wielkości 1108 pz powstałego po trawieniu enzymami restrykcyjnymi FastDigest *NheI* i FastDigest *NotI* plazmidu pCMV_VAMP2-SEP. W reakcji ligacji wzięto pod uwagę konieczność ilościowego nadmiaru wstawki względem wektora przyjmując stosunek ilościowy 3:1 (90 fmoli wstawki do 30 fmoli wektora). Ligację przeprowadzono w temperaturze pokojowej, w czasie 1 godziny 30 min przy użyciu ligazy T4 DNA Ligase (5U/µl) (*Thermo Scientific*, nr kat. EL0011) i dedykowanego dla niej buforu T4 DNA Ligase Buffer (10X) (*Thermo Scientific*, nr kat. B69). Reakcja kontrolna do reakcji ligacji nie zawierała wstawki, poza tym składem i przebiegiem nie odbiegała od właściwej reakcji ligacji.

Składniki reakcji kontrolnej i ligacji zestawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Objętościowy skład mieszanin reakcji kontrolnej i ligacji.

Skład	Reakcja	
	Kontrola	Ligacja
Wektor	6,1 µl	6,1 µl
Wstawka	-	3,5 µl
T4 DNA Ligase Buffer (10X)	2 µl	2 µl
T4 DNA Ligase (5U/µl)	2 µl	2 µl
H ₂ O	9,9 µl	6,4 µl

5.1.5. Transformacja kompetentnych komórek *Escherichia coli* szczepu DH5a przy użyciu szoku cieplnego

Transformację kompetentnych bakterii wykonano, aby sprawdzić przebieg i poznać wyniki reakcji ligacji. Proces transformacji bakterii przeprowadzono przy zastosowaniu kompetentnych komórek NEB® 5-alpha *E. coli* (New England Biolabs®, nr kat. C2987H) o genotypie *fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*. Na początku procedury kompetentne komórki bakterii przeniesiono z zamrażarki niskotemperaturowej -80°C na lód i rozmrażano przez 30 min. Następnie do 50 µl rozmrożonej zawiesiny kompetentnych komórek dodano 10 µl produktu reakcji ligacji, łagodnie przemieszano potrząsając probówką i inkubowano na lodzie w 4°C przez 30 min. Identycznie postąpiono z produktem reakcji kontrolnej. Po zakończonej inkubacji probówki włożono do termobloku grzejącego (*Thermo Scientific*) ustawionego na 42°C na 45 s, po czym z powrotem przełożono na lód na 2 min. W późniejszym etapie próbki uzupełniono 200 µl pożywki mikrobiologicznej SOB (*ang. super optimal broth*) (0,5% ekstrakt drożdżowy, 2% trypton, 85,56 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM MgSO₄) oraz ponownie umieszczono w suchym bloku grzejnym z wytrząsaniem (37°C, 1000 obr./min) na 45 min. Ostatecznie 200 µl każdej próbki rozprowadzono sterylną głaszczką mikrobiologiczną L-kształtną (*Bionovo*®) po powierzchni szalki Petriego (Ø 100 mm, *Bionovo*®) z pożywką LB z dodatkiem agaru (*Sigma-Aldrich*®, nr kat. L2897) i odpowiednim antybiotykiem selekcyjnym. Tak przygotowane kompetentne komórki bakterii na stałym podłożu mikrobiologicznym z antybiotykiem poddano całonocnej inkubacji w 37°C, a następnie przechowywano w 4°C.

5.1.6. Zakładanie płynnej hodowli bakterii z pojedynczej kolonii bakteryjnej kompetentnych komórek *Escherichia coli* po procesie transformacji

Płynną hodowlę kompetentnych komórek bakterii z samodzielnej kolonii bakteryjnej, po pobraniu przez nią plazmidu w przebiegu procesu transformacji, sporządzono w celu uzyskania osadu bakterii niezbędnego do izolacji plazmidowego DNA o wysokim stopniu czystości. W zależności od ilościowego zapotrzebowania na plazmidowe DNA oraz wykonywanej techniki biologii molekularnej przygotowywano odpowiednio 3,5 ml lub 200 ml całonocnej hodowli bakterii.

Pożywkę LB zrobiono z gotowej mieszaniny składników-LB Broth (Lennox) (*Sigma-Aldrich*[®], nr kat. L3022) według informacji zawartych przez producenta na opakowaniu. Sterylną płynną pożywkę LB o temperaturze pokojowej, w 500 ml szklanej kolbie Erlenmeyera (*Bionovo*[®]) z zabezpieczonym folią aluminiową ujściem szyjki, przeniesiono pod komorę laminarną przeznaczoną do pracy ze szczepami bakteryjnymi. Do 200 ml pożywki LB dodano antybiotyk selekcyjny - ampicylinę (*Sigma-Aldrich*[®], nr kat. A9518) w końcowym stężeniu 100 µg/ml. Z szalki z komórkami transformowanymi produktem reakcji ligacji pobrano sterylną eżę mikrobiologiczną (*Bionovo*[®]) pojedynczą kolonię bakteryjną i włożono ją do pożywki LB z odpowiednim antybiotykiem. Całość wytrząsano na wytrząsarce orbitalnej z inkubacją (*Thermo Scientific*) z prędkością 200 obr./min w temperaturze 37°C przez noc.

5.1.7. Izolacja plazmidowego DNA metodą lizy alkalicznej

Plazmidowe DNA izolowano z osadu transformowanych komórek *Escherichia coli* szczepu DH5α powstałego w wyniku wirowania (4°C, 4000 x g, 15 min) płynnej hodowli bakterii. Proces otrzymywania plazmidowego DNA przeprowadzono z wykorzystaniem zestawów Plasmid Mini (*A&A Biotechnology*, nr kat. 020-50) i EndoFree Plasmid Maxi Kit (*Qiagen*, nr kat. 12362) według protokołów zapewnionych przez ich producentów. Oba zestawy opierają się na metodzie lizy alkalicznej i umożliwiają uzyskanie plazmidowego DNA pozbawionego zanieczyszczeń o małej masie cząsteczkowej, białek itp.

Zestawu Plasmid Mini (*A&A Biotechnology*, nr kat. 020-50) do izolacji plazmidów wysokokopijnych używano w przypadku analizy restrykcyjnej weryfikującej obecność i orientację wstawki w wektorze plazmidowym. Natomiast zestaw EndoFree

Plasmid Maxi Kit (Qiagen, nr kat. 12362) stosowano podczas izolacji plazmidowego DNA, które służyło do transfekcji mieszanej hodowli neuronalno-astrocytarnej *in vitro*.

5.1.8. Oznaczanie stężenia oraz czystości plazmidowego DNA

Pomiarów stężenia i czystości wyizolowanego plazmidowego DNA dokonano przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 1000 (ND-1000) (Thermo Scientific). Spektrofotometryczna metoda oznaczania stężenia DNA polegała na pomiarze absorpcji światła przy długości fali $\lambda = 260$ nm i $\lambda = 280$ nm. Założono, że absorbancja promieniowania ultrafioletowego ($\lambda = 260$ nm) dla wodnego roztworu dwuniciowego DNA o stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ przy długości drogi optycznej równej 10 mm wynosi 1.0. Określając stosunek absorbancji odpowiednio przy $\lambda = 260$ nm i $\lambda = 280$ nm (A_{260}/A_{280}) opisano czystość badanego roztworu dwuniciowego DNA. Jego wartości w zakresie od 1,8 do 2,0 świadczyły o wysokim stopniu czystości wyizolowanego plazmidowego DNA.

5.1.9. Analiza restrykcyjna plazmidowego DNA pod względem obecności i orientacji wstawki w wektorze plazmidowym

Plazmidowe DNA sześciu losowo wybranych próbek poddano trawieniu restrykcyjnemu enzymem FastDigest BglII (Thermo Scientific, nr kat. FD0084) w buforze FastDigest Buffer (10X) (Thermo Scientific, nr kat. B64). Enzym restrykcyjny do reakcji wybrano na podstawie analizy sekwencji badanego DNA zwracając uwagę na lokalizację miejsca restrykcyjnego, czyli fragmentu sekwencji DNA rozpoznawanego i ciętego przez dany enzym. Po trawieniu restrykcyjnym próbki plazmidowego DNA o końcowym stężeniu DNA w próbce 50 ng/ μl i objętości 10 μl wymieszano poprzez pipetowanie z 2 μl buforu obciążającego DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Scientific, nr kat. R0611). Jako standardu dla próbek plazmidowego DNA użyto GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, nr kat. SM0311) w ilości 8 μl . Tak przygotowane próbki nałożono na żel agarozowy i przeprowadzono elektroforezę poziomą (80 V, 70 min).

Ostateczna selekcja plazmidu z wbudowaną i prawidłowo zorientowaną w kierunku 5'→3' wstawką odbyła się na podstawie wyniku elektroforezy przedstawionego na rycinie 5.



Rycina 5. Zdjęcie rozdziału elektroforetycznego próbek plazmidowego DNA po trawieniu restrykcyjnym enzymem FastDigest BglII. 1-standard wielkości prążków, 2-próbka nr 1 po trawieniu, 3-nietrawiona próbka nr 1 (kontrola), 4-próbka nr 2 po trawieniu, 5-nietrawiona próbka nr 2 (kontrola), 6-próbka nr 3 po trawieniu, 7- nietrawiona próbka nr 3 (kontrola), 8-próbka nr 4 po trawieniu, 9-nietrawiona próbka nr 4 (kontrola), 10-próbka nr 5 po trawieniu, 11-nietrawiona próbka nr 5 (kontrola), 12-próbka nr 6 po trawieniu, 13-nietrawiona próbka nr 6 (kontrola).

Nowo powstały plazmid opatrzone nazwą pZac2.1gfaABC1D_VAMP2-SEP.

5.2. Dysocjowana pierwotna hodowla komórek nerwowych i glejowych hipokampa oraz kory nowej szczurzych osesków P0 (*ang. postnatal day 0*) Wistar

Szczurze oseski P0 szczepu wsobnego Wistar otrzymano z hodowli prowadzonej w Zwierzętarńi Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk. Materiał biologiczny do badań stanowiły dysocjowane pierwotne hodowle mieszane neuronów i komórek glejowych pozyskane z hipokampów oraz kory nowej szczurzych osesków P0 Wistar.

Skład buforów i pożywek potrzebnych do założenia mieszanej hodowli neuronalno-astrocytarnej przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Składniki, wraz z ich producentami oraz końcowym stężeniem w buforach i pożywkach, pozwalające wykonać roztwory do izolacji i hodowli komórek nerwowych oraz glejowych hipokampa i kory nowej szczurzych osesków [Kaeche i Banker, 2006; Lenoir i wsp., 2021].

Skład (Producent)	Końcowe stężenie
0,1 M bufor boranowy, pH 8,5 wodny roztwór 0,1 M kwasu borowego i 0,1 M dekahydratu tetraboranu sodu	
H ₃ BO ₃ (Sigma-Aldrich® B6768)	0,1 M
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10 H ₂ O (Sigma-Aldrich® B9876)	0,1 M
10 razy stężony kwas kynureninowy z magnezem (10X Ky/Mg), pH 7,4 wodny roztwór 10 mM kwasu kynureninowego i 100 mM chlorku magnezu	
C ₁₀ H ₇ NO ₃ (Sigma-Aldrich® K3375)	10 mM
0,5% czerwień fenolowa (Sigma-Aldrich® P0290)	0,0025%

1 M HEPES (Sigma-Aldrich® H0887)	5 mM
1 M MgCl ₂ (BioShop® MAG516)	100 mM
NaOH (Sigma-Aldrich® S5881)	do pH 7,4
Roztwór DM (<i>ang. dissociation medium</i>), pH 7,4 wodny roztwór soli	
Na ₂ SO ₄ (Chempur® 118078707)	81,8 mM
K ₂ SO ₄ (Chempur® 117457203)	30 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O (Chempur® 116120500)	5,8 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Sigma-Aldrich® C3881)	0,25 mM
1 M HEPES (Sigma-Aldrich® H0887)	1 mM
45% D-(+)-glukoza (Sigma-Aldrich® G8769)	20 mM
0,5% czerwien fenolowa (Sigma-Aldrich® P0290)	0,001%
NaOH (Sigma-Aldrich® S5881)	do pH 7,4
Roztwór papainy, pH 7,4 (10 u/ml) w roztworze DM-Ky/Mg	
Papaina (Worthington Biochemical Corporation LS003126)	10 u/ml
L-cysteina (Sigma-Aldrich® C7352)	74 mM
Deoksyrybonukleaza I (Worthington Biochemical Corporation LS002007)	12500 u/ml
NaOH (Sigma-Aldrich® S5881)	do pH 7,4
Pożywka do wysiewania komórek (MEM/FBS) płyn hodowlany MEM (<i>ang. Minimum Essential Medium</i>) uzupełniony 10% płodową surowicą bydlęcą FBS (<i>ang. fetal bovine serum</i>)	
MEM (Gibco® 51200-046)	
FBS (Gibco® 16140-071)	10%
GlutaMAX-I (Gibco® 35050-061)	2 mM
100 mM pirogronian sodu (Sigma-Aldrich® S8636)	1 mM
45% D-(+)-glukoza (Sigma-Aldrich® G8769)	0,32%
Pożywka do długotrwałego wzrostu neuronów (NB-A/B-27) płyn hodowlany Neurobasal-A uzupełniony suplementem B-27	
Neurobasal-A (Gibco® 12349-015)	
B-27 (50X) (Gibco® 17504-001)	1X
GlutaMAX-I (Gibco® 35050-061)	0,5 mM
2-Merkaptoetanol (BioShop® MER002)	5 mM

5.2.1. Preparacja szkiełek nakrywkowych do hodowli neuronalno-astrocytarnej

Przygotowanie okrągłych szkiełek nakrywkowych o grubości 0,17 mm, średnicy 18 mm (#1,5, Ø 18 mm, *Hecht Assistant®*) do procedury wysiewania komórek obejmowało procesy czyszczenia, sterylizacji i powlekania roztworem białka. Szkiełka nakrywkowe ustawiono w pozycji pionowej w ceramicznych stojakach (*Thomas Scientific*), po czym dwukrotnie przepłukano wodą destylowaną co miało na celu usunięcie szklanego pyłu oraz innych zanieczyszczeń z ich powierzchni. W następnej kolejności sporządzono 2 M roztwór wodorotlenku sodu i zalano nim szkiełka nakrywkowe w stojakach, tak aby były one całkowicie zanurzone. Przyszykowane w ten sposób szkiełka mikroskopowe poddano działaniu implodujących mikropęcherzyków

gazu w myjce ultradźwiękowej (*Bionovo*[®]) przez 10 min. 2 M roztwór wodorotlenku sodu zutylizowano a jego resztki intensywnie wypłukano sześciokrotnie zalewając szkiełka nakrywkowe wodą destylowaną. Całość ponownie umieszczono w myjce ultradźwiękowej na 10 min. Wodę destylowaną, w której znajdowały się szkiełka nakrywkowe wymieniono dwukrotnie na świeżą, ostatecznie pozostawiając szkiełka w 96% alkoholu etylowym (*POCH*). Czyste szkiełka nakrywkowe zatopione w alkoholu etylowym przeniesiono pod komorę laminarną (*Thermo Scientific*) i przełożono do szklanego krystalizatora zabezpieczając wszystko folią aluminiową. Podjęte czynności umożliwiły wykonanie w piecu laboratoryjnym (*Thermo Scientific*) 3-godzinnej sterylizacji termicznej gorącym powietrzem o temperaturze 180°C. Ostatni etap preparacji szkiełek nakrywkowych niezbędnych do wysiania komórek dotyczył procesu ich dwuczęściowego pokrywania między innymi roztworem białka w sterylnych warunkach. Na dwa dni przed założeniem dysocjowanej pierwotnej hodowli szkiełka nakrywkowe rozmieszczono w płytkach 12-dółkowych do hodowli komórkowej (*VWR*). Następnie przygotowano roztwór hydrobromku poli-D-lizyny (*Sigma-Aldrich*[®], nr kat. *P7886*) w 0,1 M buforze boranowym, pH 8,5 o stężeniu 100 µg/ml i równomiernie nałożono na szkiełka nakrywkowe. Płytki zabezpieczono folią uszczelniającą *Parafilm*[®] (*Sigma-Aldrich*[®]) oraz folią aluminiową, aby ograniczyć parowanie podczas całonocnej inkubacji szkiełek nakrywkowych z roztworem hydrobromku poli-D-lizyny w temperaturze pokojowej. Po 16-godzinnej inkubacji szkiełka zalano sterylną wodą, którą odessano wraz z rozcieńczonym roztworem hydrobromku poli-D-lizyny, po czym trzykrotnie przepłukano nową porcją wody każdorazowo czekając 15 min. Tak wypłukane szkiełka wysuszone a na ich powierzchni rozprowadzono roztwór lamininy (*Roche Diagnostics GmbH*, nr kat. *11243217001*) w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS, ang. *phosphate buffered saline*, *Gibco*[®]) z dodatkiem 0,5 mM $MgCl_2$ (*BioShop*[®], nr kat. *MAG516*), 1 mM $CaCl_2$ (*BioShop*[®], nr kat. *CCL333*) o stężeniu 10 µg/ml. Szkiełka nakrywkowe z roztworem lamininy inkubowano w 4°C do momentu wysiewania komórek, ale nie krócej niż 12 godzin.

5.2.2. Preparacja anatomiczna mózgu szczurzego oseska z uwzględnieniem hipokampów i kory nowej

Szczurze oseski P0 szczepu Wistar odstawiono od samicy zaraz po urodzeniu, następnie umieszczono je na lodzie, aby stały się mniej ruchliwe i ospałe. Wkrótce po osłabieniu lub zniesieniu odruchów zwierzęta kolejno uśmiercono poprzez dekapitację

uprzednio odkażając ich głowy 70% alkoholem etylowym (*Linegal Chemicals*). Odciętą głowę przytrzymano za pomocą pęsety anatomicznej ząbkowanej szpiczastej zagiętej (*Falcon Surgical*), skórę i czaszkę rozcięto nożyczkami chirurgicznymi ostro-ostrymi prostymi (*Falcon Surgical*). Czaszkę oderwano od mózgu pęsetą, mózdzek odkrojono szpatułką dwustronną (*Falcon Surgical*) a mózg rozdzielono na dwie półkule zachowując opuszki węchowe [Nunez, 2008]. Tak wypreparowane półkule ulokowano w zmrożonym roztworze DM z dodatkiem kwasu kynureninowego z magnezem (DM-Ky/Mg). Z każdej półkuli usunięto pod mikroskopem stereoskopowym opony mózgowe, wyodrębniono hipokamp i fragment kory nowej używając w tym celu pęset z linii *Dumont* typ 5 (*Animalab*).

5.2.3. Izolacja komórek nerwowych i glejowych z hipokampów oraz kory nowej

Oddzielone od reszty tkanki nerwowej struktury mózgu-hipokampy i kawałki kory nowej przeniesiono odrębnie do dwóch sterylnych probówek z okrągłym dnem (*Falcon*[®]), wypełnionych lodowatym roztworem DM-Ky/Mg. Probówki przełożono pod komorę laminarną (*Thermo Scientific*), gdzie trzykrotnie płukano tkanki buforem DM-Ky/Mg. Następnie tkanki były inkubowane w 2,5 ml ogrzanego do 37°C roztworu papainy w łaźni wodnej (*Thermo Scientific*) w 37°C przez 15 min. Dysocjację tkanek powtórzono przy użyciu nowych objętości roztworu enzymu proteolitycznego, po czym przystąpiono do hamowania jego aktywności. Inaktywacja działania papainy obejmowała kolejno trzykrotną wymianę roztworu enzymu na ciepły roztwór DM-Ky/Mg oraz pożywkę do wysiewania komórek (oba roztwory o temperaturze 37°C). Na koniec hipokampy i fragmenty kory nowej pozostawiono w 1 ml pożywki do wysiewania komórek celem wydajnego rozdrobnienia poprzez pipetowanie. Pipetę automatyczną (*Eppendorf*) nastawiono na 1000 µl mechanicznie rozdzielając hipokampy oraz korę nową do momentu uzyskania zawiesin komórek. Zawiesiny komórek umieszczono w nowych, sterylnych probówkach stożkowych (*Falcon*[®]), dopełniono pożywką do objętości 5 ml i wirowano z prędkością 1000 obr./min w temperaturze pokojowej przez 5 min. Roztwór pożywki znad otrzymanych osadów komórek ostrożnie odebrano i każdy osad niezależnie zawieszono w świeżej porcji pożywki do wysiewania komórek (1 ml pożywki/półkulę). Liczbę i żywotność komórek oznaczono przeprowadzając test z 0.4% błękitem trypanu (*Gibco*[®], nr kat. 15250061) w komorze Bürkera (*Bionovo*[®]). Komórki wysiewano na szkiełka nakrywkowe pokryte roztworami hydrobromku poli-D-lizyny i lamininy w stężeniu 5 906 komórek/cm², czyli 150 000 komórek/szkiełko

i hodowano w pożywce MEM/FBS przez 3 godziny w 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Przedsięwzięty wstępny okres hodowli komórek w pożywce z surowicą wspomógł ich adhezję do szkiełek nakrywkowych. Po upływie 3 godzin pożywkę do wysiewania komórek wymieniono na NB-A/B-27, w którym utrzymywano hodowlę (37°C, 5% CO₂).

5.3. Hodowla szczurzych astrocytów hipokampa i kory nowej

Zawiesiny komórek hipokampa i kory nowej, pozyskane w wyniku izolacji komórek (zgodnie z podrozdziałem 5.2.3), o sprecyzowanej liczbie żywych komórek wykorzystano do założenia pierwotnej hodowli astrocytów.

Komórki w stężeniu 200 000 komórek/cm² wysiewano do sterylnych butelek o powierzchni 75 cm² (*GenoPlast Biotech S.A.*) i hodowano w pożywce DMEM/FBS (*ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium with fetal bovine serum*) (10% v/v FBS) w inkubatorze (37°C, 5% CO₂) (*SANLAB*) przez 24 godziny. Po upływie 24 godzin pożywkę DMEM/FBS wraz z szczątkami komórkowymi (komórki nie przyczepione do podłoża, zlepy komórek itp.) odesłano ssakiem medycznym znad przytwierdzonych do podłoża komórek i zastąpiono świeżą porcją pożywki.

Pierwotną hodowlę gleju o konfluencji komórek na poziomie 80% (7-8 dzień hodowli w warunkach *in vitro*) (*DIV, ang. day in vitro*) wytrząsano na wytrząsarce orbitalnej z inkubacją z prędkością 240 obr./min w temperaturze 37°C przez 6 godzin. W następnej kolejności dokonano wymiany pożywki na świeżą w celu usunięcia z hodowli komórek prekursorowych oligodendrocytów, które uległy odczepieniu od warstwy astrocytów na skutek wytrząsania. Po 24-godzinnej inkubacji w 37°C, w atmosferze 5% CO₂ hodowlę powtórnie wytrząsano tym razem z prędkością 180 obr./min przez 30 min, aby wyeliminować z niej mikroglej, po czym wymieniono pożywkę na świeżą [McCarthy i de Vellis, 1980; Schildge i wsp., 2013]. Tego samego dnia astrocyty w pierwotnej hodowli pasażowano, czyli przenoszono ze sterylnych butelek do płytek 12-dołkowych ze szkiełkami nakrywkowymi pokrytymi roztworami hydrobromku poli-D-lizyny i lamininy (zgodnie z podrozdziałem 5.2.1). Po wykonaniu pasażu liczba astrocytów przypadająca na powierzchnię pojedynczego szkiełka nakrywkowego wynosiła 11 811 komórek/cm², czyli 30 000 komórek/szkiełko.

Pasaż astrocytów w pojedynczej butelce rozpoczęto od delikatnego odciągnięcia pożywki DMEM/FBS znad komórek za pomocą akumulatorowego pipetora (*Eppendorf*) i przepłukania ich 5 ml ogrzanego do 37°C roztworu PBS. Następnie roztwór PBS wymieniono na 5 ml ciepłego roztworu 0,25% trypsyny z EDTA (*Gibco*[®], nr kat.

25200072), w którym inkubowano komórki przez 3 min w 37°C. Po zakończonej inkubacji trypsynę inaktywowano poprzez rozcieńczenie jej roztworu pożywką DMEM/FBS. Zawiesinę komórek w pożywce DMEM/FBS z 0,25% trypsyną i EDTA wirowano z prędkością 1000 obr./min w temperaturze pokojowej przez 5 min. Otrzymany w wyniku wirowania osad komórek zawieszono w świeżej porcji pożywki, a następnie komórki policzono w komorze Bürkera i wysiewano na wcześniej przygotowane szkiełka nakrywkowe.

5.4. Transfekcja astrocytów *in vitro*

5.4.1. Transfekcja hodowli neuronalno-astrocytarnej konstruktami genetycznymi

Dysocjowane pierwotne hodowle mieszane komórek nerwowych i glejowych, sprokurowane ze szczurzych hipokampów oraz kory nowej, transfekowano metodą chemiczną pomiędzy 7 a 9 DIV. Do lipofekcji [Karra i Dahm, 2010] wykorzystano zestaw odczynników Lipofectamine® 3000 (Invitrogen®, nr kat. L3000008). Transfekcja komórek za pomocą tego zestawu opierała się na sporządzeniu dwóch oddzielnych roztworów w płynie hodowlanym Neurobasal-A: 1) Lipofectamine® 3000, 2) plazmidowego DNA i odczynnika P3000®.

Objętościowy skład roztworów niezbędnych do wprowadzenia obcego materiału genetycznego do komórek nerwowych i glejowych, hodowanych na szkiełkach nakrywkowych w płytkach 12-dółkowych, przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Objętości składników roztworów koniecznych do transfekcji neuronów i astrocytów w przeliczeniu na powierzchnię pojedynczego dołka w płytce 12-dółkowej.

Roztwór	Składnik	Objętość [μl]
Lipofectamine® 3000	Neurobasal-A	50
	Lipofectamine® 3000	1
Plazmidowe DNA	Neurobasal-A	50
	DNA (0,5 μg/μl)	1
	Odczynnik P3000® (2 μl/μg DNA)	1

W celu lipofekcji komórek z osobnego dołka płytki 12-dółkowej do 50 μl rozcieńczonej Lipofectamine® 3000 dodano 50 μl roztworu plazmidowego DNA. W dalszej kolejności całość roztworu delikatnie wymieszano pstrykając w stożkowe dno probówki palcem i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 min. Jednocześnie z dołka, w którym znajdowały się neurony oraz astrocyty odebrano 750 μl pożywki do

długotrwałego wzrostu neuronów (pożywka kondycjonowana) i w stosunku objętościowym 1:1 zmieszano ją ze świeżą jej porcją. Po zakończonej inkubacji roztwór Lipofectamine® 3000 i plazmidowego DNA powoli dodano kroplami do komórek w pojedynczym dołku płytki 12-dołkowej pozostawiając hodowlę w 37°C na 1 godzinę. Po upływie tego czasu pożywkę wraz z Lipofectamine® 3000, plazmidowym DNA i odczynnikami P3000® odessano ssakiem medycznym znad komórek i zastąpiono wcześniej przygotowaną pożywką kondycjonowaną z pożywką do długotrwałego wzrostu neuronów.

5.4.2. Transfekcja hodowli astrocytarnej plazmidowym DNA

Hodowle astrocytów hipokampa i kory nowej transfekowano po upływie 24 godzin od momentu wysiania astrocytów na szkiełka nakrywkowe pokryte roztworami hydrobromku poli-D-lizyny i lamininy.

Przed przystąpieniem do procesu wprowadzenia plazmidowego DNA do astrocytów pożywkę DMEM/FBS, w której znajdowały się komórki ostrożnie odebrano do sterylnej probówki wirówkowej (*Falcon*®) i zastąpiono płynem hodowlanym Opti-MEM™ I (*Gibco*®, nr kat. 11058021). Po 45 min inkubacji w inkubatorze (37°C, 5% CO₂) do płynu hodowlanego o zredukowanej zawartości FBS (Opti-MEM™ I) dodano roztworu Lipofectamine® 3000 i plazmidowego DNA (zgodnie z podrozdziałem 5.4.1), po czym ponownie inkubowano przez 1 godzinę 30 min. W dalszej kolejności całość roztworu znad komórek odessano ssakiem medycznym, a jego brak uzupełniono wcześniej odebraną pożywką DMEM/FBS. Następnego dnia w hodowlach astrocytarnych poddanych procesowi transfekcji dokonano wymiany pożywki na NB-A/B-27.

5.5. Immunofluorescencyjne barwienie astrocytów w hodowlach astrocytarnych oraz neuronalno-astrocytarnych

Hodowle astrocytarne (zgodnie z podrozdziałem 5.3) oraz neuronalno-astrocytarne (zgodnie z podrozdziałem 5.2) były utrwalane między 19-21 DIV za pomocą ogrzanego do 37°C roztworu 4% paraformaldehydu (PFA, *ang. paraformaldehyde*) (*Sigma-Aldrich*®, nr kat. 441244) z dodatkiem 4% sacharozy (*Sigma-Aldrich*®, nr kat. S8501) w buforze PBS. Po 8-minutowej inkubacji ciepły roztwór 4% PFA z 4% sacharozą został usunięty pipetą automatyczną znad komórek, a następnie zastąpiony roztworem 4% sacharozy w PBS (37°C). Roztwór ten wymieniano trzykrotnie na świeży, co miało

na celu dokładne wypłukanie pozostałości roztworu 4% PFA z 4% sacharozą. Utrwalone w ten sposób komórki hodowane na szkiełkach nakrywkowych poddano 10-minutowej permabilizacji roztworem 0,1% detergentu (Tritonu X-100, *BioShop*[®], nr kat. TRX777) w PBS w temperaturze pokojowej, po czym trzykrotnie przepłukano buforem PBS. Następnie przeprowadzono etap blokowania, aby zapobiec niespecyficznym reakcjom, poprzez inkubację utrwalonych, permabilizowanych komórek na szkiełkach nakrywkowych z 10% roztworem surowicy koziej (*Gibco*[®], nr kat. 16210064) w PBS przez 1 godzinę 30 min w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu komórki inkubowano w komorze wilgotnościowej z pierwszorzędowym mysim monoklonalnym przeciwciałem, skierowanym przeciwko białku zielonej fluorescencji (*Sigma-Aldrich*[®], nr kat. MAB3580), rozcieńczonym 1000 razy w 2% roztworze surowicy koziej w PBS w temperaturze 4°C przez noc. Po zakończonej inkubacji komórki na szkiełkach ponownie przepłukano trzykrotnie buforem PBS i umieszczono w wilgotnej komorze. Tym razem inkubowano je z drugorzędowym kozim poliklonalnym przeciwciałem (skierowanym przeciwko mysim immunoglobulinom) znakowanym Alexa 488 (*Invitrogen*[®], nr kat. A-11001). Przeciwciało to rozcieńczono 500 razy w 2% roztworze surowicy koziej w PBS i inkubowano w nim komórki przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Ostatecznie wybarwione komórki na szkiełkach nakrywkowych dokładnie wypłukano w wodzie destylowanej i zatopiono w płynie do zatapiania preparatów Fluoromount-GTM Mounting Medium (*Invitrogen*[®], nr kat. 00495802).

5.6. Analiza transkryptomu różnych typów hodowli astrocytów oraz pojedynczych astrocytów w kontekście ekspresji genu *Unc13c*

5.6.1. Izolacja całkowitego RNA

Całkowite RNA izolowano z hodowli komórek *in vitro* (3 dołki w płytce 12-dołkowej na pojedynczą próbkę). Proces pozyskiwania całkowitego RNA przeprowadzono przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit (*Qiagen*, nr kat. 74104), zgodnie z protokołem zapewnionym przez producenta, wprowadzając jedynie drobne modyfikacje w celu zwiększenia ilości uzyskanego RNA. Modyfikacje te dotyczyły przede wszystkim objętości buforu lizującego RLT, 70% alkoholu etylowego oraz buforu płuczącego RW1, których użyto w połowie mniejszych ilościach niż w standardowym protokole. Ponadto wprowadzono dwa dodatkowe kroki po umieszczeniu próbki na złożu: 30-minutową inkubację z deoksyrybonukleazą I w dedykowanym buforze RDD

(Qiagen, nr kat. 79254) oraz etap płukania złoza buforem RW1 w objętości 350 μ l. Pozostała część protokołu została zachowana bez zmian.

Na koniec, po otrzymaniu całkowitego RNA komórek, dokonano pomiarów jego stężenia i czystości metodą spektrofotometryczną przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 1000 (ND-1000), po czym przystąpiono do przeprowadzania procesu odwrotnej transkrypcji.

5.6.2. Odwrotna transkrypcja RNA oraz ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy

Do odwrotnej transkrypcji całkowitego RNA wyizolowanego z hodowli komórek *in vitro* wykorzystano zestaw odczynników SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Scientific, nr kat. 11756050). Całość procedury przeprowadzono według instrukcji dostarczonej przez producenta. Do każdej reakcji użyto 568 ng całkowitego RNA. Uzyskane próbki komplementarnego DNA (cDNA, *ang. complementary DNA*) przechowywano w temperaturze -20°C .

Ilościową łańcuchową reakcję polimerazy (RT-qPCR, *ang. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) przeprowadzono dla każdej próbki cDNA w celu zbadania ekspresji genu *Unc13c* w hodowlach astrocytarnych oraz neuronalno-astrocytarnych hipokampa oraz kory nowej.

Skład mieszaniny reakcyjnej dla kontroli oraz właściwej reakcji, przeliczony na jedną próbkę, przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Składniki wraz z ich producentami oraz objętościami niezbędnymi do przygotowania pojedynczej kontroli i reakcji właściwej techniką RT-qPCR.

Skład (Producent)	Objętość [μ l]	
	Kontrola	Reakcja
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo-Scientific 4444963)	5 μ l	5 μ l
TaqMan Gene Expression Assays (Thermo-Scientific 4331182)	0,5 μ l*	0,5 μ l**
cDNA	2 μ l	2 μ l
Ultraczysta woda	2,5 μ l	2,5 μ l

* *Gapdh*, Rn01775763_g1

** Rn00597672 m1 *Unc13c*, 2105378 G8, ID 2106900

Każdą próbkę o całkowitej objętości mieszaniny reakcyjnej wynoszącej 10 μ l przygotowano w trzech powtórzeniach. Próbki umieszczono w płytce 96-dołkowej przeznaczonej do użytku w termocyklerze (Applied Biosystems, nr kat. 43-469-06) oraz zabezpieczono samoprzylepną folią (Applied Biosystems, nr kat. 43-119-71), aby chronić

je przed ewentualnymi zanieczyszczeniami i parowaniem. W następnej kolejności próbki poddano reakcji w termocyklerze StepOnePlus™ Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*). Odczytu wyników dokonano za pomocą oprogramowania StepOne™ Software v2.2.2.

Względny poziom (zmianę) ekspresji genów obliczono, wykorzystując dane (średnie arytmetyczne z wartości C_t dla jednakowych powtórzeń danych próbek) uzyskane metodą RT-qPCR. Do każdej próbki przygotowano oddzielną kontrolę o takiej samej liczbie powtórzeń, co odpowiadająca jej próbka. W tym celu posłużono się względną analizą porównawczą, określaną mianem $\Delta\Delta C_t$. Najpierw obliczono ΔC_t dla każdej próbki (średnia arytmetyczna wartości C_t próbka - średnia arytmetyczna C_t kontrola). $\Delta\Delta C_t$ to różnica pomiędzy ΔC_t próbki a średnią arytmetyczną z wartości ΔC_t dla rodzaju próbek stanowiących nasz punkt odniesienia. Ostateczne wyniki dla poszczególnych próbek uzyskano za pomocą następującej formuły matematycznej: $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

5.6.3. Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ

Fluorescencyjną hybrydyzację in situ (FISH, *ang. fluorescent in situ hybridization*) przeprowadzono w celu identyfikacji RNA Unc13c w astrocytach pochodzących z dysocjowanych pierwotnych hodowli komórek nerwowych i glejowych, pozyskanych z hipokampów oraz kory nowej. Przed przystąpieniem do procedury FISH zaprojektowano oligonukleotydowe sondy typu sens (kontrola) oraz antysens do sekwencji kodującej i 3' UTR cDNA. Sekwencje te namnożono techniką łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, *ang. polymerase chain reaction*), wykorzystując sekwencję z Allen Mouse Brain Atlas (Probe RP_040507_01_F01), <http://mouse.brain-map.org/gene/show/18781>. Sekwencje starterów bezpośredniego (*ang. forward primer*) i odwrotnego (*ang. reverse primer*) były następujące:

- 1) ATGCTCCTCTAGACTCGAGGAATTCACCAAAGCCATCCATCCATG,
- 2) TTGGGAGCTCTCCGGATCCAAGCTTATCCCGCACAATAGGCAATG.

Uzyskany w wyniku reakcji PCR produkt (powielona sekwencja) wklonowano do wektora plazmidowego 317_pGEM-7Zf+ strawionego enzymami FastDigest HindIII (*Thermo Scientific, nr kat. FD0504*) oraz FastDigest EcoRI (*Thermo Scientific, nr kat. FD0274*). Do klonowania użyto mieszaniny reakcyjnej NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (*New England Biolabs, nr kat. E2621S*) zgodnie z zaleceniami producenta.

Powstały plazmid pGEM-7Zf+_Unc13c sekwencjonowano. Wektor pGEM-7Zf+ posiada dwa przeciwstawne promotory T7 oraz SP6, które służą do przygotowania sond sens i antysens za pomocą translacji *in vitro*, a sam plazmid stanowi matrycę dla reakcji. Przed syntezą sondy sens, plazmid trawiono za pomocą enzymu FastDigest HindIII, natomiast przed syntezą sondy antysens, plazmid trawiono za pomocą enzymu FastDigest EcoRI.

Procedurę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* rozpoczęto od utrwalenia hodowli (zgodnie z podrozdziałem 5.5), które następnie poddano 15-minutowej acetylacji w temperaturze pokojowej w buforze o składzie: 0,1 M trietanolamina (*Thermo Scientific*, nr kat. 421631000), 0,25% HCl (*Sigma-Aldrich*[®], nr kat. 320331) oraz 0,25% bezwodnik kwasu octowego (*Chempur*[®], nr kat. 363-116938707). W kolejnym etapie hodowle inkubowano przez 3 godziny w roztworze prehybrydyzacyjnym (*Sigma-Aldrich*[®], nr kat. P1415), po czym wymieniono go na roztwór hybrydyzacyjny (*Sigma-Aldrich*[®], nr kat. H7140) zawierający ATG i UTR w stosunku 1:200, kontynuując inkubację w temperaturze 63°C przez noc. Po zakończonej inkubacji hodowle dwukrotnie przepłukano 0,2 razy stężonym buforem SSC (0.2X SSC), zawierającym cytrynian sodu, każdorazowo inkubując z nim hodowle przez 1 godzinę w temperaturze 63°C. Następnie pięciokrotnie wymieniono bufor na świeży, za każdym razem inkubując hodowle przez 30 min w temperaturze pokojowej. Na koniec hodowle pozostawiono w 3% nadtlenu wodoru na 20 min. Po tym etapie przystąpiono do blokowania niespecyficznych wiązań przez 1-godziną inkubację z roztworem 2-nitro-5-tiobenzoesanu (TSA[®] Plus, *PerkinElmer Life Sciences*). Następnie hodowle inkubowano z owczymi przeciwciałami anty-fluoresceina-POD (1:200) (*Roche*, nr kat. 11426346910) w temperaturze 4°C przez noc. Po inkubacji przeciwciała wypłukano zimnym roztworem PBS, a następnie wzmocniono sygnał hybrydyzacji przez użycie zestawu odczynników TSA Cyanine3 kit (*PerkinElmer Life Sciences*). Po zakończonej procedurze FISH przeprowadzono immunofluorescencyjne barwienie astrocytów w utrwalonych hodowlach (zgodnie z podrozdziałem 5.5).

5.7. Przygotowanie hodowli komórek nerwowych i glejowych hipokampa oraz kory nowej do pomiarów z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej całkowitego wewnętrznego odbicia

Dysocjowane pierwotne hodowle neuronalno-astrocytarne, transfekowane zrekombinowanym plazmidem pZac2.1gfaABC1D_VAMP2-SEP, obrazowano przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej całkowitego wewnętrznego odbicia (TIRF, *ang. total internal reflection fluorescence*) pomiędzy 19-21 DIV.

Podstawowym buforem, w którym przeprowadzano pomiary był bufor ES (*ang. extracellular solution*) [Chen i wsp., 2013] ogrzany do 37°C. Stanowił on bazę do sporządzania pozostałych buforów wykorzystywanych w pomiarach mikroskopowych.

Zawartość buforów umożliwiających przyżyciową obserwację komórek w trakcie poklatkowego nagrywania procesu uwalniania cząsteczek przekąźnikowych przez astrocyty zaprezentowano w tabeli 8.

Tabela 8. Odczynniki i ich producenci, oraz końcowe stężenia w buforach wykorzystywanych do obrazowania komórek z użyciem mikroskopii TIRF.

Skład (Producent)	Końcowe stężenie składnika w buforze
Bufor ES, pH 7,4 wodny roztwór soli	
NaCl (Sigma-Aldrich® S9888)	145 mM
KCl (Sigma-Aldrich® P4504)	2,5 mM
D-(+)-glukoza (Sigma-Aldrich® G7021)	10 mM
HEPES (BioShop® HEP001)	10 mM
C ₁₄ H ₁₈ O ₄ (Trolox) (Sigma-Aldrich® 238813)	0,4 mM
1 M CaCl ₂ ·2H ₂ O (BioShop® CCL333)	2 mM
MgSO ₄ (POCH 613754730)	1 mM
Bufor ES z cytrynianem tetrodotoksyny, pH 7,4	
Bufor ES	
Cytrynian tetrodotoksyny (Alomone Labs T-550)	1 μM
Bufor ES z solą disodową NBQX, pH 7,4	
Bufor ES	
Sól disodowa NBQX (Tocris Bioscience 1044)	50 μM
Bufor ES bez jonów Ca²⁺ z (S)-3,5-DHPG, pH 7,4	
Bufor ES bez jonów Ca ²⁺	
NaCl (Sigma-Aldrich® S9888)	145 mM
KCl (Sigma-Aldrich® P4504)	2,5 mM
D-(+)-glukoza (Sigma-Aldrich® G7021)	10 mM
HEPES (BioShop® HEP001)	10 mM

C ₁₄ H ₁₈ O ₄ (Trolox) (Sigma-Aldrich® 238813)	0,4 mM
MgSO ₄ (POCH 613754730)	1 mM
(S)-3,5-DHPG (Cayman Chemical Cay14411)	40 µM
Bufor ES z rianodyną i boranem 2-aminoetylodifenylowym, pH 7,4	
Bufor ES	
Rianodyna (Alomone Labs R-500)	20 µM
Boran 2-aminoetylodifenylowy (Tocris Bioscience 1224)	70 µM
Bufor ES z solą tetrasodową BAPTA, pH 7,4	
Sól tetrasodowa BAPTA (EMD Millipore 196418)	100 µM

Bezpośrednio przed obserwacją mikroskopową komórki wysiane na odpowiednio przygotowane okrągłe szkiełka nakrywkowe o grubości 0,17 mm i średnicy 18 mm (#1,5) umieszczano w perfuzyjnej komorze RC-49MFS (*Warner Instruments*). Komora RC-49MFS posiada rurki perfuzyjne do szybkiej wymiany płynów w obrębie komory oraz platynowe elektrody do przeprowadzania elektrycznej stymulacji komórek. Usuwanie płynów z komory zachodzi na zasadzie aspiracji, czyli zasysania poprzez wykorzystanie pompy perystaltycznej BT100S (*Lead Fluid*). Montaż szkiełka nakrywkowego w komorze jest bardzo prosty i szybki. Polega on na położeniu szkiełka z komórkami na aluminiowej podstawie posmarowanej uszczelniającym smarem do próżni, a następnie nałożeniu na wierzch nakładki wykonanej z tworzywa sztucznego. Szczelność układu oprócz smaru do próżni zapewnia gumowa uszczelka pomiędzy podstawą komory a górną nakładką oraz magnetyczne zamknięcie składające się z czterech magnesów. Komora jest kompatybilna z wstawką stolikową do stolika mikroskopowego w mikroskopie odwróconym Axio Observer.Z1 (*Zeiss*).

Schemat komory RC-49MFS wykonany w programie Autodesk Fusion 360 [Song i wsp., 2018] przedstawiono na rycinie 6.



Rycina 6. Konstrukcja komory do przyżyciowych obserwacji komórek przy użyciu technik mikroskopowych i jej przekrój podłużny.

5.8. Konfiguracja układu pomiarowego do poklatkowej rejestracji procesu egzocytozy w astrocytach

Poklatkowe filmy wykonano za pośrednictwem mikroskopu odwróconego Axio Observer.Z1 będącego własnością pracowni usługowej Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego Polskiej Akademii Nauk. Mikroskop został wyposażony w zaciemnioną komorę inkubacyjną oraz urządzenie umożliwiające kontrolę temperatury (Zeiss). Ponadto do mikroskopu podłączono kamerę z przetwornikiem CCD (EMCCD, ang. *electron multiplying charge couple device*) QuantEM™ 512SC (Photometrics®) o rozdzielczości natywnej 512×512 i wielkości piksela 16×16 μm [Denvir i Coates, 2002; Qiao i wsp., 2021]. Kamera QuantEM™ 512SC dzięki własnemu sensorowi cechuje się dużym wzmocnieniem obrazu, możliwością rejestracji pojedynczych fotonów i częstotliwością odczytu 10 MHz. W badaniach uwalniania egzocytarnych pęcherzyków z cząsteczkami przekaźnikowymi przez astrocyty użyto lasera argonowego o długości fali $\lambda = 488$ nm i obiektywu alpha Plan-Apochromat 100x/1,46 Oil DIC M27 (Zeiss).

Parametry akwizycji danych w postaci poklatkowych filmów ustawiono przy użyciu oprogramowania AxioVision Release 4.8.2 (Zeiss). Przed rozpoczęciem poklatkowego nagrywania zastosowano tzw. binning (łączenie) pikseli 2×2, co polega na integracji ładunków sąsiadujących pikseli w matrycy CCD, zwiększając wielkość piksela do 0,32×0,32 μm. Proces ten skutkuje poprawą stosunku sygnału do szumu oraz zwiększa

czułość i szybkość rejestracji. Ponadto zdefiniowano liczbę klatek składających się na pojedynczy pomiar oraz interwał czasowy pomiędzy nimi. Poklatkowa seria zdjęć obrazu mikroskopowego dla filmu kontrolnego wynosiła 1200 klatek, natomiast dla filmu, w którym obserwowano wpływ danego czynnika na przebieg egzocytozy w astrocytach, 2400 klatek. Odstęp czasowy pomiędzy rejestrowanymi klatkami wynosił 30 ms dla pomiarów, w których nie uwzględniano protokołu elektrycznej stymulacji, oraz 50 ms dla pomiarów, gdzie schemat doświadczenia obejmował elektryczną stymulację hodowli neuronalno-astrocytarnej.

Hodowle stymulowano elektrycznie przy użyciu modelu 4100 izolowanego stymulatora o dużej mocy (*ang. Isolated High Power Stimulator*) (A-M Systems) według następujących ustawień: liczba impulsów 20 lub 80 bez powielania (pojedyncza seria), czas trwania jednostkowego impulsu 1 ms, częstotliwość 83,3 Hz oraz napięcie 90 V.

5.9. Komputerowa analiza poklatkowych rejestracji obrazu mikroskopowego

Sekwencje czasowe obrazów mikroskopowych w formacie plików rastrowych-bitmapy o rozszerzeniu *zvi* (*ang. Zeiss Vision Image*) zapisano w formacie *Tiff* (*ang. tag image file format*) w programie Fiji ImageJ [Abramoff i wsp., 2004; Schneider i wsp., 2012; Stossi i Singh, 2023]. Następnie pliki przygotowano do analizy poprzez korekcję zaniku fluorescencji fluoroforu dzięki komponentowi programu Fiji ImageJ - *Bleach Correction (Exponential Fit)*. Narzędzie to dopasowuje wykładniczą krzywą zaniku do całkowitych wartości intensywności fluorescencji w poszczególnych ramkach czasowych przez co niejako pozwala na oszacowanie intensywności sygnału tła [Miura, 2020].

5.9.1. Suite2p jako narzędzie do przetwarzania danych w postaci plików rastrowych z obrazowania astrocytarnego procesu egzocytozy przekazników

Suite2p jest oprogramowaniem stworzonym przez Mariusa Pachitariu, Carsena Stringera i założycieli Cortexlab w University College London - Matteo Carandini oraz Kennetha Harrisa, dostępnym pod linkiem <https://github.com/cortex-lab/Suite2P> [Pachitariu i wsp., 2016]. Korzystanie z Suite2p wymagało instalacji zintegrowanego środowiska programistycznego (IDE, *ang. Integrated Development Environment*) - Spyder (Anaconda3).

Przed rozpoczęciem analizy poklatkowych rejestracji obrazu mikroskopowego w Suite2p dla każdego poklatkowego filmu utworzono dwa odrębne foldery: 1) *data*,

zawierający plik (film) w formacie *Tiff* (zgodnie z podrozdziałem 5.9), 2) *analysis*, pusty folder na pliki wynikowe wygenerowane w Suite2p.

W celu otwarcia oprogramowania Suite2p (wersja v0.10.3) w oknie aplikacji Anaconda Prompt (Anaconda3) wpisano następujące komendy: 1) *conda*, 2) *conda activate suite2p*, 3) *python -m suite2p*. W następnej kolejności uruchomiono analizę poklatkowego filmu poprzez wskazanie ścieżki dostępu w systemie Microsoft Windows do folderu *data* oraz *analysis*, jak również konkretnych wartości parametrów umożliwiających efektywne wykrywanie pojedynczych egzocytarnych pęcherzyków uwalnianych przez astrocyty.

Obraz okna Suite2p z właściwymi parametrami analizy zademonstrowano na rycinie 7.

Main settings	Output settings	Registration	Nonrigid	ROI detection	Extraction/Neuropil
nplanes 1	preclassify 0.0	do_registration 1	nonrigid 1	roidetect 1	allow_overlap 0
nchannels 1	save_mat 0	align_by_chan 1	block_size 256, 256	sparse_mode 0	inner_neuropil_radius 2
functional_chan 1	combined 1	nimg_init 300	snr_thresh 1.2	diameter 5	min_neuropil_pixels 350
tau 1.5	reg_tif 0	batch_size 500	maxregshiftNR 5.0	spatial_scale 0	Deconvolution win_baseline 60.0 sig_baseline 10.0 neucoeff 0.7
fs 10.0	reg_tif_chan2 0	smooth_sigma 1.15	1P 1Preg 0 spatial_hp 50.0 pre_smooth 2.5 spatial_taper 50.0	connected 1	
delete_bin 0	aspect 1.0	smooth_sigma_time 0.0		threshold_scaling 1.0	
do_bidiphase 0		maxregshift 0.1		max_overlap 0.75	
bidiphase 0.0		th_badframes 1.0		max_iterations 20	
		keep_movie_raw 0		high_pass 10.0	
		two_step_registration 0.0			

Rycina 7. Parametry analizy procesu astrocytarnej egzocytozy w Suite2p.

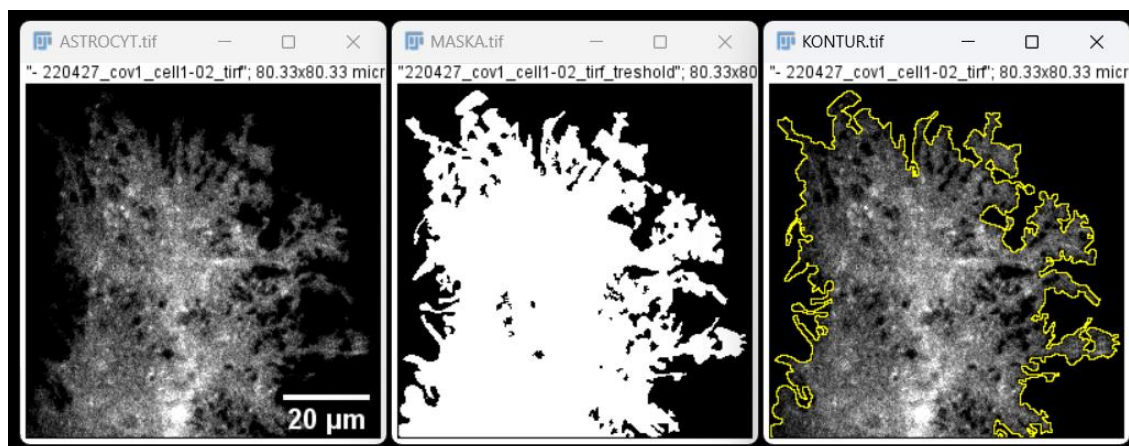
5.10. Analiza fenotypu astrocytów w hodowli komórek *in vitro*

Charakterystyka kształtu astrocytów pod względem złożoności strukturalnej komórkowych wypustek opierała się na określeniu stosunku obwodu badanej komórki do zajmowanej przez nią powierzchni. Pomiarów powierzchni komórek glejowych oraz ich obwodów dokonano na podstawie zdjęć mikroskopowych wykonywanych techniką TIRF każdorazowo przed przystąpieniem do poklatkowej rejestracji obrazu mikroskopowego.

W pierwszym etapie analizy zdjęcie mikroskopowe astrocytu otworzono w programie Fiji ImageJ i za pomocą narzędzia *Brightness/Contrast* dostosowano jasność, kontrast komórki względem tła. W dalszej kolejności wykorzystując komendę *Threshold* ustawiono odpowiedni próg binaryzacji, aby było możliwe wyodrębnienie

obiektu (komórki lub jej fragmentu) widocznego na zdjęciu i stworzenie jego maski. Następnie maski, w której szum Poissona tła jest równy 0 użyto do wygenerowania konturu komórki i uzyskania informacji o wartości jej powierzchni, obwodu przez zastosowanie narzędzia *Analyze Particles*.

Obrazy przykładowych plików wynikowych wygenerowanych w programie Fiji ImageJ na podstawie pojedynczego zdjęcia mikroskopowego astrocytu przedstawiono na rycinie 8.



Rycina 8. Rezultat działań w programie Fiji ImageJ prowadzących do pomiaru parametrów obwodu i powierzchni obiektu (astrocytu) na zdjęciu mikroskopowym. Od lewej: wynik manipulacji dokonanej narzędziem *Brightness/Contrast*, maska komórki powstała po binaryzacji obrazu, obrys analizowanego obiektu otrzymany dzięki zastosowaniu narzędzia *Analyze Particles* [Urbina i Gupton, 2021].

5.11. Metody prezentacji danych i analiza statystyczna otrzymanych wyników

Początkowo dane przedstawiono jako liczbę uwolnionych w ciągu 1 min pęcherzyków przypadających na $1 \mu\text{m}^2$ powierzchni komórki (astrocytu). Następnie znormalizowano te dane, dzieląc każdą wartość przez średnią arytmetyczną wyników uzyskanych w pomiarach poziomu bazowego dla danego typu doświadczenia. Otrzymane wartości określono mianem względnego współczynnika egzocytozy.

W dalszej kolejności dane zestawiono w histogramy przedstawiające liczbę zliczeń wartości względnego współczynnika egzocytozy. Niezależnie przeprowadzono testy normalności: Andersona-Darlinga, D'Agostino-Pearsona, Shapiro-Wilka oraz Kolmogorova-Smirnova. W związku z tym, że uzyskane rozkłady nie były normalne, w opisie wyników zastosowano analizę nieparametryczną.

W przypadku zmiennych zależnych (grupy zależne), gdy pomiar był przeprowadzany na tej samej komórce i porównywano dwie zmienne: wartości względnego współczynnika egzocytozy w dwóch przedziałach czasowych (bazowy i bez

stymulacji) lub przed i po protokole elektrycznej stymulacji, do obliczeń istotności statystycznej wykorzystano test kolejności par Wilcozona. Natomiast w przypadku zmiennych niezależnych (grupy niezależne), np., gdy porównywano wartości względnego współczynnika egzocytozy w dwóch różnych buforach, przeprowadzono test Manna-Whitneya.

W odniesieniu do parametru opisującego stopień złożoności morfologii komórek, wyrażonego jako stosunek obwodu badanej komórki do zajmowanej przez nią powierzchni, podczas porównania morfologii astrocytów w hodowli astrocytarnej oraz hodowli neuronalno-astrocytarnej zastosowano test t Welcha dla grup niezależnych o różnych wariancjach. Było to możliwe z racji wcześniejszego potwierdzenia normalności rozkładu danych zebranych w formie wspomnianego parametru. Analogicznie statystycznie opracowano dane uzyskane w wyniku RT-qPCR oraz fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ.

W sytuacji porównania więcej niż dwóch grup niezależnych (rycina 13 C) zastosowano analizę wariancji (ANOVA). Wyniki przedstawiono w formie wykresów pudełkowych (*ang. box plot*) z nałożonymi wartościami indywidualnymi poszczególnych pomiarów lub wykresów kolumnowych (średnia arytmetyczna $\pm$ standardowy błąd pomiaru, SEM - *ang. standard error of measurements*).

6. Wyniki

6.1. Porównanie poziomu egzocytozy w hodowlach astrocytarnych oraz neuronalno-astrocytarnych hipokampa

Do tej pory przeprowadzono wiele badań dotyczących wydzielania glioprzekazników w procesie egzocytozy, wykorzystując hodowle astrocytów, w których eliminowano inne niż astrocyty komórki pochodzące z tkanki nerwowej [McCarthy i de Vellis, 1980; Montana i wsp., 2004; Zhang i wsp., 2004; Calì i Bezzi, 2010]. Informacje zawarte w literaturze podkreślają jednak, że neurony, poprzez komunikację z astrocytami, wpływają na ich morfologię, co pozwala zaobserwować gwieździsty kształt tych komórek, które fenotypowo przypominają morfologię astrocytów *in vivo* [Yang i wsp., 2013].

Aby zbadać, od czego zależy i w jaki sposób jest regulowany proces egzocytozy w astrocytach, jako model eksperymentalny wybrano dysocjowaną pierwotną hodowlę hipokampalną, która składa się z komórek nerwowych i glejowych (głównie astrocytów), gdyż jest to jeden z najpopularniejszych modeli hodowli. W celu potwierdzenia zasadności tego podejścia oraz charakterystyki różnic w morfologii astrocytów w hodowli astrocytarnej oraz w hodowli hipokampalnej wykonano szereg zdjęć mikroskopowych pojedynczych komórek, co zaprezentowano na rycinie 9 A. Na ich podstawie zaobserwowano, że astrocyty w hodowli astrocytarnej cechują się poligonalną morfologią (kształtem zbliżonym do wielokąta) oraz ograniczoną liczbą wypustek, które przyjmują formę drobnych rzęsek. W przeciwieństwie do nich, astrocyty w hodowli hipokampalnej wykazują złożoną morfologię, strukturalnie przypominając gąbki, z licznymi rozgałęzionymi wypustkami. Aby opisać obserwowane różnice w morfologii astrocytów w sposób ilościowy, porównano wartości stosunku obwodu badanej komórki do zajmowanej przez nią powierzchni dla astrocytów w hodowlach astrocytarnych oraz hipokampalnych. Wyniki przedstawiono na rycinie 9 B w formie wykresu kolumnowego (średnia arytmetyczna $\pm$ SEM), z nałożonymi wartościami indywidualnymi dla stosunku obwodu do powierzchni poszczególnych komórek. Zademonstrowane na wykresie wyniki pozwoliły stwierdzić, że średnia wartość stosunku obwodu do powierzchni, będącego wskaźnikiem złożoności morfologicznej komórek, wyniosła $\sim 0,219 \mu\text{m}^{-1}$ dla astrocytów w hodowli astrocytarnej oraz $\sim 0,353 \mu\text{m}^{-1}$ dla hodowli hipokampalnej, co

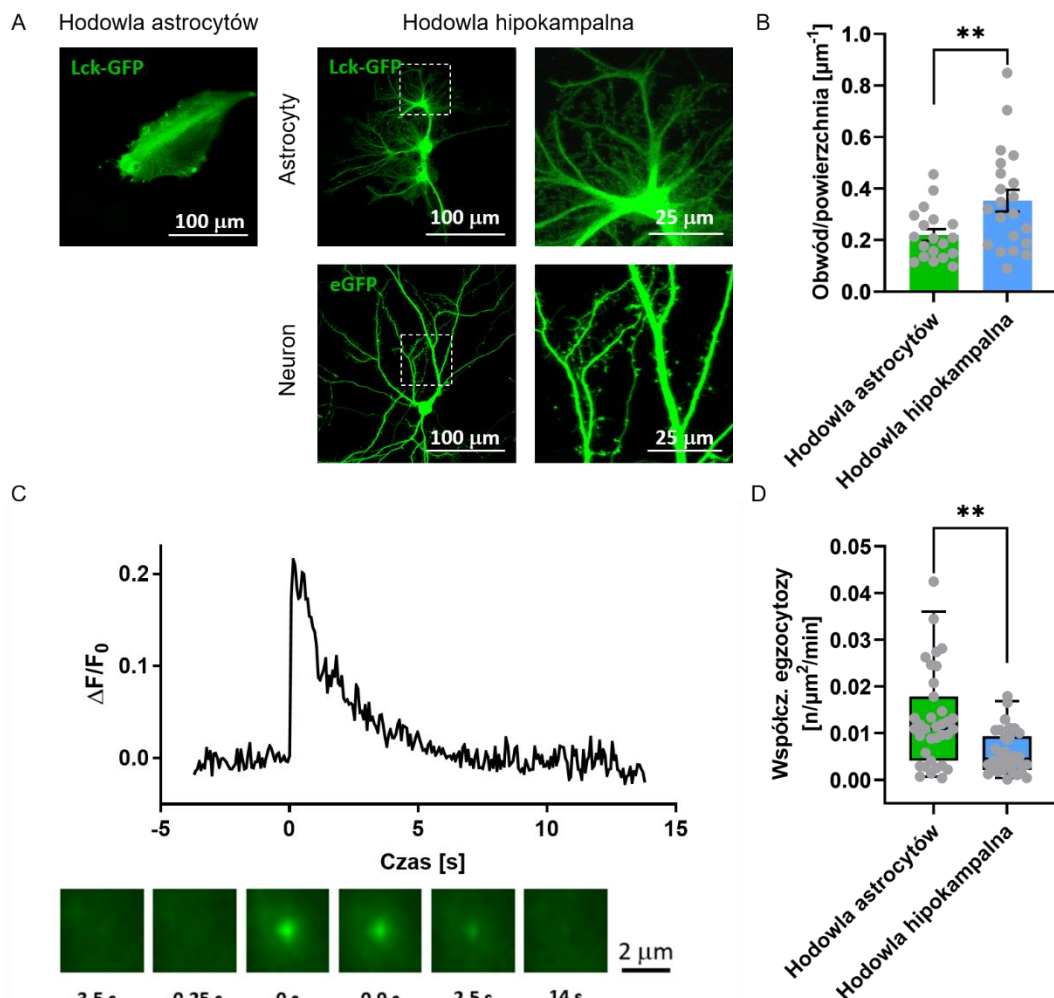
stanowi istotną statystycznie różnicę (test t Welcha dla grup niezależnych o różnych wariancjach, $p=0,0096$).

Następnie sprawdzono, czy różnice w morfologii astrocytów w hodowli hipokampalnej i hodowli astrocytarnej przekładają się na wydajność spontanicznej egzocytozy, zachodzącej w warunkach bez jakiegokolwiek stymulacji. W tym celu zobrazowano astrocyty transfekowane plazmidem pZac2.1gfaABC1D_VAMP2-SEP w obu typach hodowli za pomocą mikroskopii TIRF. Na rycinie 9 C pokazano przykładowy wykres wynikowy analizy różnic w poziomie fluorescencji w zaznaczonym obszarze zainteresowania (ROI, *ang. region of interest*) podczas pojedynczego zdarzenia egzocytozy w astrocycie oraz fragment obrazu mikroskopowego w postaci sekwencji zdjęć ilustrujących proces pojawiania się pęcherzyka sekrecyjnego w płaszczyźnie obrazowania (czas 0 s) i jego późniejszy zanik.

Wyniki porównania częstotliwości egzocytozy pomiędzy hodowlą astrocytów a hodowlą hipokampalną przedstawiono na rycinie 9 D. W tym celu porównano rozkłady wartości współczynnika egzocytozy dla astrocytów w hodowlach astrocytarnych oraz w hodowlach hipokampalnych.

Analiza rozkładu współczynnika egzocytozy astrocytów w hodowlach astrocytarnych w porównaniu do rozkładu wartości dla astrocytów współhodowanych z neuronami wykazała, że w przypadku tych pierwszych rozkład jest dwukrotnie szerszy. Oznacza to, że wartości graniczne dla percentyli 25, 50 i 75 uległy dwukrotnemu obniżeniu w przedziale międzykwartylowym rozkładu współczynnika spontanicznej egzocytozy dla hodowli hipokampalnej, w porównaniu z jego rozkładem dla astrocytów w hodowlach astrocytarnych.

Ponadto średnia arytmetyczna wartości współczynnika spontanicznej egzocytozy astrocytów w hodowlach astrocytarnych wyniosła $0,013 \text{ n}/\mu\text{m}^2/\text{min}$, podczas gdy dla astrocytów w hodowli hipokampalnej wyniosła $0,006 \text{ n}/\mu\text{m}^2/\text{min}$. Różnice w rozkładach wartości współczynnika spontanicznej egzocytozy astrocytów w hodowli astrocytarnej i hodowli hipokampalnej są istotne statystycznie (test Manna-Whitney'a; $U=337$; $p=0,0010$; suma rang 1518 dla hodowli astrocytarnej oraz 967 dla hipokampalnej).



Rycina 9. Różnice w morfologii i częstotliwości egzocytozy pomiędzy hodowlą astrocytów a hodowlą hipokampalną. **A** Przykładowe zdjęcia uzyskane techniką mikroskopii konfokalnej zostały złożone z poszczególnych stosów zdjęć w płaszczyźnie Z. Hodowle astrocytów transfekowano plazmidem pZac2.1gfaABC1D_Lck-GFP, natomiast hodowle hipokampalne transfekowano plazmidami pZac2.1gfaABC1D_Lck-GFP (do obrazowania astrocytów) oraz p β -Actin_eGFP (do obrazowania neuronów). **B** Ilościowe podejście do porównania stopnia złożoności morfologii astrocytów w hodowli astrocytarnej (n=19) i hipokampalnej (n=21) opierało się na średnich arytmetycznych (średnia arytmetyczna $\pm$ SEM) wartości stosunku obwodu do powierzchni pojedynczych astrocytów. Wyniki przedstawiono na wykresie kolumnowym, wraz z indywidualnymi wartościami tego stosunku dla poszczególnych astrocytów (n). Analiza morfologii komórek wykazała, że astrocyty w hodowli hipokampalnej charakteryzują się bardziej złożoną morfologią w porównaniu do astrocytów w hodowli astrocytarnej. **C** Wykres zmian poziomu fluorescencji w czasie podczas egzocytozy pęcherzyka sekrecyjnego dla zdefiniowanego ROI. $\Delta F/F_0 = (F - F_0)/F_0$, gdzie F_0 to wartość średniej poziomu fluorescencji z 10 początkowych, następujących po sobie klatek filmu. Czas 0 s oznacza moment fuzji błony pęcherzyka sekrecyjnego z błoną komórkową. Poniżej znajduje się schemat składający się z kolejnych zdjęć obrazu mikroskopowego ilustrujących uwalnianie pęcherzyka w procesie egzocytozy. Skala 2 μm . **D** Badania różnic w częstotliwości spontanicznej egzocytozy pomiędzy astrocytami z hodowli astrocytarnych a hipokampalnych wykazały, że astrocyty w hodowlach astrocytarnych z większą częstotliwością uwalniają cząsteczki przekaźnikowe w procesie egzocytozy niż astrocyty współhodowane z neuronami (n=35) (test Manna-Whitney'a; U=337; p=0,0010; suma rang 1518 dla hodowli astrocytarnej oraz 967 dla hipokampalnej). Wykres pudełkowy (reprezentuje kwartyle) z linią środkową prezentującą medianę wartości. Wąsy na wykresie prezentują zasięg wartości a szare kropki indywidualne wartości dla astrocytu. ** <0,01; wykresy (B i D). Uzyskane wyniki pochodzą z doświadczeń powtarzanych co najmniej

trzy razy, przy czym każde powtórzenie było przeprowadzane na hodowli komórkowej pozyskanej z niezależnej dysekcji szczurzych osesków oraz izolacji komórek.

6.2. Częstotliwość egzocytozy wzrasta pod wpływem stymulacji elektrycznej

W modelu synapsy trójdzielnej proces egzocytozy w astrocytach jest odpowiedzią na aktywność synaptyczną komórek nerwowych i uwalniane przez nie neuroprzekazniki [Winship i wsp., 2007]. W celu weryfikacji hipotezy, że zwiększone przekazywanie synaptyczne prowadzi do intensyfikacji reakcji astrocytów w postaci uwalniania glioprzekazników [Araque i wsp., 2014], przeprowadzono eksperymenty polegające na obrazowaniu przebiegu egzocytozy w astrocytach. Doświadczenia te realizowano w dwóch warunkach: w buforze ES, oraz w buforze ES, zawierającym TTX w celu zahamowania potencjałów czynnościowych w neuronach. Najpierw nagrywano poziom bazowy (spontaniczna egzocytoza), a następnie po elektrycznej stymulacji hodowli hipokampalnej.

Elektryczna stymulacja zapewnia większą kontrolę nad protokołem w porównaniu do stymulacji chemicznej. Zarówno czas jej rozpoczęcia, jak i czas trwania, liczba impulsów (potencjałów czynnościowych) oraz ich częstotliwość to parametry, które można precyzyjnie ustawić. W przeciwieństwie do tego, stymulacja chemiczna wymaga czasu na dyfuzję cząsteczek substancji w buforze do obrazowania komórek, co negatywnie wpływa na rozdzielczość czasową wykrywania zdarzeń egzocytozy bezpośrednio związanych z przyjętym podejściem eksperymentalnym.

Pierwszym aspektem przeprowadzonej analizy wyników było zbadanie częstotliwości spontanicznej egzocytozy w astrocytach (przy braku czynnika stymulującego). W ten sposób sprawdzono, czy długotrwała obserwacja mikroskopowa ma istotny wpływ na poziom obserwowanego procesu egzocytozy. Porównano rozkłady wartości względnego współczynnika egzocytozy astrocytów w dwóch przedziałach czasowych: bazowym, który trwał 1 min, oraz ponownie bez stymulacji, trwającym przez kolejne 2 min (rycina 10 A).

Analiza nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy rozkładami wartości względnego współczynnika egzocytozy w przedziale bazowym a tym bez stymulacji ($n=8$; test Wilcoxona, $p>0,9999$; suma rang dodatnich: 14; suma rang ujemnych: -14; suma przypisanych rang (W): 0).

Następnie sprawdzono, czy zwiększona aktywność neuronalna wpływa na nasilenie procesu astrocytarnej gliotransmisji. W tym celu dla każdej obserwowanej komórki najpierw wyznaczono poziom bazowy, prowadząc jej obserwację przez 1 min, a następnie stymulowano komórki 20 lub 80 impulsami i obserwowano je przez kolejne 2 min. Stymulacja 20 impulsami jest stymulacją powodującą w neuronach uwolnienie pęcherzyków synaptycznych z puli gotowej do uwolnienia (*ang. readily releasable pool*), która jest zadokowana w synaptycznej strefie aktywnej [Tagliatti i wsp., 2020].

Jak przedstawiono na rycinie 10 B i C, porównano rozkład wartości względnego współczynnika egzocytozy astrocytów przed protokołem elektrycznej stymulacji, odpowiadający spontanicznej egzocytozie (poziom bazowy), z jego rozkładem po elektrycznej stymulacji hodowli (stymulacja).

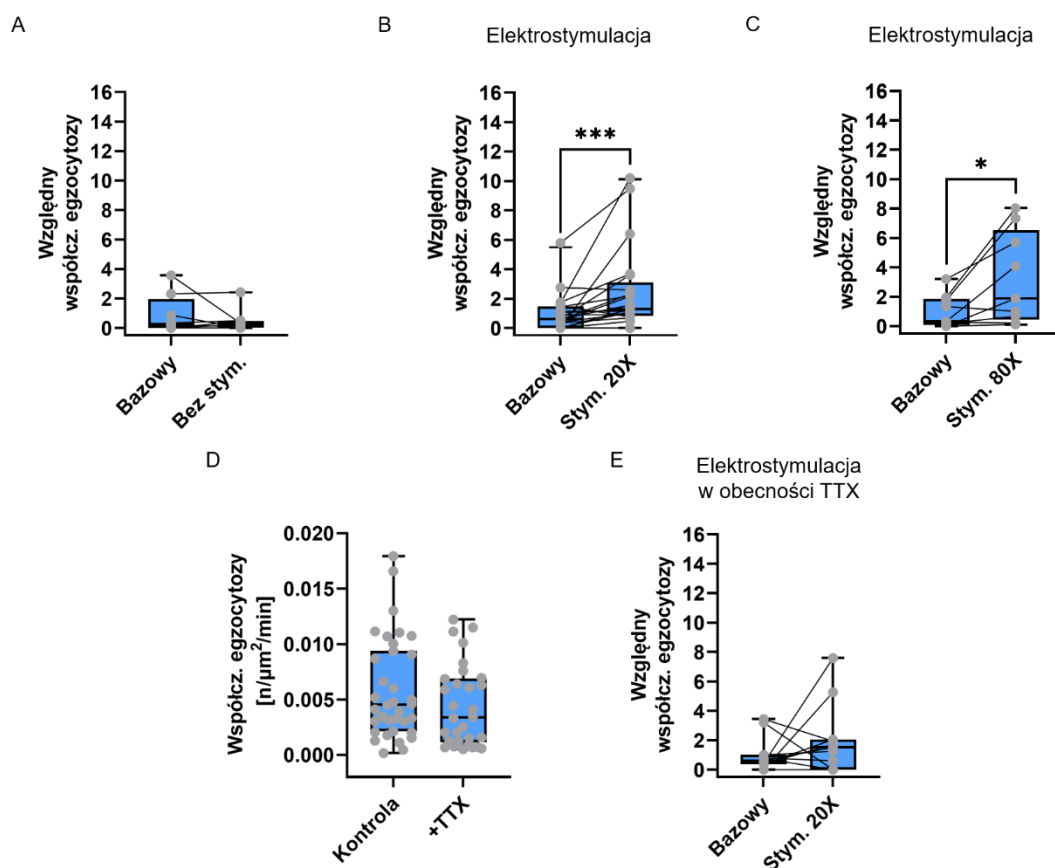
Analiza wyników przedłożonych na rycinie 10 B wskazuje na nieznacznie większy rozrzut wartości względnego współczynnika egzocytozy astrocytów w przedziale międzykwartylowym po stymulacji w porównaniu do poziomu początkowego. Największą różnicę w wartościach względnego współczynnika egzocytozy przed i po stymulacji zanotowano dla trzeciego kwartyla, gdzie odnotowano wzrost o 1,136. Wzrost ten dotyczył 75% wartości względnego współczynnika egzocytozy równych lub poniżej wartości trzeciego kwartyla. Największa zarejestrowana wartość względnego współczynnika egzocytozy dla danego astrocytu w rozkładzie odpowiada 95. percentylowi, co oznacza, że stanowi ona najwyższą wartość, biorąc pod uwagę 95% wyników w rozkładzie. Przed elektrostymulacją (poziom bazowy) wynosiła ona 2,755, a po stymulacji osiągnęła wartość 9,478. Rozkłady względnego współczynnika egzocytozy przed i po zastosowaniu protokołu elektrycznej stymulacji różnią się i jest to różnica istotna statystycznie ($n=21$; test Wilcozona, $p=0,0005$; suma rang dodatnich: 175; suma rang ujemnych: -15; suma przypisanych rang (W): 160).

Podobną analizę przeprowadzono dla stymulacji 80 impulsami, a wyniki przedstawiono na rycinie 10 C. Analiza rozkładów względnego współczynnika egzocytozy astrocytów wykazała znacznie większy rozrzut jego wartości w przedziale międzykwartylowym po stymulacji niż przed. Podobną tendencję do wzrostu wartości tego parametru odnotowano na rycinie 10 B. W przypadku protokołu stymulacji z użyciem 20 pojedynczych impulsów elektrycznych (rycina 10 B) różnica w rozkładach między trzecim a pierwszym kwartylem dla poziomu początkowego a stymulacji

wynosiła 0,245, co stanowiło mniejszą różnicą niż w przypadku protokołu z 80 pojedynczymi impulsami (rycina 10 C), gdzie ta sama różnica wyniosła 3,444. Największą różnicę w wartościach względnego współczynnika egzocytozy przed i po stymulacji odnotowano dla trzeciego kwartyla, gdzie zanotowano wzrost o 3,953. Ponadto największa wartość tego współczynnika (95. percentyl) dla rozkładów przed i po stymulacji wyniosła odpowiednio 3,209 i 8,038. Różnice w rozkładach wartości względnego współczynnika egzocytozy są istotne statystycznie ($n=9$; test Wilcoxona, $p=0,0273$; suma rang dodatnich: 41; suma rang ujemnych: -4; suma przypisanych rang (W): 37).

Następnie zbadano, czy zahamowanie aktywności neuronalnej poprzez inkubację hodowli z TTX znacząco obniża spontaniczny (bazowy) poziom egzocytozy w astrocytach. TTX jest blokerem kanałów sodowych zależnych od napięcia, który hamuje rozprzestrzenianie się potencjałów czynnościowych. Część komórek obserwowano przez 1 min w obecności buforu ES, a część w obecności TTX. Wyniki eksperymentu przedstawiono na rycinie 10 D. Inkubacja hodowli z TTX nie spowodowała znaczącego obniżenia spontanicznego poziomu egzocytozy (test Manna-Whitney'a; $U=421$; $p=0,1744$; suma rang 1259 dla kontroli oraz 886 dla TTX).

Następnie, aby zweryfikować, czy zaobserwowany wzrost wartości względnego współczynnika egzocytozy jest rzeczywiście rezultatem zwiększonej aktywności neuronalnej, czy też bezpośredniej stymulacji astrocytów, powtórzono serię eksperymentów z elektryczną stymulacją hodowli hipokampalnej w obecności TTX. Wyniki zaprezentowano na rycinie 10 E. Porównanie rozkładów wartości względnego współczynnika egzocytozy dla poziomu bazowego, odpowiadającego spontanicznej egzocytozie astrocytów w obecności TTX, oraz po elektrycznej stymulacji hodowli przy jednoczesnym blokowaniu kanałów sodowych bramkowanych napięciem ujawniło brak istotnych statystycznie różnic ($n=11$; test Wilcoxona, $p=0,3750$; suma rang dodatnich: 37, suma rang ujemnych: -18, suma przypisanych rang (W): 19), co pokazuje, że blokowanie potencjałów czynnościowych hamuje wzrost wywołany elektrostymulacją.



Rycina 10. Stymulacja elektryczna zwiększa częstotliwość egzocytozy w astrocytach w hodowli hipokampalnej. **A** Ocena częstotliwości spontanicznej egzocytozy w astrocytach nie wykazała istotnych różnic pomiędzy przedziałem bazowym a bez stymulacji. **B** Analiza wpływu elektrycznej stymulacji na częstotliwość uwalniania glioprzekazników przez astrocyty ujawniła, że proces ten zachodzi z większą częstotliwością po zastosowaniu protokołu elektrycznej stymulacji (stymulacja) w porównaniu do spontanicznej egzocytozy (poziom bazowy). **C** Badania zależności częstotliwości egzocytozy w astrocytach wykazały, że przy 80 impulsach elektrycznych również obserwujemy wzrost częstotliwości egzocytozy po stymulacji (stymulacja) w porównaniu do poziomu bazowego. **D** Analiza wpływu zmniejszonej aktywności neuronalnej na częstotliwość spontanicznego uwalniania glioprzekazników przez astrocyty nie ujawniła istotnych statystycznie różnic pomiędzy kontrolą a obecnością TTX w buforze do obrazowania. **E** Badanie, czy wzmożona częstotliwość astrocytarnej egzocytozy w hodowlach hipokampalnych po protokole stymulacji elektrycznej jest wynikiem zwiększonej aktywności neuronalnej. Analiza wyników pomiarów częstotliwości astrocytarnej egzocytozy w obecności TTX nie ujawniła istotnych statystycznie różnic w częstotliwości przeprowadzanej egzocytozy przez astrocyty przed i po zastosowaniu protokołu elektrycznej stymulacji. Wykres pudełkowy (reprezentuje kwartyle) z linią środkową prezentującą medianę wartości. Wąsy na wykresie prezentują zasięg wartości a szare kropki indywidualne wartości dla astrocyty. * <0,05; *** <0,001; wykresy (B i C). Uzyskane wyniki pochodzą z doświadczeń powtarzanych co najmniej trzy razy, przy czym każde powtórzenie było przeprowadzane na hodowli komórkowej pozyskanej z niezależnej dysekcji szczurzych osesków oraz izolacji komórek.

6.3. Znaczenie udziału jonów Ca^{2+} uwalnianych z siateczki śródplazmatycznej w egzocytozie astrocytów

W klasycznym modelu synapsy trójdzielnej główną ścieżką sygnałową prowadzącą do uwalniania glioprzekazników na drodze egzocytozy jest aktywacja metabotropowych receptorów dla glutaminianu, w szczególności mGluR5 ponieważ są one zasocjowane z białkami G_q . Dlatego w wielu badaniach nad egzocytozą w astrocytach wykorzystywano (S)-3,5-DHPG, który jest silnym agonistą tych receptorów [Muyderman i wsp., 2001].

Wiele doniesień wskazuje, że astrocyty posiadają na swojej błonie większość receptorów dla glutaminianu, które występują też w neuronach, wliczając w to receptory metabotropowe, AMPARs (*ang. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors*) oraz NMDARs (*ang. N-methyl-D-aspartate receptors*) [Hadzic i wsp., 2017; Skowrońska i wsp., 2019]. Pod kątem wywoływania sygnałów Ca^{2+} w astrocytach, to receptory metabotropowe z grupy I (związane z białkiem G_q) były najczęściej badanymi. W związku z tym postanowiono sprawdzić, czy selektywna aktywacja tych receptorów, przede wszystkim mGluR5, poprzez ich agonistę (S)-3,5-DHPG, spowoduje zmiany w częstotliwości egzocytozy. Dlatego najpierw sprawdzono, czy w przypadku stymulacji hodowli astrocytów dochodzi do wzrostu częstotliwości egzocytozy, tak jak opisano to wcześniej [Muyderman i wsp., 2001].

Jak zademonstrowano na rycinie 11 A, rozkład względnego współczynnika egzocytozy astrocytów w hodowli astrocytarnej w przedziale międzykwartylowym po wprowadzeniu buforu zawierającego (S)-3,5-DHPG uległ około 4,3-krotnemu poszerzeniu w porównaniu do pomiarów w buforze podstawowym (bufor ES), co potwierdza poprzednie obserwacje. Największą różnicę w wartościach względnego współczynnika egzocytozy w przedziale międzykwartylowym w buforze podstawowym oraz z dodatkiem (S)-3,5-DHPG odnotowano dla trzeciego kwartyli, gdzie zarejestrowano wzrost o 1,457. Wartości względnego współczynnika egzocytozy astrocytów dla kontroli (bufor podstawowy) wyniosły odpowiednio 0,764 dla 25. percentyla, 0,945 dla mediany oraz 1,025 dla 75. percentyla. Przyrost wartości względnego współczynnika egzocytozy astrocytów po zmianie buforu z podstawowego na (S)-3,5-DHPG odnotowano dla wszystkich trzech kwartyli. Jego wartości wyniosły odpowiednio 1,359 dla 25. percentyla, 1,401 dla mediany oraz 2,482 dla 75. percentyla.

Różnice w rozkładach wartości względnego współczynnika egzocytozy dla kontroli i (S)-3,5-DHPG są istotne statystycznie (n=9; test Wilcoxona, p=0,0039; suma rang dodatnich: 45, suma rang ujemnych: 0; suma przypisanych rang (W): 45).

Następnie sprawdzono, czy taki sam rodzaj chemicznej stymulacji spowoduje wzrost częstotliwości egzocytozy w hodowli hipokampalnej (rycina 11 B). Co ciekawe, analiza rozkładów względnego współczynnika egzocytozy astrocytów w hodowli hipokampalnej przed i po zamianie buforu podstawowego na bufor z dodatkiem (S)-3,5-DHPG wykazała brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami: kontrolną a (S)-3,5-DHPG (n=9; test Wilcoxona, p=0,0742; suma rang dodatnich: 38, suma rang ujemnych: -7, suma przypisanych rang (W): 31).

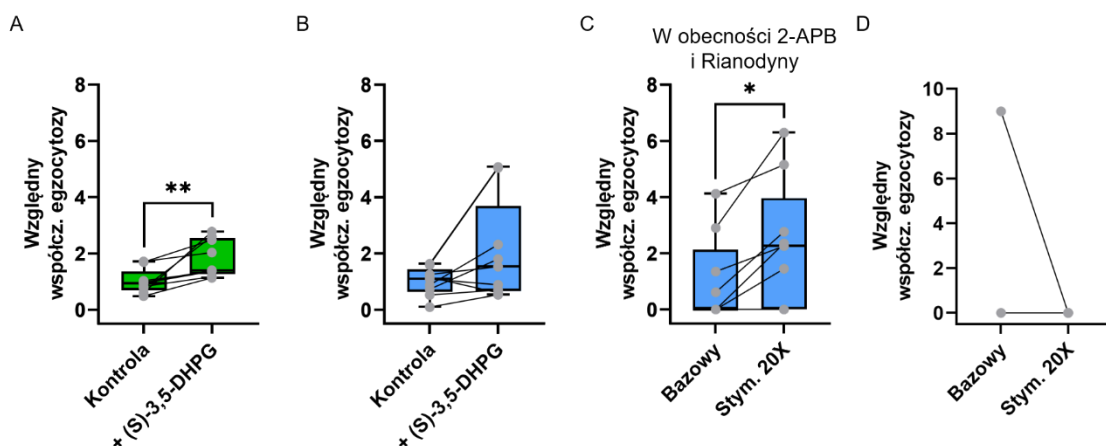
Ponieważ (S)-3,5-DHPG nie powodował istotnie statystycznego wzrostu częstotliwości egzocytozy w hodowli hipokampalnej, sprawdzono, czy uwalnianie jonów Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej jest konieczne, gdy wzrost częstotliwości egzocytozy wywołujemy poprzez elektrostymulację hodowli, tak jak to zakłada klasyczny model synapsy trójdzielnej. Zastosowano więc antagonistę receptorów IP3 - boran 2-aminoetylodifenylowy (2-APB, *ang.* 2-Aminoethoxydiphenyl borate) oraz bloker receptorów rianodynowych - rianodynę (Ry, *ang.* Ryanodine), które również znajdują się na błonie siateczki śródplazmatycznej i mogą prowadzić do uwalniania jonów Ca^{2+} . Wyniki eksperymentów zaprezentowano na rycinie 11 C.

Blokowanie tych kanałów nie niwelowało efektu elektrycznej stymulacji na wzrost częstotliwości egzocytozy. Analiza rozkładów względnego współczynnika egzocytozy astrocytów w hodowli hipokampalnej przed i po zastosowaniu protokołu elektrycznej stymulacji w buforze z dodatkiem 2-APB i Ry wykazała, że rozkład wspomnianego współczynnika po elektrycznej stymulacji uległ około 2-krotnemu poszerzeniu w porównaniu do poziomu początkowego, a zmiana ta jest istotna statystycznie (n=9; test Wilcoxona, p=0,0313; suma rang dodatnich: 21, suma rang ujemnych: 0, suma przypisanych rang (W): 21). Największą różnicę w rozkładach wartości względnego współczynnika egzocytozy astrocytów w przedziale międzykwartylowym przed i po protokole elektrycznej stymulacji odnotowano dla mediany (50. percentyl), gdzie zanotowano wzrost o 2,259. Wzrost wartości względnego współczynnika egzocytozy astrocytów po elektrycznej stymulacji w stosunku do rozkładu dla poziomu bazowego zarejestrowano również dla trzeciego kwartyla oraz 95.

percentyla, który stanowi największą jego indywidualną wartość. Wartości względnego współczynnika egzocytozy astrocytów dla 75. percentyla i 95. percentyla po elektrycznej stymulacji hodowli hipokampalnej wyniosły odpowiednio 2,768 i 6,249.

Ponieważ z powyższych eksperymentów wynika, że jony Ca^{2+} pochodzące z siateczki śródplazmatycznej nie regulują egzocytozy w hodowli hipokampalnej, postanowiono sprawdzić, czy proces ten w ogóle zależy od jonów Ca^{2+} . W tym celu inkubowano komórki z BAPTA-AM (*Invitrogen*[®], nr kat. B6769), który buforuje wewnątrzkomórkowe jony Ca^{2+} niezależnie od źródła ich pochodzenia. Hodowlę hipokampalną inkubowano przez 30 min z przepuszczalnym dla błony komórkowej chelatorem wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} - BAPTA-AM, rozpuszczonym w dimetylosulfotlenku (DMSO, *ang. dimethyl sulfoxide*) i zmieszanym w stosunku objętościowym 1:1 z Pluronic[™] F-127 (*Invitrogen*[®], nr kat. P6866), a następnie badano przebieg egzocytozy przed i po elektrycznej stymulacji. Wyniki przeprowadzonych pomiarów zademonstrowano na rycinie 11 D.

Chelatacja cytoplazmatycznych jonów Ca^{2+} spowodowała prawie całkowity zanik egzocytozy w obserwowanym czasie. Co ciekawe, analiza rozkładów względnego współczynnika egzocytozy astrocytów w hodowli hipokampalnej przed i po protokole elektrycznej stymulacji w warunkach braku jonów Ca^{2+} w cytoplazmie astrocytów, po ich wcześniejszym związaniu przez chelator BAPTA-AM (rycina 11 D), nie wykazała istotnych statystycznie różnic ($n=9$; test Wilcoxona, $p > 0,9999$; suma rang dodatnich: 0; suma rang ujemnych: -1; suma przypisanych rang (W): -1). Wskazuje to jednoznacznie, że możliwość wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie astrocytów jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania procesu egzocytozy.



Rycina 11. Egzocytoza w astrocytach w hodowli hipokampalnej nie jest regulowana przez jony Ca^{2+} uwalniane z siateczki śródplazmatycznej. **A** Analiza częstotliwości przebiegu egzocytozy w hodowli astrocytarnej ($n=9$) po uwolnieniu jonów Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowego magazynu do cytoplazmy, wywołanym przez (S)-3,5-DHPG działającym na metabotropowe receptory dla glutaminianu grupy I, wykazała, że proces ten przebiega z większą częstotliwością po zastosowaniu agonisty metabotropowych receptorów dla glutaminianu grupy I w porównaniu do częstotliwości spontanicznej egzocytozy (kontrola). **B** Identyczny eksperyment przeprowadzono na hodowli hipokampalnej ($n=9$), aby sprawdzić, czy zaobserwowana zależność jest prawdziwa dla astrocytów współhodowanych z neuronami. Zademonstrowane na wykresie wyniki pozwoliły stwierdzić brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy rozkładami względnego współczynnika egzocytozy astrocytów dla egzocytozy w buforze z (S)-3,5-DHPG a spontaniczną egzocytozą w buforze podstawowym (kontrola). **C** Badanie czy uwalnianie jonów Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowego magazynu jest niezbędne do przeprowadzania procesu egzocytozy przez astrocyty w hodowli hipokampalnej. Analiza wyników uzyskanych w rezultacie doświadczenia polegającego na specyficznym blokowaniu uwalniania jonów Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej przy użyciu 2-APB i Ry, przy jednoczesnym zastosowaniu protokołu elektrycznej stymulacji, wykazała, że elektryczna stymulacja powoduje wzrost częstotliwości glioprzebiegu w astrocytach w porównaniu do częstotliwości przebiegu spontanicznej egzocytozy, mimo „wyłączenia” uwalniania jonów Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowego magazynu. **D** Nie zaobserwowano różnic w częstotliwości egzocytozy w astrocytach w hodowli hipokampalnej po elektrycznej stymulacji w porównaniu do kontroli, gdy jony Ca^{2+} zostały usunięte z cytoplazmy astrocytów. Wykres pudełkowy (reprezentuje kwartyle) z linią środkową prezentującą medianę wartości. Wąsy na wykresie prezentują zasięg wartości a szare kropki indywidualne wartości dla astrocytu. * $<0,05$; ** $<0,01$; wykresy (A, C). Uzyskane wyniki pochodzą z doświadczeń powtarzanych co najmniej trzy razy, przy czym każde powtórzenie było przeprowadzane na hodowli komórkowej pozyskanej z niezależnej dysekcji szczurzych osesków oraz izolacji komórek.

6.4. Określenie, czy zewnątrzkomórkowy wapń (Ca^{2+}) ma wpływ na częstotliwość egzocytozy w astrocytach

Aby uzyskać pełną odpowiedź na pytanie dotyczące miejsca pochodzenia i lokalizacji sygnałów wapniowych regulujących proces uwalniania cząsteczek przekąźnikowych przez astrocyty w wyniku egzocytozy, przeprowadzono doświadczenia mające na celu wyjaśnienie roli zewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} w tym procesie. Najpierw zbadano, czy w hodowli astrocytarnej brak jonów Ca^{2+} w buforze wpływa na częstotliwość egzocytozy. W grupie kontrolnej zbadano częstotliwość spontanicznej egzocytozy w astrocytach, stosując bufor podstawowy ES, a w grupie badanej zastosowano bufor do obserwacji pozbawiony jonów Ca^{2+} .

Przedłożone na rycinie 12 A wyniki pomiarów przebiegu egzocytozy w hodowli astrocytarnej, zarówno w obecności, jak i braku jonów Ca^{2+} w środowisku zewnątrzkomórkowym, wskazują na około 2,5-krotne zwężenie rozkładu wartości współczynnika astrocytarnej egzocytozy dla pomiarów w buforze pozbawionym Ca^{2+} (0 mM Ca^{2+}) w porównaniu do rozkładu dla pomiarów przeprowadzonych w buforze podstawowym (kontrola).

W przypadku rozkładu współczynnika egzocytozy astrocytów w buforze ES bez jonów względem buforu ES odnotowano niższe wartości graniczne dla 25. percentyla o 0,002, mediany (50. percentyl) o 0,007 oraz 0,01 dla 75. percentyla.

Ponadto średnia wartość względnego współczynnika egzocytozy astrocytów wyniosła 0,013 w grupie kontrolnej oraz 0,06 w grupie obserwowanej w 0 mM Ca^{2+} . Różnice w rozkładach wartości względnego współczynnika egzocytozy dla kontroli i 0 mM Ca^{2+} są istotne statystycznie (test Manna-Whitney'a; $U=98,5$; $p=0,0098$; suma rang 450,5 dla kontroli oraz 329,5 dla 0 mM Ca^{2+}).

Analogiczne pomiary przeprowadzono dla astrocytów w hodowli hipokampalnej, a ich wyniki przedstawiono na rycinie 12 B. Analiza rozkładów współczynnika egzocytozy astrocytów wykazała, że w przypadku braku jonów Ca^{2+} w środowisku zewnątrzkomórkowym, rozkład był około 2,2-krotnie węższy w porównaniu do rozkładu wspomnianego współczynnika w obecności jonów Ca^{2+} w buforze kontrolnym ES.

Podobnie jak w przypadku astrocytów w hodowli astrocytarnej (rycina 12 A), również dla astrocytów w hodowli hipokampalnej zaobserwowano niższą wartość graniczną współczynnika egzocytozy dla rozkładu charakteryzującego pomiary w buforze pozbawionym jonów Ca^{2+} (0 mM Ca^{2+}). Największe obniżenie wartości względnego współczynnika egzocytozy astrocytów w przedziale międzykwartylowym odnotowano dla trzeciego kwartyła (75. percentyl), który wyniósł 0,005. Natomiast wartości dla pierwszego kwartyła (25. percentyl) i mediany (50. percentyl) były odpowiednio o 0,0005 i 0,002 niższe niż w przypadku rozkładu tego współczynnika w buforze podstawowym.

Średnia wartość względnego współczynnika egzocytozy astrocytów w środowisku zewnątrzkomórkowym pozbawionym jonów Ca^{2+} była również niższa w porównaniu do tego współczynnika w buforze kontrolnym ES, wynosząc 0,00418

w porównaniu do poziomu początkowego wynoszącego 0,00586. Różnice w rozkładach wartości względnego współczynnika egzocytozy dla kontroli i 0 mM Ca^{2+} są istotne statystycznie (test Manna-Whitney'a; $U=353$; $p=0,0372$; suma rang 1292 dla kontroli oraz 788 dla 0 mM Ca^{2+}).

Następnie postanowiono sprawdzić, czy brak jonów Ca^{2+} w środowisku zewnątrzkomórkowym wpłynie na wzrost częstotliwości egzocytozy wywołany elektrostymulacją. Ponieważ można się spodziewać, że zewnątrzkomórkowy brak jonów Ca^{2+} zablokuje również uwalnianie neuroprzekazników przez neurony, eksperyment ten miał również na celu sprawdzenie, czy kanały wapniowe bramkowane napięciem obecne w astrocytach są zaangażowane w proces egzocytozy [Latour i wsp., 2003; Zeng i wsp., 2009].

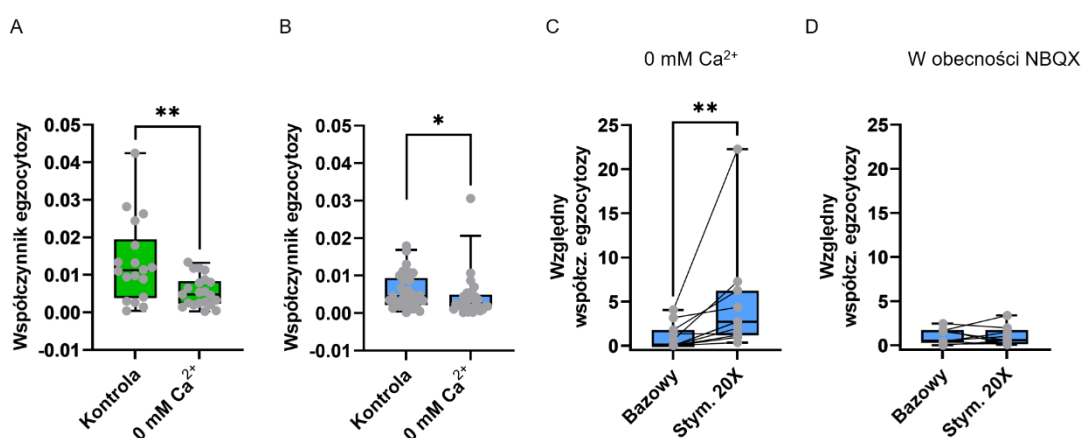
Na rycinie 12 C zaprezentowano wyniki doświadczeń dotyczących elektrycznej stymulacji hodowli hipokampalnej w warunkach braku zewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} . Rozkład względnego współczynnika egzocytozy astrocytów po stymulacji uległ około 2,8-krotnemu poszerzeniu w porównaniu do poziomu bazowego, w którym również nie było jonów Ca^{2+} w środowisku zewnątrzkomórkowym. Tendencja ta znajduje odzwierciedlenie w granicznych wartościach względnego współczynnika egzocytozy astrocytów w przedziale międzykwartylowym, które wzrosły po stymulacji w porównaniu do poziomu początkowego. Największy wzrost wartości wspomnianego współczynnika odnotowano dla trzeciego kwartyla (75. percentyl), który wyniósł 4,466, następnie dla mediany (50. percentyl) - 2,714, oraz dla pierwszego kwartyla (25. percentyl) - 1,200.

Średnia wartość względnego współczynnika egzocytozy astrocytów wzrosła około 4,7-krotnie, z 1 (poziom bazowy) do 4,677. Różnice w rozkładach wartości względnego współczynnika egzocytozy w 0 mM Ca^{2+} w środowisku zewnątrzkomórkowym przed i po protokole elektrycznej stymulacji są istotne statystycznie (test Wilcoxona, $p=0,0020$; suma rang dodatnich: 55; suma rang ujemnych: 0; suma przypisanych rang (W): 55).

Jak wspomniano we wstępie, astrocyty prezentują na swojej błonie wiele receptorów dla glutaminianu, w tym receptory AMPA [Hadzic i wsp., 2017]. W związku z tym postawiono hipotezę, że blokowanie tego receptora wpływa na częstotliwość

egzocytozy wywołaną elektryczną stymulacją hodowli. Wyniki eksperymentu przedstawiono na rycinie 12 D.

Zablokowanie receptorów AMPA na powierzchni astrocytów w hodowli hipokampalnej nie ujawniło istotnych statystycznie różnic w częstotliwości egzocytozy w astrocytach po zastosowaniu protokołu elektrycznej stymulacji w porównaniu do częstotliwości egzocytozy spontanicznej w obecności NBQX w buforze podstawowym (n=9; test Wilcozona, p=0,7344; suma rang dodatnich: 26; suma rang ujemnych: -19; suma przypisanych rang (W): 7).



Rycina 12. Zewnątrzkomórkowe jony Ca²⁺ regulują częstotliwość egzocytozy w astrocytach w hodowli astrocytarnej i hipokampalnej. **A** Analiza częstotliwości przebiegu egzocytozy w astrocytach w hodowli astrocytarnej, przeprowadzona w buforze ES z jonami Mg²⁺ i Ca²⁺, a także po zmianie buforu na ES pozbawiony jonów Ca²⁺, wykazała, że proces ten zachodzi z większą częstotliwością, gdy w środowisku zewnątrzkomórkowym obecne są jony Ca²⁺. **B** Podobną zależność dotyczącą wpływu nieobecności jonów Ca²⁺ w środowisku zewnątrzkomórkowym na częstotliwość przebiegu egzocytozy zaobserwowano również dla astrocytów w hodowli hipokampalnej. **C** Ocena wpływu elektrycznej stymulacji hodowli hipokampalnej w warunkach braku jonów Ca²⁺ w środowisku zewnątrzkomórkowym na częstotliwość przeprowadzania egzocytozy przez astrocyty wykazała, że mimo iż stymulacja nie prowadzi do zwiększonej aktywności neuronalnej, to jednak znacząco zwiększa częstotliwość procesu egzocytozy w astrocytach. **D** Analiza częstotliwości przebiegu egzocytozy w astrocytach w hodowli hipokampalnej (n=9) przed i po protokole elektrycznej stymulacji, po uprzednim zablokowaniu receptorów AMPA na ich powierzchni za pomocą NBQX, nie wykazała różnic w częstotliwości przebiegu egzocytozy w astrocytach przed i po elektrostymulacji hodowli. Wykres pudełkowy (reprezentuje kwartyle) z linią środkową prezentującą medianę wartości. Wąsy na wykresie prezentują zasięg wartości a szare kropki indywidualne wartości dla astrocytu. * <0,05; ** <0,01; wykresy (A, B, C). Uzyskane wyniki pochodzą z doświadczeń powtarzanych co najmniej trzy razy, przy czym każde powtórzenie było przeprowadzane na hodowli komórkowej pozyskanej z niezależnej dysekcji szczurzych osesków oraz izolacji komórek.

6.5. Zróźnicowanie astrocytów hipokampa i kory nowej ze względu na częstotliwość egzocytozy

Mimo historycznej perspektywy dotyczącej jednorodności astrocytów w mózgu, wynikającej z faktu, że są to komórki niepobudliwe elektrycznie [Kettenmann i Ransom, 2005], coraz więcej naukowców postuluje istnienie funkcjonalnej i molekularnej różnorodności tych komórek glejowych. Różnorodność ta wydaje się być szczególnie uzależniona od regionu mózgu, w którym występują [Chaboub i Deneen, 2012]. Niedawny artykuł Batiuk i wsp. [2020] analizował różnice w poziomie ekspresji genów pomiędzy korą nową a hipokampem. Jak napisano we wstępie, jednym z genów, który ulega różnicowej ekspresji pomiędzy klasami astrocytów AST2 i AST3 (*ang. astrocyte subtypes 2 and 3*) w różnym stopniu występującymi w korze i hipokampie, jest *Unc13c* [Batiuk i wsp., 2020]. Koduje on białko Munc13c, które jest niezwykle istotne w kotwiczeniu pęcherzyków wydzielniczych poprzez białko VAMP2 do błony komórkowej. W związku z tym postawiono hipotezę, że astrocyty pochodzące z kory mogą różnić się częstotliwością egzocytozy od tych pochodzących z hipokampa. Astrocyty w korze należące do podtypu AST2 powinny mieć wyższy poziom białka Munc13c, a przez to również wykazywać większą ilość zakotwiczonych przy błonie pęcherzyków i mieć wyższą częstotliwość egzocytozy. Dlatego postanowiono zbadać poziom egzocytozy w hodowlach neuronalno-astrocytarnych pochodzących z kory i hipokampa szczurzych osesków. Tak jak w poprzednich eksperymentach, wydajność procesu egzocytozy w astrocytach hipokampa i kory nowej oceniano w dwóch przedziałach czasowych: bazowym oraz po stymulacji.

Aby rozpatrzyć wpływ zwiększonego przekąźnictwa synaptycznego na proces egzocytozy astrocytów w kontekście ich różnego pochodzenia (hipokamp i kora nowa), na rycinie 13 A i B przedstawiono wyniki pomiarów częstotliwości przebiegu procesu egzocytozy dla astrocytów hipokampa (rycina 13 A) oraz kory nowej (rycina 13 B) przed (poziom bazowy) i po elektrycznej stymulacji hodowli.

Podobnie jak i poprzednio (rycina 10 B), analiza rozkładów względnego współczynnika egzocytozy astrocytów hipokampa, zaprezentowana na rycinie 13 A, pozwoliła stwierdzić wzrost granicznych wartości percentyli 25, 50 i 75 po protokole elektrycznej stymulacji w porównaniu do poziomu bazowego. Największy wzrost odnotowano dla wartości odpowiadającej 75. percentylowi, który wzrósł o 2,853. Widać

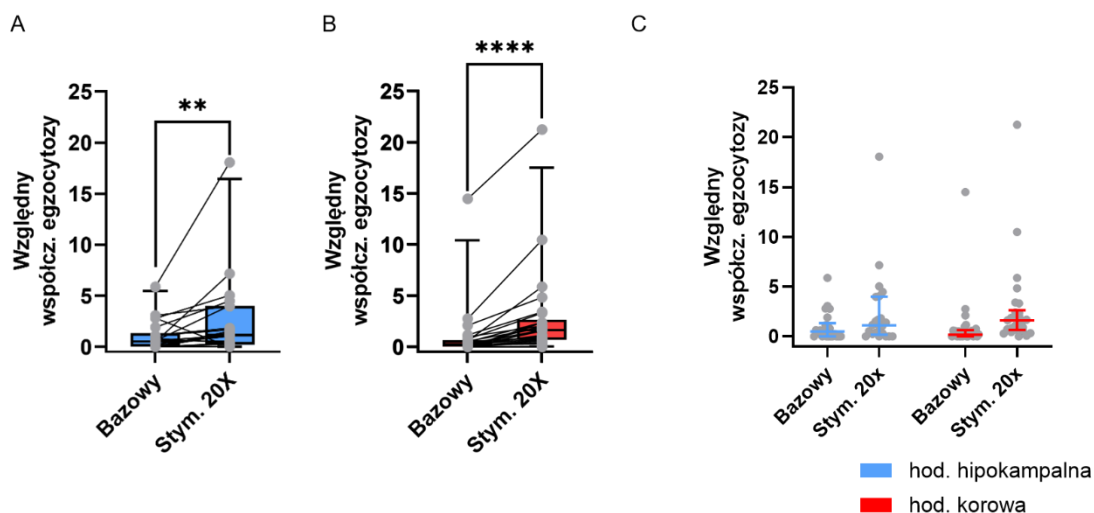
to po szerokości rozkładu względnego współczynnika egzocytozy, w którym różnica pomiędzy 75. percentylem a 25. percentylem (przedział międzykwartylowy) wyniosła 3,724. W porównaniu z wartością dla przedziału międzykwartylowego odpowiadającego poziomowi bazowemu, wynoszącą 1,119, zaobserwowano 3,3-krotne poszerzenie rozkładu po stymulacji elektrycznej w stosunku do poziomu bazowego.

Zarejestrowane różnice w rozkładach względnego współczynnika egzocytozy astrocytów hipokampa przed i po zastosowaniu elektrycznej stymulacji są istotne statystycznie ($n=22$; test Wilcozona, $p=0,0028$; suma rang dodatnich: 151; suma rang ujemnych: -20; suma przypisanych rang (W): 131).

Zademonstrowane na rycinie 13 B wyniki równoległego doświadczenia przeprowadzonego na astrocytach z hodowli korowej wykazały analogiczną tendencję do wzrostu wartości względnego współczynnika egzocytozy w odpowiedzi na protokół elektrycznej stymulacji, porównując z poziomem bazowym, jak miało to miejsce w przypadku astrocytów hipokampa.

Wzrost granicznych wartości odnotowano dla całego przedziału międzykwartylowego, a w szczególności dla trzeciego kwartyla (75. percentyl), który wzrósł o 1,819 w odniesieniu do odpowiadającej mu wartości w rozkładzie poziomu bazowego. Zaobserwowany wzrost wartości badanego parametru po elektrycznej stymulacji, wskazujący na poszerzenie rozkładu, opisuje wartość przedziału międzykwartylowego, która wyniosła 2,407. Różnica między rozkładami względnego współczynnika egzocytozy astrocytów kory nowej przed i po protokole elektrycznej stymulacji jest istotna statystycznie ($n=26$; test Wilcozona, $p < 0,0001$; suma rang dodatnich: 325; suma rang ujemnych: 0; suma przypisanych rang (W): 325).

Następnie porównano wartości względnego współczynnika egzocytozy pomiędzy hodowlą hipokampalną oraz korową (rycina 13 C) stosując dwuczynnikową analizę wariancji dla pomiarów powtórzonych. Analiza statystyczna wykazała, że efekt stymulacji był istotny statystycznie - $F(1, 46) = 19,99$; $P < 0,0001$, natomiast efekt rodzaju hodowli nie - $F(1, 46) = 0,02959$; $P = 0,8642$. Nie wykryto również interakcji pomiędzy czynnikami rodzaj hodowli x stymulacja - $F(1, 46) = 0,1919$; $P = 0,6634$.



Rycina 13. Częstotliwość egzocytozy nie różni się istotnie pomiędzy astrocytami z hodowli hipokampalnej a astrocytami z hodowli korowej. **A** Badanie, czy zwiększona aktywność neuronalna prowadzi do nasilenia procesu egzocytozy w astrocytach z hodowli hipokampalnych. Analiza wyników częstotliwości przebiegu egzocytozy w astrocytach przed (poziom bazowy) i po elektrycznej stymulacji hodowli ujawniło istotny statystycznie wzrost częstotliwości zachodzenia egzocytozy w astrocytach hipokampa po elektrycznej stymulacji (stymulacja) w porównaniu do przebiegu spontanicznej egzocytozy (poziom bazowy). **B** Ocena wpływu zwiększonego przekąźnictwa synaptycznego na częstotliwość egzocytozy w astrocytach z hodowli korowej, przeprowadzona z wykorzystaniem protokołu elektrycznej stymulacji, wykazała istotnie większą odpowiedź astrocytów kory nowej w postaci uwalnianych na drodze egzocytozy cząsteczek przekąźnikowych po zastosowanej elektrostymulacji w porównaniu do spontanicznej egzocytozy (poziom bazowy). **C** Porównanie indywidualnych wartości względnego współczynnika egzocytozy w astrocytach przed (poziom bazowy, częstotliwość przebiegu spontanicznej egzocytozy) i po elektrycznej stymulacji dwóch typów hodowli: hipokampalnej i korowej, nie ujawniło istotnej statystycznie różnicy w częstotliwości zachodzenia spontanicznej egzocytozy (poziom bazowy) w hodowlach hipokampalnych i korowych, ani po stymulacji astrocytów hipokampa oraz kory nowej (ANOVA, dwuczynnikowa analiza wariancji). Wykres pudełkowy (reprezentuje kwartyle) z linią środkową prezentującą medianę wartości. Wąsy na wykresie prezentują zasięg wartości a szare kropki indywidualne wartości dla astrocytu. ** <0,01; *** <0,001; **** <0,0001; wykresy (A, B, C). Uzyskane wyniki pochodzą z doświadczeń powtarzanych co najmniej trzy razy, przy czym każde powtórzenie było przeprowadzane na hodowli komórkowej pozyskanej z niezależnej dysekcji szczurzych ośesków oraz izolacji komórek.

6.6. Wpływ blokowania aktywności neuronalnej na częstotliwość egzocytozy w astrocytach korowych

Kontynuując charakterystykę astrocytów hipokampa i kory nowej w aspekcie zaobserwowanego wzrostu częstotliwości egzocytozy w odpowiedzi na elektryczną stymulację, postanowiono sprawdzić, czy elektrostymulacja działa za pośrednictwem komórek nerwowych, a ściślej rzecz ujmując, poprzez zwiększenie przekąźnictwa synaptycznego. W związku z tym przeprowadzono eksperyment polegający na ocenie częstotliwości egzocytozy astrocytów pochodzących z hodowli hipokampalnej oraz korowej przed (poziom bazowy) i po elektrycznej stymulacji, w obecności TTX, który hamuje potencjały czynnościowe w neuronach. W ten sposób można ustalić, czy astrocyty zróżnicowane pod względem miejsca występowania mają odmienny

mechanizm odpowiedzi na protokół elektrycznej stymulacji, biorąc pod uwagę częstotliwość procesu egzocytozy.

Podobnie jak we wcześniejszym eksperymencie (rycina 10 E), zbadano częstotliwość spontanicznej egzocytozy (poziom bazowy) w warunkach zahamowanej aktywności neuronalnej w astrocytach hipokampa, a następnie po elektrycznej stymulacji hodowli w tych samych warunkach (rycina 14 A). Analogiczny eksperyment przeprowadzono dla astrocytów kory nowej w hodowli korowej. Wyniki tych pomiarów przedstawiono na rycinie 14 B.

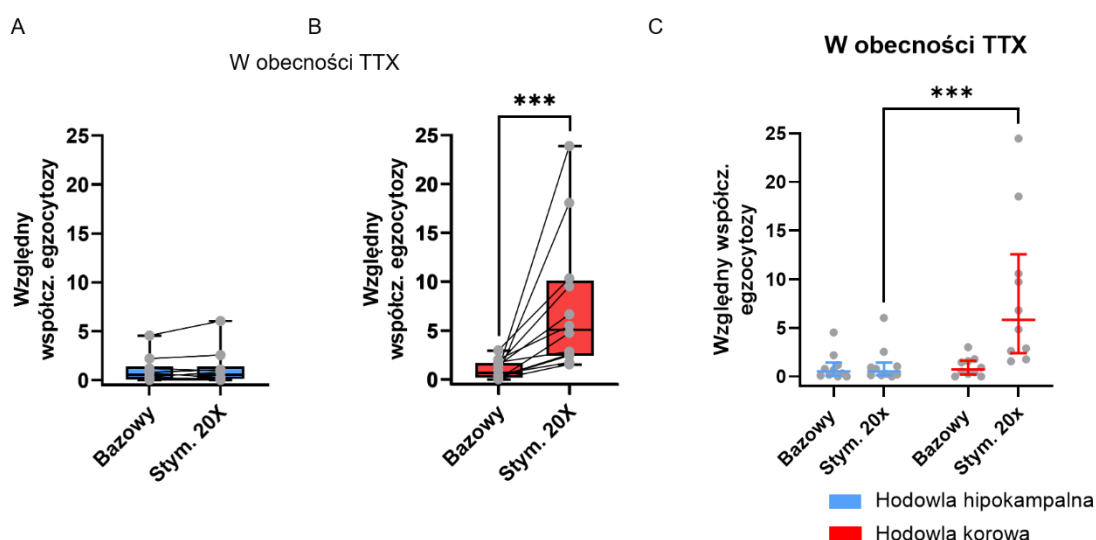
Zademonstrowane na rycinie 14 A wyniki pozwoliły stwierdzić, że stymulacja elektryczna w obecności TTX nie wywołuje istotnego statystycznie wzrostu częstotliwości egzocytozy ($n=10$; test Wilcoxona, $p=0,3008$; suma rang dodatnich: 32; suma rang ujemnych: -13; suma przypisanych rang (W): 19). Potwierdza to hipotezę, że zastosowanie protokołu elektrycznej stymulacji wpływa na aktywność neuronalną i w ten sposób reguluje częstotliwość egzocytozy w astrocytach hipokampa.

Na rycinie 14 B zaprezentowano wyniki elektrycznej stymulacji hodowli korowych po zablokowaniu kanałów sodowych bramkowanych potencjałem. Porównano rozkład wartości względnego współczynnika egzocytozy astrocytów kory nowej przed elektryczną stymulacją (poziom bazowy) z jego rozkładem po elektrycznej stymulacji 20 impulsami. Co zaskakujące, analiza uzyskanych wyników pozwoliła stwierdzić, że stymulacja elektryczna powoduje istotnie statystyczny wzrost częstotliwości egzocytozy ($n=12$; test Wilcoxona, $p=0,0005$; suma rang dodatnich: 78; suma rang ujemnych: 0; suma przypisanych rang (W): 78). W przeciwieństwie do astrocytów hipokampa, protokół elektrycznej stymulacji w przypadku astrocytów korowych nie działa poprzez wpływ na przekaznictwo synaptyczne.

Jak zademonstrowano na rycinie 14 B, rozkład względnego współczynnika egzocytozy astrocytów kory nowej po zastosowaniu protokołu elektrycznej stymulacji w obecności TTX uległ około 5,3-krotnemu poszerzeniu w porównaniu do poziomu bazowego. Wzrost ten odnotowano na poziomie granicznych wartości wszystkich percentyli (25. percentyla, mediany i 75. percentyla) w przedziale międzykwartylowym, odpowiednio o 2,254 dla 25. percentyla, 4,393 dla mediany (50. percentyl) oraz 8,277 dla 75. percentyla. Średnia arytmetyczna z wartości względnego współczynnika egzocytozy astrocytów kory nowej wyniosła 1 dla poziomu bazowego i wzrosła do 7,473 po

protokole elektrycznej stymulacji w obecności blokera potencjałozależnych kanałów sodowych.

Aby sprawdzić, czy różnice w zmianie częstotliwości egzocytozy wywołanej stymulacją elektryczną w obecności TTX pomiędzy astrocytami z hodowli korowej, a astrocytami z hodowli hipokampalnej są istotne statystycznie, przeprowadzono dwuczynnikową analizę wariancji dla pomiarów powtórzonych (rycina 14 C). Analiza ta wykazała, że stymulacja elektryczna wpływa istotnie na częstotliwość egzocytozy - $F(1, 18) = 9,877$; $P=0,0056$, podobnie jak rodzaj hodowli - $F(1, 18) = 6,977$; $P=0,0166$. Ponadto oba te czynniki ulegają interakcji (stymulacja x rodzaj hodowli) - $F(1, 18) = 8,810$; $P=0,0082$. Analiza post-hoc przy użyciu testu Šídáka wykazała, że po stymulacji elektrycznej hodowla korowa różni się istotnie statystycznie od hodowli hipokampalnej ($P = 0,0007$).



Rycina 14. Wzrost częstotliwości egzocytozy astrocytów kory nowej po elektrycznej stymulacji hodowli neuronalno-astrocytarnej nie jest zależny od aktywności neuronalnej. **A** Badanie częstotliwości egzocytozy w astrocytach z hodowli hipokampalnej, przeprowadzone po uprzednim zahamowaniu aktywności neuronalnej za pomocą TTX, nie wykazało istotnych statystycznie różnic w częstotliwości egzocytozy po elektrycznej stymulacji w porównaniu do poziomu bazowego. **B** Analiza częstotliwości przebiegu egzocytozy w astrocytach z korowych hodowli neuronalno-astrocytarnych przed (poziom bazowy) i po elektrycznej stymulacji w obecności TTX wykazała istotny statystycznie wzrost uwalniania cząsteczek przekaźnikowych przez astrocyty po elektrycznej stymulacji w stosunku do poziomu bazowego. **C** Hodowla hipokampalna różni się częstotliwością uwalniania glioprzekaźników od hodowli korowej w obecności TTX w kontekście elektrycznej stymulacji hodowli. *** $<0,001$; wykres B, C. Uzyskane wyniki pochodzą z doświadczeń powtarzanych co najmniej trzy razy, przy czym każde powtórzenie było przeprowadzane na hodowli komórkowej pozyskanej z niezależnej dysekcji szczurzych osesków oraz izolacji komórek.

6.7. Ocena częstotliwości egzocytozy astrocytów korowych w kontekście zewnątrzkomórkowego źródła sygnałów Ca^{2+}

W ostatnich latach, dzięki postępowi w metodach obrazowania, stało się jasne, że większość oscylacji w stężeniu jonów Ca^{2+} występuje w drobnych wypustkach astrocytów [Fujii i wsp., 2017]. Mając na uwadze funkcjonalne zróżnicowanie astrocytów związane z obszarem ich występowania w mózgu, postanowiono sprawdzić, czy, podobnie jak w przypadku astrocytów z hipokampalnej hodowli neuronalno-astrocytarnej, częstotliwość egzocytozy astrocytów korowych z hodowli neuronalno-astrocytarnych zwiększy się po protokole elektrycznej stymulacji w porównaniu do poziomu bazowego, mimo braku jonów Ca^{2+} w środowisku zewnątrzkomórkowym.

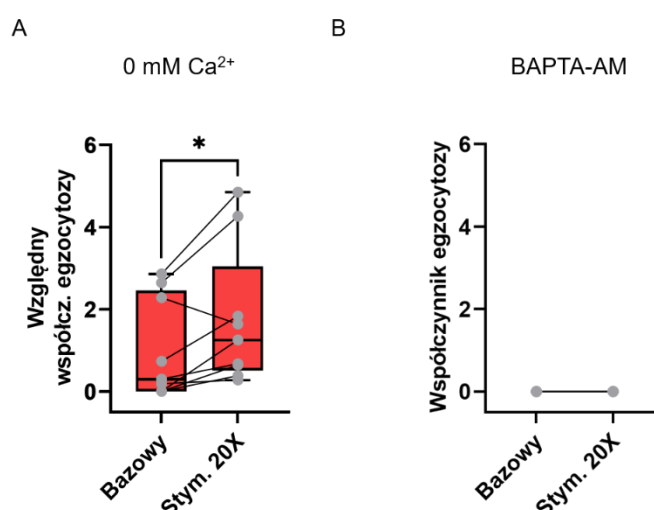
Na początku przeprowadzono eksperyment, którego celem było zbadanie częstotliwości egzocytozy astrocytów korowych przed (poziom bazowy) i po zastosowaniu protokołu elektrycznej stymulacji hodowli w warunkach braku jonów Ca^{2+} w środowisku zewnątrzkomórkowym (0 mM Ca^{2+}) (rycina 15 A). Następnym krokiem była analiza częstotliwości przebiegu egzocytozy astrocytów z korowych hodowli neuronalno-astrocytarnych przed i po elektrostymulacji, po wcześniejszym usunięciu jonów Ca^{2+} z ich cytoplazmy przy użyciu BAPTA-AM (analogicznie do podrozdziału 6.3). Wyniki przedstawiono na rycinie 15 B.

Zaprezentowane na rycinie 15 A wyniki pomiarów wpływu braku jonów Ca^{2+} w środowisku zewnątrzkomórkowym na częstotliwość procesu egzocytozy astrocytów korowych przed (poziom bazowy) i po elektrycznej stymulacji hodowli neuronalno-astrocytarnych wykazały istotną statystycznie różnicę w częstotliwości przeprowadzanej egzocytozy ($n=9$; test Wilcozona, $p=0,0273$; suma rang dodatnich: 41; suma rang ujemnych: -4; suma przypisanych rang (W): 37).

Analiza rozkładów względnego współczynnika egzocytozy astrocytów kory nowej, opisujących częstotliwość uwalniania cząsteczek przekaźnikowych w procesie egzocytozy przed i po protokole elektrycznej stymulacji w warunkach braku jonów Ca^{2+} w środowisku zewnątrzkomórkowym, ujawniła około 1,9-krotne zwężenie rozkładu po elektrostymulacji w porównaniu do rozkładu poziomu bazowego. Znaczące obniżenie wartości granicznej zaobserwowano dla trzeciego kwartyla (75. percentyl) o 0,477, natomiast w przypadku 25. percentyla i mediany odnotowano wzrost odpowiednio

o 0,642 dla 25. percentyla i 0,951 dla mediany po zastosowaniu elektrycznej stymulacji w porównaniu z poziomem bazowym.

Ostatnim aspektem przeprowadzonej charakterystyki przebiegu egzocytozy w astrocytach z korowej hodowli neuronalno-astrocytarnej było zbadanie częstotliwości tego procesu po usunięciu jonów Ca^{2+} z cytoplazmy astrocytów w warunkach bez stymulacji (poziom bazowy) a po protokole elektrycznej stymulacji. Chelatowanie jonów Ca^{2+} w cytoplazmie spowodowało całkowite zablokowanie egzocytozy zarówno na poziomie bazowym jak i po elektrostymulacji. W rejestrowanym czasie nie zaobserwowano żadnego zdarzenia egzocytozy.



Rycina 15. Astrocyty w korowej hodowli neuronalno-astrocytarnej wykazują większą częstotliwość egzocytozy po elektrostymulacji w stosunku do poziomu bazowego w warunkach braku jonów Ca^{2+} w środowisku zewnątrzkomórkowym. A Ocena wpływu braku jonów Ca^{2+} w środowisku zewnątrzkomórkowym na częstotliwość uwalniania glioprzebiegów przez astrocyty przed (poziom bazowy) i po elektrycznej stymulacji hodowli korowej. Analiza wykazała istotną statystycznie różnicę pomiędzy częstotliwością egzocytozy astrocytów korowych na poziomie bazowym i po elektrycznej stymulacji hodowli w warunkach braku jonów Ca^{2+} w środowisku zewnątrzkomórkowym. **B** Usunięcie jonów Ca^{2+} z cytoplazmy astrocytów przed (poziom bazowy) i po elektrycznej stymulacji hodowli neuronalno-glejowej poskutkowało całkowitym zablokowaniem ich egzocytozy. Wykres pudełkowy (reprezentuje kwartyle) z linią środkową prezentującą medianę wartości. Wąsy na wykresie prezentują zasięg wartości a szare kropki indywidualne wartości dla astrocytu. * < 0,05; wykres A. Uzyskane wyniki pochodzą z doświadczeń powtarzanych co najmniej trzy razy, przy czym każde powtórzenie było przeprowadzane na hodowli komórkowej pozyskanej z niezależnej dysekcji szczurzych osesków oraz izolacji komórek.

6.8. Ewaluacja transkryptomu astrocytów hipokampa i kory nowej pod względem poziomu mRNA dla genu *Unc13c*

Wykazano, że w obecności TTX częstotliwość egzocytozy w astrocytach z kory różni się od częstotliwości egzocytozy w astrocytach z hipokampa, jednak przyczyny tych różnic nie są znane. Analiza transkryptomu w kontekście markerów specyficznych dla astrocytów [Khakh i Deneen, 2019] oraz sekwencjonowanie RNA pojedynczych komórek [Batiuk i wsp., 2020] dostarczają dowodów na różnice w ekspresji genów astrocytów w zależności od obszaru mózgu. Batiuk i wsp. [2020] w swoim artykule wyodrębnili i opisali pięć podtypów astrocytów w korze mózgowej i hipokampie myszy, uwzględniając różnice w ich transkrypcyjnym profilu. Na podstawie informacji zawartych w tym artykule dokonano wyboru genu *Unc13c*, który odgrywa istotną rolę w dojrzewaniu pęcherzyków w trakcie egzocytozy oraz procesie fuzji błonowej.

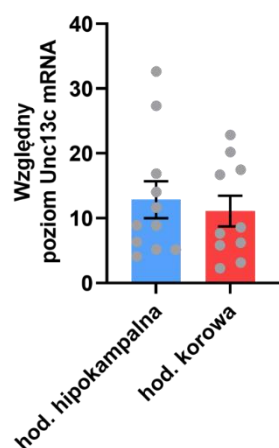
Najpierw przeprowadzono serię eksperymentów mających na celu porównanie poziomu mRNA *Unc13c* zarówno w hodowlach astrocytarnych, jak i w hodowli hipokampalnej i korowej, przy wykorzystaniu metody RT-qPCR (rycina 16 A). Następnie wykonano procedurę fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ z sondą RNA *Unc13c*, wyznakowaną Cy3. Zdjęcia astrocytów hipokampa i kory nowej, wybarwionych przy użyciu oligonukleotydów typu antisens RNA oraz Cy3, przedstawiono na rycinie 16 B. Porównanie średnich intensywności fluorescencji antisensownego RNA *Unc13c* odpowiednio dla astrocytów hipokampa i kory nowej z hodowli neuronalno-astrocytarnych zademonstrowano na rycinie 15 C.

Analiza względnego poziomu mRNA *Unc13c* w hodowlach hipokampalnej i korowej (rycina 16 A) nie wykazała istotnych statystycznie różnic we względnym poziomie mRNA *Unc13c*.

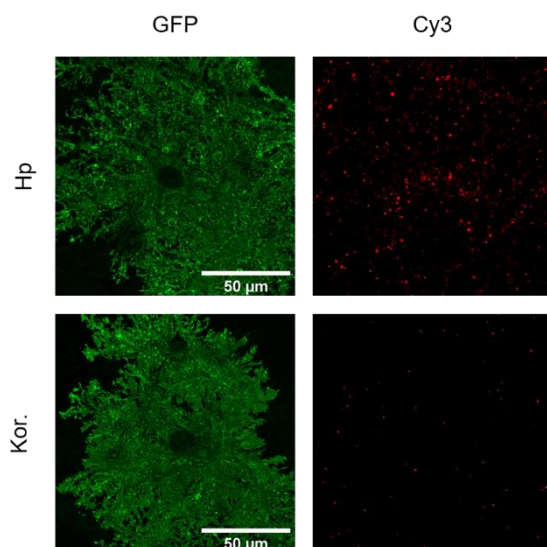
Ponieważ białko Munc13c, kodowane przez gen *Unc13c*, może również występować w neuronach, postanowiono zbadać poziom mRNA *Unc13c* za pomocą metody fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ. W celu łatwiejszej identyfikacji astrocytów, komórki te transfekowano za pomocą plazmidu pZac_gfa_Lck-GFP. Pomogło to liczyć sygnał pochodzący od wyznakowanej sondy tylko w obrębie pojedynczej komórki. Na rycinie 16 B przedstawiono zdjęcia astrocytów z mieszanych hodowli hipokampa i kory nowej, na których zaobserwowano różnice w sygnale dla sondy RNA *Unc13c*, wyznakowanej cyjaniną 3 (Cy3). Aby opisać zaobserwowane

różnice w sposób ilościowy, porównano średnią intensywność fluorescencji dla antysensownego RNA *Unc13c* w GFP-pozytywnych astrocytach z hodowli hipokampa i kory nowej (rycina 16 C), co ujawniło istotny statystycznie spadek średniej intensywności fluorescencji w przypadku astrocytów z neuronalno-astrocytarnej hodowli kory nowej w stosunku do astrocytów hipokampa w neuronalno-astrocytarnej hodowli.

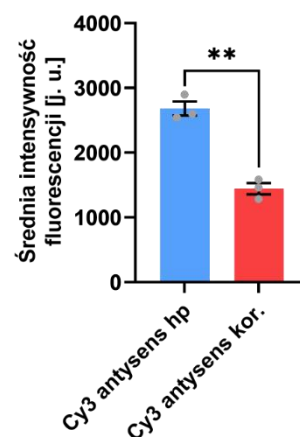
A



B



C



Rycina 16. Dysocjowane pierwotne hodowle hipokampalne charakteryzują się wyższym poziomem ekspresji genu *Unc13c* niż w przypadku neuronalno-astrocytarnych hodowli pozyskanych z kory nowej. **A** Porównanie względnego poziomu mRNA *Unc13c* pomiędzy hodowlami hipokampalną i korową nie wykazało istotnej statystycznie różnicy. **B** Zdjęcia uzyskane techniką mikroskopii konfokalnej zostały złożone z poszczególnych stosów zdjęć w płaszczyźnie Z. Hodowle neuronalno-astrocytarne hipokampa i kory nowej poddano procedurze fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ. **C** Analiza średniej intensywności fluorescencji sondy antysensownego RNA *Unc13c* dla astrocytów hipokampa i kory nowej z hodowli neuronalno-astrocytarnych ujawniła istotną statystycznie różnicę. **<0,01; wykresy (A i C).

7. Dyskusja

Przedłożone w niniejszej pracy wyniki pokazują skomplikowany obraz regulowanej egzocytozy w astrocytach, na którą wpływa wiele czynników. W szczególności zaobserwowano, że:

1. Astrocyty w hodowli neuronalno-glejowej mają znacząco niższą częstotliwość spontanicznej egzocytozy niż astrocyty w hodowlach astrocytarnych.
2. Astrocyty w hodowli hipokampalnej reagują wzrostem wydajności egzocytozy na zwiększoną aktywność komórek nerwowych wywołaną elektryczną stymulacją, a blokowanie aktywności neuronalnej znosi ten efekt.
3. Częstotliwość egzocytozy w hodowli hipokampalnej nie zależy od jonów Ca^{2+} uwalnianych z siateczki śródplazmatycznej.
4. Całkowite zbuforowanie wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} powoduje zanik egzocytozy w astrocytach w hodowlach hipokampalnej i korowej.
5. Częstotliwość egzocytozy w hodowli hipokampalnej zależy od zewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} oraz od aktywacji receptorów AMPA.
6. Częstotliwość egzocytozy w astrocytach w hodowli korowej wzrasta w wyniku stymulacji elektrycznej, również w warunkach blokowania potencjałów czynnościowych przez TTX.
7. Poziom mRNA dla *Unc13c* jest zbliżony w hodowlach hipokampalnych i korowych, chociaż astrocyty w hodowli hipokampalnej mają wyższy poziom mRNA *Unc13c* niż astrocyty w hodowli korowej.

Zademonstrowane wyniki badań potwierdziły m. in. udział metabotropowych receptorów dla glutaminianu w regulacji odpowiedzi astrocytów z hodowli astrocytarnych, przejawiającej się uwalnianiem cząsteczek przekaźnikowych na drodze egzocytozy. Ponadto w niniejszej rozprawie zwrócono uwagę na brak konieczności udziału jonów Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej w regulacji egzocytozy astrocytów hipokampa w hodowlach neuronalno-astrocytarnych. Dowiedziono, że regulacja procesu egzocytozy astrocytów, zarówno w hodowlach astrocytarnych, jak i neuronalno-astrocytarnych, odbywa się przede wszystkim za pośrednictwem jonów Ca^{2+} z środowiska zewnątrzkomórkowego. Przedstawiono również reakcję astrocytów pochodzących z hodowli neuronalno-astrocytarnych, które posiadają kanały bramkowane napięciem, na elektryczną stymulację w warunkach 0 mM zewnątrzkomórkowego

stężenia jonów Ca^{2+} . Co więcej, wykazano, że proces egzocytozy w astrocytach w hodowlach neuronalno-astrocytarnych nie zachodzi po usunięciu jonów Ca^{2+} z ich cytoplazmy.

Wyniki przedstawione w tej pracy odnoszą się do najnowszych doniesień o molekularnej różnorodności astrocytów, determinowanej przez region mózgu, w którym występują. Ukazują one różnice w przebiegu egzocytozy pomiędzy astrocytami z hodowli neuronalno-astrocytarnych pozyskanych odpowiednio z hipokampów i kory nowej. Ponadto zwracają uwagę na transkryptom hodowli neuronalno-astrocytarnych hipokampa oraz kory nowej w kontekście przebiegu procesu egzocytozy i określają różnice w poziomie mRNA *Unc13c*.

7.1. Astrocyty w hodowli neuronalno-glejowej mają znacząco niższą częstotliwość spontanicznej egzocytozy niż astrocyty w hodowlach astrocytarnych

W niniejszej pracy pokazano, że częstotliwość egzocytozy w astrocytach w hodowlach hipokampalnych jest istotnie niższa niż ta obserwowana w hodowlach astrocytarnych. Dotychczas większość badań nad procesem regulowanej egzocytozy w astrocytach opierała się na modelu doświadczalnym hodowli astrocytarnej [Pangršič i wsp., 2007; Pryazhnikov i Khiroug, 2008; Liu i wsp., 2011]. Choć takie podejście eksperymentalne umożliwia badanie odizolowanych astrocytów, co pozwala na przeprowadzenie wielu testów biochemicznych, takich jak technika Western-Blot, oraz na odseparowanie zjawisk zachodzących w astrocytach od tych w neuronach, wiąże się z istotnymi ograniczeniami wynikającymi z braku oddziaływań astrocytów z neuronami [Schmoranz i wsp., 2000; Mattheyses i wsp., 2010]. W szczególności, komórki nerwowe indukują gwieździstą morfologię astrocytów, co potwierdzają również wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy (rycina 9), podobną do tej, jaką te komórki wykazują *in vivo* [Yang i wsp., 2013; Khakh i Sofroniew, 2015], ale także wpływają na profil ekspresji wielu genów [Sardar i wsp., 2021]. Oczywiście, pomimo tego, że badanie poziomu mRNA daje pewien obraz składu białkowego komórki, to jednak nie należy go traktować „wprost”. Poziom mRNA nie zawsze musi odpowiadać proporcjonalnie poziomowi białka w komórce. Owszem zmiana poziomu mRNA powoduje zmianę ilości kodowanego przez nie białka, jednak nie mówi wiele o jego stężeniu. Poziom ten bowiem będzie uzależniony od wielu czynników, takich jak stabilność mRNA dla danego genu, możliwość jego lokalnej translacji, czy czas półtrwania białka. Jest więc możliwe, że mimo niskiego poziomu mRNA kodujących białko ważne dla przebiegu egzocytozy, jest jego wystarczająco wiele, żeby proces ten mógł funkcjonować.

W badaniach częstotliwości egzocytozy zastosowano mikroskopię TIRF, tak jak i w uprzednio opublikowanych badaniach. Jej ogromną zaletą jest eliminacja sygnału tła poprzez ograniczenie obrazowania do głębokości 100 nm powyżej poziomu szkiełka, na którym hodowane są komórki. Stanowi to istotne przeciwskazanie wykluczające możliwość wykorzystania skrawków mózgu w badaniach egzocytozy [Midorikawa, 2018], jednakże nie jest przeszkodą w obrazowaniu hodowli neuronalno-astrocytarnych. Z naszych obserwacji wynika, że obserwowanie astrocytów w hodowlach neuronalno-glejowych za pomocą mikroskopii TIRF, jest równie łatwe, co w hodowlach astrocytów.

Dzieje się tak dlatego, że to właśnie astrocyty leżą bezpośrednio na szkiełku, podczas gdy neurony i ich wypustki często spoczywają właśnie na astrocytach.

W kontekście uzyskanych wyników, niezwykle istotna jest coraz częstsza krytyka koncepcji regulowanej egzocytozy jako głównego mechanizmu glioprzekaznictwa [Fiacco i wsp., 2009; Hamilton i Attwell, 2010; Araque i wsp., 2014; Fujita i wsp., 2014; Bazargani i wsp., 2016]. Składają się na to wyniki wielu prac analizujących poziom mRNA wielu genów kodujących białka, które mogłyby brać udział w takiej regulowanej egzocytozie [Schubert i wsp., 2011]. Wydaje się więc, że obniżony poziom spontanicznej egzocytozy w astrocytach, który tutaj opisano wpisuje się w trend krytyki tego zjawiska jako mechanizmu glioprzekaznictwa.

7.2. Astrocyty w hodowli hipokampalnej reagują wzrostem wydajności egzocytozy na zwiększoną aktywność komórek nerwowych wywołaną elektryczną stymulacją, a blokowanie aktywności neuronalnej znosi ten efekt

Według aktualnej wiedzy, egzogenna (zewnętrzna) elektryczna stymulacja jest metodą wywoływania potencjałów czynnościowych w komórkach, co ma istotny wpływ na wiele procesów fizjologicznych, szczególnie w komórkach pobudliwych elektrycznie. Stymulację elektryczną wykorzystuje się powszechnie w hodowlach do wywoływania potencjałów czynnościowych, choć dotyczy to głównie sytuacji, kiedy obiektem badań są neurony [Schubert i wsp., 2011]. Liczne badania z wykorzystaniem modelu dysocjowanej pierwotnej hodowli korowej komórek nerwowych *in vitro* analizują wpływ wygenerowanego pola elektrycznego (EFS, *ang. electric field stimulation*) na dynamikę zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} w neuronach korowych. Nie uwzględniają one jednak komponentu komórek glejowych i są przeprowadzane 5 dni po wysianiu komórek na szkiełka nakrywkowe pokryte poli-D-lizyną. Niemniej jednak implikują one, iż ekspozycja komórek nerwowych na stymulację elektryczną (7.62 V/cm) indukuje przejściową hiperpolaryzację błony oraz tymczasowy wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie neuronów, co bezpośrednio przyczynia się do sekrecji neuroprzekazników przez te komórki [Alshawaf i wsp., 2023]. Mimo to, niewiele wiadomo o wpływie elektrycznej stymulacji na wydajność procesu egzocytozy cząsteczek przekazywanych astrocytów, zwłaszcza w kontekście hipotezy, że zwiększona aktywność synaptyczna prowadzi do wzmożonego uwalniania glioprzekazników przez astrocyty [Araque i wsp., 2014]. W tym kontekście, szczególnie

interesujący wydaje się wynik, gdzie hodowla hipokampalna była inkubowana z TTX, który blokuje potencjały czynnościowe, a tym samym uwalnianie neuroprzekazników. To zablokowanie aktywności neuronalnej w hodowli hipokampalnej nie spowodowało obniżenia i tak już niskiej częstotliwości egzocytozy. Jednak miało istotny wpływ na zniesie wzrostu częstotliwości egzocytozy wywołanego stymulacją elektryczną. Można ten wynik interpretować, że aktywność neuronalna, prowadząca do uwalniania neuroprzekazników prowadzi do wzrostu uwalniania glioprzekazników przez astrocyty, tak jak to zakłada model synapsy trójdzielnej.

Oczywiście możliwe jest, że sama stymulacja elektryczna wpływa na błonę astrocytów, które znajdują się w polu elektrycznym, co powoduje zmiany właściwości błony komórkowej i wywołuje egzocytozę. Jednak takiej interpretacji przeczy fakt, że moment fuzji pęcherzyków nie kumulował się i nie pokrywał z momentem samej stymulacji elektrycznej, która trwała około 0,25 s. (Rycina 10).

Jeszcze innym wytłumaczeniem wpływu stymulacji elektrycznej na wzrost częstotliwości egzocytozy, może być fakt, że astrocyty posiadają na swojej błonie kanały Ca^{2+} bramkowane napięciem. Istnieje wiele doniesień wskazujących, że astrocyty posiadają takie właśnie kanały [Cheli i wsp., 2016].

7.3. Częstotliwość egzocytozy w hodowli hipokampalnej nie zależy od jonów Ca^{2+} uwalnianych z siateczki śródplazmatycznej

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pokazują jasno, że stymulacja hodowli hipokampalnej za pomocą DHPG (agonisty receptorów metabotropowych dla glutaminianu z grupy I, czyli mGluR1 i mGluR5), nie wywołuje wzrostu częstotliwości egzocytozy w astrocytach (Rycina 11). Ponadto pokazano, że blokowanie receptorów IP_3 znajdujących się na błonie siateczki śródplazmatycznej i odpowiedzialnych za wzrost stężenia cytoplazmatycznego Ca^{2+} w wyniku aktywacji receptorów związanych z białkiem Gq, nie wpływa na wzrost częstotliwości egzocytozy wywołanej stymulacją elektryczną. Wyniki te wskazują więc jasno, że nie można traktować retikulum endoplazmatycznego jako głównego źródła jonów Ca^{2+} , który z kolei wywołuje egzocytozę. Stoją też w sprzeczności z klasycznym modelem synapsy trójdzielnej [Parpura i wsp., 2011; Bazargani i Atwell, 2016], jednak poprzednie badania przeprowadzane głównie na hodowlach astrocytarnych wskazywały właśnie receptory metabotropowe związane z białkiem Gq.

Przebieżność synaptyczna w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków, w kontekście synaps pobudzających, jest głównie realizowana przez receptory dla glutaminianu [Steinhäuser i Gallo, 1996]. Astrocyty regulują poziom cząsteczek glutaminianu w środowisku zewnątrzkomórkowym głównie wychwytyując go z przestrzeni zewnątrzkomórkowej za pomocą transporterów-GLT1 i GLAST. Glutaminian aktywuje też na błonie astrocytów metabotropowe receptory glutaminianu głównie mGluR3 i mGluR5, które ulegają ekspresji w tych komórkach [Peterson i Binder, 2020]. Jednak tylko mGluR5 jest związany z białkiem Gq, i jego aktywację można w prosty sposób powiązać ze wzrostem cytoplazmatycznego Ca^{2+} uwolnionego z siateczki śródplazmatycznej. Wiele receptorów ulegających ekspresji w astrocytach jest powiązanych ze wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} i było badanych pod tym kątem, w tym metabotropowe receptory glutaminianu grupy I [Porter i McCarthy, 1995; Porter i McCarthy, 1997]. Jak już wspomniano we wstępie, astrocyty mogą odpowiadać wzrostem stężenia jonów Ca^{2+} w zasadzie na każdy neuroprzebieżnik obecny w mózgu, dzięki różnym rodzajom receptorów, z czego wiele jest związanych z białkiem Gq i wywołuje uwalnianie jonów Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej, np. receptory purinregiczne z grupy P2Y [Porter i McCarthy, 1997], receptory adrenergiczne $\alpha 1$ [O'Donnell i wsp., 2013], serotoninowe [Miyazaki i wsp., 2013], muskarynowe [Li i wsp., 2022], H1 histaminowe [Kárpáti i wsp., 2019] i inne.

Tapsygargina to silny inhibitor ATP-azy Ca^{2+} w siateczce sarkoplazmatycznej/retikulum endoplazmatycznym (SERCA) [Seghal i wsp., 2017]. Blokując tę pompę, tapsygargina uniemożliwia transport jonów Ca^{2+} do siateczki śródplazmatycznej, co prowadzi do opróżnienia tego organelum z Ca^{2+} . Jednocześnie, w miarę jak SERCA jest hamowana, stężenie jonów Ca^{2+} w cytozolu wzrasta, co powoduje aktywację szlaków sygnalizacyjnych zależnych od wapnia.

Sygnalizacja Ca^{2+} w astrocytach jest kluczowym elementem ich działań neuromodulacyjnych. Astrocyty realizują te działania m.in. poprzez egzocytotyczne uwalnianie cząsteczek przebieżnikowych (glioprzebieżników), co jest uzależnione od stężenia Ca^{2+} [Reyes i Parpura, 2009]. Lata badań przyniosły sprzeczne wyniki dotyczące udziału różnych źródeł Ca^{2+} w regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia tych jonów oraz związku między wzrostem stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie astrocytów a procesem egzocytozy. Klasyczny model synapsy trójdzielnej wskazywał, że głównym źródłem

Ca^{2+} , koniecznym do uwolnienia glioprzekazników, jest siateczka śródplazmatyczna [Parpura i wsp., 2011].

Z drugiej strony, powszechną strategią do badań sygnalizacji Ca^{2+} w astrocytach, która pozwala na weryfikację tego założenia i określenie roli źródła Ca^{2+} w regulacji funkcji astrocytów, jest wykorzystanie myszy z nokautem receptora dla inozytolo-(1,4,5)-trifosforanu typu 2 (IP3R2, *ang. type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*), który jest dominujący w astrocytach. Model ten, mimo tego, że został stworzony jeszcze w latach 90-tych [Li i wsp., 2015] jest ciągle używany w badaniach. Charakteryzuje się funkcjonalnymi astrocytami, w których nie dochodzi do mobilizacji Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej [Okubo i Iino, 2020].

7.4. Całkowite zbuforowanie wewnątrzkomórkowego wapnia (Ca^{2+}) powoduje zanik egzocytozy w astrocytach hodowli hipokampalnej i korowej

Pomimo tego, że przedstawione wyniki wskazują, że uwalnianie jonów Ca^{2+} z siateczki śródplazmatycznej nie powoduje wzrostu częstotliwości egzocytozy, to jednak nasze wyniki jasno wskazują, że proces egzocytozy jest zależny od wapnia (Rycina 11 D). Buforowanie wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} powoduje prawie całkowite zablokowanie procesu egzocytozy zarówno w hodowli hipokampalnej, jak i korowej (Rycina 15B). Wynik ten potwierdza też doniesienia literaturowe na temat regulacji egzocytozy w astrocytach i pokazuje, że konstytutywna, nieregulowana przez Ca^{2+} , egzocytoza zachodzi w astrocytach z bardzo małą wydajnością, której nie byliśmy w stanie zaobserwować w czasie kilku minut obserwacji. W badaniach ograniczono się do śledzenia pęcherzyków posiadających synaptobrewinę (VAMP2), a więc głównie są to małe pęcherzyki podobne do pęcherzyków synaptycznych (SLMV), jak i pęcherzyki z gęstym elektronowo rdzeniem (DCV). Również mikroskopia TIRF ze względu na swoją naturę nie pozwala śledzić wszystkich błon astrocytu, tylko te, które leżą bezpośrednio na szkiełku, co zmniejsza prawdopodobieństwo wykrycia zjawiska fuzji.

Wynik ten wskazuje również, że możliwe inne mechanizmy regulujące egzocytozę, takie jak np. metabolizm 4,5-bisfosforanu fosfatydylinozytoli (PI(4,5)P2) [Ji i wsp., 2017], mają mały wpływ na uwalnianie pęcherzyków z astrocytów, a przynajmniej nie w skali minut. Sugeruje także, że pęcherzyki są najprawdopodobniej zadokowane, ale jednocześnie nie ulegają fuzji, jednak wymagałoby to dalszych badań.

Co ciekawe, stymulacja elektryczna w hodowli gdzie komórki były pozbawione jonów Ca^{2+} nie wywoływała egzocytozy w astrocytach. Świadczy to również o tym, że sama stymulacja elektryczna nie powoduje np. uszkodzenia błon w astrocytach, ani też nie promuje fuzji pęcherzyków wydzielniczych z błoną bez udziału jonów Ca^{2+} w cytoplazmie.

7.5. Częstotliwość egzocytozy w hodowli hipokampalnej zależy od zewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} oraz od aktywacji receptorów AMPA

Zaprezentowane w pracy wyniki doświadczenia, mającego na celu zbadanie wpływu braku jonów Ca^{2+} w środowisku zewnątrzkomórkowym na częstotliwość spontanicznej egzocytozy astrocytów, zarówno w hodowli astrocytarnej, jak i hipokampalnej, dostarcza dowodów wspierających hipotezę, że uwalnianie glioprzekazników przez astrocyty jest głównie regulowane za pośrednictwem Ca^{2+} pochodzącego z środowiska zewnątrzkomórkowego. Warto podkreślić, że regulacja transmisji synaptycznej przez egzocytozę glioprzekazników nie jest w pełni zależna od Ca^{2+} zmagazynowanych w siateczce śródplazmatycznej. Jak wykazano, astrocyty w hodowli hipokampalnej inkubowane w buforze pozbawionym jonów Ca^{2+} mają znacząco niższy poziom egzocytozy niż te, inkubowane w obecności tych jonów. Wynik ten jest podobny dla astrocytów z hodowli astrocytarnej.

Co interesujące, w buforze pozbawionym jonów wapnia stymulacja elektryczna hodowli hipokampalnej (Rycina 12 C) wywołuje wzrost częstotliwości egzocytozy w astrocytach. Podobny wynik uzyskano dla astrocytów w hodowli korowej (Rycina 15 A). Wynik ten jest wyjątkowo intrygujący. Spodziewano się, że w buforze bez Ca^{2+} , egzocytoza jest zahamowana również w neuronach obecnych w hodowli, w związku z tym nie powinny one w takich warunkach uwalniać neuroprzekazników, lub przekaznictwo to powinno być minimalne, podobne do tego, w obecności TTX. W przeprowadzonym eksperymencie, bufor pozbawiony jonów Ca^{2+} zawierał również 100 μM chelator tych jonów - BAPTA, który nie może wnikać do środka komórki. Obecność BAPTA w roztworze była podyktowana obawą, że sam brak jonów Ca^{2+} będzie niewystarczający i przy błonie komórki w przestrzeniach macierzy zewnątrzkomórkowej wapń dalej będzie obecny. Pomimo zastosowania tych środków ostrożności, nie udało się zablokować egzocytozy.

Doprawdy trudno skomentować ten wynik w kontekście wszystkich opisanych powyżej. Być może stymulacja elektryczna mogła spowodować uwolnienie Ca^{2+} z mitochondriów do cytozolu i tym samym spowodować wzrost egzocytozy. Mitochondria również stanowią ważny rezerwuar jonów Ca^{2+} [Cabral-Costa i Kowaltowski, 2023]. Wychwytyją nadmiar wapnia z cytozolu dzięki mitochondrialnemu uniporterowi wapnia (ang. *mitochondrial Ca^{2+} uniporter*; MCU), który transportuje Ca^{2+} dzięki potencjałowi błonowemu pomiędzy macierzą a przestrzenią międzybłonową mitochondrium. Mitochondria mogą również uwalniać wapń do cytozolu. Dzieje się to głównie za pośrednictwem mitochondrialnego wymiennicza sodowo-wapniowego (ang. *mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger*; NCLX). Można się jednak spodziewać, że podobny mechanizm mógłby działać w zakończeniach aksonów, które posiadają wiele mitochondriów, i doprowadzić do uwolnienia neuroprzekaźnika.

Co również niezwykle ciekawe, zablokowanie receptorów AMPA w hodowli hipokampalnej doprowadziło do zablokowania wzrostu częstości egzocytozy wywołanej elektrostymulacją. Wiadomo, że astrocyty posiadają receptory AMPA, o bardzo dużej różnorodności podjednostkowej zależnej od regionu mózgu [Mölders i wsp., 2018]. Wiele z tych receptorów, jest również przepuszczalnych dla jonów Ca^{2+} [Droste i wsp., 2017]⁺, co może tłumaczyć dlaczego ich blokowanie redukuje wzrost w częstotliwości egzocytozy w astrocytach wywołany stymulacją elektryczną. Wydaje się mało prawdopodobne, żeby blokowanie receptorów AMPA w neuronach miało spowodować brak uwalniania neuroprzekaźników, a przez to brak stymulacji astrocytów. Stymulacja elektryczna bowiem prowadzi do powstawania potencjałów czynnościowych w neuronach, do czego nie jest potrzebna aktywacja receptorów AMPA (konieczna w przekazywaniu synaptycznym).

7.6. Częstotliwość egzocytozy w astrocytach w hodowli korowej wzrasta w wyniku stymulacji elektrycznej, nawet w warunkach blokowania potencjałów czynnościowych przez TTX

Porównując częstotliwość egzocytozy pomiędzy astrocytami w hodowlach korowych i hipokampalnych, nie znaleziono istotnych różnic (Rycina 13). Jednak gdy porównania takiego dokonaliśmy w obecności TTX, blokującego potencjały czynnościowe w neuronach, wówczas zaobserwowano, że TTX nie blokuje wzrostu

częstotliwości egzocytozy w astrocytach w hodowli korowej (Rycina 14). Jest to bardzo zaskakujący wynik, podobny do tego, gdzie hodowle neuronalno-astrocytarne były pozbawione zewnątrzkomórkowego wapnia (Rycina 12 i 15). Może on sugerować, że przekąźnictwo neuronalne nie wpływa na częstotliwość egzocytozy w astrocytach w hodowlach korowych. Być może jednak elektrostymulacja nie jest najlepszym bodźcem w tego typu badaniach, gdyż może bezpośrednio aktywować astrocyty, co widać na podstawie wzrostu częstości egzocytozy. Wynik uzyskany w hodowli korowej z pewnością należy zbadać dokładniej stosując inne metody wzbudzenia aktywności neuronalnej. Najczęściej używanymi są: podwyższenie stężenia jonów K^+ (10 mM) z równoczesnym usunięciem jonów Mg^{2+} [Magalóire i wsp., 2023], zablokowanie receptorów GABA za pomocą pikrotoksyny, co powoduje wyłączenie hamującego przekąźnictwa GABA-ergicznego i tym samym pobudzenie hodowli. Być może warto rozważyć również metody oparte o metody optogenetyczne, lub chemogenetyczne, które pozwoliłyby na rozdzielenie stymulacji neuronów od astrocytów.

7.7. Poziom mRNA dla *Unc13c* jest zbliżony w hodowlach hipokampalnych i korowych, chociaż astrocyty w hodowli hipokampalnej mają wyższy poziom mRNA *Unc13c* niż astrocyty w hodowli korowej

Astrocyty, będące komórkami glejowymi, stanowią różnorodną populację komórek nie tylko pod względem morfologii, ale również funkcji, w zależności od regionu mózgu, w którym występują, oraz aspektów molekularnych. Okazuje się, że wykazują one także różnorodność w obrębie transkryptomu, co zostało opisane przez Batiuka i wsp. [2020]. W swoim artykule Batiuk i wsp. [2020] zidentyfikowali i opisali astrocyty AST1 oraz AST4, które występują głównie w hipokampie, a także AST2, charakterystyczne dla kory mózgowej. Astrocyty AST3 i AST5 są rozmieszczone równomiernie w obrębie tych obszarów mózgu. Dokładna lokalizacja poszczególnych podtypów była możliwa dzięki wyselekcjonowanym genom markerowym. Jednym z nich jest *Unc13c*, zaangażowany w egzocytozę, którego wyższy niż średni poziom ekspresji jest charakterystyczny dla podtypu astrocytów AST2, wszechobecnego w korze. Wyniki fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ zaprezentowane w tej pracy wskazują, że średnia intensywność fluorescencji sondy antysensownego RNA *Unc13c* dla astrocytów hipokampa jest statystycznie wyższa niż średnia fluorescencja dla kory mózgowej, co pozostaje w sprzeczności z danymi przedstawionymi przez Batiuka i wsp. [2020].

7.8. Przyszłe kierunki badań

Regulowana egzocytoza w astrocytach jest złożonym procesem, za pomocą którego astrocyty aktywnie komunikują się z komórkami nerwowymi, pośrednicząc i regulując transmisję synaptyczną. Wszechstronność roli tego procesu i astrocytów w przetwarzaniu informacji w mózgu ujawnia braki, uniemożliwiające pełne zrozumienie mechanizmów regulacyjnych leżących u podstaw procesu egzocytozy. Uzyskane wyniki przyczyniły się do opisanie mechanizmów procesu egzocytozy w astrocytach w obecności neuronów, a więc w warunkach bardziej zbliżonych do tych występujących w mózgu. Zaproponowane w niniejszej pracy źródła jonów Ca^{2+} oraz podstawowe mechanizmy sygnalizacji astrocytarnej stanowią punkt wyjścia do dalszych analiz dynamiki uwalniania glioprzekazników w odpowiedzi na stymulację chemiczną i elektryczną oraz oceny ewentualnego sprzężenia lokalnych wzrostów wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} z miejscami wzmożonego występowania zdarzeń egzocytozy.

8. Podsumowanie i wnioski końcowe

Fakt istnienia dwukierunkowej komunikacji pomiędzy komórkami nerwowymi a astrocytami, które uwalniają cząsteczki przekaźnikowe (glioprzekaźniki), w kontekście aktywności neuronów, warunkuje realizację badań podstawowych dotyczących rzeczywistej roli astrocytów w regulacji transmisji synaptycznej. Zademonstrowane w niniejszej rozprawie wyniki badań nad mechanizmami egzocytozy zależnej od Ca^{2+} w astrocytach jednoznacznie wskazują źródło Ca^{2+} oraz ukazują istotę obecności neuronów w regulacji przebiegu tego procesu.

Inną równie ważną kwestią poruszaną w tej pracy jest analiza różnic w przebiegu procesu regulowanej egzocytozy astrocytów, wynikających z ich specyficznych adaptacji i funkcji związanych z różnymi obszarami mózgu. Przyczyny zaobserwowanych rozbieżności zostały zbadane poprzez ocenę transkryptomu hodowli neuronalno-glejowych pochodzących z hipokampa oraz kory nowej. Analiza ta obejmowała ilościową ocenę poziomu ekspresji genu *Unc13c* w hodowlach.

W wyniku wykonanych badań stwierdzono, że:

1. Astrocyty w hipokampalnej hodowli neuronalno-glejowej charakteryzują się złożoną morfologią, podczas gdy w hodowli astrocytarnej mają prostą, poligonalną morfologię i kształtem przypominają wielokąty.
2. Astrocyty w hodowli hipokampalnej mają niższy poziom spontanicznej egzocytozy niż komórki w hodowli astrocytarnej.
3. Astrocyty w hodowli neuronalno-astrocytarnej hipokampa reagują wzrostem wydajności egzocytozy na zwiększoną aktywność komórek nerwowych wywołaną elektryczną stymulacją (zależność ta nie jest wprost proporcjonalna do liczby zaaplikowanych potencjałów czynnościowych).
4. Regulacja procesu egzocytozy zależnej od Ca^{2+} w astrocytach w hodowli astrocytarnej przebiega z udziałem metabotropowych receptorów dla glutaminianu.
5. Zależna od Ca^{2+} egzocytoza w astrocytach, zarówno w astrocytarnej, jak i neuronalno-astrocytarnej hodowli, jest regulowana przede wszystkim za pośrednictwem Ca^{2+} z środowiska zewnątrzkomórkowego.

6. Astrocyty kory nowej z mieszanej hodowli neuronalno-astrocytarnej wykazują większą odpowiedź na elektryczną stymulację hodowli w postaci wzrostu wydajności egzocytozy niż astrocyty hipokampa.
7. Zwiększona aktywność neuronalna nie jest podstawą reakcji astrocytów, objawiającej się wzrostem wydajności egzocytozy na elektryczną stymulację mieszanej hodowli neuronalno-astrocytarnej kory nowej.
8. Astrocyty z hodowli hipokampalnej cechują się większym sygnałem od sondy RNA *Unc13c* niż astrocyty w hodowlach korowych.

9. Wykaz wykorzystanych programów i zasobów internetowych

Clone Manager 7, wersja 7.11 – program do analizy sekwencji DNA i białek, który umożliwia tworzenie graficznych map konstruktów, planowanie klonowania *in silico*.

ZEN 3.3 (blue edition), wersja 3.3.89.0000 – modułowe oprogramowanie do akwizycji, przetwarzania i analizy danych w postaci obrazów mikroskopowych, opracowane przez firmę Carl Zeiss Microscopy GmbH.

Fiji ImageJ, wersja 1.53c – program do akwizycji, przetwarzania i analizy obrazów mikroskopowych, stworzony przez Wayne’a Rasbanda z National Institutes of Health, USA.

Suite2p, wersja 0.10.3 – oprogramowanie zastosowane do przetwarzania i analizy poklatkowych rejestracji obrazów mikroskopowych (poklatkowych filmów) dotyczących astrocytarnej egzocytozy przekźników. Program został opracowany przez Mariusa Pachitariu, Carsena Stringera oraz założycieli Cortexlab z University College London – Matteo Carandini, Kennetha Harrisa. Suite2p jest dostępne pod linkiem <https://github.com/cortex-lab/Suite2P> na GitHubie.

GraphPad Prism 9, wersja 9.0.0 (121) – program do organizacji danych liczbowych, ich graficznej prezentacji oraz analizy statystycznej.

Autodesk Fusion 360 – oprogramowanie do projektowania i modelowania bryłowego 3D (*ang. three-dimensional*), które integruje funkcje CAD (*ang. Computer Aided Design*), CAM (*ang. Computer Aided Manufacturing*), CAE (*ang. Computer Aided Engineering*) oraz PCB (*ang. Printed Circuit Board*).

Blender, wersja 4.2.3.0 – program zawierający bogaty zestaw narzędzi do modelowania 3D, renderingu. Jest to oprogramowanie, którego używano do tworzenia statycznych ilustracji.

GIMP, wersja 2.10.38 – program graficzny do tworzenia grafik.

10. Spis literary

1. Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. Image processing with ImageJ. *Biophotonics Intern.* 2004; 11: 36-42.
2. Agulhon C, Sun MY, Murphy T, Myers T, Lauderdale K, Fiacco TA. Calcium signaling and gliotransmission in normal vs. reactive astrocytes. *Front Pharmacol.* 2012; 3: 139.
3. Alabi AA, Tsien RW. Perspectives on kiss-and-run: role in exocytosis, endocytosis, and neurotransmission. *Annu Rev Physiol.* 2013; 75: 393-422.
4. Allen NJ, Eroglu C. Cell biology of astrocyte-synapse interactions. *Neuron.* 2017; 96(3): 697-708.
5. Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science.* 2018; 362(6411): 181-185.
6. Alshawaf AJ, Alnassar SA, Al-Mohanna FA. The interplay of intracellular calcium and zinc ions in response to electric field stimulation in primary rat cortical neurons *in vitro*. *Front Cell Neurosci.* 2023; 17: 1118335.
7. Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron.* 2014; 81(4): 728-739.
8. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 1999; 22(5): 208-215.
9. Arizono M, Bannai H, Nakamura K, Niwa F, Enomoto M, Matsu-Ura T, Miyamoto A, Sherwood MW, Nakamura T, Mikoshiba K. Receptor-selective diffusion barrier enhances sensitivity of astrocytic processes to metabotropic glutamate receptor stimulation. *Sci Signal.* 2012; 5(218): ra27.
10. Augusto-Oliveira M, Arrifano GP, Takeda PY, Lopes-Araújo A, Santos-Sacramento L, Anthony DC, Verkhratsky A, Crespo-Lopez ME. Astroglia-specific contributions to the regulation of synapses, cognition and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev.* 2020; 118: 331-357.
11. Bailey MS, Shipley MT. Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *J Comp Neurol.* 1993; 328(4): 501-526.
12. Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron.* 2008; 60(3): 430-440.

13. Batiuk MY, Martirosyan A, Wahis J, de Vin F, Marneffe C, Kusserow C, Koeppen J, Viana JF, Oliveira JF, Voet T, Ponting CP, Belgard TG, Holt MG. Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. *Nat Commun.* 2020; 11(1): 1220.
14. Bazargani N, Attwell D. Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nat Neurosci.* 2016; 19(2): 182-189.
15. Beard E, Lengacher S, Dias S, Magistretti PJ, Finsterwald C. Astrocytes as key regulators of brain energy metabolism: new therapeutic perspectives. *Front Physiol.* 2022; 12: 825816.
16. Ben Haim L, Rowitch DH. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci.* 2017; 18(1): 31-41.
17. Bergersen LH, Gundersen V. Morphological evidence for vesicular glutamate release from astrocytes. *Neuroscience.* 2009; 158(1): 260-265.
18. Bergersen LH, Morland C, Ormel L, Rinholm JE, Larsson M, Wold JF, Røe AT, Stranna A, Santello M, Bouvier D, Ottersen OP, Volterra A, Gundersen V. Immunogold detection of L-glutamate and D-serine in small synaptic-like microvesicles in adult hippocampal astrocytes. *Cereb Cortex.* 2012; 22(7): 1690-1697.
19. Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhäuser C, Pilati E, Volterra A. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci.* 2004; 7(6): 613-620.
20. Boisvert MM, Erikson GA, Shokhirev MN, Allen NJ. The aging astrocyte transcriptome from multiple regions of the mouse brain. *Cell Rep.* 2018; 22(1): 269-285.
21. Bowser DN, Khakh BS. Two forms of single-vesicle astrocyte exocytosis imaged with total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(10): 4212-4217.
22. Burgoyne RD, Fisher RJ, Graham ME. Regulation of kiss-and-run exocytosis. *Trends Cell Biol.* 2001; 11(10): 404-405.
23. Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci.* 2002; 22(1): 183-192.
24. Cabral-Costa JV, Kowaltowski AJ. Mitochondrial Ca²⁺ handling as a cell signaling hub: lessons from astrocyte function. *Essays Biochem.* 2023; 67(1): 63-75.

25. Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci.* 2008; 28(1): 264-278.
26. Calegari F, Coco S, Taverna E, Bassetti M, Verderio C, Corradi N, Matteoli M, Rosa P. A regulated secretory pathway in cultured hippocampal astrocytes. *J Biol Chem.* 1999; 274(32): 22539-22547.
27. Cali C, Bezzi P. CXCR4-mediated glutamate exocytosis from astrocytes. *J Neuroimmunol.* 2010; 224(1-2): 13-21.
28. Cali C, Marchaland J, Spagnuolo P, Gremion J, Bezzi P. Regulated exocytosis from astrocytes physiological and pathological related aspects. *Int Rev Neurobiol.* 2009; 85: 261-293.
29. Cauli B, Hamel E. Brain perfusion and astrocytes. *Trends Neurosci.* 2018; 41(7): 409-413.
30. Chaboub LS, Deneen B. Developmental origins of astrocyte heterogeneity: the final frontier of CNS development. *Dev Neurosci.* 2012; 34(5): 379-88.
31. Chai H, Diaz-Castro B, Shigetomi E, Monte E, Oceau JC, Yu X, Cohn W, Rajendran PS, Vondriska TM, Whitelegge JP, Coppola G, Khakh BS. Neural circuit-specialized astrocytes: transcriptomic, proteomic, morphological, and functional evidence. *Neuron.* 2017; 95(3): 531-549.
32. Chanaday NL, Cousin MA, Milosevic I, Watanabe S, Morgan JR. The synaptic vesicle cycle revisited: new insights into the modes and mechanisms. *J Neurosci.* 2019; 39(42): 8209-8216.
33. Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron.* 1991; 6(6): 983-992.
34. Cheli VT, Santiago González DA, Smith J, Spreuer V, Murphy GG, Paez PM. L-type voltage-operated calcium channels contribute to astrocyte activation in vitro. *Glia.* 2016; 64(8): 1396-415.
35. Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, Looger LL, Svoboda K, Kim DS. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature.* 2013; 499(7458): 295-300.

36. Chen XK, Xiong YF, Zhou Z. "Kiss-and-run" exocytosis in astrocytes. *Neuroscientist*. 2006; 12(5): 375-378.
37. Chen Y, Qin C, Huang J, Tang X, Liu C, Huang K, Xu J, Guo G, Tong A, Zhou L. The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Prolif*. 2020; 53(3): e12781.
38. Chen YA, Scheller RH. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2(2): 98-106.
39. Cho S, von Gersdorff H. Neuroscience: Faster than kiss-and-run. *Nature*. 2013; 504(7479): 220-221.
40. Cho WH, Barcelon E, Lee SJ. Optogenetic glia manipulation: possibilities and future prospects. *Exp Neurobiol*. 2016; 25(5): 197-204.
41. Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*. 1990; 247(4941): 470-473.
42. Crippa D, Schenk U, Francolini M, Rosa P, Verderio C, Zonta M, Pozzan T, Matteoli M, Carmignoto G. Synaptobrevin2-expressing vesicles in rat astrocytes: insights into molecular characterization, dynamics and exocytosis. *J Physiol*. 2006; 570(Pt 3): 567-582.
43. Dani JW, Chernjavsky A, Smith SJ. Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron*. 1992; 8(3): 429-440.
44. Denvir DJ, Coates CG. Electron multiplying CCD technology: Application to ultrasensitive detection of biomolecules. *Proc. SPIE Photonics West, BioS*. 2002; 4626: pp502-512.
45. Droste D, Seifert G, Seddar L, Jädtke O, Steinhäuser C, Lohr C. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in mouse olfactory bulb astrocytes. *Sci Rep*. 2017; 7: 44817.
46. Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Chen Y, Swanson RA. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci*. 2003; 23(4): 1320-1328.
47. Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(26): 15781-15786.
48. Faust TE, Devlin BA, Farhy-Tselnicker I, Ferro A, Postolache M, Xin W. Glial control of cortical neuronal circuit maturation and plasticity. *J Neurosci*. 2024; 44(40): e1208242024.

49. Fellin T, Carmignoto G. Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol*. 2004; 559(Pt 1): 3-15.
50. Fiacco TA, Agulhon C, McCarthy KD. Sorting out astrocyte physiology from pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009; 49: 151-174.
51. Finkbeiner S. Calcium waves in astrocytes-filling in the gaps. *Neuron*. 1992; 8(6): 1101-1108.
52. Foo LC, Allen NJ, Bushong EA, Ventura PB, Chung WS, Zhou L, Cahoy JD, Daneman R, Zong H, Ellisman MH, Barres BA. Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes. *Neuron*. 2011; 71(5): 799-811.
53. Fróes MM, Correia AH, Garcia-Abreu J, Spray DC, Campos de Carvalho AC, Neto VM. Gap-junctional coupling between neurons and astrocytes in primary central nervous system cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(13): 7541-7546.
54. Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, Krämer-Albers EM. Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. *Front Cell Neurosci*. 2013; 7: 182.
55. Fujii Y, Maekawa S, Morita M. Astrocyte calcium waves propagate proximally by gap junction and distally by extracellular diffusion of ATP released from volume-regulated anion channels. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 13115.
56. Fujita T, Chen MJ, Li B, Smith NA, Peng W, Sun W, Toner MJ, Kress BT, Wang L, Benraiss A, Takano T, Wang S, Nedergaard M. Neuronal transgene expression in dominant-negative SNARE mice. *J Neurosci*. 2014; 34(50): 16594-604. Erratum in: *J Neurosci*. 2016; 36(14): 4136-4137.
57. Gharbi T, Zhang Z, Yang GY. The function of astrocyte mediated extracellular vesicles in central nervous system diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 568889.
58. Giaume C, Venance L. Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia*. 1998; 24(1): 50-64.
59. Goenaga J, Araque A, Kofuji P, Herrera Moro Chao D. Calcium signaling in astrocytes and gliotransmitter release. *Front Synaptic Neurosci*. 2023; 15: 1138577.
60. Gradisnik L, Velnar T. Astrocytes in the central nervous system and their functions in health and disease: A review. *World J Clin Cases*. 2023; 11(15): 3385-3394.
61. Gross L. "Supporting" players take the lead in protecting the overstimulated brain. *PLoS Biol*. 2006; 4(11): e371.
62. Hadzic M, Jack A, Wahle P. Ionotropic glutamate receptors: Which ones, when, and where in the mammalian neocortex. *J Comp Neurol*. 2017; 525(4): 976-1033.

63. Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med*. 2007; 13(2): 54-63.
64. Hamilton NB, Attwell D. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci*. 2010; 11(4): 227-238.
65. Hasel P, Dando O, Jiwaji Z, Baxter P, Todd AC, Heron S, Márkus NM, McQueen J, Hampton DW, Torvell M, Tiwari SS, McKay S, Eraso-Pichot A, Zorzano A, Masgrau R, Galea E, Chandran S, Wyllie DJA, Simpson TI, Hardingham GE. Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism. *Nat Commun*. 2017; 8: 15132.
66. Hatten ME. Neuronal regulation of astroglial morphology and proliferation in vitro. *J Cell Biol*. 1985; 100(2): 384-396.
67. Haydon PG, Carmignoto G. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev*. 2006; 86(3): 1009-1031.
68. He F, Sun YE. Glial cells more than support cells? *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(4): 661-665.
69. He L, Wu LG. The debate on the kiss-and-run fusion at synapses. *Trends Neurosci*. 2007; 30(9): 447-455.
70. Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*. 2010; 463(7278): 232-236.
71. Hisatsune C, Nakamura K, Kuroda Y, Nakamura T, Mikoshiba K. Amplification of Ca^{2+} signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *J Biol Chem*. 2005; 280(12): 11723-11730.
72. Hong W. SNAREs and traffic. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1744(2): 120-144.
73. Horvat A, Zorec R, Vardjan N. Lactate as an astroglial signal augmenting aerobic glycolysis and lipid metabolism. *Front Physiol*. 2021; 12: 735532.
74. Hur YS, Kim KD, Paek SH, Yoo SH. Evidence for the existence of secretory granule (dense-core vesicle)-based inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca^{2+} signaling system in astrocytes. *PLoS One*. 2010; 5(8): e11973.
75. Jahn R, Lang T, Südhof TC. Membrane fusion. *Cell*. 2003; 112(4): 519-533.
76. Jahn R, Scheller RH. SNAREs-engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(9): 631-643.
77. Jensen AM, Chiu SY. Fluorescence measurement of changes in intracellular calcium induced by excitatory amino acids in cultured cortical astrocytes. *J Neurosci*. 1990; 10(4): 1165-1175.

78. Ji C, Fan F, Lou X. Vesicle Docking Is a Key Target of Local PI(4,5)P₂ Metabolism in the Secretory Pathway of INS-1 Cells. *Cell Rep.* 2017; 20(6): 1409-1421.
79. Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci.* 2007; 10(3): 331-339.
80. Kaech S, Banker G. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc.* 2006; 1(5): 2406-2415.
81. Kárpáti A, Yoshikawa T, Naganuma F, Matsuzawa T, Kitano H, Yamada Y, Yokoyama M, Futatsugi A, Mikoshiba K, Yanai K. Histamine H₁ receptor on astrocytes and neurons controls distinct aspects of mouse behaviour. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 16451.
82. Karra D, Dahm R. Transfection techniques for neuronal cells. *J Neurosci.* 2010; 30(18): 6171-6177.
83. Kasai H, Takahashi N, Tokumaru H. Distinct initial SNARE configurations underlying the diversity of exocytosis. *Physiol Rev.* 2012; 92(4): 1915-1964.
84. Kesavan J, Watters O, de Diego-Garcia L, Méndez AM, Alves M, Dinkel K, Hamacher M, Prehn JHM, Henshall DC, Engel T. Functional expression of the ATP-gated P2X₇ receptor in human iPSC-derived astrocytes. *Purinergic Signal.* 2024; 20(3): 303-309.
85. Kettenmann H, Ransom BR. The concept of neuroglia: a historical perspective. Oxford Univ Press. 2005.
86. Khakh BS, Deneen B. The emerging nature of astrocyte diversity. *Annu Rev Neurosci.* 2019; 42: 187-207.
87. Khakh BS, McCarthy KD. Astrocyte calcium signaling: from observations to functions and the challenges therein. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7(4): a020404.
88. Khakh BS, Sofroniew MV. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci.* 2015; 18(7): 942-952.
89. Kirischuk S, Héja L, Kardos J, Billups B. Astrocyte sodium signaling and the regulation of neurotransmission. *Glia.* 2016; 64(10): 1655-1666.
90. Koch H, Hofmann K, Brose N. Definition of Munc13-homology-domains and characterization of a novel ubiquitously expressed Munc13 isoform. *Biochem J.* 2000; 349(Pt 1): 247-253.

91. Kofuji P, Araque A. Swelling gliotransmission by SWELL1 channels. *Neuron*. 2019; 102(4): 711-713.
92. Latour I, Hamid J, Beedle AM, Zamponi GW, Macvicar BA. Expression of voltage-gated Ca^{2+} channel subtypes in cultured astrocytes. *Glia*. 2003; 41(4): 347-353.
93. Lee A, Pow DV. Astrocytes: glutamate transport and alternate splicing of transporters. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010; 42(12): 1901-1906.
94. Lenoir S, Genoux A, Agasse F, Saudou F, Humbert S. Recreating mouse cortico-hippocampal neuronal circuit in microfluidic devices to study BDNF axonal transport upon glucocorticoid treatment. *STAR Protoc*. 2021; 2(1): 100382.
95. Li D, Hérault K, Zylbersztejn K, Lauterbach MA, Guillon M, Oheim M, Ropert N. Astrocyte VAMP3 vesicles undergo Ca^{2+} -independent cycling and modulate glutamate transporter trafficking. *J Physiol*. 2015; 593(13): 2807-2832.
96. Li D, Ropert N, Koulakoff A, Giaume C, Oheim M. Lysosomes are the major vesicular compartment undergoing Ca^{2+} -regulated exocytosis from cortical astrocytes. *J Neurosci*. 2008; 28(30): 7648-7658.
97. Li H, Xie Y, Zhang N, Yu Y, Zhang Q, Ding S. Disruption of $\text{IP}_3\text{R}2$ -mediated Ca^{2+} signaling pathway in astrocytes ameliorates neuronal death and brain damage while reducing behavioral deficits after focal ischemic stroke. *Cell Calcium*. 2015; 58(6): 565-576.
98. Li W, Ma C, Guan R, Xu Y, Tomchick DR, Rizo J. The crystal structure of a Munc13 C-terminal module exhibits a remarkable similarity to vesicle tethering factors. *Structure*. 2011; 19(10): 1443-1455.
99. Li WP, Su XH, Hu NY, Hu J, Li XW, Yang JM, Gao TM. Astrocytes mediate cholinergic regulation of adult hippocampal neurogenesis and memory through M_1 muscarinic receptor. *Biol Psychiatry*. 2022; 92(12): 984-998.
100. Lipstein N, Schaks S, Dimova K, Kalkhof S, Ihling C, Kölbel K, Ashery U, Rhee J, Brose N, Sinz A, Jahn O. Nonconserved Ca^{2+} /calmodulin binding sites in Munc13s differentially control synaptic short-term plasticity. *Mol Cell Biol*. 2012; 32(22): 4628-4641.
101. Liu T, Sun L, Xiong Y, Shang S, Guo N, Teng S, Wang Y, Liu B, Wang C, Wang L, Zheng L, Zhang CX, Han W, Zhou Z. Calcium triggers exocytosis from two types of organelles in a single astrocyte. *J Neurosci*. 2011; 31(29): 10593-10601.

102. Liu X, Seven AB, Camacho M, Esser V, Xu J, Trimbuch T, Quade B, Su L, Ma C, Rosenmund C, Rizo J. Functional synergy between the Munc13 C-terminal C1 and C2 domains. *Elife*. 2016; 5: e13696.
103. Löscher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol*. 2005; 76(1): 22-76.
104. Magloire V, Savtchenko LP, Jensen TP, Sylantyev S, Kopach O, Cole N, Tyurikova O, Kullmann DM, Walker MC, Marvin JS, Looger LL, Hasseman JP, Kolb I, Pavlov I, Rusakov DA. Volume-transmitted GABA waves pace epileptiform rhythms in the hippocampal network. *Curr Biol*. 2023; 33(7): 1249-1264.e7.
105. Mahmoud S, Gharagozloo M, Simard C, Gris D. Astrocytes maintain glutamate homeostasis in the CNS by controlling the balance between glutamate uptake and release. *Cells*. 2019; 8(2): 184.
106. Mahon MJ. pHluorin2: an enhanced, ratiometric, pH-sensitive green fluorescent protein. *Adv Biosci Biotechnol*. 2011; 2(3): 132-137.
107. Malarkey EB, Parpura V. Temporal characteristics of vesicular fusion in astrocytes: examination of synaptobrevin 2-laden vesicles at single vesicle resolution. *J Physiol*. 2011; 589(17): 4271-4300.
108. Marchaland J, Calì C, Voglmaier SM, Li H, Regazzi R, Edwards RH, Bezzi P. Fast subplasma membrane Ca^{2+} transients control exo-endocytosis of synaptic-like microvesicles in astrocytes. *J Neurosci*. 2008; 28(37): 9122-9132.
109. Martineau M, Shi T, Puyal J, Knolhoff AM, Dulong J, Gasnier B, Klingauf J, Sweedler JV, Jahn R, Mothet JP. Storage and uptake of D-serine into astrocytic synaptic-like vesicles specify gliotransmission. *J Neurosci*. 2013; 33(8): 3413-3423.
110. Martineau M, Somasundaram A, Grimm JB, Gruber TD, Choquet D, Taraska JW, Lavis LD, Perrais D. Semisynthetic fluorescent pH sensors for imaging exocytosis and endocytosis. *Nat Commun*. 2017; 8(1): 1412.
111. Mattheyses AL, Simon SM, Rappoport JZ. Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist. *J Cell Sci*. 2010; 123(Pt 21): 3621-3628.
112. McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*. 1980; 85(3): 890-902.
113. Michaluk P, Heller JP, Rusakov DA. Rapid recycling of glutamate transporters on the astroglial surface. *Elife*. 2021; 10: e64714.

114. Michelassi F, Liu H, Hu Z, Dittman JS. A C1-C2 module in Munc13 inhibits calcium-dependent neurotransmitter release. *Neuron*. 2017; 95(3): 577-590.
115. Midorikawa M. Real-time imaging of synaptic vesicle exocytosis by total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. *Neurosci Res*. 2018; 136: 1-5.
116. Mielnicka A, Michaluk P. Exocytosis in astrocytes. *Biomolecules*. 2021; 11(9): 1367.
117. Miesenböck G, De Angelis DA, Rothman JE. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature*. 1998; 394(6689): 192-195.
118. Miura K. Bleach correction ImageJ plugin for compensating the photobleaching of time-lapse sequences. *F1000Res*. 2020; 9: 1494.
119. Miyazaki I, Asanuma M, Murakami S, Takeshima M, Torigoe N, Kitamura Y, Miyoshi K. Targeting 5-HT(1A) receptors in astrocytes to protect dopaminergic neurons in Parkinsonian models. *Neurobiol Dis*. 2013; 59: 244-256.
120. Montana V, Ni Y, Sunjara V, Hua X, Parpura V. Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci*. 2004; 24(11): 2633-2642.
121. Montgomery DL. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet Pathol*. 1994; 31(2): 145-67.
122. Morel L, Chiang MSR, Higashimori H, Shoneye T, Iyer LK, Yelick J, Tai A, Yang Y. Molecular and functional properties of regional astrocytes in the adult brain. *J Neurosci*. 2017; 37(36): 8706-8717.
123. Mölders A, Koch A, Menke R, Klöcker N. Heterogeneity of the astrocytic AMPA-receptor transcriptome. *Glia*. 2018; 66(12): 2604-2616.
124. Muyderman H, Angehagen M, Sandberg M, Björklund U, Olsson T, Hansson E, Nilsson M. Alpha 1-adrenergic modulation of metabotropic glutamate receptor-induced calcium oscillations and glutamate release in astrocytes. *J Biol Chem*. 2001; 276(49): 46504-46514.
125. Namihira M, Kohyama J, Semi K, Sanosaka T, Deneen B, Taga T, Nakashima K. Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. *Dev Cell*. 2009; 16(2): 245-255.
126. Noriega-Prieto JA, Araque A. Sensing and regulating synaptic activity by astrocytes at tripartite synapse. *Neurochem Res*. 2021; 46(10): 2580-2585.
127. Nunez J. Primary culture of hippocampal neurons from P0 newborn rats. *J Vis Exp*. 2008; 19: 895.

128. Okubo Y, Iino M. Visualization of astrocytic intracellular Ca^{2+} mobilization. *J Physiol*. 2020; 598(9): 1671-1681.
129. Ding F, O'Donnell J, Thrane AS, Zeppenfeld D, Kang H, Xie L, Wang F, Nedergaard M. α 1-Adrenergic receptors mediate coordinated Ca^{2+} signaling of cortical astrocytes in awake, behaving mice. *Cell Calcium*. 2013; 54(6): 387-394.
130. Pachitariu M, Stringer C, Schröder S, Dipoppa M, Rossi LF, Carandini M, Harris KD. Suite2p: beyond 10,000 neurons with standard two-photon microscopy. *bioRxiv*. 2016; 061507.
131. Panatier A, Robitaille R. Astrocytic mGluR5 and the tripartite synapse. *Neuroscience*. 2016; 323: 29-34.
132. Pangršič T, Potokar M, Stenovec M, Kreft M, Fabbretti E, Nistri A, Pryazhnikov E, Khiroug L, Giniatullin R, Zorec R. Exocytotic release of ATP from cultured astrocytes. *J Biol Chem*. 2007; 282(39): 28749-28758.
133. Parpura V, Baker BJ, Jeras M, Zorec R. Regulated exocytosis in astrocytic signal integration. *Neurochem Int*. 2010; 57(4): 451-459.
134. Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*. 1994; 369(6483): 744-747.
135. Parpura V, Grubišić V, Verkhratsky A. Ca^{2+} sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813(5): 984-991.
136. Parpura V, Zorec R. Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev*. 2010; 63(1-2): 83-92.
137. Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci*. 1997; 17(20): 7817-7830.
138. Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*. 2009; 32(8): 421-431.
139. Peterson AR, Binder DK. Astrocyte glutamate uptake and signaling as novel targets for antiepileptogenic therapy. *Front Neurol*. 2020; 11: 1006.
140. Porter JT, McCarthy KD. GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroleptoligands with increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. *Glia*. 1995; 13(2): 101-112.
141. Porter JT, McCarthy KD. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol*. 1997; 51(4): 439-455.

142. Prada I, Marchaland J, Podini P, Magrassi L, D'Alessandro R, Bezzi P, Meldolesi J. REST/NRSF governs the expression of dense-core vesicle gliosecretion in astrocytes. *J Cell Biol.* 2011; 193(3): 537-549.
143. Pryazhnikov E, Khiroug L. Sub-micromolar increase in $[Ca^{2+}]_i$ triggers delayed exocytosis of ATP in cultured astrocytes. *Glia.* 2008; 56(1): 38-49.
144. Qiao L, Wang M, Jin Z. A method for EMCCD multiplication gain measurement with comprehensive correction. *Sci Rep.* 2021; 11(1): 6058.
145. Raff MC, Abney ER, Cohen J, Lindsay R, Noble M. Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics. *J Neurosci.* 1983; 3(6): 1289-1300.
146. Ray B, Chopra N, Long JM, Lahiri DK. Human primary mixed brain cultures: preparation, differentiation, characterization and application to neuroscience research. *Mol Brain.* 2014; 7: 63.
147. Reyes RC, Parpura V. The trinity of Ca^{2+} sources for the exocytotic glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int.* 2009; 55(1-3): 2-8.
148. Rosenberg PA, Knowles R, Knowles KP, Li Y. Beta-adrenergic receptor-mediated regulation of extracellular adenosine in cerebral cortex in culture. *J Neurosci.* 1994; 14(5 Pt 2): 2953-2965.
149. Rungta RL, Bernier LP, Dissing-Olesen L, Groten CJ, LeDue JM, Ko R, Drissler S, MacVicar BA. Ca^{2+} transients in astrocyte fine processes occur via Ca^{2+} influx in the adult mouse hippocampus. *Glia.* 2016; 64(12): 2093-2103.
150. Sahlender DA, Savtchouk I, Volterra A. What do we know about gliotransmitter release from astrocytes? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014; 369(1654): 20130592.
151. Sankaranarayanan S, De Angelis D, Rothman JE, Ryan TA. The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophys J.* 2000; 79(4): 2199-2208.
152. Sardar D, Lozzi B, Woo J, Huang TW, Cvetkovic C, Creighton CJ, Krencik R, Deneen B. Mapping astrocyte transcriptional signatures in response to neuroactive compounds. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(8): 3975.
153. Savtchouk I, Volterra A. Gliotransmission: Beyond black-and-white. *J Neurosci.* 2018; 38(1): 14-25.
154. Schildge S, Bohrer C, Beck K, Schachtrup C. Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. *J Vis Exp.* 2013; 71: 50079.

155. Schmoranz J, Gouliau M, Axelrod D, Simon SM. Imaging constitutive exocytosis with total internal reflection fluorescence microscopy. *J Cell Biol.* 2000; 149(1): 23-32.
156. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012; 9(7): 671-675.
157. Schools GP, Kimelberg HK. mGluR3 and mGluR5 are the predominant metabotropic glutamate receptor mRNAs expressed in hippocampal astrocytes acutely isolated from young rats. *J Neurosci Res.* 1999; 58(4): 533-543.
158. Schubert V, Bouvier D, Volterra A. SNARE protein expression in synaptic terminals and astrocytes in the adult hippocampus: a comparative analysis. *Glia.* 2011; 59(10): 1472-1488.
159. Sehgal P, Szalai P, Olesen C, Praetorius HA, Nissen P, Christensen SB, Engedal N, Møller JV. Inhibition of the sarco/endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} -ATPase by thapsigargin analogs induces cell death via ER Ca^{2+} depletion and the unfolded protein response. *J Biol Chem.* 2017; 292(48): 19656-19673.
160. Shigetomi E, Bushong EA, Hausteiner MD, Tong X, Jackson-Weaver O, Kracun S, Xu J, Sofroniew MV, Ellisman MH, Khakh BS. Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. *J Gen Physiol.* 2013; 141(5): 633-647.
161. Skowrońska K, Obara-Michlewska M, Zielińska M, Albrecht J. NMDA receptors in astrocytes: In search for roles in neurotransmission and astrocytic homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(2): 309.
162. Somjen GG. Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia.* 1988; 1(1): 2-9.
163. Song PP, Qi YM, Cai DC. Research and application of Autodesk Fusion360 in industrial design. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 2018; 359(1): 012037.
164. Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature.* 1993; 362(6418): 318-324.
165. Spray DC. In: Gap junctions in the nervous system. Spray DC, Dermietzel R, editors. Georgetown, TX: Landes; 1996. pp. 1-11.
166. Steinhäuser C, Gallo V. News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci.* 1996; 19(8): 339-345.

167. Stoppelkamp S, Riedel G, Platt B. Culturing conditions determine neuronal and glial excitability. *J Neurosci Methods*. 2010; 194(1): 132-138.
168. Stossi F, Singh PK. Basic image analysis and manipulation in ImageJ/Fiji. *Curr Protoc Mol Biol*. 2023; 3(7): e849.
169. Sugita S. Mechanisms of exocytosis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008; 192(2): 185-193.
170. Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*. 1998; 395(6700): 347-353.
171. Südhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci*. 2004; 27: 509-547.
172. Südhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science*. 2009; 323(5913): 474-477.
173. Szatkowski M, Barbour B, Attwell D. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature*. 1990; 348(6300): 443-446.
174. Tagliatti E, Bello OD, Mendonça PRF, Kotzadimitriou D, Nicholson E, Coleman J, Timofeeva Y, Rothman JE, Krishnakumar SS, Volynski KE. Synaptotagmin 1 oligomers clamp and regulate different modes of neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020; 117(7): 3819-3827.
175. Teleanu RI, Niculescu AG, Roza E, Vladăcenco O, Grumezescu AM, Teleanu DM. Neurotransmitters-Key factors in neurological and neurodegenerative disorders of the central nervous system. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(11): 5954.
176. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22(22): 4673-4680.
177. Urbina F, Gomez SM, Gupton SL. Spatiotemporal organization of exocytosis emerges during neuronal shape change. *J Cell Biol*. 2018; 217(3): 1113-1128.
178. Urbina F, Gupton SL. Automated detection and analysis of exocytosis. *J Vis Exp*. 2021; (175).
179. Vardjan N, Parpura V, Verkhratsky A, Zorec R. Gliocrine system: astroglia as secretory cells of the CNS. *Adv Exp Med Biol*. 2019; 1175: 93-115.
180. Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, Geuze HJ, Südhof TC. Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science*. 2000; 287(5454): 864-869.

181. Verkhratsky A. Patching the glia reveals the functional organisation of the brain. *Pflugers Archiv*. 2006; 453(3): 411-420.
182. Verkhratsky A, Matteoli M, Parpura V, Mothet JP, Zorec R. Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. *EMBO J*. 2016; 35(3): 239-257.
183. Virchow, R. Über die Nerven Kitt [On nerve glue]. *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin*. 1864.
184. von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol*. 2016; 524(18): 3865-3895.
185. Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Söllner TH, Rothman JE. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*. 1998; 92(6): 759-772.
186. Wen X, Saltzgaber GW, Thoreson WB. Kiss-and-run is a significant contributor to synaptic exocytosis and endocytosis in photoreceptors. *Front Cell Neurosci*. 2017; 11: 286.
187. Winship IR, Plaa N, Murphy TH. Rapid astrocyte calcium signals correlate with neuronal activity and onset of the hemodynamic response in vivo. *J Neurosci*. 2007; 27(23): 6268-6272.
188. Wolfes AC, Ahmed S, Awasthi A, Stahlberg MA, Rajput A, Magruder DS, Bonn S, Dean C. A novel method for culturing stellate astrocytes reveals spatially distinct Ca^{2+} signaling and vesicle recycling in astrocytic processes. *J Gen Physiol*. 2017; 149(1): 149-170.
189. Wu LG, Hamid E, Shin W, Chiang HC. Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu Rev Physiol*. 2014; 76: 301-331.
190. Yang J, Vitery MDC, Chen J, Osei-Owusu J, Chu J, Qiu Z. Glutamate-releasing SWELL1 channel in astrocytes modulates synaptic transmission and promotes brain damage in stroke. *Neuron*. 2019; 102(4): 813-827.
191. Yang Y, Higashimori H, Morel L. Developmental maturation of astrocytes and pathogenesis of neurodevelopmental disorders. *J Neurodev Disord*. 2013; 5(1): 22.
192. Zelentsova AS, Deykin AV, Soldatov VO, Ulezko AA, Borisova AY, Belyaeva VS, Skorkina MY, Angelova PR. P2X7 receptor and purinergic signaling: orchestrating mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *eNeuro*. 2022; 9(6).

193. Zeng S, Li B, Zeng S, Chen S. Simulation of spontaneous Ca^{2+} oscillations in astrocytes mediated by voltage-gated calcium channels. *Biophys J*. 2009; 97(9): 2429-1437.
194. Zhang Q, Pangrsic T, Kreft M, Krzan M, Li N, Sul JY, Halassa M, Van Bockstaele E, Zorec R, Haydon PG. Fusion-related release of glutamate from astrocytes. *J Biol Chem*. 2004; 279(13): 12724-12733.
195. Zhang Y, Barres BA. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr Opin Neurobiol*. 2010; 20(5): 588-594.
196. Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q, Wang W, Gu XS, Duan S. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol*. 2007; 9(8): 945-953.
197. Zhao YF, Tang Y, Illes P. Astrocytic and oligodendrocytic P2X7 receptors determine neuronal functions in the CNS. *Front Mol Neurosci*. 2021; 14: 641570.

11. Zestawienie własnych publikacji

Krupinski-Ptaszek A, Makowski A, **Mielnicka A**, Pawłowska M, Tenne R, Lapkiewicz R. Super-resolution microscopy based on the inherent fluctuations of dye molecules. arXiv:2401.00261. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2401.00261>.

Mielnicka A, Kołodziej T, Dziob D, Lasota S, Sroka J, Rajfur Z. Impact of elastic substrate on the dynamic heterogeneity of WC256 Walker carcinosarcoma cells. Sci Rep. 2023; 13(1): 15743. doi: 10.1038/s41598-023-35313-2. PMID: 37735532; PMCID: PMC10514059.

Kołodziej T, **Mielnicka A**, Dziob D, Chojnacka AK, Rawski M, Mazurkiewicz J, Rajfur Z. Morphomigrational description as a new approach connecting cell's migration with its morphology. Sci Rep. 2023; 13(1): 11006. doi: 10.1038/s41598-023-35827-9. PMID: 37419901; PMCID: PMC10328925.

Mielnicka A, Michaluk P. Exocytosis in astrocytes. Biomolecules. 2021; 11(9): 1367. doi: 10.3390/biom11091367. PMID: 34572580; PMCID: PMC8471187.

Tatoń G, Dziob D, **Mielnicka A**, Lisowski B, Rok T, Świątek M, Kuterba P, Rokita E. The influence of electromagnetic wave originating from WiFi router on water viscosity. Prz Elektrotech. 2018; 94(12): 278-280. doi: 10.15199/48.2018.12.64.