

mgr **KATARZYNA SKOWROŃSKA**

**Wpływ długotrwałego pobudzenia receptora NMDA
w hodowanych astrocytach mysich
na wybrane białka astrocytarne**

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

Promotor: Prof. dr hab. Jan Albrecht

Promotor pomocniczy: Dr inż. Marta Obara-Michlewska



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

Warszawa 2019

Wykaz publikacji autorki:

1. **Skowrońska K.**, Obara-Michlewska M., Zielińska M., Albrecht J. 2019. NMDA receptors in astrocytes: in search for roles in neurotransmission and astrocytic homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* 20(2): 309, (IF=4.183)
2. **Skowrońska K.**, Obara-Michlewska M., Czarnecka A., Dąbrowska K., Zielińska M., Albrecht J. 2019. Persistent overexposure to N-methyl-D-aspartate (NMDA) calcium-dependently downregulates glutamine synthetase, aquaporin 4 and Kir4.1 channel in mouse cortical astrocytes. *Neurotox Res.* 35(1): 271-280, (IF=3.311)
3. Dąbrowska K, **Skowrońska K.**, Popek M., Obara-Michlewska M., Albrecht J., Zielińska M. 2018. Roles of glutamate and glutamine transport in ammonia neurotoxicity: state of the art and question marks. *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug Targets.* 18(4): 306-315, (IF=2.013)

Część badań przeprowadzono we współpracy z:

1. Środowiskowym Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk
2. Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk

Autorka uzyskała środki finansowe w ramach:

Projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki PRELUDIUM 14 nr 2017/27/N/NZ3/02819
„Rola astrocytarnych receptorów NMDA w regulacji aktywności syntetazy glutaminy w hodowanych astrocytach mysich. Próba zdefiniowania wewnątrzastrocytarnych szlaków sygnałowych”.

Ponadto badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie doktorskiej były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu badawczego HARMONIA 4 (2013/08/M/NZ3/00869)



Niniejszą pracę dedykuję
Mojej Mamie i Śp. Dziadkowi Waldemarowi,
dzięki którym miałam możliwość kształcić się i zdobywać wiedzę,
którzy zawsze wierzyli w moje możliwości nawet wtedy, kiedy sama w siebie wątpiłam
i wytrwale wspierali przez wszystkie lata nauki.

*Dziękuję Mojemu Mężowi,
za zrozumienie dla wybranej przeze mnie ścieżki kariery
i pomoc bez której nie mogłabym łączyć pracy naukowej z macierzyństwem.*

*„Trzeba mieć wytrwałość i wiarę w siebie.
Trzeba wierzyć, że człowiek jest do czegoś zdolny i osiągnąć to za wszelką cenę.”*

Maria Skłodowska-Curie

*Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi, Panu Prof. dr hab. Janowi Albrechtowi,
za przyjęcie mnie do swojego zespołu i możliwość realizacji badań w Zakładzie Neurotoksykologii.
Dziękuję za inspirację do zgłębiania zagadnień naukowych, pełną zaangażowania pomoc o każdej porze dnia i
nocy, bezcenne wskazówki i rady – nie tylko naukowe.*

*Dziękuję za wsparcie, zaufanie i wiarę w moje możliwości. Miałam w życiu ogromne szczęście mogąc
realizować się zawodowo pod okiem takiego Mistrza, jakim jest Pan Profesor; był to dla mnie ogromny
zaszczyt i nauka, którą zapamiętam na zawsze.*

*Pragnę szczególnie podziękować Dr inż. Marcie Obarze-Michlewskiej za przekazaną wiedzę, poświęcony czas i
niezastąpioną pomoc na każdym etapie powstawania niniejszej pracy, a ponadto za życzliwość i uśmiech.*

Dziękuję pracownikom Zakładu Neurotoksykologii:

*Prof. dr hab. Magdalenie Zielińskiej za trafne uwagi, kreatywne podejście w poszukiwaniu rozwiązań
problemów biologicznych, dyskusje naukowe i wyrozumiałość,*

*Dr Annie Czarneckiej za owocną współpracę przy prowadzeniu badań nad akwaporyną 4, motywację,
profesjonalne rady, wsparcie i życzliwość,*

Dr hab. Monice Szelidze za pomoc metodologiczną,

Dr Krzysztofowi Milewskiemu za podzielenie się wiedzą o metodzie Western-blot,

Małgorzacie Bogacińskiej-Karaś za wprowadzenie w świat hodowli komórkowych,

Inez Fręsko za utrzymywanie przyjemnej atmosfery w Zakładzie,

Dorocie Rycko za pomoc w prowadzeniu spraw administracyjnych i życzliwość,

Dr Ewelinie Majewskiej za dzielenie wszystkich trosk i wsparcie,

Dr Mariuszowi Popkę za umiłanie czasu pracy muzyką,

*Doktorantom (Karolinie Orzeł, Markowi Pawlikowi, Krzysztofowi Borzęckiemu, Katarzynie Dąbrowskiej) za
wszystkie rozmowy, zwariowane pomysły oraz przyjacielską atmosferę.*

Dziękuję również wielu innym pracownikom Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN:

Dr Hannie Kozłowskiej za pokazanie fascynującego świata mikroskopii konfokalnej, nieocenioną pomoc w przeprowadzeniu badań immunocytohistochemicznych udokumentowanych w postaci zdjęć i filmów umieszczonych w tej rozprawie, wszystkie rozmowy i wsparcie.

Dr hab. Elżbiecie Ziemińskiej za podzielenie się wiedzą i doświadczeniem, a także za cenne wskazówki dotyczące techniki badania zmian stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego.

Dr Małgorzacie Beręsewicz za pomoc w uwidocznieniu sygnału na elektroforogramach.

Prof. dr hab. Joannie Sypeckiej i Aleksandrze Bilmin za współpracę w działaniach samorządu doktorantów podczas pełnienia przeze mnie funkcji przewodniczącej.

Dominice Masternak za wsparcie i ciepłe słowa.

Katarzynie Wyszowskiej, Katarzynie Woźniak, Katarzynie Okrąglińskiej-Młotek, Katarzynie Wróblewskiej, Annie Grzybek i Mirosławowi Rycko za nieocenioną pomoc w organizacji wydarzeń popularnonaukowych.

~

Dziękuję Dr Januszowi Dębskiemu ze Środowiskowego Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN za owocną współpracę i pomoc udzieloną przy analizie spektrometrii mas.

~

Dziękuję Prof. dr hab. Bożenie Kamińskiej-Kaczmarek z Pracowni Neurobiologii Molekularnej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN za użyczenie komórek mikrogleju mysiego.

~

Pragnę podziękować również mojej rodzinie za nieustające wsparcie, a szczególnie moim kuzynkom Anecie i Edycie za pomoc w obowiązkach rodzicielskich.

Bardzo serdecznie dziękuję.

Kasia

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	3
I. STRESZCZENIE	6
II. ABSTRACT	8
III. INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	10
IV. WSTĘP	11
IV.1. Charakterystyka receptora NMDA	12
IV.2. Receptor NMDA w astrocytach	18
IV.3. Syntetaza glutaminy – regulator cyklu glutaminian/glutamina	22
IV.4. Wybrane białka astrocytarne zaangażowane w regulację homeostazy wodno-jonowej	25
IV.4.1. Akwaporyna 4	25
IV.4.2. Kanał potasowy Kir4.1	28
IV.5. Transportery glutaminianu	32
V. HIPOTEZA I CELE PRACY	36
VI. MATERIAŁY I METODY	37
VI.1. Hodowle pierwotne korowych astrocytów mysich	37
VI.2. Badanie przeżywalności astrocytów	38
VI.3. Analiza immunocytochemiczna i analiza obrazu za pomocą mikroskopii konfokalnej i z kontrastem fazowym	38
VI.4. Izolacja RNA z hodowli komórkowych	40
VI.5. Pomiar stężenia oraz czystości RNA	40
VI.6. Reakcja odwrotnej transkrypcji	41
VI.7. Wyciszenie ekspresji podjednostki GluN1 NMDAR w astrocytach przy użyciu siRNA	41
VI.8. Analiza ilościowa ekspresji mRNA metodą PCR w czasie rzeczywistym	42
VI.9. Oznaczanie aktywności syntetazy glutaminy	43
VI. 10. Wychwyty D-[2,3- ³ H]-asparaginianu	44
VI. 11. Wiązanie [3- ³ H]-MK801	44
VI. 12. Badanie zmian stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego ([Ca ²⁺] _i)	45
VI. 13. Izolacja i analiza elektroforetyczna białek metodą Western-blot (WB)	47
VI. 14. Oznaczanie białka	48
VI. 14.1. Oznaczanie białka metodą Bradforda	48
VI. 14.2. Oznaczanie białka metodą BCA	49
VI.15. Identyfikacja białek za pomocą Spektrometrii Mas (MS)	49
VI.16. Analiza statystyczna	50
VII. WYNIKI	51
VII.1. Charakterystyka hodowli pierwotnych korowych astrocytów mysich	51
VII.1.1. Potwierdzenie obecności wybranych białek astrocytarnych	51
VII.1.2. Potwierdzenie obecności podjednostki GluN1 NMDAR na poziomie mRNA i białka	55

VII.2. Wpływ NMDA na przeżywalność (test MTT) pierwotnych korowych astrocytów mysich	57
VII.3. Wpływ wyciszenia podjednostki GluN1 (siGluN1) na poziom mRNA dla podjednostki GluN1 NMDAR w pierwotnych korowych astrocytach mysich	58
VII.4. Wpływ NMDA i Glu na poziom mRNA dla podjednostek NMDAR w pierwotnych korowych astrocytach mysich	58
VII.5. Badanie mechanizmu aktywacji NMDAR w pierwotnych korowych astrocytach mysich	59
VII.5.1. Wpływ NMDA lub Glu na wiązanie radioliganda [³ H]-MK801	59
VII.5.2. Wpływ NMDA, Glu, MK801 oraz wyciszenia podjednostki GluN1 (siGluN1) na zmiany [Ca ²⁺] _i	60
VII.5.2.1. <i>Pomiary uzyskane za pomocą mikroskopu semikonfokalnego</i>	60
VII.5.2.2. <i>Pomiary uzyskane za pomocą czytnika fluorescencji</i>	71
VII.6. Wpływ NMDA lub Glu na poziom mRNA, ekspresję białka i aktywność syntetazy glutaminy w pierwotnych korowych astrocytach mysich z niewyciszoną i wyciszoną podjednostką GluN1 (siGluN1): rola zewnątrzkomórkowego wapnia	72
VII.7. Wpływ NMDA na poziom mRNA i ekspresję białka kanału wodnego akwaporyny 4 w pierwotnych korowych astrocytach mysich z niewyciszoną i wyciszoną podjednostką GluN1 (siGluN1): rola zewnątrzkomórkowego wapnia	74
VII.8. Wpływ NMDA na poziom mRNA i ekspresję białka kanału potasowego Kir4.1 w pierwotnych korowych astrocytach mysich z niewyciszoną i wyciszoną podjednostką GluN1 (siGluN1): rola zewnątrzkomórkowego wapnia	75
VII.9. Wpływ NMDA lub Glu na poziom mRNA kodujących transportery glutaminianu: GLAST i GLT-1 w pierwotnych korowych astrocytach mysich	77
VII.10. Wpływ NMDA i Glu na wychwyt D-[2,3- ³ H]-asparagianu w pierwotnych korowych astrocytach mysich	78
VIII. DYSKUSJA	79
IX. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI	89
X. OPIS SUPLEMENTU	91
XI. BIBLIOGRAFIA	92
XI.1. E-źródła	112

WYKAZ SKRÓTÓW

[Ca ²⁺] _i	stężenie wapnia wewnątrzkomórkowego
Actb	β-aktyna
AD	choroba Alzheimera (ang. <i>Alzheimer's disease</i>)
ALS	stwardnienie zanikowe boczne (ang. <i>amyotrophic lateral sclerosis</i>)
AMPA	kwas α-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izooksazolopropionowy
AMPA	receptory AMPA
ANOVA	analiza wariancji (ang. <i>Analysis OF VAriance</i>)
AP5	selektywny antagonist receptoru NMDA (ang. <i>D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid</i>)
AQP	akwaporyna
ARE	element odpowiedzi antyoksydacyjnej jądrowego DNA (ang. <i>antioxidant response element</i>)
Asp	asparaginian
ATP	adenozyno-5'-trifosforan (ang. <i>adenosine triphosphate</i>)
BBB	bariera krew-mózg (ang. <i>blood-brain barrier</i>)
BCA	kwas bicinehoniczny (ang. <i>bicinchoninic acid</i>)
BDNF	neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BSA	albumina surowicy bydłczej (ang. <i>bovine serum albumine</i>)
CaMKII	zależna od Ca ²⁺ i kalmoduliny kinaza białkowa II
cAMP	cykliczny 3',5' adenyzyonomonofosforan (ang. <i>cyclic Adenosine MonoPhosphate</i>)
Cdk	kinaza zależna od cyklin
cDNA	komplementarny DNA (ang. <i>complementary DNA</i>)
CNQX	antagonista receptorów AMPA (ang. <i>6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione</i>)
cpm	liczba zliczeń sygnału na minutę (ang. <i>counts per minute</i>)
CREB	białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP (ang. <i>cAMP-response element binding protein</i>)
CTD	wewnątrzkomórkowa domena C-końcowa receptora NMDA (ang. <i>C-terminal domain</i>).
dBcAMP	dwumaślan cyklicznego 3',5' adenyzyonomonofosforanu (ang. <i>diButyryl cyclic Adenosine MonoPhosphate</i>)
DEPC	dietylopirowęglan
DL-TBOA	inhibitor transporterów Glu (ang. <i>DL-threo-beta-Benzoyloxyaspartate</i>)
DMEM	pożywka do hodowli komórkowych (ang. <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>)
DMSO	dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy
EAAT	transporter aminokwasów pobudzających (ang. <i>excitatory amino acid transporter</i>)
EAST/SeSAME	rzadki autosomalny zespół recesywny wywołany mutacjami w <i>Kcnj10</i> (ang. <i>Epilepsy, Ataxia, Sensorineural deafness and Tubulopathy</i>)
EDTA	kwas wersenowy; kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EpRE	element odpowiedzi elektrofilowej (ang. <i>electrophile response element</i>)
ER	siateczka śródplazmatyczna (ang. <i>endoplasmic reticulum</i>)
FBS	plodowa surowica bydłcza (ang. <i>fetal bovine serum</i>)
FOXO	podgrupa czynników transkrypcyjnych rodziny Forkhead (ang. <i>forkhead box O</i>)
GABA	kwas γ-aminomasłowy
GAPDH	dehydrogenaza fosforanu aldehydu glicerynowego (ang. <i>glyceraldehyde 3-phospho dehydrogenase</i>)
GDNF	czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego (ang. <i>glia-derived neurotrophic factor</i>)
GFAP	kwaśne białko włóknikowe gleju (ang. <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GGC	cykl glutaminian/glutamina (ang. <i>glutamate-glutamine cycle</i>)
GJ	połączenia szczelinowe (ang. <i>gap junction</i>)
GLAST	transporter glutaminowo-asparaginowy
Gln	glutamina
GLT-1	transporter glutaminianowy 1
Glu	glutaminian
Gly	glicyna
GS	syntetaza glutaminy (ang. <i>glutamine synthetase</i>)
GSH	glutation
HD	choroba Huntingtona (ang. <i>Huntington's disease</i>)

Hoechst	sonda fluoroscencyjna do barwienia jąder komórkowych
HP	struktura spinki do włosów (ang. <i>hairpin loops</i>)
HRP	peroksydaza chrzanowa (ang. <i>horseradish peroxidase</i>)
iGluR	jonotropowe receptory glutaminianu
IL-1 β	interleukina 1 β
IMDiK	Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
IP3R	receptor trisfosforanu inozytolu
KA	kwas kainowy
KAR	receptory kainianowe
Keap1	białko regulujące Nrf2 (ang. <i>Kelch-like ECH associated protein 1</i>)
Kir	dokomórkowy prostowniczy kanał potasowy (ang. <i>inwardly rectifying potassium channels</i>)
K _m	stała Michaelisa
KYNA	kwas kynureninowy (ang. <i>kynurenic acid</i>)
LBD	domena receptora NMDA wiążąca ligand (ang. <i>ligand-binding domain</i>),
LC-MS	technika analityczna wykorzystująca połączenie spektrometrii mas z chromatografią ciecząwą (ang. <i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>)
MCAo	trwała niedrożność tętnicy środkowej mózgu (ang. <i>permanent middle cerebral artery occlusion</i>)
mGluR	metabotropowe receptory glutaminianu
MK801	dizocyplina; antagonist receptoru NMDA blokujący jego kanał (ang. <i>5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo(a,d)cycloheptan-5,10-imine maleate</i>)
MMTS	metylotiometylosulfotlenek metylu (ang. <i>methanethiosulfonate</i>)
MS	Spektrometria Mas
mRNA	matrycowy RNA (ang. <i>messenger RNA</i>)
MTT	bromek 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylotetrazolu (ang. <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium</i>)
NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, forma zredukowana
NF200	neurofilament ciężki o masie molekularnej 200 kDa (ang. <i>200 kDa neurofilament protein</i>)
NGF	czynnik wzrostu nerwów (ang. <i>nerve growth factor</i>)
NGS	surowica kozia (ang. <i>normal goat serum</i>)
NMDA	kwas N-metylo-D-asparaginowy
NMDAR	receptor NMDA
NMO	zapalenie nerwu wzrokowego i rdzenia kręgowego (ang. <i>Neuromyelitis Optica</i>)
NPA	motyw asparagina-prolina-alanina
Nrf2	jądrowy czynnik (pochodzenia erytroidalnego) typu 2
NTD	zewnątrzkomórkowa domena N-końcowa receptora NMDA (ang. <i>N-terminal domain</i>)
o/n	przez noc (ang. <i>over night</i>)
OAP	ortogonalne układy cząstek (ang. <i>orthogonal arrays of particles</i>)
OD	gęstość optyczna (ang. <i>optical density</i>)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PAG	fosfozależna glutaminaza (ang. <i>phosphate activated glutaminase</i>)
PAN	Polska Akademia Nauk
PBS	roztwór soli fizjologicznej w buforze fosforanowym (ang. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PD	choroba Parkinsona (ang. <i>Parkinson's disease</i>)
PDK1	kinaza 1 zależna od fosfatydyloinozytolu
PI3K	kinaza 3-fosfatydyloinozytolu
PIP ₂	fosfatydyloinozytolo-4,5-bifosforan (ang. <i>phosphatidylinositol 4,5-biphosphate</i>)
PIP ₃	fosfatydyloinozytolo-3,4,5-trisfosforan
PKA	kinaza białkowa A
PKB	kinaza białkowa B
PKC	kinaza białkowa C
PLC	fosfolipaza C
QUIN	kwas chinolinowy, agonista NMDAR (ang. <i>quinolinic acid</i>)
RIPA	bufor lizujący komórki (ang. <i>radio-immunoprecipitation assay</i>)
RMP	blonowy potencjał spoczynkowy (ang. <i>resting membrane potential</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy
ROI	obszar wybrany do liczenia zmian stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego (ang. <i>region of interest</i>)
RT	temperatura pokojowa (ang. <i>room temperature</i>)

Wykaz skrótów

Real-Time PCR	PCR w czasie rzeczywistym (ang. <i>real-time PCR</i>)
SCA	ataksja rdzeniowo-mózdkowa (ang. <i>spinocerebellar ataxia</i>)
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
SDS	dodecylosiarczan sodu (ang. <i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SDS-PAGE	elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (ang. <i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SERCA	zależne od ATP kanały wapniowe w siateczce śródplazmatycznej (ang. <i>sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase</i>)
SFK	kinazy z rodziny Src
siRNA	małe interferujące RNA (ang. <i>small interfering RNA</i>)
TBS-T	buforowany roztwór soli TRIS, z dodatkiem Tween-20 (ang. <i>tris-buffered saline with Tween-20</i>)
TCEP	tris(2-karboksyetylo)fosfina (ang. <i>tris(2-carboxyethyl)phosphine</i>)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TFA	kwas trifluorooctowy
TLE	padaczka skroniowa (ang. <i>temporal lobe epilepsy</i>)
TM	transbłonowa domena transportera dla glutaminianu
TMD	transbłonowa domena receptora NMDA tworząca kanał (ang. <i>transmembrane domain</i>)
TNF- α	czynnik martwicy nowotworu (ang. <i>tumor necrosis factor</i>)
TTX	tetradotoksyna (ang. <i>tetradotoxin</i>)
V _{max}	szybkość maksymalna wychwytu
WB	Western blot

I. STRESZCZENIE

Receptor *N*-metylo-D-asparaginowy (NMDAR), podtyp jonotropowego receptora dla glutaminianu (Glu), odgrywa kluczową rolę w fizjologii i patologii ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Przez długi czas badania roli NMDAR w OUN dotyczyły wyłącznie receptorów zlokalizowanych w neuronach. W ostatnich latach udowodniono obecność NMDAR w astrocytach, jednakże ich rola w metabolizmie i funkcji tych komórek jest słabo poznana. Pobudzenie astrocytarnego NMDAR generuje prądy jonowe i prowadzi do akumulacji Ca^{2+} wewnątrz astrocytów, co może zachodzić w sposób kanoniczny, jonotropowy, tzn. poprzez napływ zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} i/lub pochodzić ze źródeł wewnątrzkomórkowych, na drodze mechanizmu metabotropowego.

Rolę astrocytarnego NMDAR w fizjologii i patologii mózgu zaczęto poznawać dopiero od bardzo niedawna. Badania na szczurzych hodowlach mieszanych astrocytarno-neuronalnych wykazały, że aktywacja astrocytarnego NMDAR wywołuje efekt neuroprotekcyny, stymulując syntezę i uwalnianie przeciwutleniających prekursorów glutationu (GSH) z astrocytów do neuronów poprzez wewnątrzkomórkowy szlak sygnalizacyjny NMDAR-Cdk5-Nrf2. Istnieje niewiele danych literaturowych, w których analizowano odpowiedzi NMDAR w astrocytach na bodźce patogene. Dotychczas wykazano, że astrocytarne NMDAR pośredniczą w zwiększonym wydzielaniu cytokin prozapalnych w komórkach poddanych stymulacji zapalnej, promują wydzielanie β -NGF w hipokampie po traktowaniu amyloidem β 1-40 i przyczyniają się do zwiększenia stężenia Ca^{2+} w astrocytach poddanych długotrwałej ekspozycji na amoniak. Ponadto, badania przeprowadzone wcześniej w Zakładzie Neurotoksykologii IMDiK PAN wykazały, że długotrwała stymulacja NMDAR w hodowanych astrocytach szczurzych obniża ekspresję Kir4.1, dokomórkowego prostowniczego kanału potasowego swoistego dla astrocytów, co wskazuje na zaangażowanie astrocytarnego NMDAR w stanach patologicznych mózgu związanych z zaburzeniami homeostazy jonów.

Bazując na tym ostatnim doniesieniu, postawiliśmy hipotezę, że długotrwała stymulacja astrocytarnego NMDAR może również indukować zmiany w ekspresji innych białek astrocytarnych, krytycznych dla utrzymania homeostatycznych funkcji astrocytów w OUN.

Głównym celem rozprawy było zbadanie wpływu długotrwałego pobudzenia NMDAR w hodowanych astrocytów mysich na ekspresję syntetazy glutaminy (GS), akwaporyny 4 (AQP4) i Kir4.1. Autentyczność interakcji NMDA z NMDAR, zweryfikowano badając efekt NMDA w hodowlach astrocytów z wyciszoną podjednostką GluN1 NMDAR, która jest niezbędna do połączenia innych podjednostek NMDAR i utworzenia funkcjonalnego kanału receptora. Ponadto zmierzono aktywność GS w astrocytach eksponowanych na NMDA, aby ocenić, czy zmiany w ekspresji tego białka skutkują jego zmienioną funkcją. Aby ocenić, czy mamy do czynienia z mechanizmem

jonotropowym, traktowanie NMDA przeprowadzano w obecności i pod nieobecność Ca^{2+} w pożywce hodowlanej. W celu sprawdzenia, czy efekty NMDAR są wybiórcze dla badanych białek astrocytarnych, czy może dotyczą wszystkich białek swoistych dla tych komórek, zbadano wpływ traktowania NMDA na astrocytarne transportery Glu: GLAST i GLT-1. Badania nad efektami długotrwałymi poprzedzono analizą wpływu krótkotrwałego pobudzenia NMDAR na wewnątrzkomórkowy przepływ wapnia.

Krótkotrwałe traktowanie NMDA wywoływało wzrost stężenia Ca^{2+} wewnątrzkomórkowego w astrocytach w sposób angażujący interakcję NMDA z NMDAR, bowiem odpowiedź była blokowana przez bloker kanału receptora, MK801, a ponadto nie wystąpiła w komórkach z wyciszoną podjednostką GluN1 NMDAR. Po raz pierwszy wykazaliśmy, że NMDA powoduje wzrost wiązania [^3H]-MK801 w hodowanych astrocytach, a więc efekt, który może mieć miejsce tylko wówczas, gdy receptor został uprzednio zaktywowany. Przeprowadzona analiza immunocytochemiczna ujawniła błonową lokalizację podjednostki GluN1 NMDAR w astrocytach. Dodatkowo użycie specyficznego siRNA dla podjednostki GluN1 NMDAR potwierdziło swoistość uzyskanego wyniku. Ekspresję podjednostki GluN1 NMDAR na poziomie białka wykazała także przeprowadzona analiza metodą Western-blot.

Długotrwała ekspozycja astrocytów na NMDA obniżyła ekspresję trzech specyficznych dla astrocytów białek - GS, AQP4 oraz Kir4.1. Co więcej, wykazano, że obniżenie ekspresji GS przekłada się na zahamowanie aktywności tego enzymu. Zniesienie zmian wywołanych przez NMDA poprzez wyciszenie podjednostki GluN1 NMDAR pozytywnie zweryfikowało specyficzne oddziaływanie NMDA z NMDAR. Obniżona ekspresja GS, AQP4 i Kir4.1 zależała od obecności Ca^{2+} w pożywce hodowlanej, co wskazuje, że efekt ten został wywołany na drodze jonotropowej. Jednocześnie wykazano, że regulacja przez NMDAR nie jest uniwersalna dla wszystkich białek astrocytarnych; traktowanie NMDA powodowało podwyższenie ekspresji mRNA dla GLAST, nie wpływając na ekspresję mRNA dla GLT-1, oraz znacznie obniżało zdolność astrocytów do wychwytu D-asparagianu (niemetabolizowanego analogu Glu).

W sumie, w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że hodowane astrocyty mysie posiadają funkcjonalny NMDAR, którego pobudzenie indukuje zależny od obecności wapnia zewnątrzkomórkowego mechanizm przekazywania sygnału do wnętrza komórki, w postaci napływu Ca^{2+} . Fakt, że długotrwała ekspozycja astrocytów *in vitro* na NMDA obniżała ekspresję trzech białek astrocytarnych, krytycznych w utrzymaniu homeostazy jonowej (Kir4.1), wodnej (AQP4) i zachowaniu równowagi neuroprzekazników (GS), dokumentuje udział astrocytarnego NMDAR w plastycznej odpowiedzi astrocytów na sygnał ekscytotoksyczny. W zależności od charakteru i czasu działania czynnika patogenego, indukowane przez NMDAR zmiany w funkcji astrocytów mogą mieć skutki neuroprotektoryjne bądź neuropatogenne.

II. ABSTRACT

The *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR), a subtype of the ionotropic glutamate (Glu) receptor, plays a critical role in physiology and pathology of the central nervous system (CNS). For a long time, the interpretation of the role of NMDAR in the CNS has almost exclusively accounted for receptors located in neurons.

The role of astrocytic NMDAR in the brain physiology and pathology has only begun to be understood. Recently, the presence of NMDAR in astrocytes has been proven, however their role in the metabolism and function of these cells is poorly understood. The stimulation of astrocytic NMDAR generates currents and leads to the accumulation of Ca^{2+} in astrocytes, which may occur by a canonical, ionotropic manner, i.e. by the inflow of extracellular Ca^{2+} and/or originate from intracellular sources, *via* the metabotropic mechanism. Studies in rat astrocyte-neuronal co-cultures have shown that activation of the astrocytic NMDAR induces a neuroprotective effect, stimulating the synthesis and release of the antioxidant glutathione (GSH) precursors from astrocytes to neurons *via* the intracellular NMDAR-Cdk5-Nrf2 signaling pathway. There are few literature data, in which responses of NMDAR in astrocytes to pathogenic stimuli were analyzed. So far, astrocytic NMDAR have been shown to mediate increased secretion of the proinflammatory cytokines in the cells subjected to inflammatory stimulation, promote the secretion of β -NGF in the hippocampus after treatment with amyloid β 1-40 and contribute to the increased Ca^{2+} concentrations in astrocytes subjected to the long-term exposure to ammonia. In addition, previous studies in the Department of Neurotoxicology IMDiK PAN have shown that long-term stimulation of NMDAR in cultured rat astrocytes downregulates the expression of the Kir4.1, an astroglia-specific inward rectifying potassium channel, indicating the involvement of astrocytic NMDAR in brain pathological conditions associated with disturbances of ion homeostasis.

Basing on this finding we hypothesized that the long-term, excessive stimulation of astrocytic NMDAR may also induce alterations in the expression of other astrocytic proteins critical for maintenance of homeostatic functions of astrocytes in the CNS.

The main aim of the dissertation was to examine the effect of long-term stimulation of NMDAR in cultured mouse astrocytes on the expression of glutamine synthetase (GS), aquaporin-4 (AQP4) and Kir4.1. The authenticity of the NMDA interaction with NMDAR was verified by investigating the NMDA effect in astrocytes with silenced GluN1 subunit of NMDAR. GluN1 is essential for the assembly of other NMDAR subunits and the formation of a functional NMDAR channel. In addition, GS activity in NMDA-exposed astrocytes was measured to analyze whether changes in the expression of this protein alter its function. To test whether the ionotropic mechanism is involved in observed changes, the NMDA treatment was carried out in the presence and absence of Ca^{2+} in the incubation medium. To check whether NMDAR effects are selective for examined

astrocytic proteins or whether they also affect other astrocytic specific proteins, the effect of NMDA treatment on astrocytic Glu transporters: GLAST and GLT-1 was examined. The study of long-term effects was preceded by the analysis of the effect of short-term NMDAR stimulation on intracellular calcium flow.

The short-term treatment of NMDA caused an increase of intracellular Ca^{2+} concentration in astrocytes in a way involving NMDA interaction with NMDAR, because the response was blocked by the receptor channel blocker, MK801, and it did not occur in cells with a silenced GluN1 subunit. For the first time, we have shown that NMDA causes an increase of [^3H]-MK801 binding in cultured astrocytes, an effect that can only occur if the receptor has been preactivated. Immunocytochemical analysis confirmed the presence of the GluN1 subunit of NMDAR and revealed its membrane localization in astrocytes, moreover use of specific siRNA for the GluN1 subunit warranted the specificity of the obtained result. Additionally, expression of the GluN1 subunit at the protein level was affirmed by Western blot analysis.

The long-term exposure of astrocytes to NMDA decreased the expression of three astroglia-specific proteins - GS, AQP4 and Kir4.1. Moreover, downregulation of GS expression was translated to the decreased enzyme activity. The abolition of the NMDA-induced changes by silencing the GluN1 subunit of NMDAR positively verified the dependence of the changes on specific interaction of NMDA with NMDAR. The dependence of the decrease of GS, AQP4 and Kir4.1 content on the presence of calcium in the incubation medium, indicated that this effect was induced by the ionotropic mechanism. Moreover, it has been demonstrated that the mechanism of regulation by NMDAR differs for astroglia-specific proteins; NMDA treatment increased expression of GLAST mRNA without affecting the expression of GLT-1 mRNA, but significantly reduced the ability of astrocytes to D-aspartate uptake (an unmetabolisable Glu analogue).

In summary, the results of this dissertation demonstrate that cultured mouse astrocytes possess functional NMDAR, the stimulation of which induces an ionotropic mechanism of signal transduction to the cell, in the form of an influx of Ca^{2+} . The fact that long-term exposure of astrocytes *in vitro* to NMDA decreased the expression of three astrocytic proteins, critical in maintaining of ion (Kir4.1), water (AQP4) homeostasis and the balance of neurotransmitters (GS), documented the participation of astrocytic NMDAR in the response of astrocytes to the excitotoxic signal. Depending on the nature and the duration of the pathogenic factor, NMDAR-induced changes in astrocyte function may be either neuroprotective or neuropathogenic.

III. INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. Po raz pierwszy i jednoznacznie udokumentowano obecność funkcjonalnego NMDAR w hodowanych astrocytach mysich.
2. Udowodniono, że długotrwałe pobudzenie NMDAR moduluje ekspresję białek astrocytarnych: GS, AQP4 i Kir4.1 w kierunku obniżenia ich udziału w utrzymaniu homeostazy wodno-jonowej i neuroprzekaznikowej w OUN.
3. Wykazano, iż skutki długotrwałego pobudzenia NMDAR w hodowanych astrocytach są zależne od dostępności wapnia zewnątrzkomórkowego, a tym samym odzwierciedlają jonotropowy charakter działania receptora.

IV. WSTĘP

Obecność komórek glejowych w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) udokumentowano już w połowie XIX wieku [Virchow 1858, Parpura i Verkhratsky, 2012]. Od chwili ich wykrycia do całkiem niedawna uważano, że komórki te zapewniają troficzne i strukturalne wsparcie dla neuronów, nie uczestnicząc bezpośrednio w przekazywaniu sygnałów [Verkhratsky i Butt, 2013]. Dopiero od mniej więcej dwóch dekad uważa się, że komórki glejowe aktywnie współuczestniczą w neuroprzekaznictwie. Astrocyty, będące typem komórek glejowych, odgrywają kluczową rolę w regulacji aktywności neuronów w mózgu. Są usytuowane przestrzennie pomiędzy neuronami i naczyniami krwionośnymi. Tworząc trójdzielne synapsy w połączeniu z presynaptycznymi i postsynaptycznymi neuronami regulują homeostazę jonową i wodną, a także zapewniają równowagę metaboliczną poprzez usuwanie gromadzących się podczas aktywności neuronalnej neuroprzekazników [pobudzającego - glutaminianu (Glu), hamującego - kwasu γ -aminomasłowego (GABA) i glicyny (Gly)] oraz wydzielają różne substancje neuroaktywne, w tym glioprzekazniki [adenozyno-5'-trifosforan - ATP (ang. *adenosine triphosphate*), D-seryna], czynniki neurotroficzne [czynnik wzrostu nerwów – NGF (ang. *nerve growth factor*), neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego – BDNF (ang. *brain-derived neurotrophic factor*), czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego – GDNF (ang. *glia-derived neurotrophic factor*)] i cytokiny [czynnik martwicy nowotworu - TNF- α (ang. *tumor necrosis factor*) i interleukina 1 β - IL-1 β] [Araque i wsp., 1999, Parpura i Zorec, 2010, Devinsky i wsp., 2013]. W ciągu ostatnich 20 lat udokumentowano nową rolę astrocytów jaką jest przenoszenie i przechowywanie informacji w mózgu. Astrocyty nie tylko rejestrują aktywność synaptyczną za pośrednictwem receptorów błonowych, ale także reagują na nią poprzez wewnątrzkomórkową sygnalizację wapniową (zmiany stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} - $[Ca^{2+}]_i$). Odkrycia te umocniły koncepcję synapsy trójdzielnej, w której astrocyty traktuje się jako aktywnych uczestników przekazywania informacji między neuronami [Perea i wsp., 2009, Santello i wsp., 2012, Perea i wsp., 2014].

Funkcjom neuromodulacyjnym astrocytów sprzyja ich uorganizowanie w syncytium, w którym kontaktują się za pośrednictwem połączeń szczelinowych (GJ; ang. *gap junction*) [Araque i wsp., 1999, Ma i wsp., 2016]. Przestrzenne domeny astrocytów kształtują dla każdej komórki obszar niezależnych interakcji z otaczającymi synapsami [Mitterauer, 2010]. Oszacowano, że pojedynczy korowy astrocyt plasuje się między 4 a 8 ciałami neuronów i kontaktuje się z 300-600 dendrytami [Halassa i wsp., 2007] i $\sim 100\ 000$ synaps [Bushong i wsp., 2002]. Strategiczne umiejscowienie i organizacja astrocytów korowych w określone domeny pozwala im brać udział we wszystkich aspektach fizjologii mózgu, w tym w regulacji przepływu krwi [Paulson i Newman, 1987], transmisji synaptycznej [Buskila i Amitai, 2010], regulacji metabolicznej [Tsacopoulos i Magistretti, 1996], utrzymaniu homeostazy jonowej [Wallraff i wsp., 2006] oraz - jak proponują badacze z grupy

Nedergaard - usuwaniu z OUN zbędnych bądź zgromadzonych w nadmiarze metabolitów, m.in. z udziałem swoistego kanału wodnego - akwaporyny 4 (AQP4) [Iliff i wsp., 2012, Jessen i wsp., 2015]. Ponadto interakcja astrocytów z neuronami pozwala na poziomie lokalnym regulować pobudliwość neuronów [Nedergaard i wsp., 2003]. W sumie, zmiany w organizacji domen astrocytarnych mają znaczący wpływ na transmisję synaptyczną [Oberheim i wsp., 2008]. Astrocyty są składnikiem połączeń nerwowo-naczyniowych, mających kluczowe znaczenie dla tworzenia i utrzymywania bariery krew-mózg (BBB; ang. *blood-brain barrier*), która zapewnia homeostazę jonową i metaboliczną OUN [Abbott i wsp., 2010].

Głównym neuroprzekaźnikiem pobudzającym w OUN jest Glu, który spełnia swoje funkcje poprzez aktywację specyficznych receptorów błonowych, jak również z udziałem transporterów Glu. W układzie nerwowym wyróżnia się dwa rodzaje receptorów dla Glu: a) sprzężone z białkami G receptory metabotropowe (mGluR), b) receptory jonotropowe (iGluR) [Kew i Kemp, 2005]. Receptory iGluR są kanałami jonowymi bramkowanymi przez Glu. Po związaniu Glu z zewnątrzkomórkową domeną tych receptorów, następuje zmiana ich konformacji w celu umożliwienia przepływu kationów przez błonę plazmatyczną. Wyróżnia się trzy typy iGluR, których nazwy pochodzą od ich egzogennych, selektywnych agonistów [Hollmann i Heinemann, 1994, Ozawa i wsp., 1998, Kessels i Malinow, 2009]:

- a) AMPA - α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izooksazolopropionowe,
- b) KA - kainianowe,
- c) NMDA - *N*-metylo-*D*-asparaginowe.

Przedmiotem niniejszej dysertacji jest wpływ aktywacji receptorów NMDA (NMDAR) zlokalizowanych na astrocytach na ekspresję i/lub aktywność wybranych białek astrocytarnych: syntetazy glutaminy (GS), AQP4 i prostowniczego kanału potasowego swoistego dla astrocytów (Kir4.1). Zaobserwowane efekty wstępnie porównano z wpływem pobudzenia NMDAR na ekspresję swoistych astrocytarnych transporterów Glu: GLAST i GLT-1.

IV.1. Charakterystyka receptora NMDA

Dotychczasowy stan wiedzy o strukturze i funkcji NMDAR pochodzi z badań nad NMDAR obecnymi na komórkach nerwowych. Można je kategoryzować zgodnie z ich lokalizacją jako receptory synaptyczne i pozasynaptyczne (ang. *extrasynaptic*) [Tovar i Westbrook, 2002, Petralia i wsp., 2010, Gladding i Raymond, 2011]. Receptory te charakteryzują się wysoką przepuszczalnością dla jonów Ca^{2+} , które odgrywają ważną rolę w wielu aspektach funkcjonowania komórek organizmów wyższych. Ich obecność jest konieczna do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania mózgu, ale ich nadaktywność bądź obniżona aktywność są również związane z ostrą i przewlekłą neurodegeneracją,

zespołami bólu neuropatycznego i zaburzeniami rozwojowymi, takimi jak schizofrenia i autyzm [Paoletti i wsp., 2013].

Aktywacja neuronalnych NMDAR może być toksyczna dla neuronów lub promować ich przetrwanie i plastyczność. Nadmierna aktywacja NMDAR wywołana przedłużoną ekspozycją neuronów na Glu aktywuje neurotoksyczne szlaki transdukcji sygnału prowadzące do degeneracji neuronów i ich śmierci, w której pośredniczy napływ Ca^{2+} do komórki przez kanały jonowe sprzężone z receptorami NMDAR [Rothman i Olney, 1995]; innymi słowy, nadmierna aktywacja NMDAR może powodować ekscytotoksyczność [Tapia, 1996]. Z drugiej strony, aktywność synaptycznych NMDAR jest kluczowa dla przeżycia neuronów, a blokowanie aktywności NMDAR *in vivo*, szczególnie podczas rozwoju, powoduje ich apoptozę [Ikonomidou i wsp., 1999, Hetman i Kharebava, 2006]. Konsekwencje stymulacji synaptycznego i pozasynaptycznego NMDAR są diametralnie różne. Stymulowanie synaptycznych NMDAR aktywuje szlak sygnalizacyjny prowadzący do aktywacji czynnika transkrypcyjnego CREB (białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP; ang. *cAMP-response element binding protein*) i promuje przeżycie, podczas gdy aktywacja pozasynaptycznych NMDAR jest niezbędna dla transmisji synaptycznej i plastyczności [Shin i Linden, 2005], zwiększa aktywność sieci neuronalnej [Garcia-Munoz i wsp., 2015], indukuje zmiany w synaptycznych receptorach AMPA (AMPA) [Sun i June, 2007], jak również może osłabiać szlak sygnalizacyjny z udziałem CREB oraz promować śmierć komórki [Hardingham i Bading, 2010]. Synaptyczne NMDAR inicjują fizjologiczną regulację efektywności transmisji synaptycznej [Petralia i wsp., 2010, Paoletti i wsp., 2013]. Pośredniczą one również w szlaku sygnalizacji wapniowej do jądra komórkowego, gdzie następuje aktywacja ekspresji genów krytycznych dla długoterminowego wdrażania adaptacji behawioralnych [West i Greenberg, 2011, Bading, 2013]. Co więcej, synaptyczne NMDAR silnie aktywują neuronalne geny odpowiedzialne za ochronę ich struktury i przetrwanie [Zhang i wsp., 2007, Mauceri i wsp., 2011]. Przeciwnie do nich, aktywowane pozasynaptyczne NMDAR uruchamiają szlaki prowadzące do śmierci komórki, inicjując patologiczną triadę związaną z dysfunkcją mitochondrialną, deregulacją transkrypcji oraz utratą integralności i łączności struktur neuronalnych [Hardingham i Bading, 2010]. Tym samym patologiczna aktywacja pozasynaptycznych NMDAR powoduje wzajemne potęgowanie się upośledzeń, co przyczynia się do progresji stanu chorobowego, prowadząc zarówno do obniżenia zdolności poznawczych, jak i do wzrostu deficytów w produkcji energii komórkowej, co kończy się śmiercią komórki [Bading, 2017].

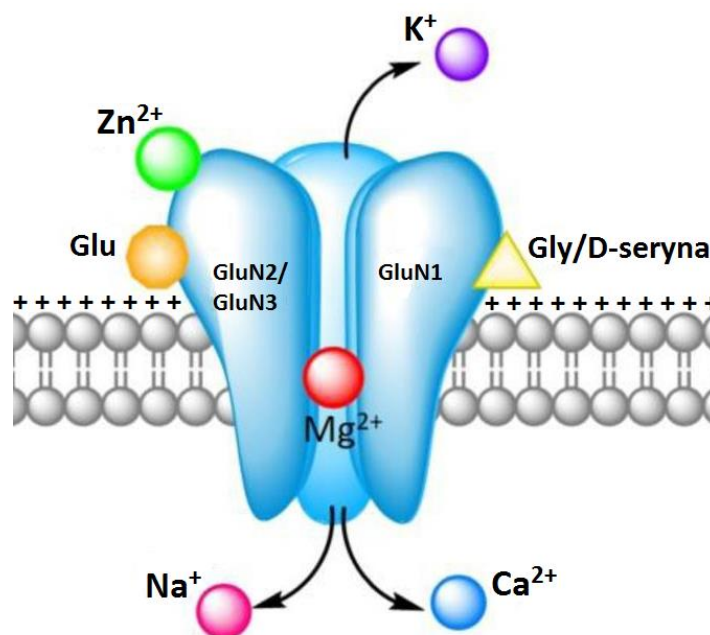
NMDAR dominują w hipokampie, korze mózgowej, jądrach podstawy, przegrodzie i jądrze migdałowatym. Odgrywają kluczową rolę w rozwoju OUN, generowaniu rytmów oddychania i lokomocji oraz procesów leżących u podstaw transmisji synaptycznej, uczenia się, pamięci i neuroplastyczności [Verkhatsky i Kirchhoff, 2007, Hunt i Castillo, 2012]. W związku z tym nieprawidłowe poziomy ekspresji i zmieniona funkcja NMDAR są związane z licznymi zaburzeniami

neurologicznymi i stanami patologicznymi. Obniżona aktywność NMDAR może prowadzić do zaburzeń funkcji poznawczych, podczas gdy nadmierna stymulacja powoduje ekscytotoksyczność i jest zaangażowana w patogenezę szeregu zaburzeń neurologicznych [Lipton, 2006]. Dlatego NMDAR są ważnymi celami terapeutycznymi dla wielu zaburzeń OUN, takich jak niedotlenienie, niedokrwienie spowodowane np. udarem, choroba Huntingtona (HD; ang. *Huntington's disease*), Parkinsona (PD; ang. *Parkinson's disease*) i Alzheimerera (AD; ang. *Alzheimer's disease*), padaczka, ból neuropatyczny, alkoholizm, schizofrenia i zaburzenia nastroju [Kemp i McKernan, 2002, Jansen i Dannhardt, 2003, Chazot, 2004, Farlow, 2004, Wood, 2005, Brown i Krupp, 2006, Cai, 2006, Missale i wsp., 2006].

NMDAR jest kompleksem czterech podjednostek białkowych penetrujących błonę komórkową, tworzących w ten sposób kanał przepuszczalny dla jonów Na^+ , K^+ oraz Ca^{2+} . Pobudzenie NMDAR skutkuje napływem jonów Ca^{2+} i Na^+ do wnętrza komórki, oraz uwolnieniem jonów K^+ na zewnątrz (Ryc. 1). NMDAR jest kanałem kationowym o częściowej selektywności do przewodzenia Ca^{2+} . Napływ Ca^{2+} przez NMDAR aktywuje różne wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne. Powszechnie wiadomo, że szlaki te uczestniczą m.in. w przeżywaniu, rozwoju i różnicowaniu neuronów. Z drugiej strony wiadomo również, że nadmierna i trwała aktywacja NMDAR może skutkować ekscytotoksycznością, wywołaną przez nadmiar Ca^{2+} i aktywacją szlaków wewnątrzkomórkowych, które prowadzą do śmierci neuronów [Aarts i Tymianski, 2003, Hardingham i Bading, 2010]. Te zależne od Ca^{2+} wewnątrzkomórkowego szlaki aktywowane przez NMDAR definiowane są również terminem niekanoniczny mechanizm metabotropowy [Schwarzschild i wsp., 1999, Dore i wsp., 2016, Weiler i wsp., 2016].

Przepuszczalność kanału NMDAR w neuronach zależy od potencjału błony neuronalnej i od obecności ligandów (agonistów, antagonistów i koagonistów). Podwójne bramkowanie odróżnia je od pozostałych iGluR. Obok miejsca wiążącego dla endogennych agonistów i ich kompetycyjnych antagonistów, NMDAR zawiera również miejsce wiązania dla Gly, która pełni rolę koagonisty, a więc jej obecność jest niezbędna do pełnego pobudzenia receptora. W warunkach potencjału spoczynkowego błony kanał receptora jest zablokowany przez znajdujące się w nim jony Mg^{2+} , które znacznie hamują przepływ jonów [Mayer i wsp., 1984]. Podczas depolaryzacji błony, na skutek pobudzenia, Mg^{2+} jest uwalniany, co umożliwia aktywację receptora. Aktywacja neuronalnych NMDAR i otwarcie kanału receptora wymaga związania agonisty – Glu z podjednostką GluN2 oraz koagonisty – Gly lub D-seryny z GluN1 [Traynelis i wsp., 2010], a także depolaryzacji błony postsynaptycznej, w której znajduje się receptor, w celu usunięcia jonu Mg^{2+} blokującego kanał, czyli tzw. bloku magnezowego [Mayer i wsp., 1984]. NMDAR są również wrażliwe na jony Zn^{2+} , H^+ i inne cząsteczki np. poliaminy (spermina, spermidyna). Receptory te posiadają również szereg miejsc allosterycznych, do których przyłączają się inne ligandy (np. ifenprodil, Ro25-6981, TCN 201,

związki UBP, pochodne ang. *quinazolin-4-one*, siarczan pregnenolonu, tetrahydroizochinolina) modulujące jego aktywność [Zhu i Paoletti, 2015].



Ryc.1 Aktywacja receptora NMDA. Przekrojowy schemat receptora NMDA przedstawiający wiązanie Glu w podjednostce GluN2 i koagonistów Gly lub D-seryny w podjednostce GluN1 z jednoczesną depolaryzacją błony i zwolnieniem bloku magnezowego. Po aktywacji receptora jony Ca²⁺ i Na⁺ przenikają do komórki, a jony K⁺ z niej wypływają. Zmodyfikowano wg Barr i Burdette [2017].

Strukturalnie NMDAR są heterotetramerami, stanowiącymi kombinację czterech z siedmiu rodzajów podjednostek (GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A, GluN3B). NMDAR zawierają dwie podjednostki GluN1 wiążące Gly (lub D-serynę), połączone z jedną lub dwiema podjednostkami GluN2 wiążącymi Glu. Podjednostka GluN3, która również wiąże Gly (lub D-serynę), może zastąpić jedną podjednostkę GluN2. Klasyczne neuronalne NMDAR zbudowane są z dwóch GluN1 i dwóch GluN2A lub GluN2B [Cull-Candy i Leszkiewicz, 2004, Rambhadran i wsp., 2010, Hogan-Cann i Anderson, 2016]. Skład podjednostkowy neuronalnych receptorów synaptycznych i pozasynaptycznych jest podobny, z tym, że oprócz posiadania wspólnej podjednostki GluN1, pozasynaptyczne NMDAR zawierają preferencyjnie podjednostkę GluN2B, podczas gdy GluN2A jest dominującą podjednostką w synaptycznych NMDAR [Paoletti i wsp., 2013].

Kompozycja podjednostek odpowiada za specyficzne farmakologiczne i biofizyczne właściwości tych receptorów, dlatego podlega ścisłej regulacji. Ponadto wpływa na przewodnictwo jonowe, powinowactwo agonisty, wrażliwość na modulację allosteryczną, charakterystykę desensytyzacji receptora i powiązanie z wewnątrzkomórkowymi związkami pośredniczącymi w sygnalizacji [Paoletti i wsp., 2013]. NMDAR posiadające podjednostki GluN2C/D są mniej wrażliwe na blokowanie kanałów przez Mg²⁺ niż te z GluN2A/B, a połączenie podjednostki GluN3 z GluN2 i GluN1 dodatkowo zmniejsza wrażliwość na Mg²⁺ i ogranicza przepuszczalność Ca²⁺ [Chatterton i

wsp., 2002, Traynelis i wsp., 2010, Paoletti, 2011]. Wszystkie siedem podjednostek NMDAR podlega alternatywnemu splicingowi, który może również wpływać na funkcję kanału, a złożoność strukturalna jest dodatkowo potęgowana przez obecność specyficznych miejsc regulatorowych, które wiążą wiele modulatorów allosterycznych, takich jak Zn^{2+} , H^+ , poliaminy, związki utleniające i redukujące [Traynelis i wsp., 2010].

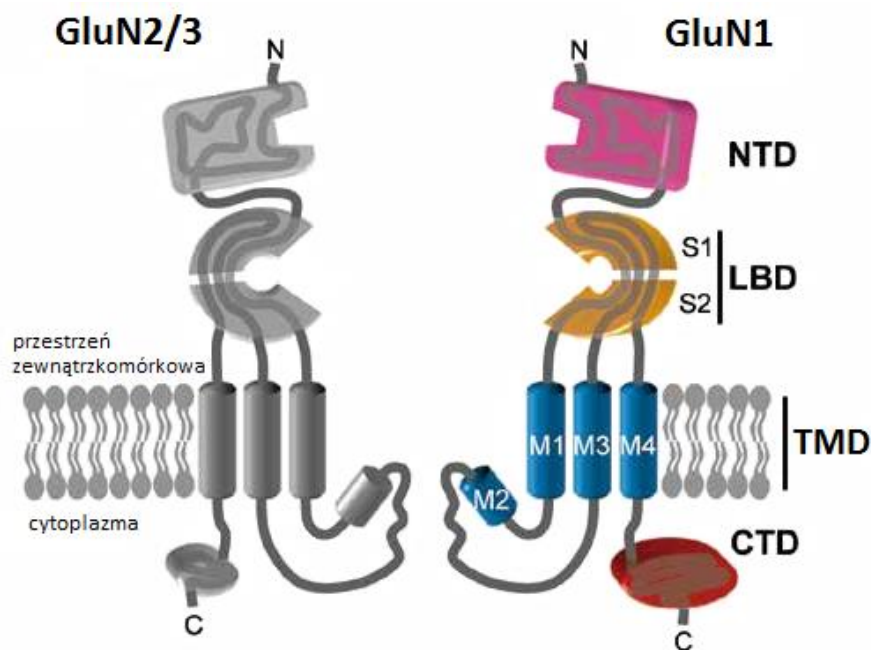
Podjednostka GluN1 jest podjednostką niezbędną do ukształtowania receptora, przyłączania pozostałych podjednostek i jego funkcjonalnej aktywności [Fukaya i wsp., 2003, Atlason i wsp., 2007, Schüler i wsp., 2008]. Kodowana jest przez gen *Grin1*, i jako jedyna z podjednostek jest obecna we wszystkich opisanych dotychczas podtypach NMDAR. GluN1 odgrywa kluczową rolę w tworzeniu NMDAR w siateczce śródplazmatycznej (ER; ang. *endoplasmic reticulum*), gdzie reguluje uwolnienie receptora z ER [Ju i Cui, 2016]. Istnieje osiem różnych elementów GluN1, generowanych przez alternatywny splicing pojedynczego genu [Dingledine i wsp., 1999, Paoletti i Neyton, 2007]. Ponadto istnieją cztery geny GluN2 (*Grin2 a-d*) i dwa geny GluN3 (*Grin3 a-b*) [Cull-Candy i Leszkiewicz, 2004], które podlegają wielu potranslacyjnym modyfikacjom generując warianty molekularne nadające NMDAR określone właściwości funkcjonalne. Podjednostki GluN1 i GluN2A są wszechobecne, GluN2B występuje w przodomózgowiu, GluN2C w mózdzku, a GluN2D ulega ekspresji głównie na wczesnym etapie rozwoju i ogranicza się do pnia mózgu, śródmózgowia i wzgórza [Paoletti i Neyton, 2007]. Różnorodność podjednostek pozwala także na tworzenie NMDAR o zróżnicowanej budowie, w wyniku czego powstają receptory o odmiennych właściwościach biofizycznych.

NMDAR podlegają różnym modyfikacjom potranslacyjnym, które bezpośrednio wpływają na funkcję kanału. Podjednostki NMDAR zawierają miejsca glikozylacji, palmitoilacji, S-nitrozytacji i fosforylacji [Traynelis i wsp., 2010]. Kinazy serynowo-treoninowe, takie jak kinaza białkowa A (PKA), kinaza białkowa C (PKC) oraz zależna od Ca^{2+} i kalmoduliny kinaza białkowa II (CaMKII) fosforylują reszty na wewnątrzkomórkowym końcu C podjednostek GluN1 i GluN2 [Dingledine i wsp., 1999], a kinazy z rodziny Src (SFK) fosforylują podjednostkę GluN2 na resztach tyrozyny [Salter i Kalia, 2004]. Chociaż działanie kinaz białkowych na funkcję NMDAR nie zostało jak dotąd w pełni scharakteryzowane, wydaje się, że PKC nasila przewodnictwo kanału NMDAR poprzez redukcję bloku Mg^{2+} [Chen i Huang, 1992]. Podobnie, aktywność kinazy Src może zwiększać bramkowanie kanału poprzez stabilizację NMDAR na powierzchni komórki [Salter i Kalia, 2004]. Poza różnorodnością strukturalną i efektami modyfikacji potranslacyjnych na kanoniczną aktywność kanału NMDAR, istnieje również niezależna od kanału sygnalizacja NMDAR [Kessels i wsp., 2013, Nabavi i wsp., 2013]. Tak zwane niekanoniczne metabotropowe mechanizmy sygnalizacji mogą zależeć od aktywnej rekrutacji kinazy Src [Weilinger i wsp., 2016], jednak zrozumienie funkcjonalnego znaczenia tych szlaków jest w fazie początkowej.

Każda podjednostka NMDAR jest podzielona na cztery funkcjonalne domeny (Ryc. 2):

- zewnątrzkomórkową domenę N-kończową (NTD; ang. *N-terminal domain*),
- domenę wiążącą ligand (LBD; ang. *ligand-binding domain*),
- domenę transbłonową tworzącą kanał (TMD; ang. *transmembrane domain*),
- wewnątrzkomórkową domenę C-kończową (CTD; ang. *C-terminal domain*).

W obrębie domeny TMD podjednostki wyróżnia się także cztery segmenty białkowe: M1 - M4, które są krytyczne dla komunikacji między domenami i bramkowania [Talukder i wsp., 2010, Kazi i wsp., 2013]. Trzy segmenty białkowe (M1, M3, M4) są rozmieszczone blisko siebie i jednocześnie oddzielone długim łącznikiem od czwartego segmentu (M2). Segment M2 tworzy w błonie pętlę i stanowi ścianę kanału jonowego. Ma on kluczowe znaczenie dla przepuszczalności kanału dla jonów Ca^{2+} oraz jego blokady przez jony Mg^{2+} i inne substancje. Pozostałe segmenty M są zakotwiczone w błonie. Domena LBD składa się z zewnątrzkomórkowego segmentu S1, znajdującego się przed M1, i segmentu S2 umieszczonego pomiędzy M3 i M4 (Ryc. 2). Domena NTD znajduje się na zewnątrz w N-końcu względem S1, a domena CTD znajduje się wewnątrz komórki (Ryc. 2). Domena NTD wykazuje homologię z domenami wiążącymi mGluR, co sugeruje, że tworzy ona strukturę wiążącą ligand, odmienną od domeny wiążącej agonistę S1-S2. Domena NTD w podjednostkach GluN2 wiąże jony Zn^{+} (GluN2A) lub poliaminy (GluN2B), które modulują funkcję NMDAR [Vyklicky i wsp., 2014].



Ryc.2 Budowa receptora NMDA z uwzględnieniem budowy podjednostki receptora. Każda podjednostka posiada domenę NTD, LBD, TMD i CTD. Widok poziomy dwóch z czterech podjednostek receptora. Zmodyfikowano wg Strehlow i wsp., [2015].

W NMDAR region zewnątrzkomórkowy zbudowany jest z ok. 500 aminokwasów, natomiast wewnątrzkomórkowa domena C-końcowa zbudowana jest w przypadku podjednostek GluN1 i GluN3 z 200 aminokwasów, a GluN2 z 500 aminokwasów. Region zewnątrzkomórkowy tworzą dwie funkcjonalne domeny: NTD, która jest zaangażowana w interakcję molekularną podjednostek i LBD, która z kolei w ścisłej interakcji z pętlą zewnątrzkomórkową S2 tworzy miejsce wiązania ligandu – Glu w podjednostce GluN2 i Gly lub D-seryny w podjednostce GluN1 i GluN3 (Ryc. 1) [Rambhadrán i wsp., 2010]. Wewnątrzkomórkowa domena CTD pośredniczy w molekularnych oddziaływaniach NMDAR, regulujących jego właściwości funkcjonalne, na przykład w synapsie z białkami gęstości postsynaptycznej, które pośredniczą w tworzeniu klastrów molekularnych [Traynelis i wsp., 2010, Paoletti i wsp., 2013].

IV.2. Receptor NMDA w astrocytach

Badania prowadzone w ostatnich trzech dekadach wykazały, że astrocyty posiadają receptory dla różnych neuroprzekaźników, które pozwalają im reagować na sygnały pochodzące z neuronów. Dowiedziono, że astrocyty posiadają receptory jonotropowe i metabotropowe dla Glu. Od lat przedmiotem debaty są obecność, a w szczególności rola NMDAR w tych komórkach [Montes de Oca Balderas i González Hernández, 2018]. Kontrowersje budzi głównie fakt, że astrocyty nie generują potencjałów czynnościowych jak neurony, ale także to, że NMDAR w astrocytach prezentują cechy nieobserwowane w neuronalnych NMDAR. Począwszy od lat 90. XX wieku, obecność NMDAR została zidentyfikowana w różnych nieneuronalnych komórkach OUN, w tym w wielu typach komórek glejowych [Müller i wsp., 1993, Conti i wsp., 1996, Wang i wsp., 1996, Kaur i wsp., 2006] i komórkach śródbłonna naczyń mózgowych [Krizbai i wsp., 1998, Sharp i wsp., 2003, Parfenova i wsp., 2003, András i wsp., 2007]. Pojawiające się dane sugerują, że receptory te mogą być odpowiedzialne za różne funkcje fizjologiczne, w tym mielinizację, wrażliwość na ból i stan zapalny.

Pierwsze prace, wykonane przy użyciu metod o znacznie mniejszej czułości i rozdzielczości niż obecnie stosowane, nie potwierdzały obecności NMDAR w astrocytach. W badaniach tych, podawanie NMDA do hodowli astrocytów szczurzych nie wywoływało ani odpowiedzi elektrycznej, ani gromadzenia Ca^{2+} w komórce [Bowman i Kimelberg, 1984, Kettenmann i Schachner, 1985, Pearce i wsp., 1986, Backus i wsp., 1989, Usowicz i wsp., 1989, Dani i wsp., 1992, Holzwarth i wsp., 1994, Seifert i Steinhäuser, 1995]. Z czasem jednak pojawiły się dane eksperymentalne dokumentujące ich obecność w tych komórkach. Wykazano ekspresję mRNA dla podjednostek GluN1, GluN2A i GluN2B w hodowli astrocytów mysich [Zhou i wsp., 2010] i szczurzych [Jimenez-Blasco i wsp., 2015]. Ponadto liczne dane literaturowe, w tym najnowsza baza transkrypcyjna opublikowana przez zespół Barres'a, informują, że astrocyty izolowane z myszy posiadają wszystkie podjednostki NMDAR na różnych poziomach ekspresji, z przeważającą ilością GluN1, GluN2C i

GluN3A [Cahoy i wsp., 2008, Rusnakova i wsp., 2013 Orre i wsp., 2014, Zhang i wsp., 2014, Dzamba i wsp., 2015]. Transkrypty dla wszystkich siedmiu podjednostek NMDAR (tj. GluN1, GluN2A-D i GluN3A, B) znaleziono w hodowanych astrocytach szczurzych [Montes de Oca Balderas i Aguilera, 2015] i ludzkich [Lee i wsp., 2010b].

Różne grupy badawcze próbowały udokumentować obecność podjednostek NMDAR w astrocytach za pomocą technik histologicznych. Pierwsze badania z użyciem technik hybrydyzacji *in situ* i mikroskopii elektronowej, wykazały brak ekspresji mRNA dla podjednostki GluN1 NMDAR w astrocytach kory mózgowej dorosłych szczurów [Conti i wsp., 1994]. Nieco później, wykorzystując technikę immunohistochemii w połączeniu z mikroskopią elektronową przeprowadzono barwienie astrocytów pochodzących z różnych okolic mózgu przeciwciałami anti-GluN1 [Farb i wsp., 1995, Gracy i Pickel, 1995, Conti i wsp., 1996, Petralia i wsp., 1996, van Bockstaele i Colago, 1996], anti-GluN2A/B [Conti i wsp., 1996, Petralia i wsp., 1996] wykazując ekspresję tych podjednostek na poziomie białka. Ekspresja białka GluN2C została udokumentowana w astrocytach pochodzących od myszy linii Grin2C^{tm1(EGFP/cre/ERT2)Wtsi} [Ravikrishnan, 2018]. Stosując barwienie immunochemiczne wykazano ekspresję podjednostki GluN1 [Krebs i wsp., 2003, Zhou i wsp., 2010] i GluN2B [Krebs i wsp., 2003, Zhou 2010, Gerard i Hansson, 2012] w hodowanych astrocytach mysich i szczurzych, GluN3A w korowych astrocytach myszy [Dzamba i wsp., 2015] oraz wszystkich siedmiu podjednostek w hodowanych astrocytach szczurzych [Montes de Oca Balderas i Aguilera, 2015] i ludzkich [Lee i wsp., 2010b].

Późniejsze dane literaturowe wykazały obecność NMDAR zbudowanych z podjednostek GluN1, GluN2B i GluN2C w sortowanych astrocytach kory mózgu myszy i szczura, zdolnych do generowania sygnału wapniowego po stymulacji NMDA (100μM), który z kolei był blokowany przez MK801 (dizocylpina; antagonistą NMDAR blokujący kanał receptora) [Schipke i wsp., 2001, Morquette i wsp., 2015]. Wykazano także, że w korowych astrocytach szczurzych NMDAR ulegają aktywacji przez Glu [Zhang i wsp. 2003] i NMDA [Hu i wsp., 2004]. Mocnych dowodów na istnienie NMDAR w astrocytach dostarczyła grupa Verkhratsky'ego wykazująca, że korowe astrocyty mysie posiadają funkcjonalne NMDAR, zdolne do generowania sygnałów Ca²⁺, które pośredniczą w komunikacji neuron-astrocyt [Lalo i wsp., 2006].

Przyjmuje się, że w astrocytach NMDAR zbudowane są z dwóch podjednostek GluN1, jednej GluN2C/2D i jednej GluN3 [Palygin i wsp. 2011]. Wykazano, że tak zbudowane NMDAR charakteryzują się zmniejszoną przepuszczalnością Ca²⁺ i słabą podatnością kanału na blok magnezowy, nawet przy ujemnym błonowym potencjale spoczynkowym [Káradóttir i wsp., 2005, Lalo i wsp., 2006, Burzomato i wsp., 2010, Palygin i wsp., 2011]. Badania farmakologiczne wykazały, że NMDAR w astrocytach mogą być utworzone przez różne podjednostki, co nadaje im określone właściwości funkcjonalne. Różnorodność podjednostek i wiele potranslacyjnych i

potranskrypcyjnych modyfikacji sugeruje, że funkcja NMDAR jest bardzo złożona. Choć jak wspomniano powyżej astrocyty posiadają funkcjonalne NMDAR, których aktywacja skutkuje pojawieniem się wewnątrzkomórkowego sygnału wapniowego [Schipke i wsp., 2001, Lalo i wsp., 2006, Lee i wsp., 2010b, Palygin i wsp., 2010], dokładny mechanizm ich funkcjonowania oraz rola w fizjologii i patologii mózgu nadal pozostają niejasne. Dotychczasowe badania nie rozstrzygają czy aktywność astrocytarnego NMDAR jest zależna czy też niezależna od obecności wapnia na zewnątrz komórki.

Astrocytarne NMDAR mogą odgrywać istotną rolę w patologii OUN, i jako takie mogą stać się celem nowych strategii terapeutycznych. Pierwszy dowód sugerujący, że astrocytarne NMDAR mogą odgrywać rolę w rozwoju reaktywnych astrocytów, a zatem w patologii, stanowiło wykazanie, że ekspresja podjednostek GluN2A i GluN2B NMDAR wzrasta w reaktywnych astrocytach hipokampa szczura po przejściowym niedokrwieniu [Gottlieb i Matute, 1997, Krebs i wsp., 2003]. Obecność mRNA dla wszystkich podjednostek NMDAR wykazano w korowych astrocytach u myszy także po niedokrwieniu w modelu trwałej niedrożności tętnicy środkowej mózgu (MCAo; ang. *permanent middle cerebral artery occlusion*) [Dzamba i wsp., 2015]. Po stymulacji NMDA (4–100 mM) astrocyty *in vivo* generowały sygnał wapniowy wrażliwy na AP5 (selektywny antagonist NMDAR, wiąże się do miejsca wiązania Glu na GluN2) i memantynę (niekompetycyjny antagonist NMDAR blokujący receptory zawierające podjednostki GluN2C i GluN2D), który uległ obniżeniu po niedokrwieniu mózgu. Ponadto odpowiedź na NMDA (500 μ M) była obniżona także w hodowanych astrocytach izolowanych od myszy z niedokrwieniem wywołanym MCAo [Dzamba i wsp., 2015].

Astrocytarne NMDAR mogą być zaangażowane w procesy zapalne w OUN. W hodowanych astrocytach reaktywna astroglejoza charakteryzuje się proliferacją fenotypu związanego z uwalnianiem Glu, wytwarzaniem cytokin i reaktywnych związków tlenu [Sofroniew, 2009], a astrocytarne NMDAR mogą przyczyniać się do transformacji morfologicznych charakterystycznych dla reaktywnej astrogliozy [Ting i wsp., 2009] i pośredniczyć w uwalnianiu cytokin prozapalnych [Gerard i Hansson, 2012].

Gerard i Hansson jako pierwsi zasugerowali, że w hodowanych astrocytach szczurzych aktywacja NMDAR przez NMDA indukuje wypływ Ca^{2+} z ER. Co ciekawe, odpowiedź ta ulegała obniżeniu w astrocytach hodowanych w pożywce bezwapniowej lub zawierającej jony Cd^{2+} . Ponadto, zastosowanie kofeiny (moduluje uwalnianie Ca^{2+} ze źródeł wewnątrzkomórkowych; aktywuje receptory rianodynowe [Ehrlich i wsp., 1994, Simpson i wsp., 1995] i jest inhibitorem receptora trifosforanu inozytolu - IP3R [Parker i Ivorra, 1991, Brown i wsp., 1992, Bezprozvanny i wsp., 1994, Ehrlich i wsp., 1994]) i tapsygarginy [inhibitor zależnych od ATP kanałów wapniowych w ER (SERCA; ang. *sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase*)] obniżało odpowiedź na NMDA o 90%. Połączenie kofeiny i tapsygarginy z pożywką bezwapniową całkowicie zablokowało odpowiedź na

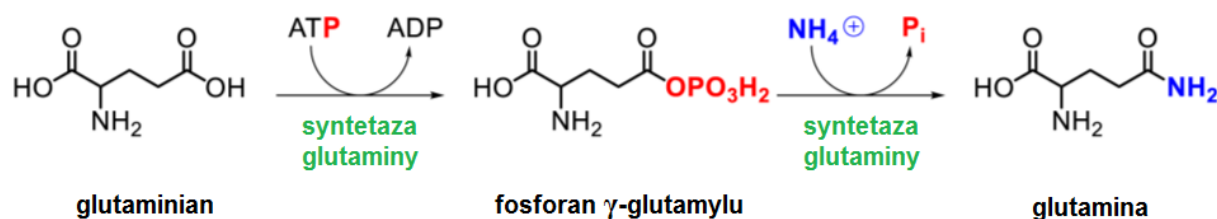
NMDA, co wskazuje, że źródłem Ca^{2+} były zasoby wewnątrzkomórkowe. Z kolei, ksestospongina C (inhibitor IP3R) znacząco (80%) zmniejszyła odpowiedź w postaci sygnału wapniowego, a dodana w pożywce bezwapniowej prawie całkowicie ją zahamowała, wskazując na występowanie metabotropowego (tzn. związanego z uwalnianiem Ca^{2+} z zasobów wewnątrzkomórkowych) mechanizmu sygnalizacji [Gerard i Hansson, 2012]. Dowodów na to, że astrocytarne NMDAR mogą działać poprzez niekanoniczne, metabotropowe szlaki sygnałowe dostarczyli również Montes de Oca Balderas i Aguilera, którzy w swych badaniach wykazali, że hodowane astrocyty szczurze posiadają NMDAR zdolne do generowania sygnału wapniowego z wewnątrzkomórkowych zasobów, w których pośredniczą receptory IP3 i rianodynowe, jak sugerowali Gerard i Hansson. Jednak, w przeciwieństwie do pracy Gerarda i Hansson, odpowiedź na NMDA była niezależna od jonotropowej (tzn. zależnej od Ca^{2+} zewnątrzkomórkowego) aktywności receptora, gdyż zastosowany bloker kanału NMDAR - MK801 i pożywka bezwapniowa nie blokowały sygnału wapniowego [Montes de Oca Balderas i Aguilera, 2015]. Obserwacje te mogą pomóc wyjaśnić początkowe odkrycia w hodowanych astrocytach, w których odnotowano brak sygnału wapniowego lub odpowiedzi elektrofizjologicznej na niskie stężenia NMDA. Niemniej jednak nadal nie zbadano mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za niekanoniczną funkcję NMDAR.

Ostatnio wykazano również, że stymulacja NMDAR w astrocytach generuje sygnał wapniowy w mieszanych hodowlach astrocytarno-neuronalnych zarówno w pożywce standardowej i bezwapniowej [Jimenez-Blasco i wsp., 2015]. Natomiast inkubacja z tapsygarginą całkowicie zablokowała odpowiedź na NMDA, co świadczy o uwalnianiu wapnia z puli wewnątrzkomórkowej. Ponadto długotrwała ekspozycja astrocytów na NMDA ($20\mu\text{M}$, 8h) prowadziła do aktywacji wewnątrzkomórkowych mechanizmów aktywujących Nrf2 [jądrowy czynnik (pochodzenia erytroidalnego) typu 2], za pośrednictwem szlaku PLC/PKC/p35/Cdk5 (zależna od cyklin kinaza 5), co prowadziło do zwiększonego uwalniania przez astrocyty prekursorów glutationu (GSH) do współhodowanych neuronów. Dzięki temu neurony były odporne na stres oksydacyjny i NMDA. Traktowanie NMDA aktywowało także transkrypcję genów docelowych dla Nrf2, zaangażowanych w odpowiedź antyoksydacyjną [Jimenez-Blasco i wsp., 2015].

Badania przeprowadzone w Zakładzie Neurotoksykologii IMDiK PAN na astrocytach szczurzych wykazały, że 72-godzinna ekspozycja na Glu lub NMDA [$100\mu\text{M}$] obniża ekspresję białka Kir4.1 odgrywającego istotną rolę w utrzymaniu homeostazy wodno-jonowej w OUN [Obara-Michlewska i wsp., 2015]. W związku z tym pojawiła się hipoteza zakładająca, że NMDAR na astrocytach mogłyby również brać udział w regulacji ekspresji innych białek astrocytarnych. Charakterystykę wybranych białek o kluczowym znaczeniu dla funkcji biologicznej astrocytów przedstawiono w rozdziałach IV.3 – IV.5.

IV.3. Syntetaza glutaminy – regulator cyklu glutaminian/glutamina

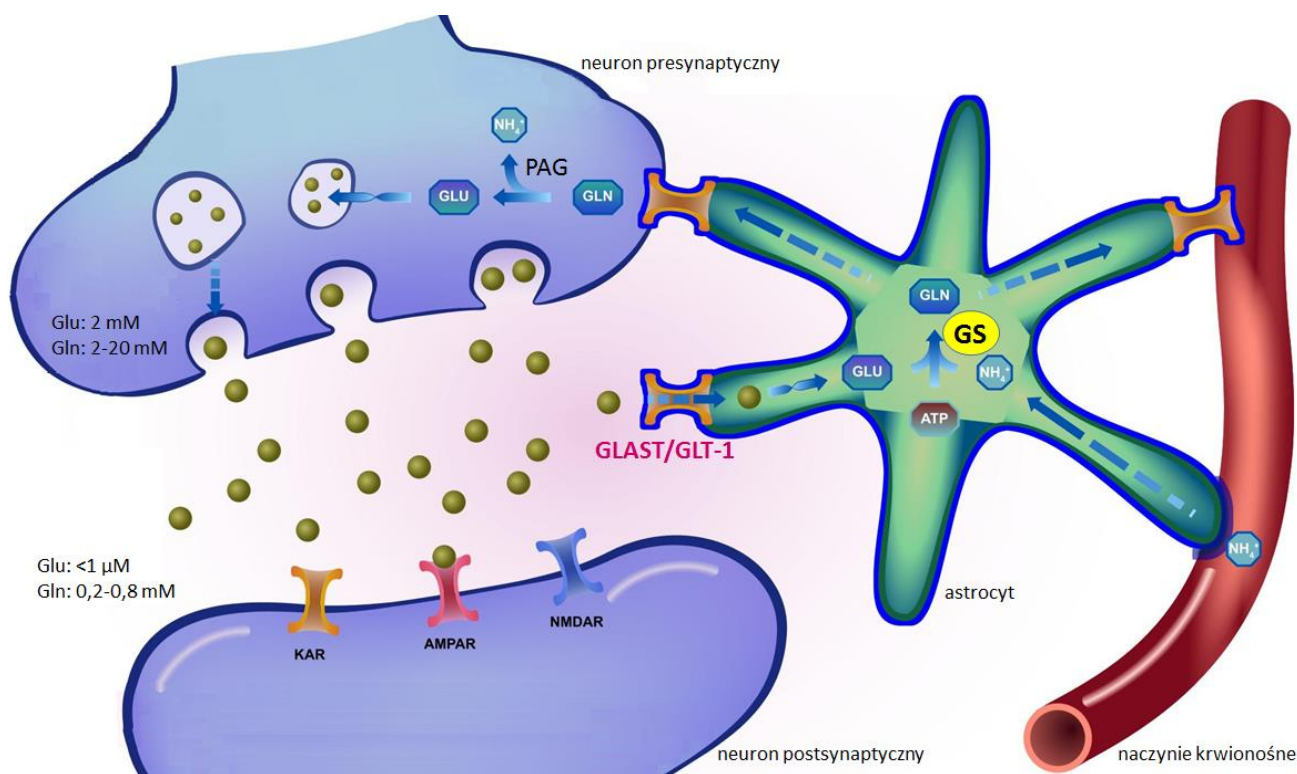
Syntetaza glutaminy (GS; ang. *glutamine synthetase*) (EC 6.3.1.2) to specyficzny dla astrocytów enzym zależny od ATP, który katalizuje tworzenie się glutaminy (Gln) z Glu i amoniaku w dwuetapowej reakcji (Ryc. 3) [Häussinger, 1990, Listrom i wsp., 1997, Eisenberg i wsp., 2000]. Szybkość reakcji enzymatycznej zależy od dostępności kofaktora (jony metali dwuwartościowych), podaży substratu oraz poziomów ekspresji i aktywności GS [Häberle i wsp., 2006].



Ryc.3 Reakcja syntezy glutaminy. Schematyczne przedstawienie dwuetapowej reakcji katalizowanej przez GS z wytworzeniem Gln przy użyciu Glu, ATP i amoniaku jako substratów. Fosforan pochodzący z ATP jest przedstawiony na czerwono, a amoniak na niebiesko. Zmodyfikowano wg Spodenkiewicz i wsp., [2016].

Gln, jako najobficiej dostępny wolny aminokwas w organizmie człowieka, odgrywa główną rolę w istotnych szlakach metabolicznych, takich jak metabolizm azotu, detoksykacja amoniaku, homeostaza kwasowo-zasadowa, regulacja osmotyczna oraz sygnalizacja wewnątrzkomórkowa i proliferacja komórek [Curi i wsp., 2005, Solbu i wsp., 2005, Häussinger i Schliess, 2007, Albrecht i wsp., 2010, Soeters i Grecu, 2012, Cooper i Jeitner, 2016]. Gln w OUN jest syntetyzowana prawie wyłącznie w astrocytach [Martinez-Hernandez i wsp., 1977], a jej stężenie w płynie mózgowo-rdzeniowym jest wielokrotnie wyższe (517 μM) niż któregośkolwiek innego aminokwasu [Dolgodilina i wsp., 2016].

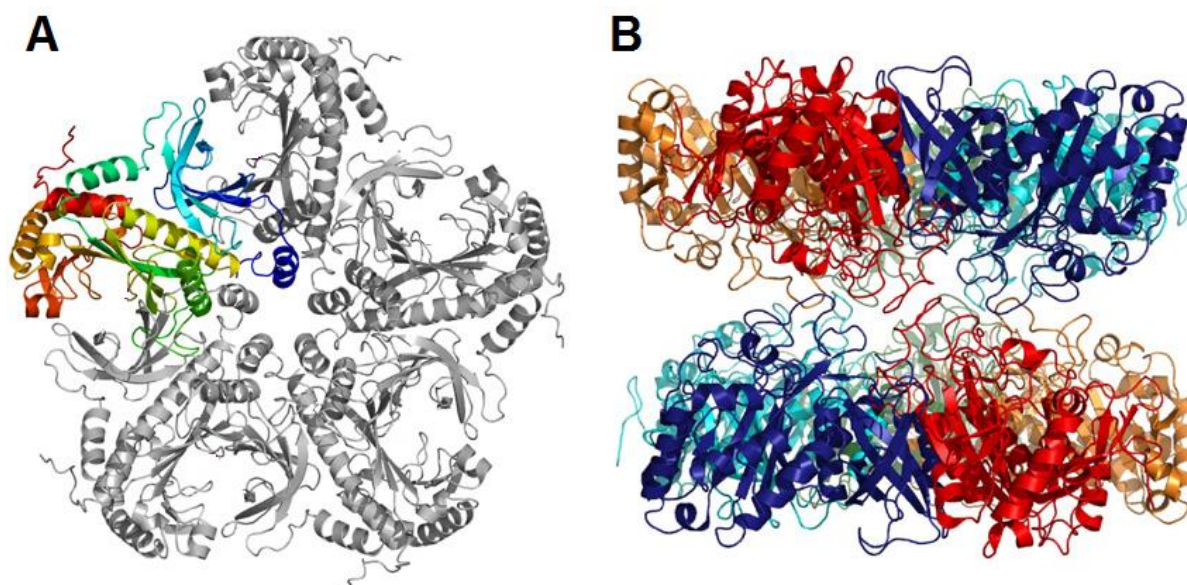
GS w mózgu jest kluczowym składnikiem cyklu glutaminian/glutamina (GGC; ang. *glutamate-glutamine cycle*) zaangażowanego w syntezę i degradację neuroprzekazników aminokwasowych, zwłaszcza Glu [Bak i wsp., 2006]. Uwolniony z zakończeń synaptycznych Glu zostaje usunięty z przestrzeni synaptycznej poprzez jego wychwyt przez astrocyty, gdzie w reakcji katalizowanej przez GS jest przekształcany w Gln [Martinez-Hernandez i wsp., 1977, Rose i wsp., 2013, Schousboe i wsp., 2014]. Gln jest następnie uwalniana z astrocytów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej [Broer i Brookes, 2001], skąd zostaje wychwycona przez neurony i zhydrolizowana przez fosfozależną glutaminazę (PAG; ang. *phosphate-activated glutaminase*) do Glu [Albrecht i wsp., 2007, Hertz, 2013, Schousboe i wsp., 2014], uzupełniając w ten sposób pulę neuroprzekazników (Ryc. 4). GS odgrywa zatem istotną rolę w ochronie neuronów przed ekscytotoksycznością poprzez neutralizowanie amoniaku i Glu w astrocytach, a dostarczając Gln do syntezy Glu i GABA, reguluje pobudzającą i hamującą transmisję synaptyczną neuronów [Albrecht i wsp., 2010, Cooper, 2013, Walls i wsp., 2015, Cooper i Jeitner, 2016].



Ryc.4 Cykl glutaminian/glutamina (GGC). Glu uwolniony z neuronów jest wychwytywany zwrótnie przez astrocyty za pośrednictwem transporterów Glu (GLAST/GLT-1). Glu w astrocytach zostaje przekształcony w Gln za pomocą GS. Powstała Gln jest uwalniana przez astrocyty, transportowana do neuronów i przekształcana za pomocą PAG ponownie w Glu, który zostaje upakowany w pęcherzyki synaptyczne, skąd później jest ponownie uwalniany. Zmodyfikowano wg <https://reactome.org/PathwayBrowser/#/R-HSA-112315&SEL=R-HSA-112310&PATH=R-HSA-112316>.

Amoniak jest naturalnym produktem degradacji białek i innych związków, ale w wysokich stężeniach jest toksyczny dla OUN, w skrajnych przypadkach prowadząc do śpiączki, a nawet śmierci. GS jest kluczowym regulatorem metabolizmu azotu, ponieważ redukuje wolny amoniak poprzez przekształcenie go w Gln, która wchodzi do krwioobiegu i jest transportowana do wątroby [Hawkins, 2009, Cooper, 2012, Hawkins i Viña, 2016]. Toksycznemu działaniu amoniaku, zapobiega jego neutralizacja w wątrobie, co przebiega poprzez przekształcenie amoniaku przez enzymy cyklu mocznikowego w mocznik, który jest wydalany z moczem. Enzymy cyklu mocznikowego nie ulegają ekspresji w mózgu, dlatego reakcja katalizowana przez GS (Ryc. 3) jest głównym mechanizmem detoksykacji amoniaku w mózgu [Braissant, 2010, Cooper i Jeitner, 2016]; ok. 85% amoniaku jest neutralizowane na tej drodze [Albrecht i Norenberg, 2006].

Zazwyczaj GS występuje jako oligomer złożony z ośmiu podjednostek (~42 kDa monomer). Strukturalnie monomer GS posiada trzy domeny: N-końcową, „β-grasp” i katalityczną. Ludzka GS jest homodekamerycznym białkiem złożonym z dwóch pentamerycznych pierścieni ułożonych jeden na drugim tak, że orientacja jednego pierścienia jest przeciwległa do drugiego (Ryc. 5).



Ryc.5 Model budowy GS. (A) Pierścień pentameru GS z zaznaczoną kolorem jedną z podjednostek. Widok z góry. (B) Dekamer GS przedstawiony na diagramie wstążkowym, który pokazuje strukturę drugorzędową dwóch pentamerycznych pierścieni układających się ze sobą jeden na drugim. Każdy monomer zaznaczono innym kolorem. Widok poziomy. Zmodyfikowano wg Krajewski i wsp., [2008].

Na aktywność GS wpływają modyfikacje potranslacyjne jak acetylacja lizyny [Nguyen i wsp., 2016] czy nitrowanie tyrozyny [Görg i wsp., 2005]. Funkcje GS reguluje również wiele innych czynników, w tym aktywacja β -kateniny [Sekine i wsp., 2006], regulacja hormonalna [Hansson, 1989, Wang i Watford, 2007], zmiana pH [Nissim, 1999, Häussinger i Schliess, 2007], stres oksydacyjny [Skowrońska i Albrecht, 2013], deprywacja glukozy [Rosier i wsp., 1996], niedokrwienie [Jeitner i wsp., 2015] lub stężenie Gln [Labow i wsp., 2001].

Kluczowa rola GS w syntezie i metabolizmie Glu i GABA powoduje, że zmiany w ekspresji lub aktywności GS stanowią ważny czynnik sprawczy w różnych patologiach mózgu. Udokumentowano związek GS z AD. W płynie mózgowo-rdzeniowym chorych z AD poziomy GS są wyższe niż w porównywalnej grupie pacjentów zdrowych [Gunnarsen i Haley, 1992]. GS jest również jednym z głównych białek modyfikowanych oksydacyjnie w hipokampie chorych z AD związaną z łagodnym upośledzeniem funkcji poznawczych [Butterfield i wsp., 2006]. W niektórych przypadkach AD stwierdzano obniżenie aktywności GS w mózgu, wiążąc z nim rozregulowanie metabolizmu Glu i upośledzenie neuroplastyczności w trakcie rozwoju choroby [Smith i wsp., 1991, Hensley i wsp., 1995]. Ekspresja GS jest obniżona w hipokampie chorych z padaczką skroniową [Eid i wsp., 2004, 2013], jak również w modelach padaczkowych u gryzoni [Hammer i wsp., 2008, Papageorgiou i wsp., 2011]. Obniżenie aktywności GS zaburza detoksykację Glu i amoniaku, przez co może znacząco przyczyniać się do nadpobudliwości neuronów, ekscytotoksyczności i padaczki z komponentą neurodegeneracyjną. Chociaż GS jest enzymem pełniącym kluczową rolę w komunikacji astrocyt-neuron, dokładna anatomiczna korelacja pomiędzy neuronami i ekspresją astrocytarnej GS w zdrowym i chorym mózgu pozostaje niewyjaśniona [Ong i wsp., 1995, Eid i wsp., 2004, 2013,

Sosunov i wsp., 2014]. Ponadto niedobór i nieprawidłową ekspresję GS wykazano w mózgu chorych z PD [Yu i wsp., 2012], schizofrenią [Steffek i wsp., 2008], depresją [Klempan i wsp., 2009, Sequeira i wsp., 2009], cukrzycą [Yu i wsp., 2009] i niedotlenieniem mózgu [Lee i wsp., 2010a].

IV.4. Wybrane białka astrocytarne zaangażowane w regulację homeostazy wodno-jonowej

IV.4.1. Akwaporyna 4

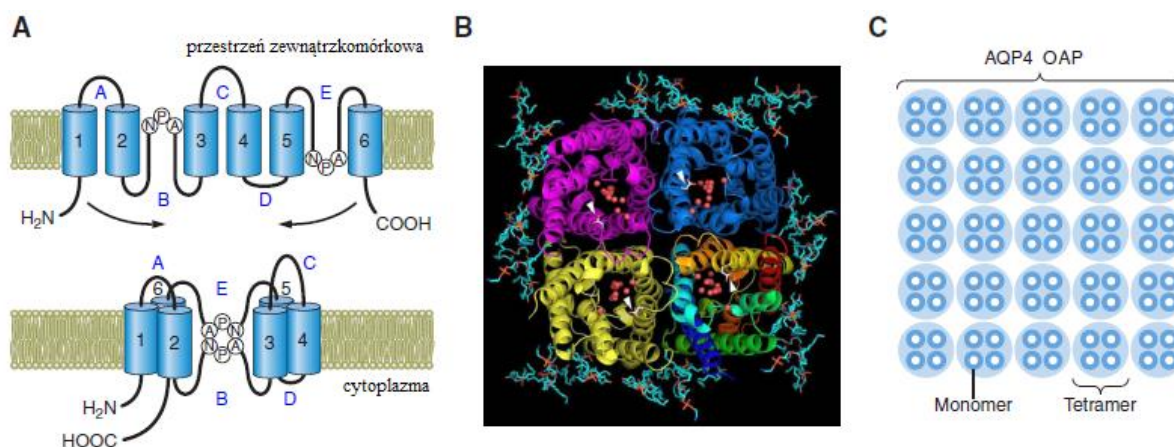
Akwaporyny (AQP) to rodzina małych, transbłonowych hydrofobowych białek kanałowych, które umożliwiają selektywny dwukierunkowy transport wody i małych cząstek rozpuszczalnych w wodzie: glicerolu [Heller i wsp., 1980, Borgnia i Agre, 2001], amoniaku [Saparov i wsp., 2007], mocznika [Borgnia i wsp., 1999], arseninu [Liu i wsp., 2002] przez komórki [Borgnia i wsp., 1999, Sachdeva i Singh, 2014, Finn i Cerdà, 2015].

Dotychczas zidentyfikowano 13 izoform AQP u ssaków, z czego osiem (AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP7, AQP8, AQP9, AQP11) ulega ekspresji w OUN, a z nich AQP1, AQP4, AQP9 odgrywają szczególną rolę w OUN [Badaut i wsp., 2014]. AQP można podzielić na dwie podrodziny:

- a) AQP selektywne tylko dla wody (AQP1, AQP2, AQP4, AQP5 i AQP8),
- b) AQP umożliwiające przejście także glicerolu i innych nienaladowanych cząsteczek (AQP3, AQP7, AQP9 i AQP10) (ang. *aqua-glyceroporins*) [Hub i de Groot, 2008].

Transport przez AQP jest niezwykle szybki (około trzech miliardów cząsteczek wody na sekundę przez pojedynczą AQP1) [Zeidel i wsp., 1992, Luckey, 2014] i działa w odpowiedzi na gradient ciśnienia osmotycznego występujący pomiędzy dwiema stronami błony. AQP są obecne w wielu nabłonkach i śródbłonkach związanych z transportem płynów, takich jak kanaliki nerkowe, nabłonek gruczołowy i splot naczyń, jak również w innych typach komórek jak komórki skóry i tłuszczu. W większości typów komórek AQP rezydują w błonie komórkowej, błonie mitochondrialnej – AQP9 [Amiry-Moghaddam i wsp., 2005], z wyjątkiem AQP2, która znajduje się w przewodzie zbiorczym nerki.

AQP są tetramerami (Ryc. 6), których monomery stanowią funkcjonalnie niezależne kanały wodne [Wang i Tajkhorshid, 2007]. Monomery AQP (~30 kDa) zbudowane są z sześciu transbłonowych domen o strukturze α -helis otaczających pojedynczy, wąski kanał wodny [Papadopoulos i Verkman, 2013] oraz pięciu pętli A-E, gdzie pętla B i D są skierowane do wewnątrz komórki i odpowiadają za utworzenie kanału wodnego [Mulders i wsp., 1998], a pętla A, C, E są skierowane na zewnątrz. AQP posiadają także charakterystyczny motyw asparagina-prolina-alanina (NPA), który jest niezbędny do utworzenia w kanale monomeru domeny pozwalającej na przenikanie wody (Ryc. 6A).



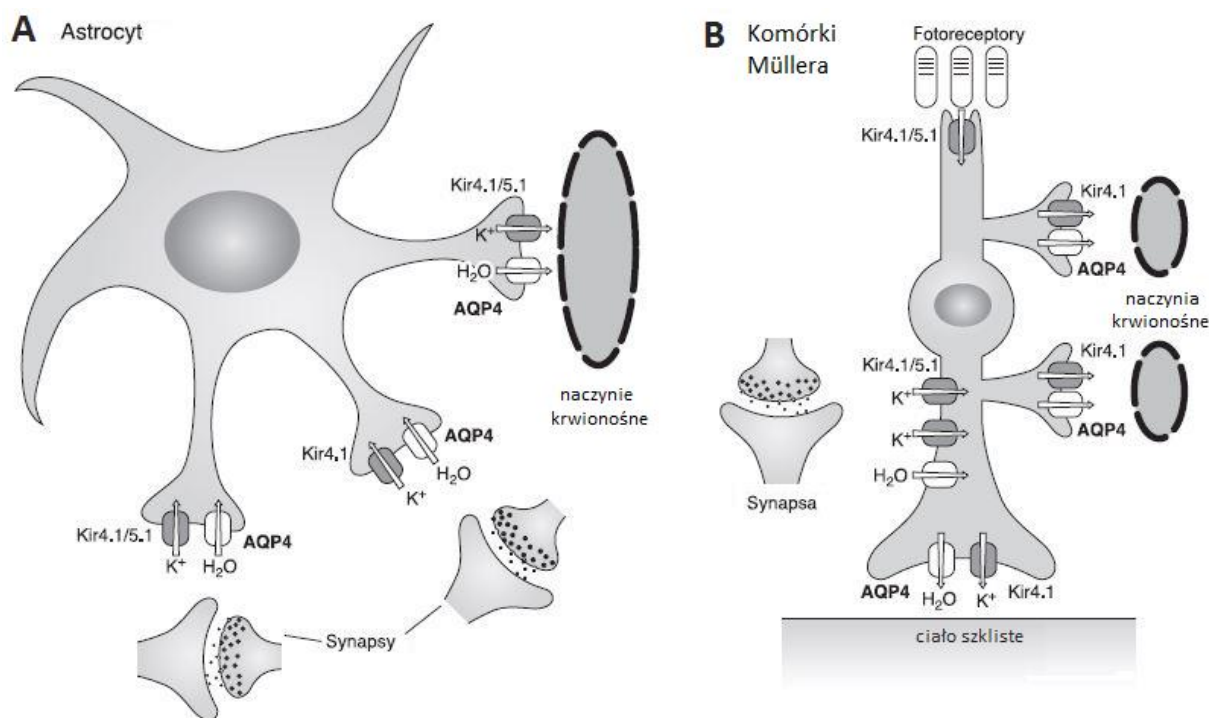
Ryc.6 Molekularna budowa AQP4. (A) Klepsydrowy model (ang. *hourglass model*) budowy AQP4. (B) Model budowy tetramery AQP4 przedstawiony na diagramie wstążkowym, który pokazuje kształt i położenie elementów struktury drugorzędowej, z cząsteczkami wody zaznaczonymi jako czerwone kule. Widok z góry. (C) Tetramery AQP4 zgromadzone się w błonie plazmatycznej jako czworokątne tablice, zwane również ortogonalnymi układami cząstek (OAP). Zmodyfikowano wg Nagelhus i Ottersen [2013].

AQP odgrywają kluczowe role biologiczne, regulując objętość i wewnętrzne ciśnienie osmotyczne komórek [Day i wsp., 2014]. Pełnią szeroką gamę funkcji fizjologicznych: odpowiadają za koncentrację moczu w nerkach [Chen i wsp., 2005], utrzymanie przezroczystości soczewki w gałce ocznej [Verkman, 2003], regulację homeostazy wodnej w mózgu [Amiry-Moghaddam i Ottersen, 2003], synaptogenezę i tworzenie pamięci [Hubbard i wsp., 2016]. Są także zaangażowane w patogenezę różnych schorzeń: migrację komórek podczas wzrostu guza [Saadoun i wsp., 2005a], angiogenezę podczas powstawania nowotworów [Saadoun i wsp., 2002], rozwój i ustąpienie obrzęku cytotoxycznego i naczyńopochodnego [Manley i wsp., 2000, Papadopoulos i wsp., 2004a], niedokrwienie mózgu, krwotoku śródmózgowego i podpajęczynówkowego [Chu i wsp., 2016, Previch i wsp., 2016], zapalenie nerwu wzrokowego i rdzenia kręgowego (NMO; ang. *Neuromyelitis Optica*) [Lennon i wsp., 2005, Ikeshima-Kataoka, 2016, Sánchez Gomar i wsp., 2016]. AQP są przyczyną kilku patologii, związanych z zaburzoną homeostazą wody [Agre i Kozono, 2003, Schrier, 2007].

AQP4 jest najczęściej występującą AQP w mózgu [Nagelhus i Ottersen, 2013], zlokalizowaną w okolicach, które znajdują się w bliskim kontakcie z naczyniami krwionośnymi lub płynem mózgowo-rdzeniowym [Jung i wsp., 1994, Amiry-Moghaddam i Ottersen, 2003, Yoneda i wsp., 2001, Mobasheri i wsp., 2007]. W obrębie struktur mózgowych AQP4 występuje w zakręcie zębatym i regionach CA-1 i CA-3 hipokampa, w jądrze prążka krańcowego (ang. *stria terminalis*), środkowym jądrze uzdeczki (ang. *habenular nucleus*) nadwzgorza, korze nowej, mózdzku oraz jądrze nadwzrokowym (ang. *supraoptic nucleus*) i jądrze nadskrzyżowaniowym (ang. *suprachiasmatic nucleus*) podwzgorza [Badaut i wsp., 2002]. Jej główną funkcją jest szybki transport wody przez śródbłonek.

W OUN AQP4 ulega ekspresji głównie w komórkach astrogleju. Astrocyty oprócz AQP4 posiadają również AQP1 i AQP9 [Badaut i wsp., 2001, 2004, Satoh i wsp., 2007]. Unikalną

właściwością kanału wodnego AQP4 jest tworzenie struktur wyższego rzędu w błonie plazmatycznej. Najpierw monomery organizują się w tetramery, które następnie agregują w większe struktury zwane ortogonalnymi układami cząstek (OAP; ang. *orthogonal arrays of particles*) (Ryc. 6C). [Hiroaki i wsp., 2006]. W OUN AQP4 w postaci OAP znajduje się w zakończeniach astrocytów znajdujących się w pobliżu naczyń krwionośnych [Rash i wsp., 1998, Arciénega i wsp., 2010]. Wewnątrzkomórkowy rozkład AQP4 w astrocytach jest wyraźnie spolaryzowany, jest ona skoncentrowana głównie w błonie plazmatycznej w pobliżu lub w bezpośrednim kontakcie z naczyniami krwionośnymi i w warstwie wyściółki (Ryc. 7A) [Rash i wsp., 1998]. W hodowanych astrocytach szczurzych i mysich AQP4 lokalizuje się wewnątrzkomórkowo i w błonach komórkowych [Nicchia i wsp., 2008, Potokar i wsp., 2013]. Wewnątrzkomórkowa ekspresja AQP4 obserwowana w hodowanych astrocytach może być konsekwencją zmian w środowisku pozakomórkowym. W astrocytach AQP4 często kolokalizuje z innymi kanałami, np. kanałem potasowym Kir4.1 (Ryc. 7) [Nagelhus i wsp., 2004, Haj-Yasein i wsp., 2015]. W badaniach *in situ* i *in vivo* zidentyfikowano AQP4 jako partnera molekularnego Kir4.1 w domenach astrogleju zaangażowanych w buforowanie K^+ [Nagelhus i wsp., 1999; 2004]. Uważa się, że duża gęstość AQP4 wokół naczyń krwionośnych w mózgu ułatwia przepływ wody, gdy potas jest uwalniany z zakończeń astrocytów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i naczyń krwionośnych (buforowanie potasu); tym samym przyczynia się do utrzymania homeostazy jonowej [Kofuji i Newman, 2004, Rash, 2010].



Ryc.7 Lokalizacja kanałów AQP4 i Kir4.1 w tych samych domenach błonowych astrogleju. (A) Astrocyty posiadają kanały AQP4 kolokalizujące z homo- (Kir4.1) i heteromerycznymi (Kir4.1/5.1) kanałami Kir4.1 w zakończeniach. (B) Komórki Müllera siatkówki eksprymują kanały AQP4 z heteromerycznymi kanałami Kir4.1/5.1 w miejscach perysynaptycznych i homomerycznymi kanałami Kir4.1 na zakończeniach w pobliżu naczyń krwionośnych. Zmodyfikowano wg Hibino i wsp., [2010].

AQP4 jest zaangażowana w regulację poziomu płynu mózgowo-rdzeniowego i wydzielanie hormonów [Hasegawa i wsp., 1994, Venero i wsp., 2001]. Jej aktywność ujawnia się w szeregu zaburzeń regulacji wody m.in. w upośledzeniu słuchu [Li i Verkman, 2001, Nicchia i wsp., 2011], powstawaniu obrzęku mózgu [Zador i wsp., 2009, Papadopoulos i Verkman, 2007], padaczce [Heuser i wsp., 2010] i toczniowym zapaleniu mózgu [Alexander i wsp., 2003], dlatego w ostatnich latach cieszy się dużym zainteresowaniem jako obiecujący cel terapeutyczny. Ustalono, że AQP4 jest zaangażowana w powstawanie cytotoksycznego obrzęku mózgu [Amiry-Moghaddam i Ottersen, 2003, Frigeri i wsp., 2007]. Udowodniono, że myszy pozbawione AQP4 (ang. *AQP4 null mice*) są chronione przed cytotoksycznym obrzękiem mózgu wywołanym w kilku doświadczalnych modelach stanów patologicznych takich jak: hiponatremia [Papadopoulos i Verkman, 2007], bakteryjne zapalenie opon mózgowych [Papadopoulos i Verkman, 2005] oraz ogniskowe niedokrwienie mózgu (ang. *focal cerebral ischemia*) [Manley i wsp., 2000]. Z drugiej strony, myszy z delecją genu *Aqp4* są bardziej podatne na towarzyszący guzom mózgu obrzęk naczyniopochodny (ang. *vasogenic edema*), będący konsekwencją zwiększonej przepuszczalności komórek śródbłonna naczyń mózgowych [Papadopoulos i wsp., 2004b]. W mysim modelu AD (mysz Tg-ArcSwe) zmiany w ekspresji AQP4 są widoczne we wczesnych etapach tworzenia blaszek starczych z β -amyloidu, co wskazuje, że utrata polaryzacji astrocytarnej AQP4 może odgrywać rolę w patogenezie choroby [Yang i wsp., 2011, 2017, Zeppenfeld i wsp., 2017, Mader i Brimberg, 2019]. Obecnie wiadomo, że AQP4 jest docelowym antygenem autoprzeciwciał IgG w NMO [Lennon i wsp., 2005, Krampla i wsp., 2009]. Modułacja ekspresji AQP4 w astrocytach odgrywa ważną rolę w utrzymaniu prawidłowych funkcji neuronów. Pomiarzy elektroencefalograficzne wykazały zmniejszony próg drgawkowy i wydłużony czas napadu przy niedoborze AQP4 [Binder i wsp., 2004; 2006], sugerując, że AQP4 moduluje pobudliwość neuronów przez regulację otaczającego neurony środowiska osmotycznego i jonowego. Nokaut AQP4 zmienia podstawowy poziom aminokwasów [Fan i wsp., 2005], spowalnia komórkowe uwalnianie i wychwytywanie K^+ w mózgu [Padmawar i wsp., 2005], obniża wychwytywanie Glu i ekspresję transportera GLT-1 (transporter glutaminianowy 1) w astrocytach [Zeng i wsp., 2007]. Te mikrośrodowiskowe zmiany indukowane przez nokaut AQP4 pokazują jak istotną rolę białko to pełni w funkcjonowaniu neuronów.

IV.4.2. Kanał potasowy Kir4.1

Przestrzenne buforowanie potasu lub syfonowanie prowadzące do usunięcia nadmiaru zewnątrzkomórkowego K^+ uwalnianego przez wzbudzone neurony jest kluczowym mechanizmem utrzymywania aktywności neuronalnej [Newman, 1993, Kofuji i Newman, 2004, Simard i Nedergaard, 2004, Ohno i wsp., 2015] i jest sprzężone z wychwytem Glu i wody przez astrocyty [Olsen i Sontheimer, 2008]. Wysoka i selektywna przepuszczalność błony dla K^+ oraz silnie ujemny

błonowy potencjał spoczynkowy (RMP; ang. *resting membrane potential*) są uważane za podstawowe właściwości fizjologiczne komórek glejowych [Kuffler i wsp., 1966]. Wysoka przepuszczalność K^+ i utrzymanie prawidłowego RMP przez komórki glejowe jest możliwe dzięki obecności w błonach komórkowych kanałów potasowych, zwłaszcza dokomórkowych prostowniczych kanałów potasowych (Kir; ang. *inwardly rectifying potassium channels*) [Verkhatsky i Steinhäuser, 2000].

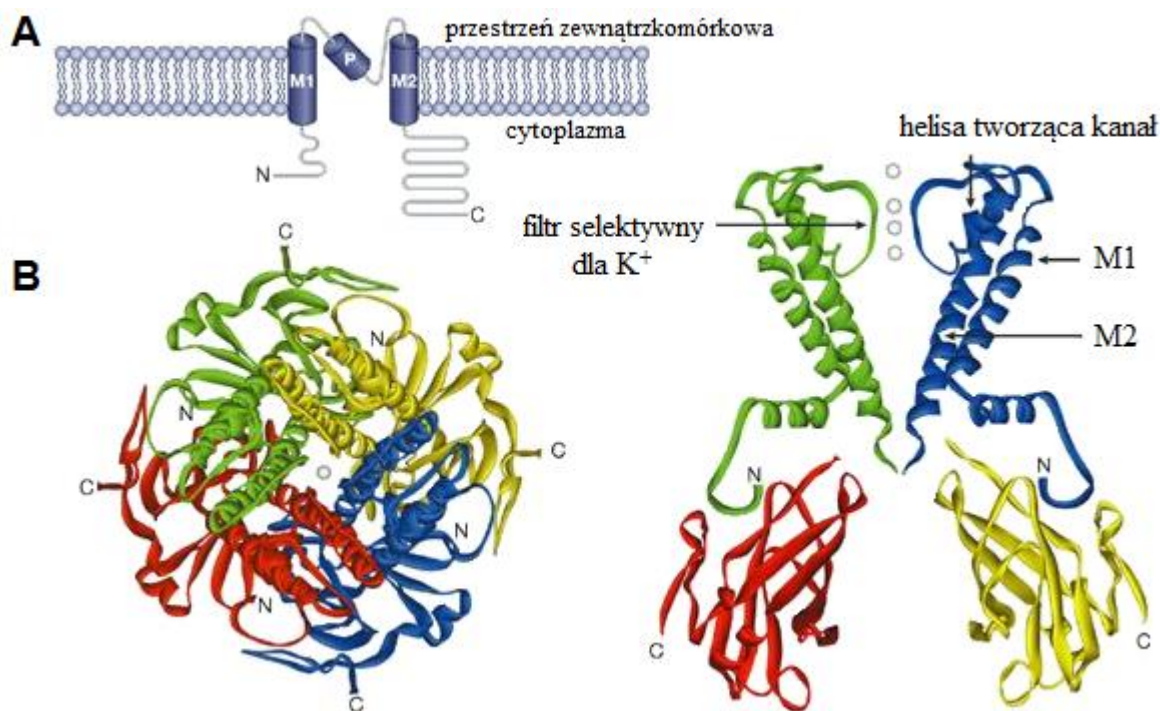
Kanały Kir to rodzina 15 kanałów podzielonych na siedem różnych podklas (Kir1.x - Kir7.x), które różnią się ich właściwościami biofizycznymi, wrażliwością na fosfolipidy, rozmieszczeniem w narządach i lokalizacją komórkową [Hibino i wsp., 2010, Sepúlveda i wsp., 2015]. Podklasy Kir mają podobną topologię błonową i charakteryzują się asymetryczną przewodnością, która zmniejsza się z depolaryzacją błony, a wzrasta wraz z hiperpolaryzacją [Kubo i wsp., 1993].

Kanały Kir są podzielone na 4 podtypy na podstawie ich właściwości biofizycznych i funkcji fizjologicznych [Sepúlveda i wsp., 2015]:

- a) klasyczne kanały dokomórkowe wewnątrzprostownicze: Kir2.1 (IRK1), Kir2.2 (IRK2) i Kir2.3 (IRK3);
- b) kanały K^+ aktywowane przez białka G: Kir3.1 (GIRK1), Kir3.2 (GIRK2), Kir3.3 (GIRK3) i Kir3.4 (GIRK4/CIR);
- c) kanały K^+ wrażliwe na ATP: Kir6.x/SURx;
- d) transportujące kanały K^+ : Kir1.1 i Kir4.x, Kir5.1 (BIR9) oraz Kir7.1.

Kanały Kir to tetrameryczne kompleksy białkowe, które są kluczowe dla utrzymywania potencjału błonowego w różnych tkankach, w tym mózgu, sercu, trzustce oraz mięśniach szkieletowych i gładkich [Nichols i Lopatin, 1997, Kuang i wsp., 2015]. Odgrywają kluczową rolę w regulacji wielu funkcji komórkowych, w tym kontrolowaniu potencjału błony i pobudliwości neuronów, homeostazy K^+ , uwalnianiu hormonów i przekaźników, a także w regulowaniu aktywności serca [Hille, 2001, Stanfield i Sutcliffe, 2003, Hibino i wsp., 2010, Swale i wsp., 2014]. Należy podkreślić, że Kir są głównym regulatorem K^+ nie tylko w astrocytach, ale także w oligodendrocytach [Poopalasundaram i wsp., 2000, Kalsi i wsp., 2004], gdzie są niezbędne do ich rozwoju i mielinizacji [Neusch i wsp., 2001], jak również w komórkach Müllera w siatkówce, czy komórkach Bergmanna w mózdzku [Newman, 1993, Müller i wsp., 1994, Kofuji i wsp., 2000, Kofuji i Newman, 2004,].

Kanały Kir zbudowane są z czterech podjednostek, a każda podjednostka składa się z wewnątrzkomórkowych domen N- i C-końcowych (znajdujących się w cytozolu), dwóch transbłonowych domen (M1 i M2) i pętli (P) z filtrem selektywnym względem potasu tworzącej kanał (Ryc. 8) [Bichet i wsp., 2003, Tao i wsp., 2009]. Wszystkie eukariotyczne kanały Kir wymagają do aktywacji wiązania fosfatydyloinozytolo-4,5-bifosforanu (PIP_2) [Zhang i wsp., 1999, Rapedius i wsp., 2007], są łatwo blokowane przez niskie stężenia Ba^{2+} i Cs^+ [Hibino i wsp., 2010] i wszystkie są wrażliwe na pH [Sepúlveda i wsp., 2015].

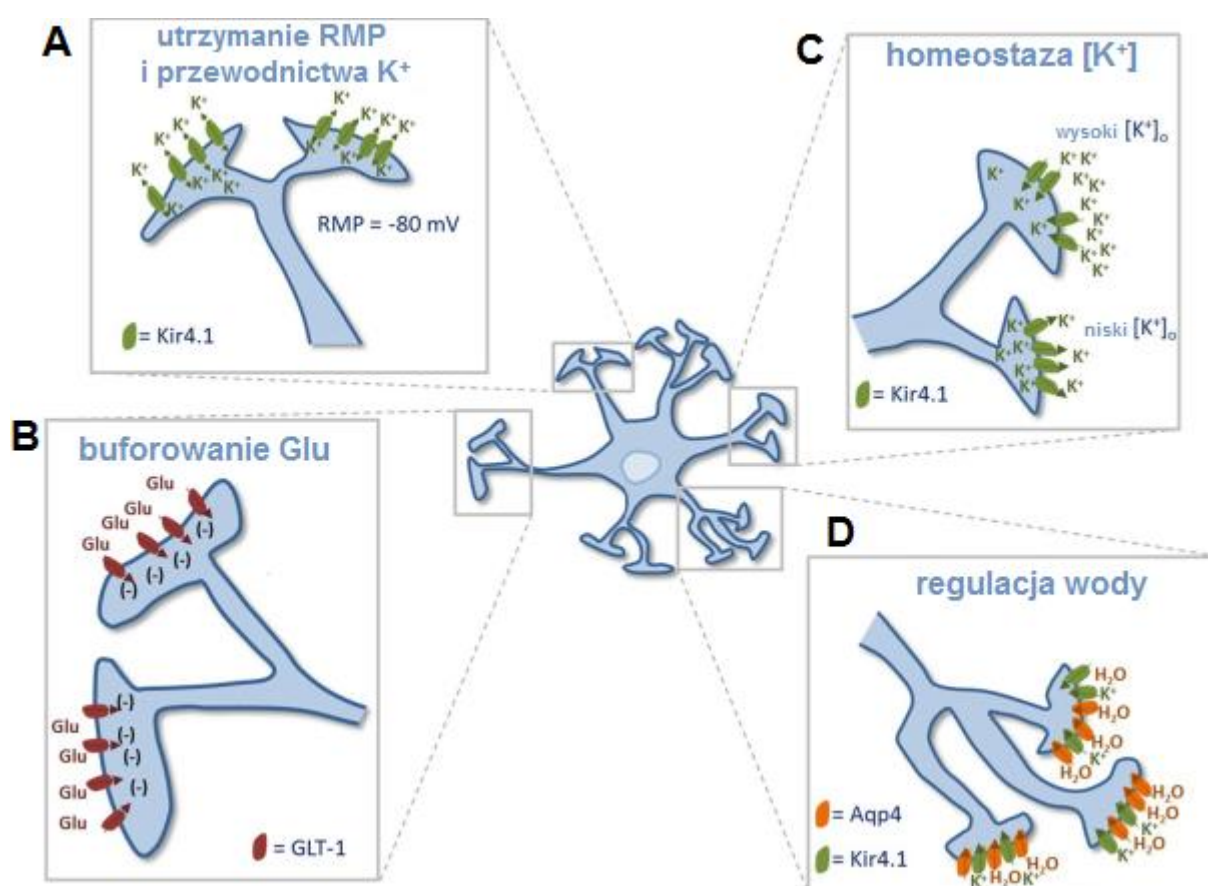


Ryc.8 Molekularna budowa kanałów Kir. (A) Schemat struktury kanału Kir. Kanał Kir posiada dwie domeny M1 i M2 oraz cytoplazmatyczne domeny N- i C-końca. (B) Panel lewy: Model budowy tetramery Kir przedstawiony na diagramie wstążkowym, który pokazuje kształt i położenie elementów struktury drugorzędowej. Widok z góry. Panel prawy: Widok poziomy na tę samą strukturę z zaznaczonymi domenami M1 i M2, porem kanału z filtrem selektywnym dla K⁺ i cytoplazmatycznymi końcami N i C. Dla przejrzystości obrazu pominięto dwie podjednostki. Zmodyfikowano wg Bichet i wsp., [2003].

Kanał Kir4.1 został odkryty w komórkach gleju kory mózgu i mózdzku przez grupę Kurashi na Uniwersytecie w Osace [Takumi i wsp., 1995]. Poźniejsze badania potwierdziły lokalizację Kir4.1 w różnych typach komórek glejowych OUN (w astrocytach, oligodendrocytach, oraz prekursorowych komórkach oligodendrocytów NG2+) [Steinhäuser i wsp., 2012]. Obecność kanału zidentyfikowano w różnych okolicach OUN, głównie w: opuszcze węchowej [Higashi i wsp., 2001], pniu mózgu [Nwaobi i wsp., 2014], rdzeniu kręgowym [Poopalasundaram i wsp., 2000, Nwaobi i wsp., 2014] śródmózgowiu [Tang i wsp., 2009], a jego szczególnie wysoką ekspresję wykazano w mózdzku [Higashi i wsp., 2001, Poopalasundaram i wsp., 2000, Tang i wsp. 2009]. Poza OUN Kir4.1 ulega ekspresji w komórkach Müllera w siatkówce [Ishii i wsp., 1997, Kofuji i wsp., 2000], w uchu wewnętrznym [Hibino i wsp., 1997], gdzie ma kluczowe znaczenie dla prawidłowego rozwoju ślimaka i słuchu [Rozengurt i wsp., 2003], a w nerkach jest umiejscowiony w błonie podstawno-bocznej nabłonka kanalików dystalnych i zbiorczych [Ito i wsp., 1996, Lachheb i wsp., 2008], gdzie umożliwia wymianę jonów K⁺ dostarczając K⁺ do Na⁺/K⁺-ATPazy, która kieruje transportem elektrolitów [Ito i wsp., 1996, Palygin i wsp., 2017].

Kir4.1 jest najobficiej występującym kanałem potasowym w astrocytach [Kofuji i Newman, 2004], gdzie odgrywa kluczową rolę w ustalaniu RMP (Ryc. 9A) [Neusch i wsp., 2006; Kucheryavykh i wsp., 2007], utrzymaniu wysokiego poziomu przewodnictwa K⁺, regulacji

zewnątrzkomórkowego Glu i ilości wody w komórce (Ryc. 9A,B,D) [Nwaobi i wsp., 2016]. Badania wykorzystujące zwierzęta z nokautem Kir4.1 wykazały, że Kir4.1 pełni ważną rolę w kluczowej funkcji astrocytów jaką jest utrzymanie homeostazy K^+ [Kofuji i wsp., 2000, Neusch i wsp., 2006, Djukic i wsp., 2007, Seifert i wsp., 2009, Bay i Butt, 2012] poprzez pośredniczenie w przestrzennym buforowaniu astrocytarnego K^+ (Ryc. 9C) [Larsen i Macaulay, 2014]. Badania ultrastrukturalne wykazały spolaryzowany subkomórkowy wzór ekspresji kanałów Kir4.1. Występują one w dużej gęstości w pobliżu otaczających astrocyty synaps oraz na zakończeniach astrocytów skierowanych w stronę naczyń krwionośnych (Ryc. 7) [Higashi i wsp., 2001, Nagelhus i wsp., 2004]. Uważa się, że ten nierównomierny rozkład służy specyficznym funkcjom astrocytów, w tym szybkiemu wychwytowi i redystrybucji K^+ , w mechanizmie przestrzennego buforowania.



Ryc.9 Funkcje Kir4.1 w astrocytach i ich wpływ na funkcję OUN. Kir4.1 przyczynia się do: (A) utrzymania hiperpolaryzowanego RMP astrocytów i wysokiego spoczynkowego przewodnictwa K^+ ; (B) utrzymania wydajnego buforowania Glu przez astrocytarne transportery Glu; (C) regulacji homeostazy potasu; (D) regulacji homeostazy wodnej komórek dzięki współpracy z kanałem AQP4 lokalizującym się na zakończeniach astrocytów. Zmodyfikowano wg Nwaobi i wsp., [2016].

W astrocytach oprócz kanału Kir4.1 obecne są również inne kanały Kir: Kir5.1 i Kir2.1. Przyjmuje się, że Kir4.1 spełnia podstawową funkcję w regulacji K^+ , zarówno jako kanał homomeryczny, jak i po połączeniu z podtypami Kir5.1 i Kir2.0 [Ishii i wsp. 2003, Hibino i wsp., 2004]. Potas uwolniony podczas aktywności neuronalnej jest wychwytywany przez komórki glejowe poprzez zlokalizowane w pobliżu synaps silnie rektyfikujące heteromeryczne kanały Kir4.1/Kir5.1,

Kir4.1/2.1 i homomeryczne kanały Kir2.1. Następnie potas za pośrednictwem GJ przemieszcza się do obszarów, w których stężenie K^+ jest niskie, po czym wypływa do przestrzeni międzykomórkowej poprzez słabo rektyfikujące homomeryczne kanały Kir4.1 (Ryc. 9C) [Butt i Kalsi, 2006, Neusch i wsp., 2006, Ohno i wsp., 2015].

Dysfunkcja kanałów Kir4.1 może mieć związek z patogenezą szeregu schorzeń neurologicznych [Nwaobi i wsp., 2016]. Np. mutacje powodujące utratę funkcji ludzkiego genu (*Kcnj10*) kodującego Kir4.1 są odpowiedzialne za zespół EAST/SeSAME, autosomalne recesywne zaburzenie charakteryzujące się drgawkami, głuchotą odbiorczą, ataksją, niepełnosprawnością intelektualną i zaburzeniami równowagi elektrolitowej [Scholl i wsp., 2009, Reichold i wsp., 2010]. Genetyczne mutacje *Kcnj10* wydają się mieć związek z patogenezą padaczki [Lenzen i wsp., 2005, Dai i wsp., 2015]. Do innych schorzeń związanych z dysfunkcją kanałów Kir4.1 zalicza się ataksję rdzeniowo-mózdkową (SCA; ang. *spinocerebellar ataxia*) [Gilliam i wsp., 2014], autyzm [Sicca i wsp., 2011], stwardnienie zanikowe boczne (ALS; ang. *amyotrophic lateral sclerosis*) [Kaiser i wsp., 2006, Bataveljić i wsp., 2012], AD [Wilcock i wsp., 2009] i HD [Tong i wsp., 2014]. Badania przeprowadzone w macierzystym Zakładzie Neurotoksykologii IMDiK PAN ujawniły związek spadku ekspresji Kir4.1 z patogenezą encefalopatii hiperamonemicznych [Obara-Michlewska i wsp., 2010, 2011, 2015].

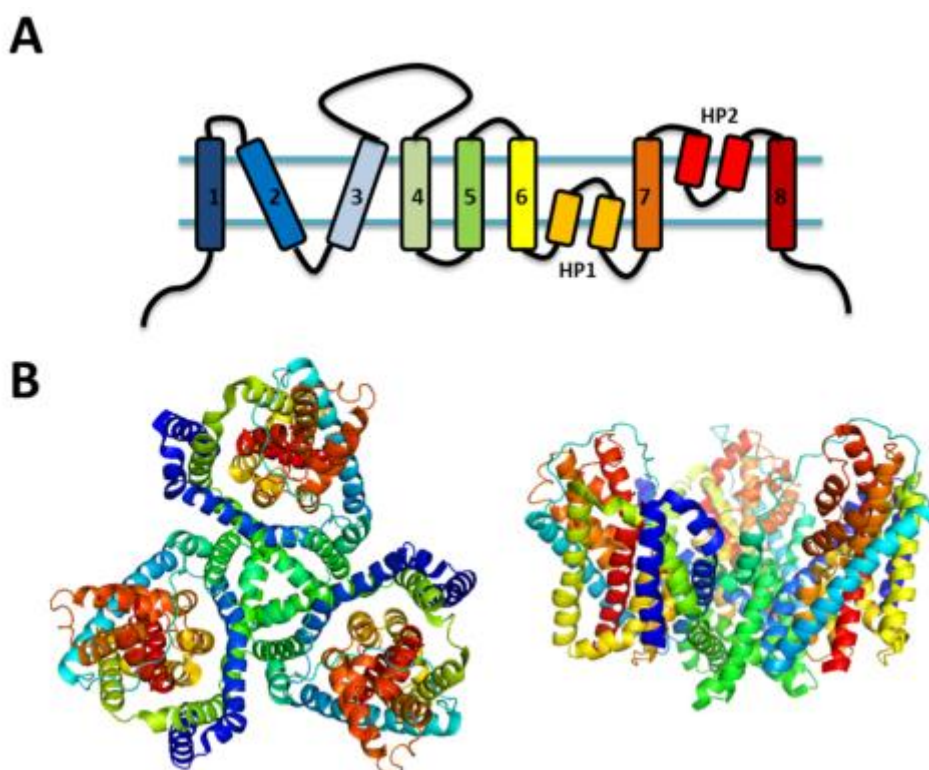
IV.5. Transportery glutaminianu

Zewnątrzkomórkowy poziom Glu jest regulowany przez rodzinę zależnych od Na^+ transporterów Glu. Transportery Glu należą do rodziny transporterów SLC1 (ang. *solute carrier 1*). Ludzki genom zawiera siedem genów odpowiadających transporterom z rodziny SLC1. Pięć z nich to transportery dla Glu zwane transporterami aminokwasów pobudzających (EAAT; ang. *excitatory amino acid transporter*) (EAAT 1 - EAAT 5, odpowiednio SLC1A3, -2, -1, -6 i -7) [Danbolt, 2001]. U gryzoni ludzkemu EAAT 1 odpowiada GLAST – (transporter glutaminowo-asparaginowy) [Storck i wsp., 1992], homologiczny do ludzkiego EAAT 2 jest GLT-1 [Pines i wsp., 1992], a do EAAT 3 - EAAC 1 (ang. *excitatory amino acid carrier one*) [Danbolt i wsp., 2016]. Pozostałe dwa transportery SLC1 są transporterami aminokwasów obojętnych (ang. *alanine/serine/cysteine transporter* - ASCT1 i ASCT2, odpowiednio SLC1A4 i -5) i transportują one alaninę, serynę i cysteinę [Arriza i wsp., 1993, Shafqat i wsp., 1993]. Transportery EAAT1 (GLAST) i EAAT2 (GLT-1) są obecne głównie w komórkach glejowych, [Storck i wsp., 1992, Chaudhry i wsp., 1995, Lehre i Danbolt, 1998], podczas gdy EAAT3, EAAT4 i EAAT5 występują przeważnie w neuronach [Dehnes i wsp., 1998, Sullivan i wsp., 2004, Holmseth i wsp., 2012].

GLAST jest silnie ekspresjonowany w komórkach glejowych Bergmanna w mózdku, które pochodzą z linii astrocytów i otaczają komórki Purkinjego otrzymujące impulsy pobudzające

[Rothstein i wsp., 1994]. Stosunkowo najwięcej jest go w astrocytach mózdkowych, ale jest także obecny w astrocytach w innych okolicach mózgu [Danbolt, 1994, Lehre i wsp., 1995, Schmitt i wsp., 1997, Regan i wsp., 2007, Jungblut i wsp., 2012], w siatkówce [Rauen, 2000, Bringmann i wsp., 2013] i opuszce węchowej [Danbolt, 2001]. GLT-1 jest transporterem Glu występującym w największej ilości w mózgu, głównie w astrocytach (80-90%) i w zakończeniach aksonów w regionie CA1 hipokampa (5-10%) [Rothstein i wsp., 1994, Chaudhry i wsp., 1995, Mennerick i wsp., 1998, Berger i Hediger, 2000, Furness i wsp., 2008, Roberts i wsp., 2014, Danbolt i wsp., 2016, Rimmelé i Rosenberg, 2016]. Ekspresja GLT-1 w neuronach wydaje się być głównie presynaptyczna. Obliczono, że GLT-1 stanowi 2% całkowitego białka mózgowego i odpowiada za około 90% całkowitego wychwyty Glu w mózgu [Eulenburg i Gomez, 2010]. Wykazano, że delecja genu dla GLT-1 u myszy powoduje prawie całkowitą utratę (około 95%) wychwyty Glu [Tanaka i wsp., 1997, Otis i Kavanaugh, 2000, Matsugami i wsp., 2006, Kiryk i wsp., 2008, Holmseth i wsp., 2012, Zhou i wsp., 2014]. Ekspresja GLT-1 jest bardzo niska u osesków szczurzych i mysich, i wzrasta wraz z dojrzewaniem mózgu [Furuta i wsp., 1997, Ullensvang i wsp., 1997, Hanson i wsp., 2015].

W budowie EAAT wyróżnia się osiem domen transbłonowych (TM) i dwie pętle o strukturze spinki do włosów: HP1 i HP2 (ang. *hairpin loops*). HP1 umiejscowiony jest między TM 6 a 7, natomiast HP2 między TM 7 a 8 (Ryc. 10) [Grunewald i Kanner, 2000].



Ryc.10 Molekularna budowa transporterów Glu. (A) Schemat struktury transportera Glu. Transporter Glu posiada osiem domen TM1 i dwie pętle HP1 i HP2 (B) Model budowy monomeru transportera Glu przedstawiony na diagramie wstążkowym, który pokazuje kształt i położenie elementów struktury drugorzędowej. Panel lewy: Widok z góry. Panel prawy: Widok poziomy. Zmodyfikowano wg Divito i Underhill [2014].

EAAT regulują neurotransmisję glutaminianergiczną, a mechanizm za pomocą którego realizują ten proces, jest wynikiem sprzężenia bioenergetyki procesu transportowego i lokalizacji samych transporterów. Wszystkie transportery odpowiadają za utrzymanie prawidłowej homeostazy Glu i transportują Glu z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do cytoplazmy. Astrocytarne GLT-1 i GLAST odgrywają kluczową rolę w usuwaniu Glu ze szczeliny synaptycznej poprzez cykl GGC (Ryc. 4) [Robinson i Jackson, 2016]. Biorą one udział w transporcie L-glutaminianu (L-Glu) oraz D- lub L-asparaginianu (D, L-Asp) z wysokim powinowactwem ($\sim 30 \mu\text{M}$ dla GLT-1) [Arriza i wsp., 1994; 1997, Fairman i wsp., 1995]. Podczas jednego cyklu, każdy transporter wiąże jedną zewnątrzkomórkową cząsteczkę Glu, a także trzy jony Na^+ , jeden K^+ i jeden H^+ [Zerangue i Kavanaugh, 1996, Owe i wsp., 2006]. Glu wiąże się z transporterami EAAT z szybkością $10^6\text{-}10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [Otis i Jahr, 1998, Grewer i wsp., 2000], przy wydajności wychwytywania 0,5 dla EAAT 1-3 [Otis i Jahr, 1998, Bergles i wsp., 2002]. Transporter następnie ulega zmianie konformacyjnej i zostaje skierowany do wewnątrz komórki, gdzie substraty (Glu, H^+ i Na^+) są uwalniane do cytoplazmy. Po tym etapie następuje wiązanie jednego wewnątrzkomórkowego jonu K^+ i ponowne przejście do stanu, gdzie transporter skierowany jest na zewnątrz i uwalnia jon K^+ kończąc cykl [Zerangue i Kavanaugh, 1996, Reyes i Parpura, 2009]. Niezwiązany Glu szybko napotyka dostępne transportery EAAT i zostaje związany, a następnie transportowany, co zapobiega rozprzestrzenianiu się go z synapsy. Ta kombinacja buforowania, transportu Glu i ekspresji transporterów wyjaśnia mechanizm oczyszczania przestrzeni synaptycznej z Glu przez EAAT. Czynniki wpływające na wychwyt, w tym różnice podtypu EAAT i regulacja lokalizacji transporterów na powierzchni komórek w pobliżu synaps nie są dobrze poznane [Tzingounis i Wadiche, 2007].

Z transporterami Glu w astrocytach kolokalizuje $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPaza}$ [Cholet i wsp., 2002], która generuje elektrochemiczny gradient wysokiego stężenia jonów K^+ i niskiego Na^+ wewnątrz komórki, dostarczając energię do wychwytu Glu [Danbolt, 2001, Sheldon i Robinson, 2007, Vandenberg i Ryan, 2013]. Głównym źródłem energii kompleksu transportującego $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPaza-Glu}$ jest ATP, generowany przez glikolizę [Balaban i Bader, 1984]. Transportery Glu oddziałują fizycznie z $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPazą}$, tworząc z nią makromolekularny kompleks zaangażowany w regulację neuroprzebieżności glutaminianergicznego [Gegelashvili i wsp., 2007, Rose i wsp., 2009, Bauer i wsp., 2012].

Dane literaturowe wskazują, że transportery Glu mogą również uczestniczyć w wewnątrzkomórkowych szlakach sygnalizacyjnych wyzwalanych przez ten aminokwas. Zespół Amara wykazał zależny od Glu dopływ Ca^{2+} za pomocą niekonwencjonalnego mechanizmu, który angażował transportery Glu, a nie receptory Glu, w komórkach przysadki GH3 [Fairman i wsp., 1995]. Różne grupy badawcze sugerują, że translokacja transporterów Glu do błony komórkowej jest regulowana przez sam transporter [Duan i wsp., 1999, González i Ortega, 2000]. Odkrycia te

wskazują na nowy mechanizm regulacyjny dla transporterów Glu, ostatnio rozszerzony o dyfuzję błonową transporterów, która modyfikuje kinetykę pobudzających prądów postsynaptycznych (ang. *kinetics of excitatory postsynaptic currents*) [Murphy-Royal, 2015]. W tym kontekście transportery Glu mają właściwości podobne do receptorów; wykazano, że w korowych astrocytach szczurzych, L-Glu, D- i L-asparaginian, oraz podlegające transportowi inhibitory wychwyty Glu zwiększają fosforylację p42/44 MAPK [Abe i Saito, 2001]. Aktywność transporterów Glu wpływa również na szlak PI3K/Akt/mTOR [Martínez-Lozada i wsp., 2011, López-Colomé i wsp., 2012].

Nadmierne stężenie zewnątrzkomórkowego Glu może być skutkiem nadmiernego uwalniania bądź upośledzonego wychwyty zwrotnego przez astrocyty. Nadmierne uwalnianie Glu prowadzi do ekscytotoksycznej śmierci neuronów [Choi, 1988], a ponadto jest związane z różnymi stanami chorobowymi, począwszy od zmian niedokrwiennych, poprzez zaburzenia demielinizacyjne jak stwardnienie rozsiane, po choroby neurodegeneracyjne: AD i HD [Domingues i wsp., 2010]. Mechanizm molekularny leżący u podstaw nieprawidłowego wychwyty Glu w tych schorzeniach nie we wszystkich przypadkach udało się zidentyfikować. Niemniej wiele danych wskazuje na korelację pomiędzy obniżeniem ekspresji GLAST i GLT-1, a deficytami poznawczymi towarzyszącymi zarówno wymienionym schorzeniom [Gegelashvili i Bjerrum, 2014], jak i obserwowanymi podczas ekspozycji na metale ciężkie: ołów i metylortęć [Karki i wsp., 2015]. Obniżona ekspresja GLT-1 obserwowana w ALS, schizofrenii, zaburzeniach nastroju i lęku, AD, urazach mózgu, jaskrze, demencji związanej z HIV jest wynikiem zarówno nieprawidłowej regulacji na poziomie transkrypcji jak i zaburzeń dojrzewania mRNA (splicingu) [Lin i wsp., 1998, Lauriat i McInnes, 2007].

Wychwyty Glu przez astrocyty (za pośrednictwem transporterów Glu) towarzyszy również transport wody, który może powodować obrzmiewanie astrocytów wokół synaps, co powoduje zmniejszenie pozakomórkowej przestrzeni synaptycznej podczas transmisji i przetwarzania synaptycznego [O'Shea, 2002, Gunnarson i wsp., 2008]. Aby przywrócić objętość przestrzeni pozakomórkowej, astrocyty transportują wodę do otaczających je naczyń krwionośnych poprzez kanał wodny AQP4 umiejscowiony w okołonacyniowych zakończeniach astrocytów. Badania przeprowadzone *in vitro*, jak i *in vivo* wskazują, że delecja genu *Aqp4* u myszy obniża ekspresję transportera GLT-1 i upośledza zdolność wychwyty Glu [Zeng i wsp., 2007, Li i wsp., 2012, Yan i wsp., 2013].

V. HIPOTEZA I CELE PRACY

Postawiono hipotezę roboczą zakładającą, że długotrwałe pobudzenie NMDAR w astrocytach mysich wpływa na ekspresję i/lub aktywność białek astrocytarnych, kluczowych dla ich funkcji homeostatycznych.

W świetle tej hipotezy cele pracy sprowadziły się do:

1. Potwierdzenia obecności NMDAR w hodowanych astrocytach mysich.
2. Zbadania, czy długotrwałe pobudzenie NMDAR wpływa na ekspresję wybranych białek astrocytarnych o dobrze zdefiniowanej roli fizjologicznej:
 - a) syntetazy glutaminy (GS),
 - b) kanału wodnego akwaporyny 4 (AQP4),
 - c) kanału potasowego Kir4.1,
 - d) białek transportujących Glu: GLAST (EAAT 1) i GLT-1 (EAAT 2).
3. Ustalenia, czy pojawienie się skutków długotrwałego pobudzenia astrocytarnego NMDAR wymaga obecności jonów wapnia w pożywce hodowlanej.

Dodatkowo podjęto próbę ustalenia:

4. Czy pobudzenie astrocytarnego NMDAR wiąże się ze zmianami jego składu podjednostkowego.

VI. MATERIAŁY I METODY

VI.1. Hodowle pierwotne korowych astrocytów mysich

Pierwotne korowe astrocyty mysie hodowano według metody Hertz'a [1989]. Siedmiodniowe oseski mysie (C57BL6/J) dekapitowano i natychmiast izolowano korę mózgową. Tkanę przepuszczano przez nylonowe filtry o średnicy 80 μm , a następnie 40 μm (Millipore, Burlington, MA, USA), po czym zawieszano w pożywce DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) wzbogaconej płodową surowicą bydlęcą (FBS; ang. *fetal bovine serum*) (Bio-Tech, Warszawa, Polska). Komórki hodowano w standardowych warunkach (5% CO_2 , 37°C) na szalkach lub płytkach plastikowych (Nunc, Roskilde, Dania) przez 3 tygodnie, a pożywkę wymieniano dwa razy w tygodniu. Stężenie FBS w pożywce w pierwszym tygodniu wynosiło 20%, w drugim tygodniu - 15%, a w trzecim 10%. Ponadto, w trzecim tygodniu hodowli do pożywki dodawano dwumaślan cyklicznego 3',5' adenozyonomonofosforanu (dBcAMP; ang. *diButyryl cyclic Adenosine MonoPhosphate*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) w stężeniu końcowym 0,25 mM, aby zaindukować różnicowanie morfologiczne i dojrzewanie funkcjonalne astrocytów, wyrażające się zwiększeniem ekspresji GS, GLT-1 oraz wychwyty D-Asp [Fedoroff i wsp., 1984, Lange i wsp., 2012]. Do pożywki DMEM dodawano antybiotyki w stężeniu końcowym 100 U/ml penicyliny i 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycyny (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Warunki inkubacji komórek z odczynnikami

W celu wyjaśnienia roli poszczególnych puli wapnia: zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej, inkubację prowadzono w pożywce z wapniem i bez wapnia (DMEM high glucose, no calcium; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 10% FBS). Inkubację w pożywce bezwapniowej ograniczono do 8 godzin ze względu na obumieranie astrocytów przy dłuższym okresie inkubacji.

Po 21 dniach hodowli, pożywkę usuwano, komórki przepłukiwano dwukrotnie buforem PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 7,3 mM Na_2HPO_4 ; 0,9 mM CaCl_2 ; 0,5 mM MgCl_2 ; pH 7,4; 37°C), a doświadczenia przeprowadzono na astrocytach nietraktowanych (kontrolnych) oraz traktowanych przez:

- a) 8 godzin 2mM Glu lub 100 μM NMDA w pożywce wapniowej (DMEM z wapniem; 10% FBS) lub bezwapniowej (DMEM bez wapnia; 10% FBS);
- b) 72 godziny 2 mM Glu lub 100 μM NMDA w pożywce wapniowej (DMEM z wapniem; 10% FBS).

100 μM NMDA jest toksyczny dla neuronów [Papadia i wsp., 2008, Wroge i wsp., 2012], ale nie dla astrocytów [Lachmann i wsp., 2013, Obara-Michlewska i wsp., 2015].

VI.2. Badanie przeżywalności astrocytów

Do badania przeżywalności astrocytów zastosowano metodę MTT opisaną przez Mosman'a [1983] z nieznacznymi modyfikacjami. Zasada tej metody opiera się na zdolności metabolizowania przez mitochondrialne dehydrogenazy bromku 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ylo)-2,5-difenylo-tetrazolu (MTT) do formazanu. Reakcja zachodzi tylko w żywych komórkach, a stężenie formazanu jest proporcjonalne do przeżywalności komórek w hodowli. Komórki wysiewano w gęstości 40 tys. komórek/dołek i hodowano na płytkach 24-dołkowych inkubując je z NMDA a) przez 8 godzin w obecności pożywki wapniowej i bezwapniowej i b) przez 72 godziny w pożywce wapniowej. Po upływie badanego czasu, komórki przepłukiwano PBS (37°C) i inkubowano z roztworem MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) w PBS (0,5 mg/ml) przez 30 minut w 37°C. Następnie roztwór odciągnano, dodawano 350 µl 96,6% dimetylosulfotlenku (DMSO; ang. *dimethyl sulfoxide*; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) rozpuszczającego formazan i inkubowano 10 minut na kołysce. Po inkubacji przenoszono po 100 µl próbek na płytkę 96-dołkową i za pomocą spektrofotometru (MR680, Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA), mierzono absorbancję przy długości fali 570 nm. Wyniki przedstawiono jako procent kontroli, którą stanowiły komórki nietraktowane NMDA.

VI.3. Analiza immunocytochemiczna i analiza obrazu za pomocą mikroskopii konfokalnej i z kontrastem fazowym

Astrocyty z 21-dniowej hodowli pierwotnej przesiewano na pokryte polilizyną (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) szkiełka nakrywkowe o średnicy 14 mm (Medlab Products) znajdujące się w płytkach 24-dołkowych. Gęstość komórek w momencie wysiewu wynosiła 1-1.5 x 10⁴/cm². W celu znakowania immunocytochemicznego komórki utrwalano przez 20 minut w 4% roztworze paraformaldehydu w sterylnym PBS, po czym płukano trzykrotnie roztworem PBS i inkubowano w roztworze zawierającym 0,25% Triton X-100 w PBS przez 30 minut w temperaturze pokojowej (RT; ang. *room temperature*) w celu permeabilizacji błon komórkowych astrocytów. Po trzykrotnym przepłukaniu roztworem PBS komórki inkubowano z mieszaniną blokującą zawierającą 10% surowicy koziej (NGS; ang. *normal goat serum*) lub 5% albuminy surowicy bydlęcej (BSA; ang. *bovine serum albumine*) przez 60 minut w celu zablokowania niespecyficznego miejsc wiązania przeciwciał.

Jako pierwszorzędowych przeciwciał używano:

1) do znakowania astrocytów - monoklonalne przeciwciało GFAP (1:400, IgG₁, MAB360, Merck, Darmstadt, Niemcy) w roztworze PBS/mieszanina blokująca (10% surowica kozia w PBS) w stosunku 1:1,

2) do znakowania podjednostki GluN1 NMDAR - monoklonalne przeciwciało anti-GluN1 (1:200, IgG, 05-432, Merck, Darmstadt, Niemcy) w roztworze PBS/mieszanina blokująca (10% surowica kozia w PBS) w stosunku 1:1,

3) do znakowania GS - poliklonalne przeciwciało anti-GS (1:1000, IgG, G2781, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) w roztworze PBS/mieszanina blokująca (10% surowica kozia w PBS) w stosunku 1:1,

4) do znakowania AQP4 - poliklonalne przeciwciało anti-AQP4 (1:200, IgG, sc-9888, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Teksas, USA) w roztworze PBS/mieszanina blokująca (10% surowica kozia w PBS) w stosunku 1:1,

5) do znakowania Kir4.1 - poliklonalne przeciwciało anti-Kir4.1 (1:100, IgG, AGP-012, Alomone Labs, Jerusalem, Izrael) w roztworze PBS/mieszanina blokująca (5% BSA w PBS) w stosunku 1:1.

W celu udowodnienia czystości prowadzonej hodowli astrocytów mysich wykonano dodatkowe barwienia na neurony i mikroglej. W doświadczeniach tych jako pierwszorzędowych przeciwciał używano:

6) do znakowania neuronów - monoklonalne przeciwciało anti-NF200 (1:400, IgG₁, N0142, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) w roztworze PBS/mieszanina blokująca (10% NGS w PBS) w stosunku 1:1,

7) do znakowania mikrogleju - poliklonalne przeciwciało anti-iba-1 (1:500, IgG, ab5076, abcam, Cambridge, Wielka Brytania) w roztworze PBS/mieszanina blokująca (5% BSA w PBS) w stosunku 1:1.

Po całonocnej inkubacji w 4°C przeciwciała pierwszorzędowe odpłukiwano roztworem PBS i nakładano odpowiednie przeciwciała drugorzędowe:

1) anti-mysie IgG₁ Alexa Fluor 488 (dla NF-200, GFAP),

2) anti-kozie IgG Alexa Fluor 546 (dla iba-1, AQP4),

3) anti-mysie IgG_{2a} Alexa Fluor 546 (dla GluN1 NMDAR),

4) anti-królicze IgG Alexa Fluor 546 (dla GS),

5) anti-świnka morska IgG Alexa Fluor 568 (dla Kir4.1) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) w stosunku 1:500 w roztworze PBS przez 60 minut w RT. W przypadku znakowań podwójnych nakładano kolejne przeciwciała pierwszo- i drugorzędowe, stosując analogiczną procedurę. Następnie po trzykrotnym przepłukaniu roztworem PBS barwiono jądra komórkowe używając Hoechst 33258 (H1398, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Po trzykrotnym przepłukaniu roztworem PBS preparaty wyjmowano z płytki 24-dołkowej, osuszano i nakładano na szkiełka mikroskopowe zatapiając w Dako Fluorescence Mounting Medium (Agilent, Santa Clara, CA, USA) i pozostawiano do wyschnięcia w RT.

Preparaty oglądano i analizowano w Środowiskowym Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych (IMDiK PAN) z wykorzystaniem konfokalnego mikroskopu skaningowego LSM 780/Elyra PS.1 (Zeiss, Jena, Niemcy). Do wzbudzania fluorochromów użyto: lasera argonowego (488 nm) do wzbudzenia Alexa Fluor 488, lasera DPSS (561 nm) do pobudzenia Alexa Fluor 546 i diody 405 nm do znacznika jąder Hoechst. Obrazy analizowano przy użyciu programu ZEN 2012 (Zeiss, Jena, Niemcy).

Mikrofotografie z kontrastem fazowym wykonano przy użyciu analizatora Juli Smart Fluorescent Cell Analyzer (Bulldog Bio, Rochester, Nowy Jork, USA).

VI.4. Izolacja RNA z hodowli komórkowych

Całkowity kwas rybonukleinowy (RNA; ang. *rybonucleic acid*) izolowano z astrocytów za pomocą odczynnika TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) [Chomczynski i Sacchi, 1987]. Komórki, przepłukiwano 1 ml zimnego buforu PBS i zalewano 1 ml TRI Reagent'u na 3 minuty. Lizat komórkowy przenoszono do probówek typu Eppendorf, dodawano 0,2 ml chloroformu (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) i wytrząsano energicznie. Po 5 minutach inkubacji w RT próbki wirowano ($12\ 000\times g$, 15 minut, $4^{\circ}C$). Fazę wodną (górną) przenoszono do nowych probówek, w celu wytrącenia RNA, dodawano 0,5 ml izopropanolu (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), wytrząsano intensywnie 3 razy przez 15 sekund, inkubowano 10 minut w RT, po czym próbki wirowano ($10\ 000\times g$, 10 minut, $4^{\circ}C$). Nadsącz usuwano, a osad zalewano 1 ml schłodzonego 75% etanolu (Polskie Odczynniki Chemiczne S.A.), worteksowano i wirowano ($10\ 000\times g$, 10 minut, $4^{\circ}C$). Po usunięciu nadsączu próbki suszono (~ 20 minut, $37^{\circ}C$) i zawieszano w $20\ \mu l\ H_2O\ DEPC$, w której zinaktywowano RNazy poprzez uprzednie podanie 0,1% dietylopirowęgla (DEPC) i autoklawowanie ($H_2O\ DEPC$).

Otrzymane mRNA oczyszczano z genomowego DNA za pomocą DNazy I z zestawu DNase I (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Zgodnie z zaleceniami producenta próbki rozcieńczano tak, aby uzyskać stężenie $10\ \mu g$ kwasu nukleinowego w $50\ \mu l$ roztworu. Następnie dodawano $5\ \mu l$ buforu (10X DNase I Buffer) i $1\ \mu l$ enzymu (DNase I). Po zmieszaniu próbki inkubowano 30 minut w temperaturze $37^{\circ}C$. Następnie do próbek dodawano EDTA w stężeniu końcowym $5\ mM$ i inkubowano je przez 10 minut w temperaturze $75^{\circ}C$ w celu inaktywacji DNazy. Tak przygotowane próbki wykorzystywano do reakcji odwrotnej transkrypcji.

VI.5. Pomiar stężenia oraz czystości RNA

Stężenie i czystość preparatów RNA oznaczano w spektrofotometrze NanoDrop ND1000 (Marshall Scientific, Hampton, USA), mierząc gęstość optyczną (OD; ang. *optical density*) przy długości fali 260 i 280 nm, stosując zasadę, że $OD_{260} = 1$ odpowiada $40\ \mu g$ RNA, a stosunek

OD260/OD280 równy 2 oznacza czysty RNA. Do badań używano RNA o stosunku OD 260/280 nm wyższym od 1,6.

VI.6. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcję odwrotnej transkrypcji (ang. *reverse transcription*) przeprowadzano w celu uzyskania DNA komplementarnego do RNA (cDNA; ang. *complementary DNA*). Do odwrotnej transkrypcji używano 1 µg RNA, uzupełniając do 10 µl objętość próbek H₂O DEPC. Reakcję syntezy cDNA przeprowadzano z użyciem zestawu odczynników High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA). Reakcję odwrotnej transkrypcji (skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 1) przeprowadzono w termocyklerze (T3000, Biometra GmbH, Göttingen, Niemcy), w następujących warunkach: 10 minut w 25°C, 120 minut w 37°C, 5 minut w 85°C.

Tab.1 Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej w reakcjach odwrotnej transkrypcji z użyciem zestawu odczynników High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	składnik mieszaniny reakcyjnej	objętość [µl]
bufor do reakcji odwrotnej transkrypcji	10× RT Buffer	2
mieszanina deoksynukleotydów	25× dNTP Mix (100mM)	0,8
primery	10× RT Random Primers	2
odwrotna transkryptaza	MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1
	H ₂ O DEPC	4,2
	RNA	10
Całkowita objętość		20

VI.7. Wyciszanie ekspresji podjednostki GluN1 NMDAR w astrocytach przy użyciu siRNA

Wyciszanie ekspresji podjednostki GluN1 (gen *Grin1*), składowej NMDAR odpowiedzialnej za tworzenie kanału jonowego [Traynelis i wsp., 2010] przeprowadzono wykorzystując technologię siRNA. Cztery 21-nukleotydowe dupлексы RNA (5'-CAGCGTCTGGTTTGAGATGAT-3'; 5'-CTGCGTTGACCTGCTCATCAA-3'; 5'-CAGGATAGAAAGAGTGGTAGA-3'; 5'-CAGACTAAAGATAGTGACAAT-3') specyficzne dla podjednostki GluN1 NMDAR i kodujące inne regiony genu umożliwiając najbardziej efektywne wyciszenie, zakupiono w Qiagen i postępowano według protokołu producenta. Do doświadczeń wykorzystywano trzytygodniowe hodowle astrocytów, które przepłukiwano buforem PBS, trypsynizowano i wysiewano na płytki 6-dołkowe w gęstości 155.000 - 160.000 w 1,5 ml DMEM (10% FBS). Tego samego dnia komórki transfekowano z użyciem odczynnika do transfekcji HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden,

Niemcy) według protokołu producenta: „*fast-forward protocol for transfection of adherent cells*”. siRNA (5 μM) zawieszano w 300 μl OptiMEM (bez FBS, antybiotyków, itp.) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), wraz z 9 μl odczynnika do transfekcji HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Niemcy). Po 30 minutach inkubacji w RT kompleksy siRNA-HiPerFect uformowały się i następnie, po kropli, dodawano je do wysianych komórek i delikatnie mieszano. Komórki hodowano w standardowych warunkach przez 24 godziny. Po tym czasie poddane transfekcji komórki hodowano w standardowych warunkach przez 8 i 72 godziny w obecności 100 μM NMDA. Komórkami kontrolnymi wobec transfekowanych kompleksami siRNA-HiPerFect były komórki hodowane w obecności samego odczynnika do transfekcji HiPerFect („mock”). Po tym czasie, badano poziom mRNA dla GluN1 NMDAR, GS, AQP4, Kir4.1 w komórkach metodą PCR w czasie rzeczywistym.

VI.8. Analiza ilościowa ekspresji mRNA metodą PCR w czasie rzeczywistym

Poziom mRNA dla genów GS (*Glu1*), AQP4 (*Aqp4*), Kir4.1 (*Kcnj10*), podjednostek NMDAR (GluN1 – *Grin1*, GluN2a – *Grin2a*, GluN2b – *Grin2b*, GluN2c – *Grin2c*, GluN2d – *Grin2d*, GluN3a – *Grin3a*, GluN3b – *Grin3b*), GLT-1 (*Slc1a2*), GLAST (*Slc1a3*) oraz β -aktyny (*Actb*) i 18S RNA (*Rn18s*), których używano jako genów referencyjnych, oznaczano metodą PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR; ang. *real-time* PCR), wykorzystując sondy (znakowane fluorescencyjnie startery) TaqMan Gene Expression Assay (Tabela 3) oraz TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA). Do reakcji używano 1,5 μl matrycy cDNA i 5 μl TaqMan Fast Universal PCR Master Mix, a całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej (skład: Tabela 2) wynosiła 10 μl . Reakcje Real-Time PCR dla wszystkich badanych genów przeprowadzano w płytkach 96-dołkowych w wystandaryzowanych warunkach (10 minut aktywacji polimerazy w 95°C, 40 cykli: 30 sekund denaturacji w 95°C, 1 minuta przyłączenia w 60°C) w aparacie ABI PRISM 7500 Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornia, USA). Względną zmianę poziomu mRNA obliczono według metody $\Delta\Delta C_t$ [Livak i Schmittgen, 2001] odnosząc się do genu referencyjnego – β -aktyny lub 18S RNA.

Tab.2 Skład mieszaniny reakcyjnej do Real-Time PCR przeprowadzanej z użyciem zestawu odczynników TaqMan Gene Expression.

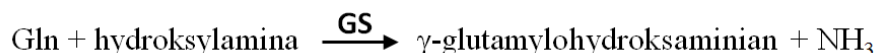
składnik mieszaniny reakcyjnej	objętość [μl]
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix	5
TaqMan Gene Expression Assay (sonda, primer)	0,5
H ₂ O DEPC	3
cDNA	1,5
Całkowita objętość	10

Tab.3 Sondy TaqMan stosowane w reakcji Real-Time PCR.

symbol genu	nazwa genu	numer referencyjny sondy TaqMan (ang. assay ID)
<i>Glut</i>	GS	Mm00725701_s1
<i>Aqp4</i>	aquaporin 4	Mm00802131_m1
<i>Kcnj10</i>	Kir4.1	Mm00445028_m1
<i>Grin1</i>	GluN1	Mm00433790_m1
<i>Grin2a</i>	GluN2a	Mm00433802_m1
<i>Grin2b</i>	GluN2b	Mm00433820_m1
<i>Grin2c</i>	GluN2c	Mm00439180_m1
<i>Grin2d</i>	GluN2d	Mm00433822_m1
<i>Grin3a</i>	GluN3a	Mm01341723_m1
<i>Grin3b</i>	GluN3b	Mm00504568_m1
<i>Slc1a2</i>	GLT-1	Mm00441457_m1
<i>Slc1a3</i>	GLAST	Mm00600697_m1
<i>Actb</i>	β-aktyna	Mm00607939_s1
<i>Rn 18s</i>	18S RNA	Mm03928990_g1

VI.9. Oznaczanie aktywności syntetazy glutaminy

Aktywność syntetazy glutaminy (GS) w astrocytach oznaczano metodą kolorymetryczną opisaną przez Robinsona [2015], polegającej na pomiarze ilości γ -glutamylhydroksaminianu, powstałego w wyniku reakcji hydroksylaminy z glutaminą:



Po 8 godzinach inkubacji z NMDA komórki, rosnące na szalkach o średnicy 6 cm, przepłukiwano roztworem PBS, zalewano 1 ml PBS i zeszkrobano skrobaczką. Po przeniesieniu komórek do probówek typu Eppendorf próbki wirowano na niskich obrotach (2500×g, 5 minut, 4°C), po czym z nad osadzonych komórek usuwano supernatant i dodawano 100 μ l buforu imidazolowego (50 mM imidazol o pH 7,2). Następnie komórki poddawano lizie poprzez naprzemienne zamrażanie (cztery razy po 5 minut) w suchym lodzie i rozmrażanie w łaźni wodnej w 37°C. Z otrzymanego lizatu komórkowego pobierano 25 μ l, które przenoszono do nowych probówek w celu oznaczenia zawartości białka metodą BCA, a do reszty (75 μ l) zawiesiny dodawano mieszaninę reakcyjną (50 mM imidazol o pH 7,2; 2 mM MnCl_2 ; 25 mM arsenian sodu; 0,16 mM ADP; 50 mM Gln; 25 mM hydroksylamina) i inkubowano przez 2 godziny w 37°C. Reakcję zatrzymywano dodając bufor stopujący (0,37 M FeCl_3 ; 0,67 M HCl; 0,2 M kwas trichlorooctowy). Następnie próbki wirowano (15 000×g, 5 minut) i przenoszono po 200 μ l supernatantu z każdej próbki (i standardów do krzywej wzorcowej) do dołków na płytce 96-dołkowej. Absorbancję oznaczano przy długości fali 540 nm z wykorzystaniem mikropłytkowego czytnika fluorescencji FLUOstar Omega (BMG LABTECH

GmbH, Ortenberg, Niemcy) wobec γ -glutamylhydroksaminianu (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) jako standardu. Aktywność GS wyznaczano na podstawie wartości absorbancji roztworów γ -glutamylhydroksaminianu o stężeniu 0 – 5 mM w buforze imidazolowym. Wartości aktywności GS standaryzowano względem zawartości białka w próbkach poddanych reakcji (metoda BCA). Jednostkę aktywności GS definiowano jako $\mu\text{mol}/\text{mg}$ białka/min i wyrażono jako procent kontroli.

VI. 10. Wychwyty D-[2,3-³H]-asparaginianu

Po 72 godzinach inkubacji astrocytów (hodowanych na płytkach 24-dołkowych; Nunc) z 100 μM NMDA lub 2 mM Glu pożywkę usuwano i komórki przepłukiwano dwukrotnie buforem Krebsa (118 mM NaCl; 25 mM NaHCO₃; 4,7 mM KCl; 1,2 mM KH₂PO₄; 2,5 mM CaCl₂; 1,2 mM MgSO₄; 10 mM glukoza) wysycanym 95% O₂ i 5% CO₂, pH 7,4, o temperaturze 37°C. Wychwyty Asp (niemetabolizowanego analogu Glu) badano preinkubując astrocyty w buforze Krebsa przez 15 minut w 37°C. Po podaniu nieznakowanego D-Asp o stężeniu 500 μM , a w doświadczeniach kinetycznych w stężeniu 10 – 1500 μM , wychwyty rozpoczynano od dodania 0,1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ D-[2,3-³H]-Asp (PerkinElmer, Waltham, MA, USA; specyficzna radioaktywność 9,25 MBq/ml) na 3 minuty. Wychwyty zatrzymywano przez szybkie dodanie 1 ml zimnego (4°C) buforu Krebsa, który usuwano, a komórki trzykrotnie przepłukiwano zimnym (4°C) buforem Krebsa. Następnie komórki zalewano 500 μl 1 M NaOH i przez 60 minut poddawano lizie w 37°C. Do fiolek scyntylicyjnych pobierano 400 μl lizatu i dodawano 2 ml płynu scyntylicyjnego InstaGell (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Radioaktywność próbek (cpm; ang. *counts per minute*) mierzono w liczniku scyntylicyjnym (Wallac 1409, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) przez 5 minut. Pozostały lizat komórkowy służył do oznaczenia białka metodą Bradforda [1976]. Wyniki wyrażono jako stosunek dpm (ang. *disintegrations per minute*) do ilości białka i przedstawiono jako procent kontroli.

VI. 11. Wiązanie [3-³H]-MK801

Po 21 dniach hodowli, pożywkę usuwano i komórki przepłukiwano dwukrotnie buforem (20 mM HEPES, pH 7.4 o temperaturze 37°C). Specyficzne wiązanie [³H]-MK801 (antagonisty NMDAR blokującego kanał receptora), badano preinkubując astrocyty przez 15 minut w 37°C w buforze z:

- a) 100 μM NMDA,
- b) 2 mM Glu,
- c) 30 μM Gly + 100 μM NMDA,
- d) 30 μM Gly + 2 mM Glu.

Po preinkubacji dodawano 4 nM [³H]-MK801 (PerkinElmer, Waltham, MA, USA; specyficzna radioaktywność 9,25 MBq/ml) na 15 minut. Przy oznaczaniu wiązania niespecyficznego stosowano

1 mM MK801. Wiązanie zatrzymywano przez szybkie dodanie 1 ml zimnego (4°C) buforu, który usuwano, a komórki trzykrotnie przepłukiwano zimnym (4°C) buforem. Następnie komórki zalewano 500 µl 1 M NaOH i przez 60 minut poddawano lizie w 37°C. Do fiolek scyntylicyjnych pobierano 400 µl lizatu i dodawano 2 ml płynu scyntylicyjnego InstaGell (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Radioaktywność próbek (cpm; ang. *counts per minute*) mierzono w liczniku scyntylicyjnym (Wallac 1409, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) przez 5 minut. Pozostały lizat komórkowy służył do oznaczenia białka metodą Bradforda [1976]. Wyniki wyrażono jako stosunek dpm do ilości białka i przedstawiono jako procent kontroli.

VI. 12. Badanie zmian stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego ($[Ca^{2+}]_i$)

Badaniu poddano:

- 1) komórki hodowane w standardowych warunkach,
- 2) komórki traktowane 50 µM MK801 przez 45 minut w 37°C w pożywce hodowlanej,
- 3) komórki z wyciszoną podjednostką GluN1 NMDAR („siGluN1”),
- 4) komórki kontrolne wobec transfekowanych, które hodowano w obecności samego odczynnika do transfekcji HiPerFect („mock”).

Zmiany $[Ca^{2+}]_i$ były rejestrowane za pomocą wskaźnika fluorescencyjnego wrażliwego na zmiany stężenia wapnia – Fluo3 [Schousboe i wsp., 1992]. Astrocyty były inkubowane przez 45 minut w 37°C z 5 µM Fluo3 (F1242, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.02% kwasem pluronowym (P2443, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) w buforze Locke 5 o składzie: 154 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.3 mM $CaCl_2$, 4 mM $NaHCO_3$, 5 mM glukoza i 5 mM HEPES (pH 7.4). Następnie roztwór odciągano i po trzykrotnym przepłukaniu komórek buforem Locke 5, podawano NMDA lub Glu. Komórkom podawano również 100 µM ATP jako pozytywną kontrolę [Jeremic i wsp., 2001, Shigetomi i wsp., 2010].

Zmiany we fluorescencji Fluo3 były monitorowane co 10 s przez 25 minut z wykorzystaniem mikropłytkowego czytnika fluorescencji FLUOstar Omega (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Niemcy) ustawionego na wzbudzenie przy długości fali 485 nm i emisję przy długości fali 538 nm. Poziom wyjściowy fluorescencji był rejestrowany przez 90 sekund, po czym rejestrowano zmiany we fluorescencji po traktowaniu NMDA lub Glu.

Intensywność fluorescencji komórek inkubowanych z Fluo3 była mierzona również za pomocą mikroskopu semikonfokalnego ze spindyskiem Cell Observer SD (Zeiss, Jena, Niemcy) zaopatrzonego w oświetlacz Colibri emitujący światło ledowe o długości fali 488 nm. Pomiar fluorescencji Fluo3 rejestrowano co 15 sekund przez 25 minut. Po akwizycji obrazu analizowano przy

użyciu pakietu fizjologicznego programu ZEN 2012 (Zeiss, Jena, Niemcy) w Środowiskowym Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych (IMDiK PAN).

Ze względu na stabilność autofluorescencji, która nie przekraczała 10% wyjściowego poziomu fluorescencji płytek z komórkami inkubowanymi z Fluo3, nie było potrzeby jej korygowania w ustawieniach żadnego z doświadczeń. Przy pomiarach za pomocą mikroskopu semikonfokalnego odjęto szum tła, a obszary zainteresowania (ROI; ang. *region of interest*) zostały precyzyjnie narysowane wokół każdej wybranej do liczenia komórki. Średnią intensywność fluorescencji (F) zmierzono dla każdego wariantu doświadczenia w płytce (metoda wykorzystująca czytnik fluorescencji) i zaznaczonego uprzednio ROI (metoda wykorzystująca mikroskop semikonfokalny), a zmiany $[Ca^{2+}]_i$ oceniano przez obliczenie względnej zmiany fluorescencji w stosunku do poziomu wyjściowego ($\Delta F/F_0$) o wzorze $\Delta F/F_0 = (F_{tx} - F_0)/F_0$, gdzie F_{tx} jest F w czasie x, a F_0 oznacza średnią fluorescencję podczas pierwszych 90 sekund (metoda wykorzystująca czytnik fluorescencji) lub 165 sekund (metoda wykorzystująca mikroskop semikonfokalny). Względna zmiana fluorescencji ($\Delta F/F_0$) dla każdej wybranej komórki została obliczona jako suma znormalizowanych wartości $\Delta F/F_0$ między 0 a 100 sekundą (metoda wykorzystująca czytnik fluorescencji) oraz między 0 a 3 minutą (metoda wykorzystująca mikroskop semikonfokalny). Wyniki uzyskane przy użyciu mikroskopu semikonfokalnego przedstawiono jako obrazy spod mikroskopu i przestrzenne profile intensywności świecenia obrazów (2.5 D) dla przykładowego doświadczenia w czasie 0 sekund (Ryc. 25-33; A - przed stymulacją) i po traktowaniu NMDA lub Glu (Ryc. 25-33; B - 3 minuta), czy ATP (Ryc. 27; B - 3 minuta), oraz jako przykładowy wykres intensywności fluorescencji dla 13 losowo wybranych komórek z danego wariantu doświadczenia w czasie 0 do 25 minut (Ryc. 25-33 C).

Wyniki na Ryc. 34A i C (metoda wykorzystująca mikroskop semikonfokalny) oraz Ryc. 35 (metoda wykorzystująca czytnik fluorescencji) przedstawiono graficznie jako wartości procentowe względnej zmiany fluorescencji w stosunku do poziomu wyjściowego ($\Delta F/F_0$ %). Ponadto, dane ilościowe charakteryzujące wzrost fluorescencji Fluo3 powyżej poziomu wyjściowego, zmierzone tuż po szybkiej fazie wzrostu poziomu Ca^{2+} , tj. po traktowaniu NMDA lub Glu, i różnice między grupami eksperymentalnymi przedstawiono na Ryc. 34 B, D (metoda wykorzystująca mikroskop semikonfokalny) oraz na Ryc. 36 (metoda wykorzystująca czytnik fluorescencji). Dane przedstawione na Ryc. 34 i Ryc. 36 uzyskano z trzech niezależnych hodowli komórkowych. Wyniki dla każdego wariantu doświadczenia na Ryc.34 przedstawiają średnie dane zebrane z 5 losowo wybranych komórek w obserwowanym polu widzenia.

VI. 13. Izolacja i analiza elektroforetyczna białek metodą Western-blot (WB)

Do lizy komórek używano buforu RIPA (ang. *radio-immunoprecipitation assay*) o składzie: 0,5% CHAPS; 0,01 M fosforan sodu (pH=7,2); 0,15 M NaCl; 0,1% SDS; 1% deoksycholan sodu; 1% NP-40 (Igepal; Fluka); 2 mM EDTA. Bezpośrednio przed doświadczeniem do buforu dodawano 50 mM fluorek sodu oraz mieszaniny inhibitorów proteaz (1:200) i fosfataz (1:100) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Komórki, rosnące na szalkach o średnicy 6 cm lub 10 cm, przepłukiwano PBS, zalewano 1 ml PBS i zeskrobywano skrobaczką. Po przeniesieniu komórek do probówek typu Eppendorf próbki wirowano na niskich obrotach (2500×g, 5 minut, 4°C), po czym z nad osadzonych komórek usuwano supernatant i dodawano 50 µl buforu RIPA. Lizat komórkowy poddawano krótkiej (15 sekund) trzykrotnej sonifikacji na lodzie i wirowano (10.000×g, 10 minut, 4°C). Supernatant, zawierający białka przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf i oznaczano zawartość białka metodą BCA według protokołu załączonego przez producenta (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Do 20 µg (120 µg w przypadku GluN1 NMDAR) białka dodawano odczynnik obciążająco-barwiący (Sample Buffer Laemmli 2x Concentrate, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) i inkubowano 30 minut w RT (w przypadku GluN1 NMDAR, GS, Kir4.1) lub 30 minut w 37°C (w przypadku AQP4). Próbki białka nakładano na 10% żel poliakrylamidowy i dokonywano rozdzielania elektroforetycznego białek (SDS-PAGE; ang. *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) w buforze do elektroforezy (skład w Tabeli 4), w aparacie firmy Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA). Na żel razem z próbkami nakładano marker PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 10-250 kDa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) w celu identyfikacji wielkości prążków uzyskanych po rozdzielaniu. Następnie przeprowadzano półsuchy transfer białek z żelu na membranę nitrocelulozową (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA) w buforze do transferu półsuchego (skład w Tabeli 4), w aparacie Trans-Blot® Turbo™ Transfer System firmy Bio-Rad (napięcie 25 V, natężenie 1 A, 30 minut). Wydajność transferu sprawdzano stosując barwienie roztworem odczynnika Ponceau S (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Po transferze membranę z białkami inkubowano przez 1 godzinę w 3% BSA w buforze TBS-T (ang. *tris-buffered saline with Tween-20*) w RT w celu zablokowania miejsc niespecyficznego wiązania przeciwciał. Następnie membranę inkubowano z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym (stężenia użytych przeciwciał podano w Tabeli 5) przez noc (*o/n*; ang. *over night*) w 1% BSA w TBS-T w 4°C, po czym trzykrotnie płukano TBS-T i inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym, skoniugowanym z peroksydazą chrzanową (HRP; ang. *horseradish peroxidase*) w 1% BSA w TBS-T przez 1 godzinę w RT. Następnie membrany przepłukiwano trzykrotnie TBS-T i dokonywano detekcji sygnału chemiluminescencyjnego za pomocą substratu dla HRP, Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA). W kolejnym etapie membrany trzykrotnie przepłukiwano TBS-T i

usuwano przeciwciała związane z membraną (tzw. stripping) za pomocą roztworu 0,1 M Gly o pH 2,9. Po strippingu membranę ponownie blokowano w 3% BSA w TBS-T, trzykrotnie przepłukiwano TBS-T i inkubowano przez godzinę z przeciwciałem anty-dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego skoniugowanym z HRP (GAPDH; ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) w 1% BSA w TBS-T, którą stosowano jako białko referencyjne. Chemiluminescencję mierzono za pomocą aparatu G-Box, a analizę densytometryczną przeprowadzono za pomocą programu GeneTools (SynGene, Cambridge, Wielka Brytania). Wyniki przedstawiano jako iloraz sygnału badanego białka do białka referencyjnego (GAPDH) i porównywano do wartości uzyskanych dla komórek nietraktowanych (wyniki wyrażono jako procent kontroli).

Tab.4 Skład żeli i buforów używanych do WB

Żel rozdzielający	10 % akrylamid/bis-akrylamid; 0,375 M Tris-HCl pH=8,8; 0,1% SDS; 0,05 % TEMED; 0,05% nadsiarazan amonu
Żel zagęszczający	4 % Akrylamid/Bisakrylamid; 0,125 M Tris-HCl pH=6,8; 0,1% SDS; 0,1% TEMED; 0,05% nadsiarazan amonu
Bufor do elektroforezy	25 mM Tris ; 192 mM Gly ; 0,1% SDS ; pH=8,3
Bufor do transferu pólusowego	48 mM Tris; 39 mM Gly; 20% metanol; 0,0375% SDS
Bufor TBS-T	20 mM Tris pH=7,5; 0,9% NaCl; 0,5 % Tween-20

Tab.5 Spis przeciwciał stosowanych w WB

nazwa przeciwciała I ^o	numer katalogowy, producent	stężenie przeciwciała
anty-GluN1 NMDAR	05-432, Merck	1:200
anty-GS	G2781, Sigma-Aldrich	1:10 000
anty-AQP4	sc-9888, Santa Cruz Biotechnology	1:1000
anty-Kir4.1	AGP-012, Alomone Labs	1:800
anty-GAPDH	HRP-60004, Proteintech	1:8 000

VI. 14. Oznaczanie białka

Sposób przygotowania próbek do oznaczania białka opisany jest w poszczególnych podrozdziałach. W próbkach traktowanych NaOH białko oznaczano metodą Bradforda [1976], natomiast w próbkach do WB (w buforze RIPA) metodą Smitha [1985] z wykorzystaniem kwasu bicinchoninowego (BCA).

VI. 14.1. Oznaczanie białka metodą Bradforda

W metodzie tej używa się błękitu Coomasie Brilliant Blue (barwnika błękitu brylantowego), który po związaniu z białkiem zmienia barwę z brązowej na niebieską, tworząc stabilny kompleks wykorzystywany do oznaczenia kolorymetrycznego [Bradford, 1976]. Trzydzieści µl lizatu

komórkowego (lub standardu do krzywej wzorcowej) w 1 M NaOH nanoszono (w trzech powtórzeniach) do dołków na płytce 96-dołkowej i dodawano 270 μ l odczynnika Bradforda (0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250; 4,75% etanol; 8,5% kwas ortofosforowy). Pomiarów absorbancji dokonywano przy długości fali 595 nm z wykorzystaniem spektrofotometru płytkowego (MR680, Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA). Zawartość białka wyznaczano na podstawie krzywej wzorcowej wykreślonej na podstawie wartości absorbancji roztworów BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) o stężeniu 0,5 – 10 μ g/próbę w 1 M NaOH.

VI. 14.2. Oznaczenie białka metodą BCA

Metoda ta opiera się na zdolności białek do redukcji jonów Cu^{2+} do Cu^+ w stopniu proporcjonalnym do stężenia oraz zdolności Cu^+ do tworzenia barwnych kompleksów z kwasem bincinoninowym (BCA) o maksimum absorbancji przy 562 nm. Absorbancja kompleksów jest wprost proporcjonalna do zawartości jonów Cu^+ , których ilość z kolei zależna jest od ilości białka w badanej próbce. Do oznaczeń używano zestawu BCA Protein Assay Kit (Pierce™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Próbkę białka rozcieńczano 10-krotnie i 10 μ l badanej próby lub standardu nanoszono do dołka na płytce 96-dołkowej w 3 powtórzeniach. Następnie do każdego dołka dodawano 200 μ l odczynnika do oznaczeń BCA Working Reagent (sporządzonego poprzez zmieszanie odczynników „A” i „B” w stosunku 50:1). Po 30 minutach inkubacji w temperaturze 37°C mierzono absorbancję przy długości fali 570 nm wykorzystując spektrofotometr płytkowy (MR680, Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA). Zawartość białka obliczano na podstawie krzywej wzorcowej wykreślonej na podstawie wartości absorbancji roztworów BSA o stężeniach 0,025 – 2 mg/ml.

VI.15. Identyfikacja białek za pomocą Spektrometrii Mas (MS)

Przygotowanie prób

Identyfikacji poddano 5 μ g lizatu białkowego zawieszony w buforze RIPA lub pocięty na kawałki fragment gradientowego (7,5–15%) żelu poliakrylamidowego, na którym rozdzielono 20 μ g lizatu białkowego, wybarwionego następnie srebrem w celu identyfikacji ścieżek białka.

Trawienie trypsyną

Podczas procedury trawienia białka zawarte w lizatach komórkowych lub kawałkach żelu poliakrylamidowego, zostały poddane redukcji 50 mM tris(2-karboksyetylo)fosfiny (TCEP; ang. *tris(2-carboxyethyl)phosphine*) przez 60 minut w temperaturze 60°C oraz alkilacji 200 mM metylotiometylosulfotlenku metylu (MMTS; ang. *methanethiosulfonate*). Kolejnym etapem była degradacja białek do peptydów przy pomocy enzymu proteolitycznego – trypsyny (sequencing Grade

Modified Trypsin – Promega V5111) w stosunku 1:50 (v:v) w 37°C o/n. Następnie reakcję trawienia zablokowano poprzez zakwaszenie próbki 0,1% kwasem trifluorooctowym (TFA).

Rozdział mieszaniny i pomiar mas peptydów - LC-MS

Uzyskane mieszaniny peptydów były rozdzielane w układzie nano-HPLC: prekolumna RP-18 (nanoACQUITY Symmetry® C18-Waters 186003514), która była połączona bezpośrednio z kolumną nano-HPLC RP-18 (nanoACQUITY BECH C18 - Waters 186003545), gdzie jako fazy ruchomej używano gradientu acetonitrylu 5-35% w obecności 0,05% kwasu mrówkowego o przepływie 150 nl/min przez 180 minut. Wylot kolumny chromatograficznej był bezpośrednio sprzężony ze spektrometrem mas Orbitrap Velos (Thermo Electron Corp., San Jose, CA), na którym dokonano pomiaru mas peptydów oraz ich fragmentów.

Analiza danych

Białka zostały zidentyfikowane poprzez porównania uzyskanych mas peptydów i ich fragmentów z bazą danych sekwencji białkowych SwissProt (wersja uaktualniana w czerwcu 2015) zawężonej do sekwencji *Mus musculus* przy pomocy systemu identyfikacji MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>; Matrix Science, London).

Analiza statystyczna wiarygodności uzyskanych przypisań pozwoliła ustalić listę białek obecnych w próbkach. Tolerancja masy jonów mieściła się w granicach 20 ppm i 0,6 Da. Białko uznano za prawidłowo zidentyfikowane, jeżeli prawdopodobieństwo przypadkowego przyporządkowania było mniejsze niż 5%.

VI.16. Analiza statystyczna

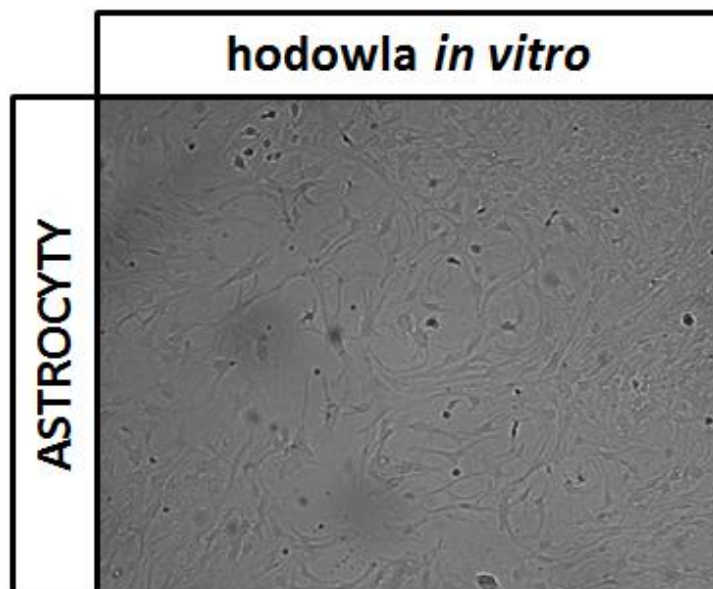
Wszystkie wyniki wyrażono jako średnie arytmetyczne \pm odchylenie standardowe (SD; ang. *standard deviation*). Liczbę doświadczeń podano w legendzie do każdej ryciny. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono stosując test t-Studenta (w przypadku porównywania dwóch grup) lub analizę wariancji (ANOVA) (w przypadku porównywania więcej niż dwóch grup) z testem *post hoc* Dunnett'a lub Tukey'a w stosunku do kontroli, przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism 7.0. Różnice były uznawane za znamienne statystycznie, gdy poziom ufności wynosił $p < 0,05$.

VII. WYNIKI

VII.1. Charakterystyka hodowli pierwotnych korowych astrocytów mysich

VII.1.1. Potwierdzenie obecności wybranych białek astrocytarnych

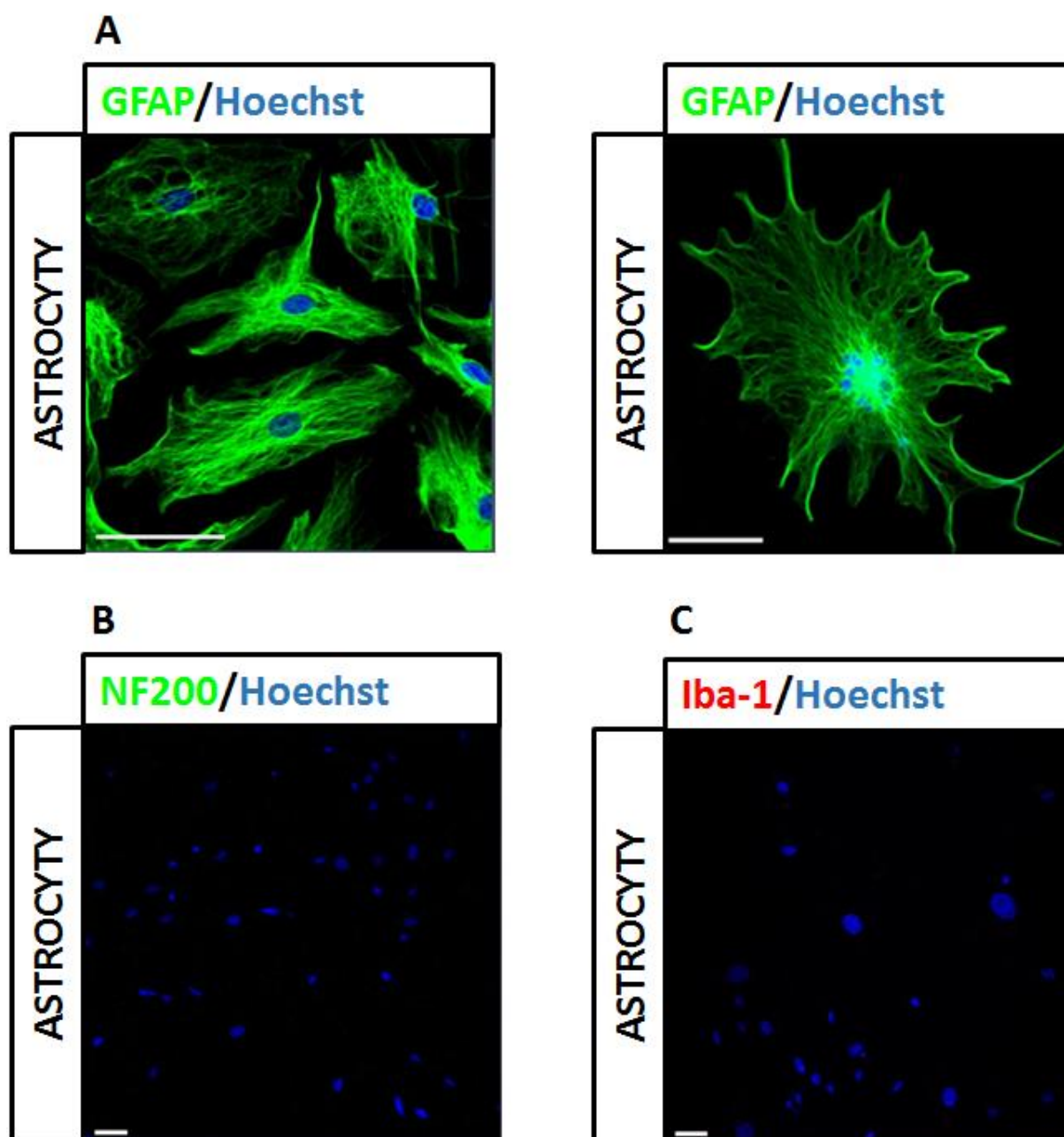
W warunkach hodowli *in vitro* astrocyty są spłaszczone, wielokątne lub wrzecionowate, co pokazano za pomocą mikroskopii z kontrastem fazowym (Ryc. 11).



Ryc.11 Przykładowa mikrofotografia przedstawiająca morfologię korowych astrocytów mysich w wyprowadzonej hodowli. Powiększenie 40x.

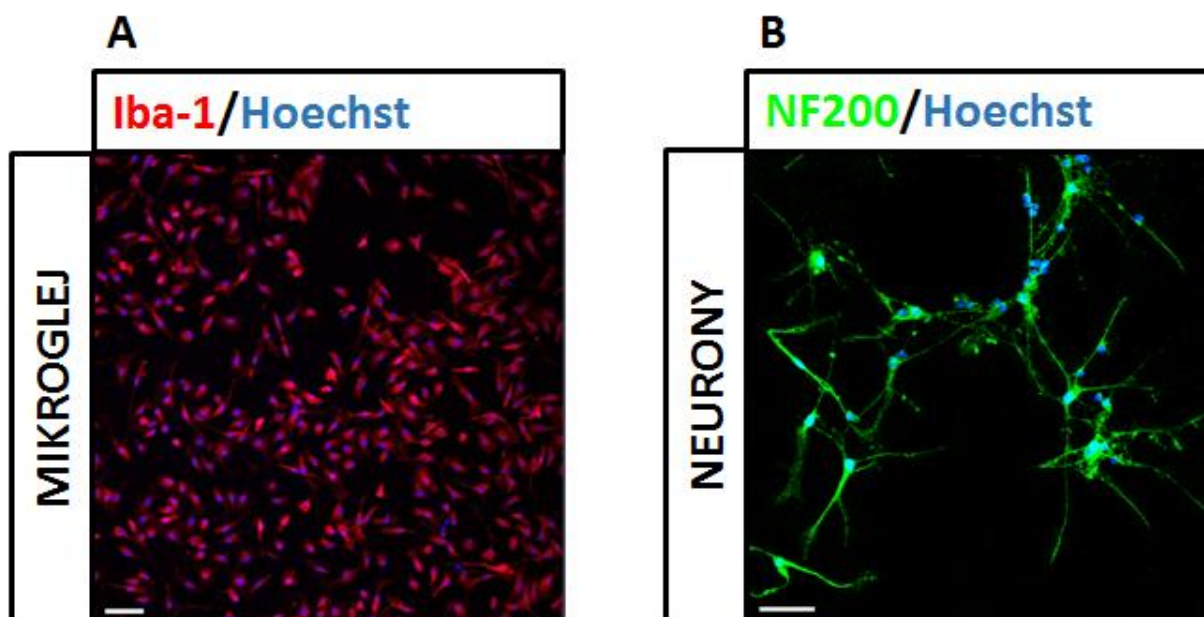
Przeprowadzona analiza immunocytochemiczna pozwoliła stwierdzić, że prowadzona hodowla komórkowa składa się z astrocytów, co wykazano barwieniem z wykorzystaniem markera astrocytów – GFAP (ang. *Glial fibrillary acidic protein*), kwaśnego włóknikowego białka glejowego (Ryc. 12A).

Czystość wyprowadzonej pierwotnej hodowli astrocytów potwierdziły dodatkowe barwienia z wykorzystaniem markerów dla neuronów – NF200 (Ryc. 12B) i mikrogleju – Iba-1 (Ryc. 12C), które wykazały brak obecności tych komórek w hodowli.



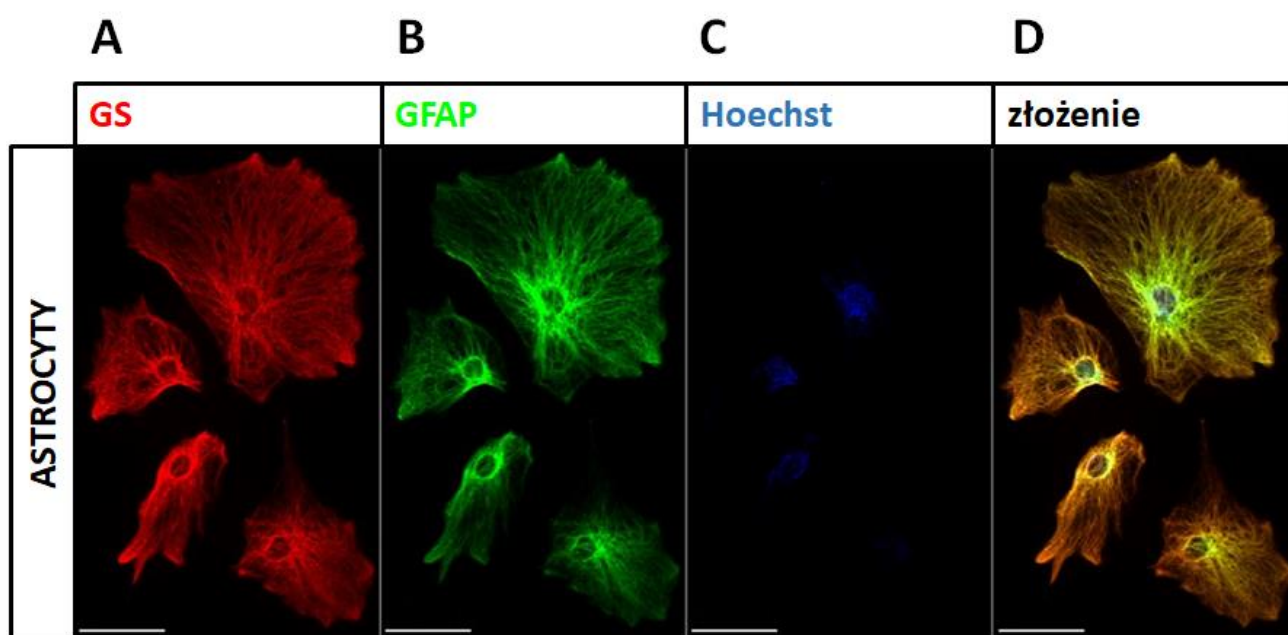
Ryc.12 Immunocytochemiczne barwienie pierwotnych astrocytów mysich przeciwciałami (A) anty-GFAP (zielony), (B) anty-NF-200 (zielony), (C) anty-Iba-1 (czerwony) w połączeniu z Hoechst (niebieski). Skala, 50 μ m.

Specyficzność pierwszorzędowych przeciwciał anty-Iba-1 i anty-NF200 potwierdziły barwienia pierwotnych hodowli mikrogleju mysiego (Ryc. 13A) (komórki mikrogleju mysiego otrzymano dzięki uprzejmości Pani Profesor Bożeny Kamińskiej-Kaczmarek z Pracowni Neurobiologii Molekularnej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie) i neuronów mysich (Ryc. 13B) (hodowlę pierwotną mysich komórek ziarnistych mózdzku otrzymano według metody Schousboe [1989], nieznacznie zmodyfikowanej w Zakładzie Neurotoksykologii IMDiK PAN [Dolińska i wsp., 2004]).



Ryc.13 Immunocytochemiczne barwienie pierwotnej hodowli mikrogleju i neuronów mysich przeciwciałami (A) anti-Iba-1 (czerwony), (B) anti-NF-200 (zielony) w połączeniu z Hoechst (niebieski). Skala, 50 μ m.

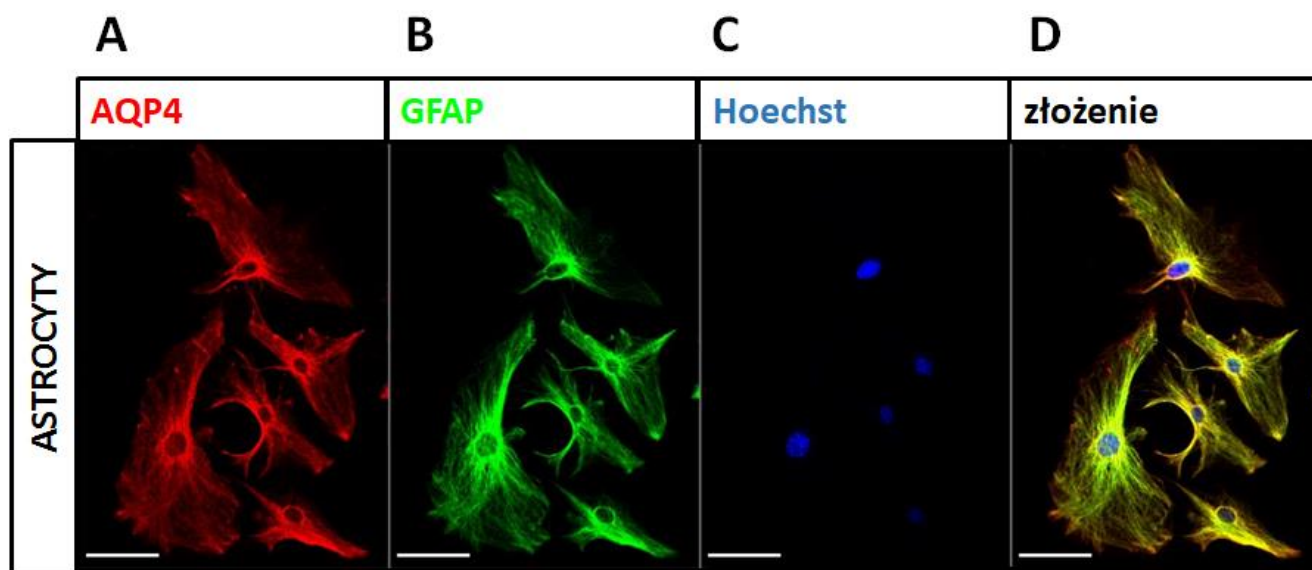
Zastosowanie przeciwciała anti-GS, białka również wykorzystywanego jako marker astrocytów [Anlauf i Derouiche, 2013], potwierdziło ekspresję GS (Ryc. 14A), a także czystość prowadzonej hodowli pierwotnej astrocytów mysich.



Ryc.14 Immunocytochemiczne barwienie pierwotnych astrocytów mysich przeciwciałami (A) anti-GS (czerwony), (B) anti-GFAP (zielony), (C) Hoechst (niebieski), (D) obraz złożony. Skala, 50 μ m.

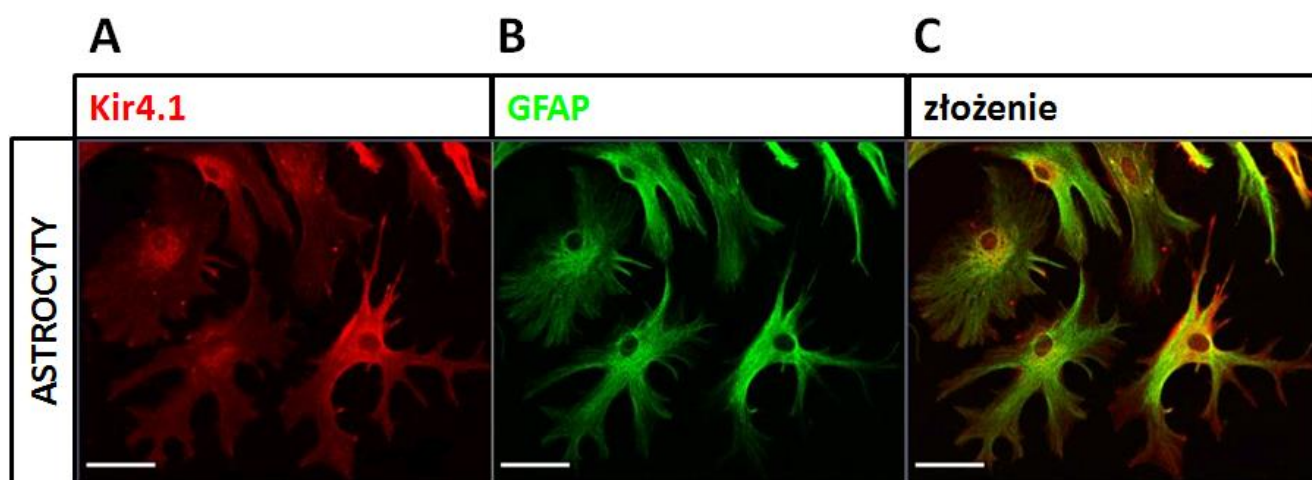
W hodowli większość astrocytów traci charakterystyczny kształt podobny do gwiazdy, jak również polaryzację subkomórkowej lokalizacji AQP4 i Kir4.1 w błonie komórkowej, normalnie występującą *in vivo* [Nicchia i wsp., 2008, Benfenati i Ferroni, 2010].

Przeprowadzona analiza immunocytochemiczna ujawniła, że AQP4 (Ryc. 15A) ulega ekspresji zarówno w ciele jak i w zakończeniach astrocytów (Ryc. 15D), podobnie do wcześniej opisywanych wzorów ekspresji *in vitro* [Saadoun i wsp., 2005b, Nicchia i wsp., 2008, Sharma i wsp., 2010, Aoyama i wsp., 2012, Potokar i wsp., 2013, Posati i wsp., 2016].



Ryc.15 Immunocytochemiczne barwienie pierwotnych astrocytów mysich przeciwciałami (A) anty-AQP4 (czerwony), (B) anty-GFAP (zielony), (C) Hoechst (niebieski), (D) obraz złożony. Skala, 50 μm .

Potwierdzono także wzór ekspresji Kir4.1 w pierwotnych hodowlach astrocytów przy użyciu metody podwójnego barwienia immunofluorescencyjnego. Analiza mikroskopowa ujawniła, że immunoreaktywność Kir4.1 była najczęściej wykrywana zarówno w ciele i zakończeniach astrocytów (Ryc. 16), podobnie do wcześniej opisanych wzorów ekspresji *in vivo* [Harada i wsp., 2013, Nagao i wsp., 2013] i *in vitro* [Potasi i wsp., 2016, Kinboshi i wsp., 2017].

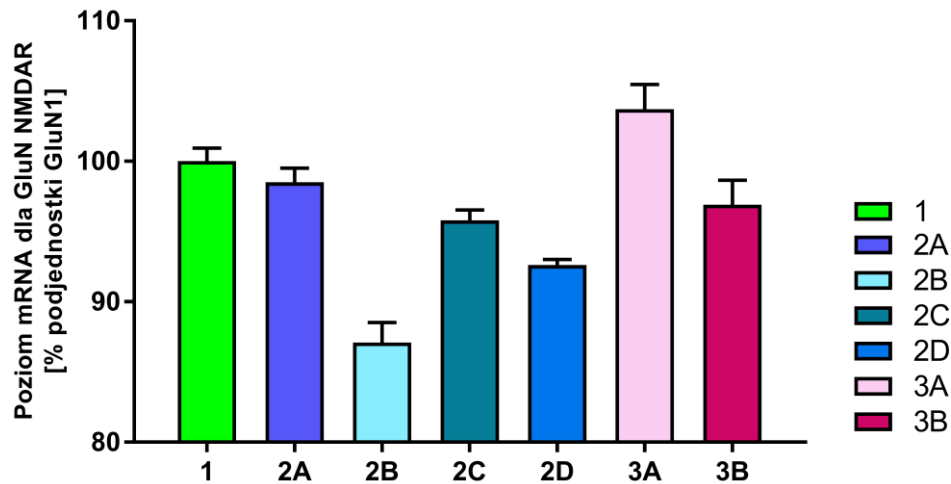


Ryc.16 Immunocytochemiczne barwienie pierwotnych astrocytów mysich przeciwciałami (A) anty-Kir4.1 (czerwony), (B) anty-GFAP (zielony), (C) obraz złożony. Skala, 50 μm .

Dodatkowo w próbkach lizatów komórkowych pochodzących z hodowanych astrocytów mysich poddanych analizie MS zidentyfikowano AQP4, GFAP, GLAST, GLT-1, GS (Tabela 6).

VII.1.2. Potwierdzenie obecności podjednostki GluN1 NMDAR na poziomie mRNA i białka

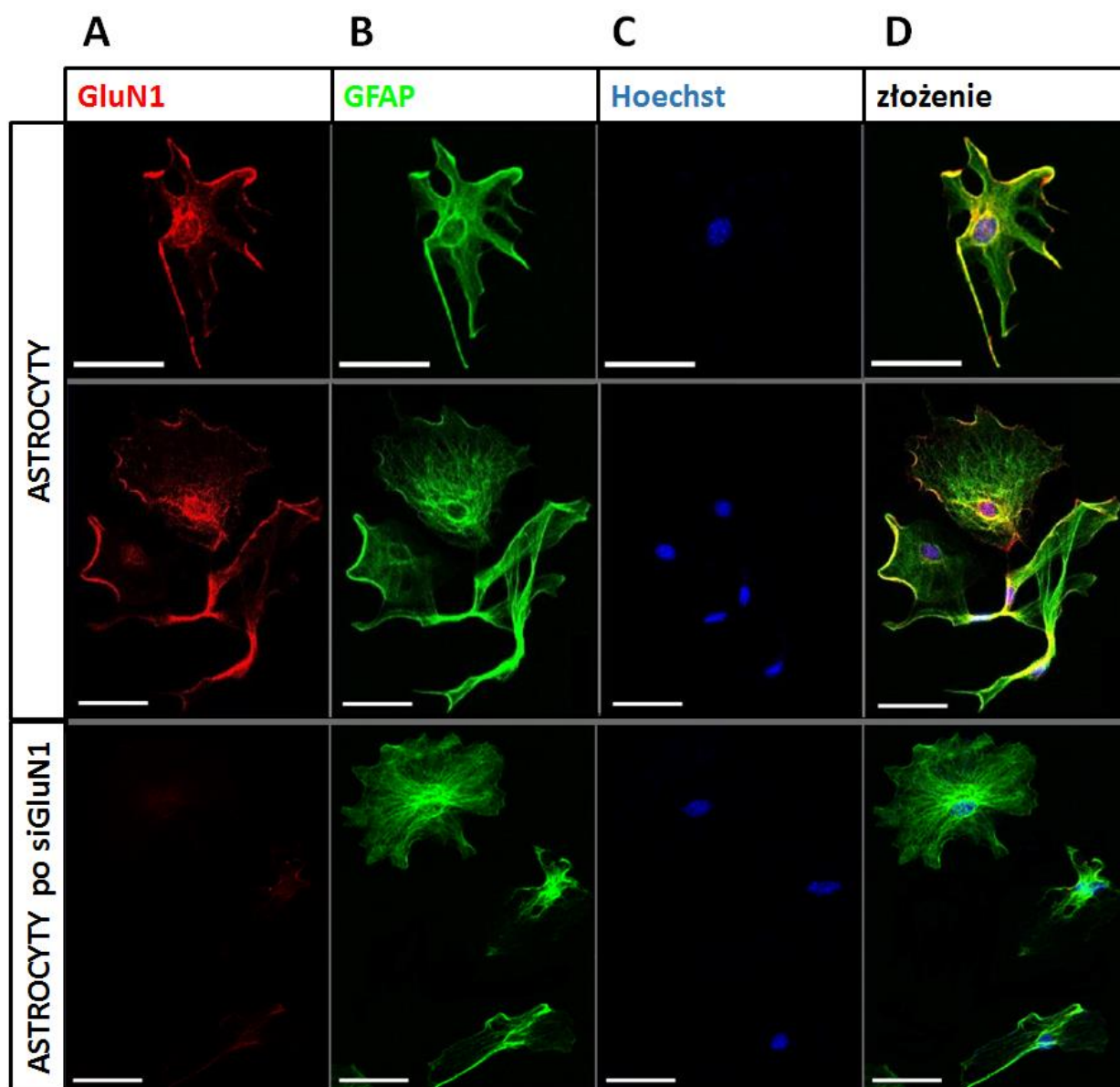
W prowadzonej hodowli astrocytów mysich wykazano obecność mRNA dla wszystkich siedmiu podjednostek NMDAR (Ryc. 17).



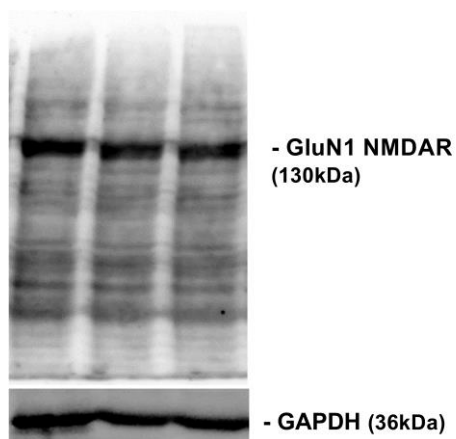
Ryc.17 Relatywny poziom ekspresji mRNA podjednostek NMDAR w hodowanych astrocytach mysich. Zastosowano 18S RNA jako gen referencyjny. Wyniki są średnią (\pm SD) z 3 niezależnych doświadczeń i są wyrażone jako procent podjednostki GluN1 NMDAR.

Stosując barwienie immunofluorescencyjne z przeciwciałem anty-GluN1 NMDAR wykazano błonową ekspresję białka podjednostki GluN1 NMDAR w hodowanych astrocytach mysich (Ryc. 18). Na panelu dolnym Ryciny 19 zilustrowano specyficzność i skuteczność wyciszenia podjednostki GluN1 NMDAR za pomocą siRNA.

Ponadto, ekspresję białka podjednostki GluN1 NMDAR w hodowanych astrocytach mysich wykazano również metodą Western-blot. Na elektroforogramach uwidocznił się sygnał odpowiadający badanej podjednostce na wysokości ~130 kDa (Ryc. 19)



Ryc.18 Immunocytochemiczne barwienie pierwotnych astrocytów mysich z niewyciszoną i wyciszoną podjednostką GluN1 NMDAR przeciwciałami (A) anti-GluN1 NMDAR (czerwony), (B) anti-GFAP (zielony), (C) Hoechst (niebieski), (D) obraz złożony. Skala, 50 μ m.



Ryc.19 Przykładowy obraz immunodetekcji białka GluN1 NMDAR w hodowanych astrocytach mysich.

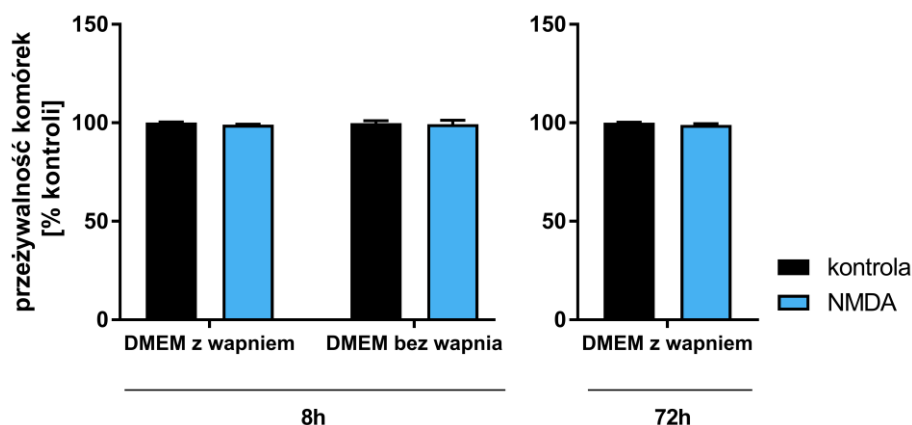
W lizatach komórkowych pochodzących z hodowanych astrocytów analiza MS nie wykazała obecności podjednostki GluN1 NMDAR (Tabela 6). Natomiast zidentyfikowano podjednostkę GluN1 NMDAR w homogenatach kory mózgowej myszy oraz w wyciętym prążku żelu poliakrylamidowego na wysokości 130 kDa, na którym rozdzielono elektroforetycznie lizat komórkowy pochodzący z hodowanych neuronów mysich. Ponadto zidentyfikowano podjednostkę GluN2D NMDAR w homogenatach kory mózgowej myszy oraz w lizatach pochodzących z hodowanych astrocytów mysich. Białko podjednostki GluN2B zidentyfikowano tylko w homogenatach kory mózgowej myszy (Tabela 6).

Tab.6 Wybrane białka zidentyfikowane w próbkach poddanych analizie MS.

	Rodzaj próbki	Białko
PRAŻKI	neurony mysie	<u>GluN1 NMDAR</u> NF200
	kora mózgowa myszy	AQP4 GFAP GLAST GLT-1 <u>GluN1 NMDAR</u> GluN2B NMDAR GluN2D NMDAR GS
LIZATY	astrocyty mysie	AQP4 GFAP GLAST GLT-1 GluN2D NMDAR GS

VII.2. Wpływ NMDA na przeżywalność (test MTT) pierwotnych korowych astrocytów mysich

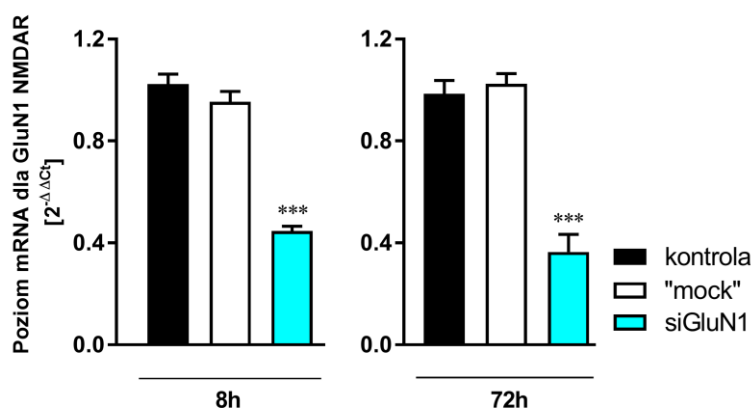
Traktowanie astrocytów mysich NMDA (100 μ M) przez 72 godziny w obecności Ca^{2+} zewnątrzkomórkowego nie wpłynęło na wynik testu MTT, wskazując na niezmienną przeżywalność komórek w tych warunkach (Ryc. 20). Jednakże w pożywce bezwapniowej zaczęło się ujawniać nieznaczne obniżenie przeżywalności komórek, gdy inkubacja trwała dłużej niż 8 godzin (dane nie przedstawione). Dlatego do eksperymentów, które wymagały pożywki pozbawionej wapnia wybrano inkubację trwającą 8 godzin.



Ryc.20 Wpływ 8- i 72-godzinnej inkubacji z NMDA (100 μ M) na przeżywalność pierwotnych astrocytów mysich (test MTT). Wyniki są średnią (\pm SD) z 4 niezależnych doświadczeń i są wyrażone jako procent kontroli (pożywka z wapniem).

VII.3. Wpływ wyciszenia podjednostki GluN1 (siGluN1) na poziom mRNA dla podjednostki GluN1 NMDAR w pierwotnych korowych astrocytach mysich

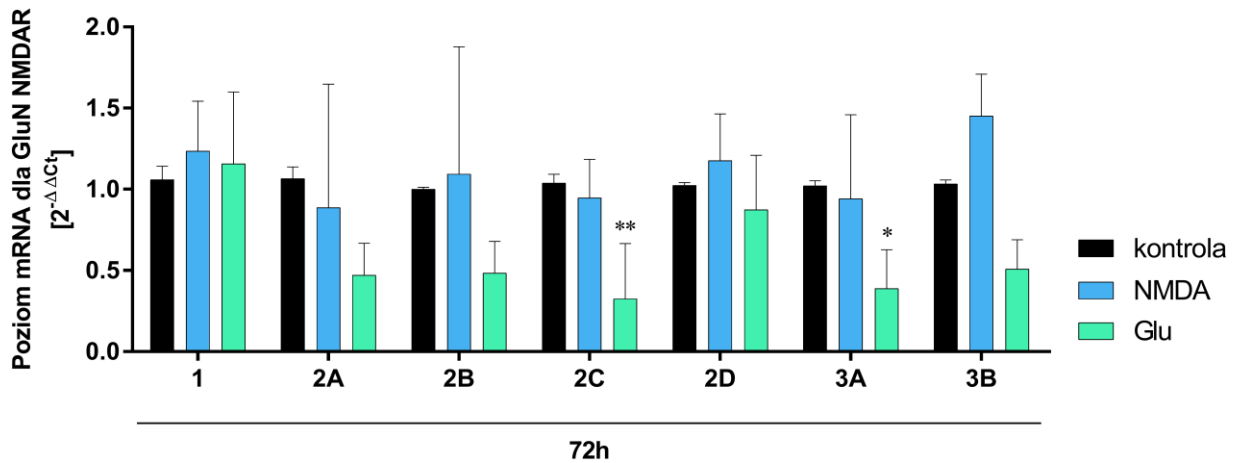
Skuteczność wyciszenia ekspresji podjednostki GluN1 NMDAR za pomocą siRNA (siGluN1) sprawdzono określając względny poziom mRNA dla tej podjednostki metodą Real-Time PCR. W komórkach traktowanych siGluN1 nastąpiło obniżenie poziomu mRNA tej podjednostki o 56% po 8 godzinach i o 63% po 72 godzinach transfekcji w stosunku do komórek kontrolnych, w tym także wobec komórek „mock”, które hodowane były w obecności samego odczynnika do transfekcji (Ryc. 21).



Ryc.21 Wpływ 8- i 72-godzinnej transfekcji za pomocą siGluN1 na poziom mRNA dla podjednostki GluN1 NMDAR. Uzyskane wyniki są średnią (\pm SD) z 3 niezależnych doświadczeń. *** $p < 0,001$ jednokierunkowa analiza ANOVA z testem *post hoc* Dunnett'a.

VII.4. Wpływ NMDA i Glu na poziom mRNA dla podjednostek NMDAR w pierwotnych korowych astrocytach mysich

NMDA nie wpływał na poziom mRNA podjednostek, natomiast Glu powodował obniżenie poziomu mRNA dwóch (Ryc. 22) z siedmiu podjednostek (GluN2C o 46%, GluN3B o 60%) NMDAR; efekt nie dotyczył jednak najbardziej nas interesującej podjednostki GluN1.

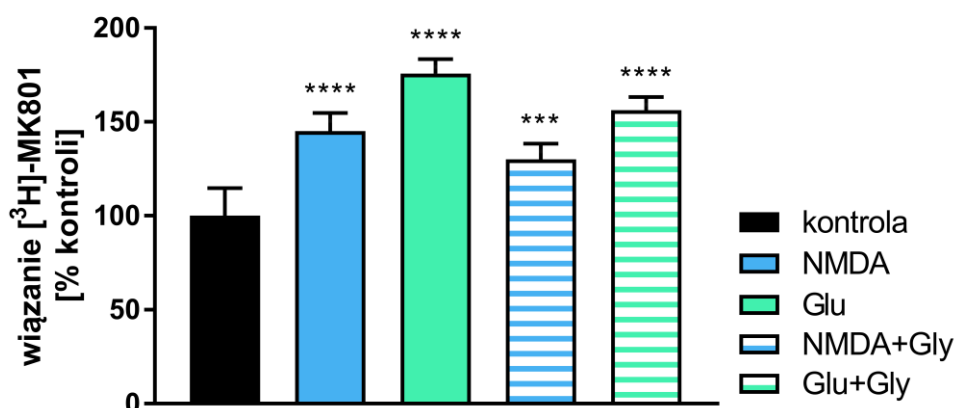


Ryc.22 Wpływ NMDA lub Glu na poziom mRNA dla podjednostek NMDAR po 72h inkubacji. Wyniki są średnią (\pm SD) z 3-4 niezależnych doświadczeń. * p < 0,05; ** p < 0,01 dwukierunkowa analiza ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a.

VII.5. Badanie mechanizmu aktywacji NMDAR w pierwotnych korowych astrocytach mysich

VII.5.1. Wpływ NMDA lub Glu na wiązanie radioliganda [3 H]-MK801

Hipoteza o bezpośredniej aktywacji NMDAR przez NMDA była testowana poprzez badanie jego wpływu na wiązanie znakowanego trytem blokera kanału receptora do hodowanych astrocytów mysich. Ponieważ MK801 ma powinowactwo wyłącznie do miejsca wewnątrz kanału receptora, wywołany przez NMDA wzrost specyficznego wiązania [3 H]-MK801 wskazywałby na jego aktywację. Badanie wykazało znaczny wzrost wiązania [3 H]-MK801 po podaniu NMDA lub Glu (Ryc. 23), co wskazuje na obecność aktywnych NMDAR w hodowanych astrocytach mysich. Zastosowanie Gly nie wzmacniało efektu działania NMDA lub Glu (Ryc. 23).

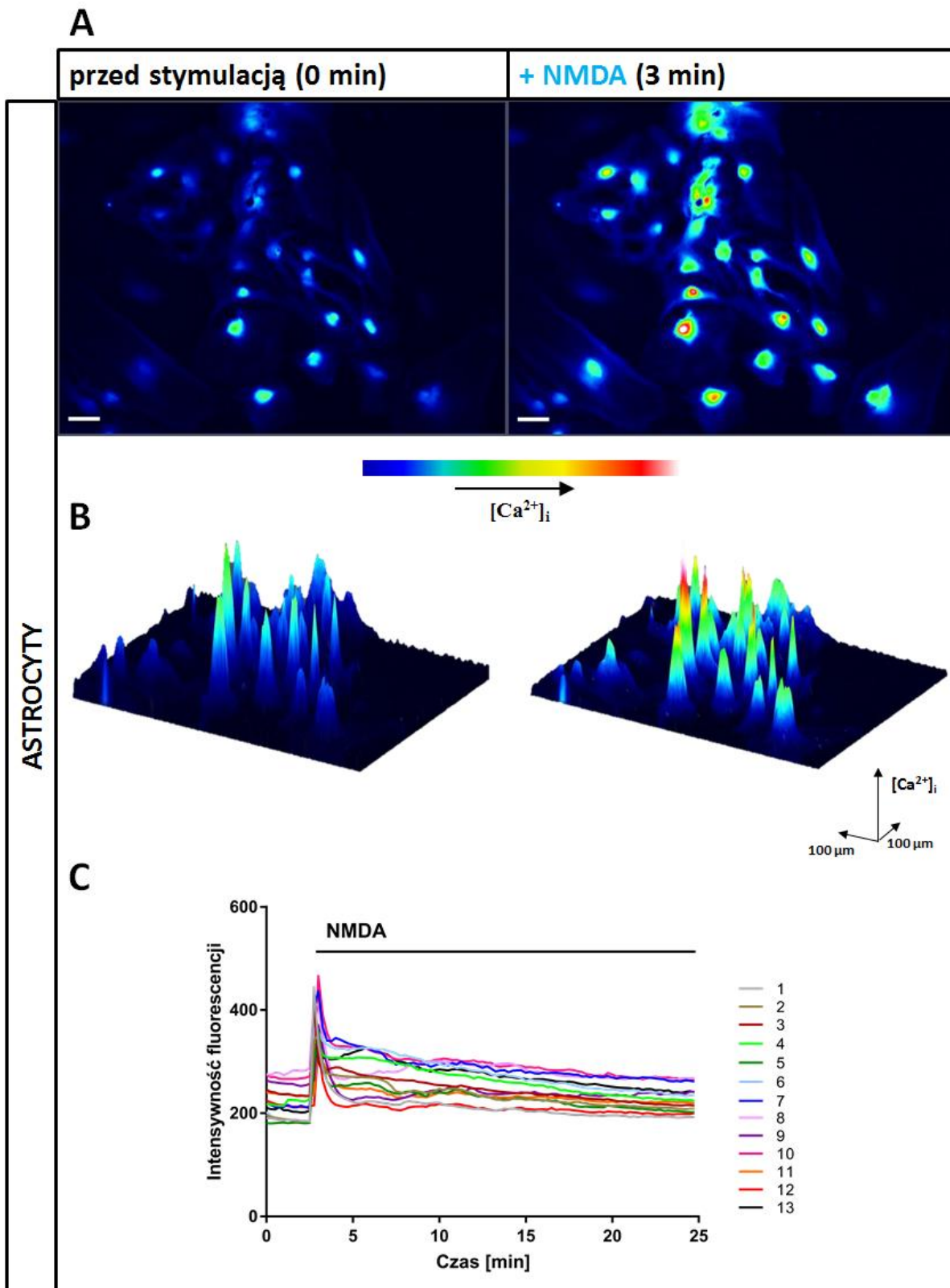


Ryc.23 Specyficzne wiązanie [3 H]-MK801 do astrocytów mysich: modulacja aktywności receptora przez NMDA, Glu, NMDA z Gly i Glu z Gly. Wyniki są średnią (\pm SD) z 4 niezależnych doświadczeń. *** p < 0,001 vs. kontrola; **** p < 0,0001 vs. kontrola jednokierunkowa analiza ANOVA z testem *post hoc* Tukey'a.

VII.5.2. Wpływ NMDA, Glu, MK801 oraz wyciszenia podjednostki GluN1 (siGluN1) na zmiany $[Ca^{2+}]_i$

VII.5.2.1. Pomiary uzyskane za pomocą mikroskopu semikonfokalnego

Traktowanie astrocytów NMDA (Ryc. 24) lub Glu (Ryc. 25) spowodowało wzrost intensywności fluorescencji Fluo3, co świadczy o wzroście stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} w komórkach ($[Ca^{2+}]_i$). Efektom wywołanym przez tych agonistów zapobiegała wcześniejsza inkubacja z MK801 (Ryc. 27 i 28, odpowiednio). Wywołanemu przez NMDA lub Glu wzrostowi $[Ca^{2+}]_i$ niemal całkowicie zapobiegało również wyciszenie ekspresji podjednostki GluN1 NMDAR przy użyciu siRNA (Ryc. 31 i 32, odpowiednio), co świadczy o udziale NMDAR w mechanizmie wzrostu $[Ca^{2+}]_i$. Kontrolę wobec komórek z wyciszoną GluN1 NMDAR stanowiły komórki „mock”, hodowane w obecności samego odczynnika do transfekcji (bez siRNA). W komórkach „mock” nie zaobserwowano zahamowania odpowiedzi na podanie NMDA (Ryc. 29) lub Glu (Ryc. 30). Uzyskany wzrost $[Ca^{2+}]_i$ po stymulacji przez ATP (Ryc. 26) stanowił kontrolę pozytywną doświadczenia [Jeremic i wsp., 2001, Shigetomi i wsp., 2010]. Wyniki te uzyskano za pomocą mikroskopu semikonfokalnego, które zbiorczo przedstawia Ryc. 33.



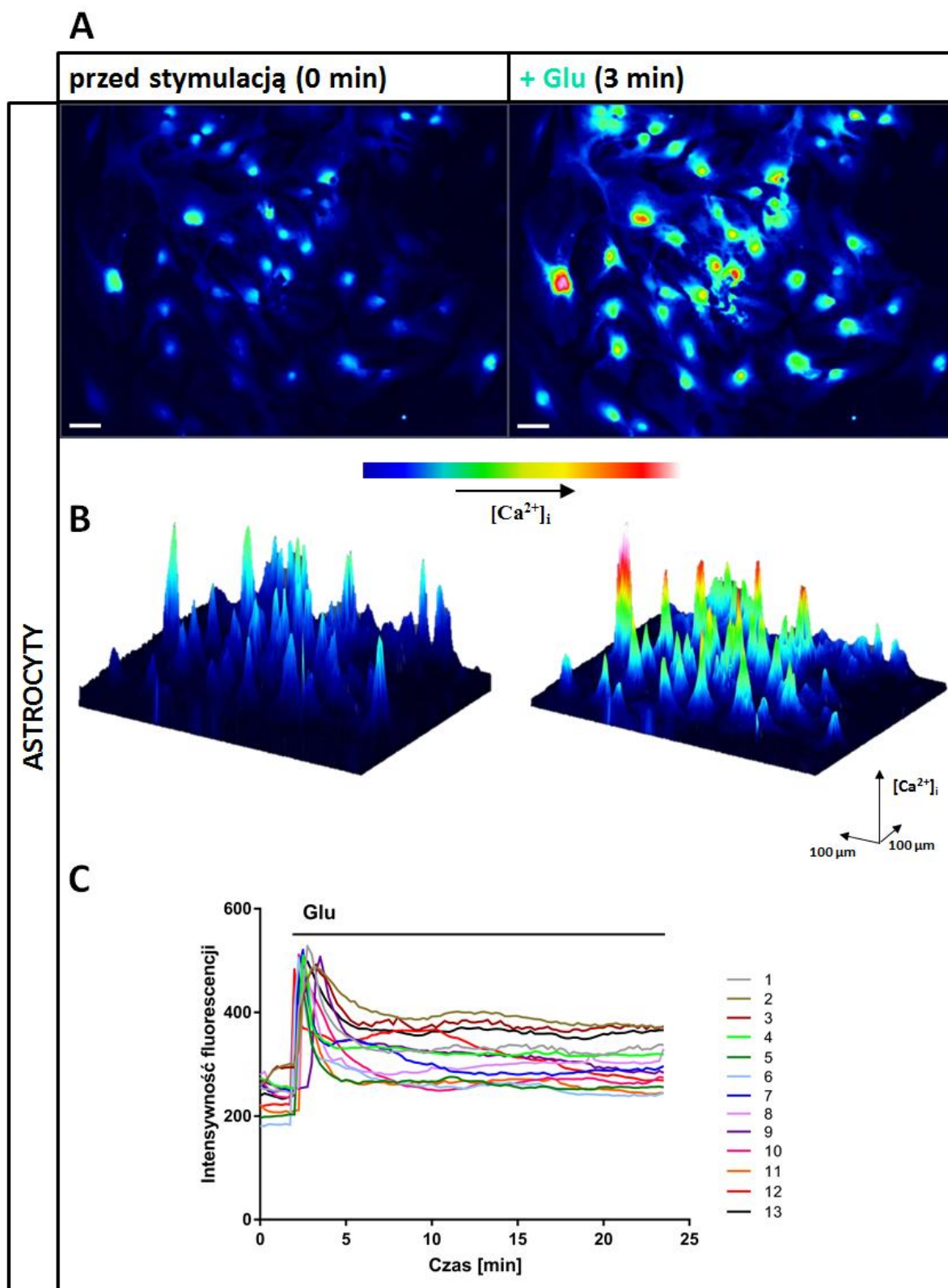
Ryc.24 Wpływ NMDA na fluorescencję Fluo3 (zmiany $[Ca^{2+}]_i$) w hodowanych astrocytach mysich.

(A) Obrazy spod mikroskopu semikonfokalnego przedstawiają komórki nietraktowane (0 min, panel lewy) oraz po stymulacji NMDA (3 min, panel prawy). Skala, $50\ \mu\text{m}$. Intensywność fluorescencji Fluo3 przedstawiono jako pseudokolorы reprezentujące względne zmiany $[Ca^{2+}]_i$, co ilustruje skala pseudokoloru.

(B) Przestrzenne obrazowanie profilu intensywności świecenia obrazu (2.5 D) przed (0 min, panel lewy) i po stymulacji NMDA (3 min, panel prawy).

(C) Przykładowy przebieg zmian intensywności fluorescencji Fluo3 po stymulacji NMDA w 13 wybranych komórkach poddanych analizie.

W suplemencie zamieszczono film dokumentujący zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w astrocytach po stymulacji NMDA (S1 Video 1).



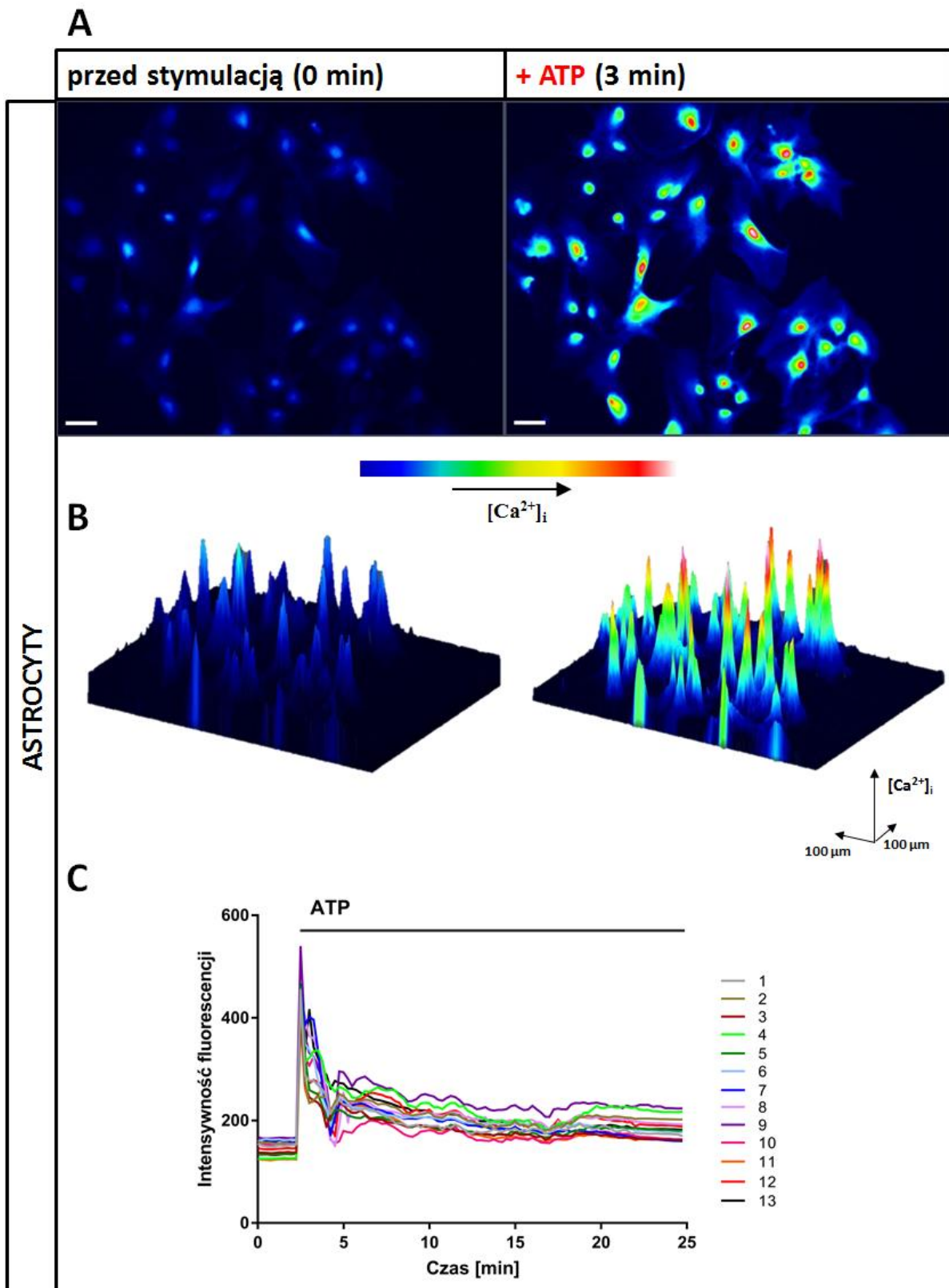
Ryc.25 Wpływ Glu na fluorescencję Fluo3 (zmiany $[Ca^{2+}]_i$) w hodowanych astrocytach mysich.

(A) Obrazy spod mikroskopu semikonfokalnego przedstawiają komórki nietraktowane (0 min, panel lewy) oraz po stymulacji Glu (3 min, panel prawy). Skala, 50 μm . Intensywność fluorescencji Fluo3 przedstawiono jako pseudokolory reprezentujące względne zmiany $[Ca^{2+}]_i$, co ilustruje skala pseudokoloru.

(B) Przestrzenne obrazowanie profilu intensywności świecenia obrazu (2.5 D) przed (0 min, panel lewy) i po stymulacji Glu (3 min, panel prawy).

(C) Przykładowy przebieg zmian intensywności fluorescencji Fluo3 po stymulacji Glu w 13 wybranych komórkach poddanych analizie.

W suplemencie zamieszczono film dokumentujący zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w astrocytach po stymulacji Glu (S2 Video 2).



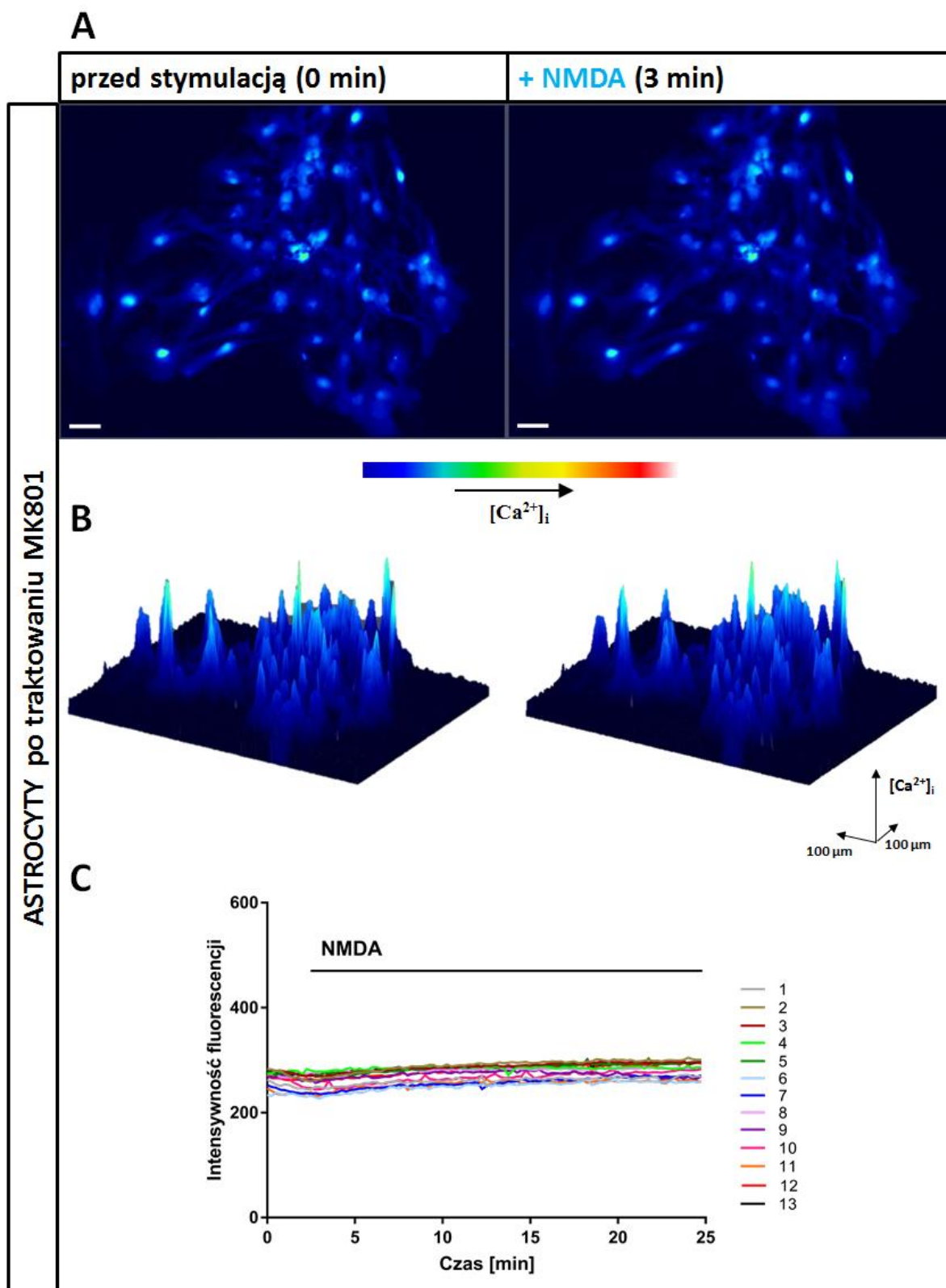
Ryc.26 Wpływ ATP na fluorescencję Fluo3 (zmiany $[Ca^{2+}]_i$) w hodowanych astrocytach mysich.

(A) Obrazy spod mikroskopu semikonfokalnego przedstawiają komórki nietraktowane (0 min, panel lewy) oraz po stymulacji ATP (3 min, panel prawy). Skala, 50 μ m. Intensywność fluorescencji Fluo3 przedstawiono jako pseudokolorы reprezentujące względne zmiany $[Ca^{2+}]_i$, co ilustruje skala pseudokoloru.

(B) Przestrzenne obrazowanie profilu intensywności świecenia obrazu (2.5 D) przed (0 min, panel lewy) i po stymulacji ATP (3 min, panel prawy).

(C) Przykładowy przebieg zmian intensywności fluorescencji Fluo3 po stymulacji ATP w 13 wybranych komórkach poddanych analizie.

W suplemencie zamieszczono film dokumentujący zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w astrocytach po stymulacji ATP (S3 Video 3).



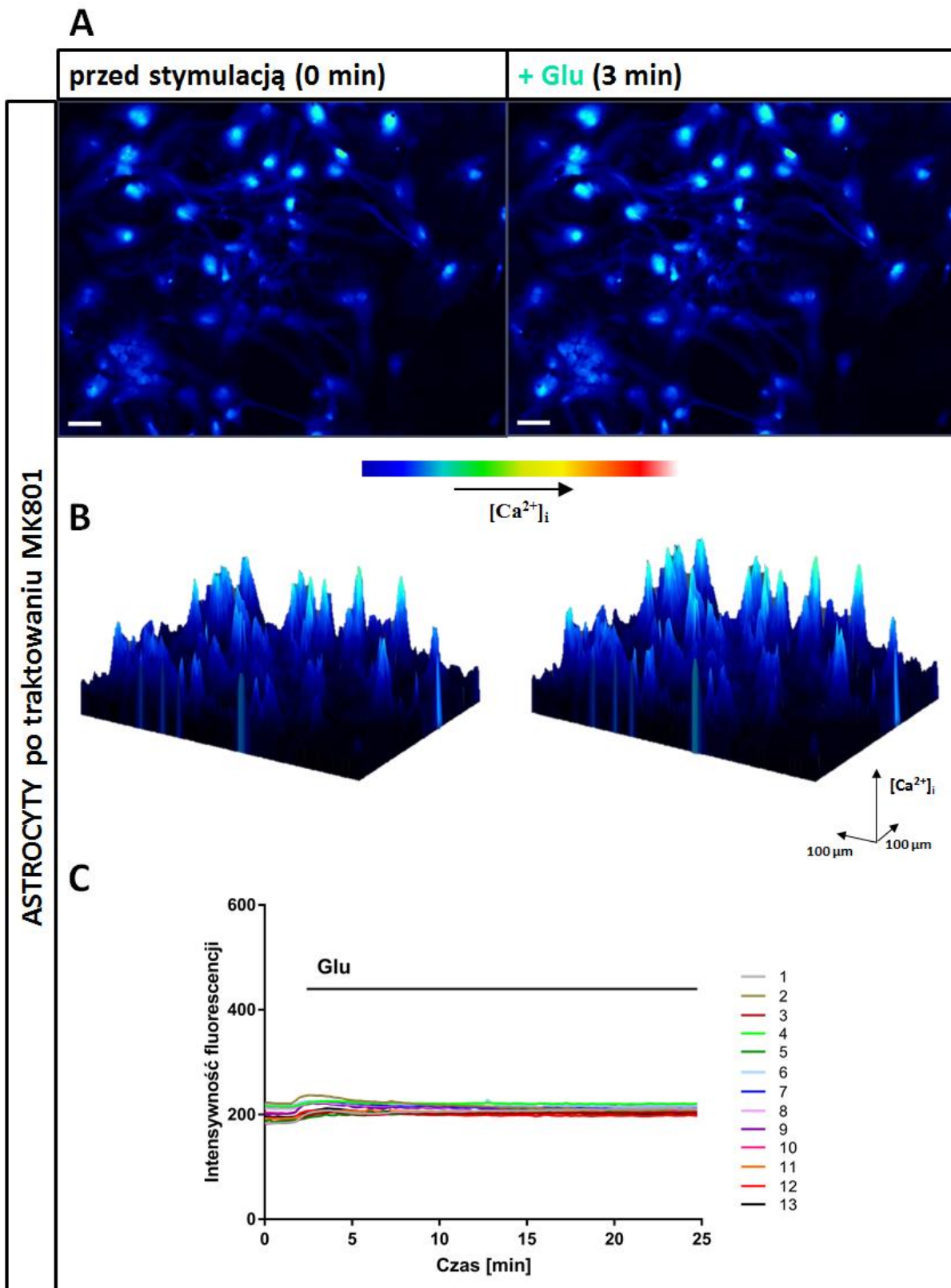
Ryc.27 Wpływ NMDA na fluorescencję Fluo3 (zmiany $[Ca^{2+}]_i$) w hodowanych astrocytach mysich po traktowaniu MK801.

(A) Obrazy spod mikroskopu semikonfokalnego przedstawiają komórki nietraktowane (0 min, panel lewy) oraz po stymulacji NMDA (3 min, panel prawy). Skala, 50 μ m. Intensywność fluorescencji Fluo3 przedstawiono jako pseudokolorы reprezentujące względne zmiany $[Ca^{2+}]_i$, co ilustruje skala pseudokoloru.

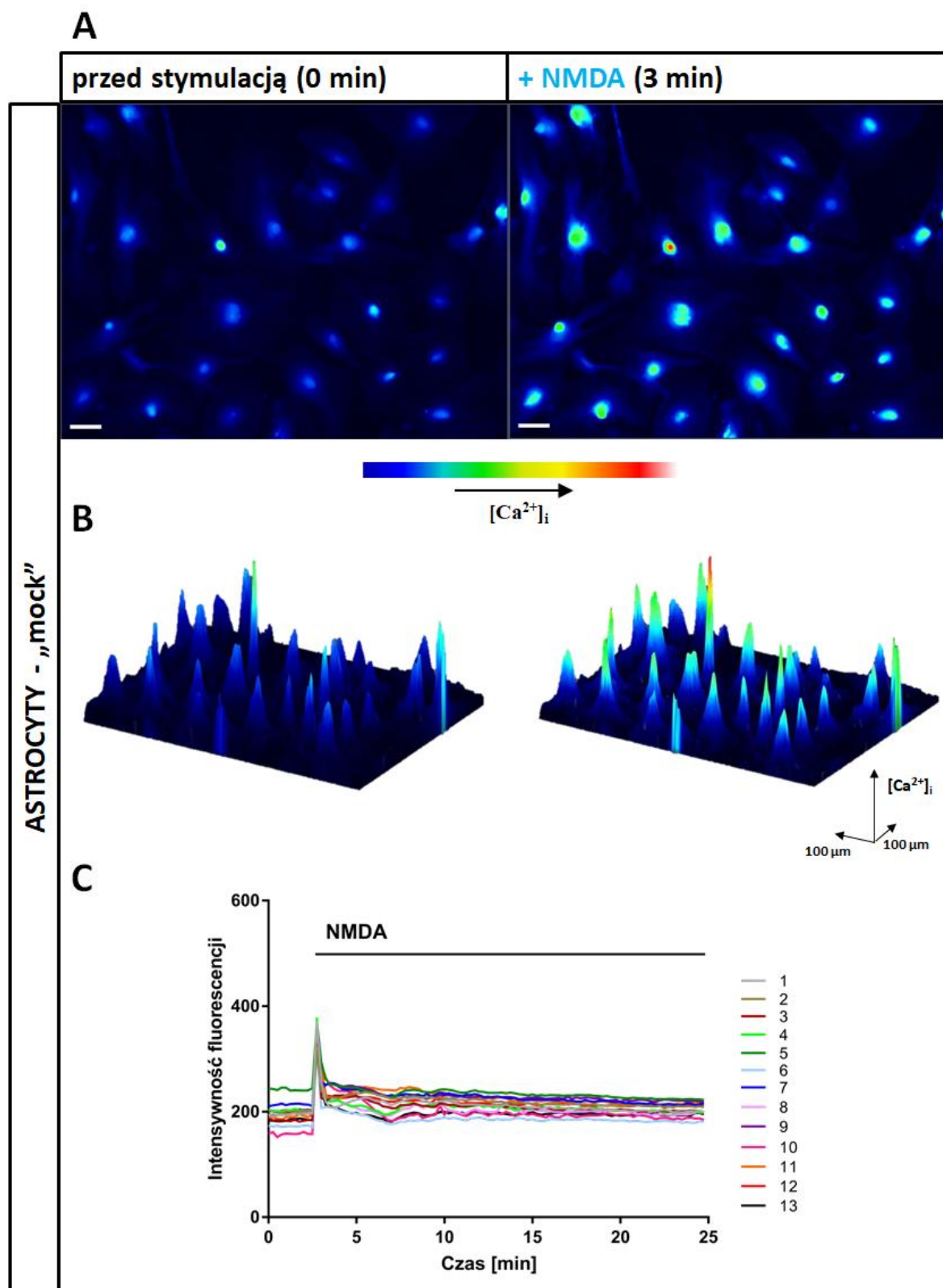
(B) Przestrzenne obrazowanie profilu intensywności świecenia obrazu (2.5 D) przed (0 min, panel lewy) i po stymulacji NMDA (3 min, panel prawy).

(C) Przykładowy przebieg zmian intensywności fluorescencji Fluo3 po stymulacji NMDA w 13 wybranych komórkach poddanych analizie.

W suplemencie zamieszczono film dokumentujący zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w astrocytach traktowanych MK801 po stymulacji NMDA (S4 Video 4).



Ryc.28 Wpływ Glu na fluorescencję Fluo3 (zmiany $[Ca^{2+}]_i$) w hodowanych astrocytach mysich po traktowaniu MK801. (A) Obrazy spod mikroskopu semikonfokalnego przedstawiają komórki nietraktowane (0 min, panel lewy) oraz po stymulacji Glu (3 min, panel prawy). Skala, 50 μ m. Intensywność fluorescencji Fluo3 przedstawiono jako pseudokolorы reprezentujące względne zmiany $[Ca^{2+}]_i$, co ilustruje skala pseudokoloru. (B) Przestrzenne obrazowanie profilu intensywności świecenia obrazu (2.5 D) przed (0 min, panel lewy) i po stymulacji Glu (3 min, panel prawy). (C) Przykładowy przebieg zmian intensywności fluorescencji Fluo3 po stymulacji Glu w 13 wybranych komórkach poddanych analizie. W suplemencie zamieszczono film dokumentujący zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w astrocytach traktowanych MK801 po stymulacji Glu (S5 Video 5).



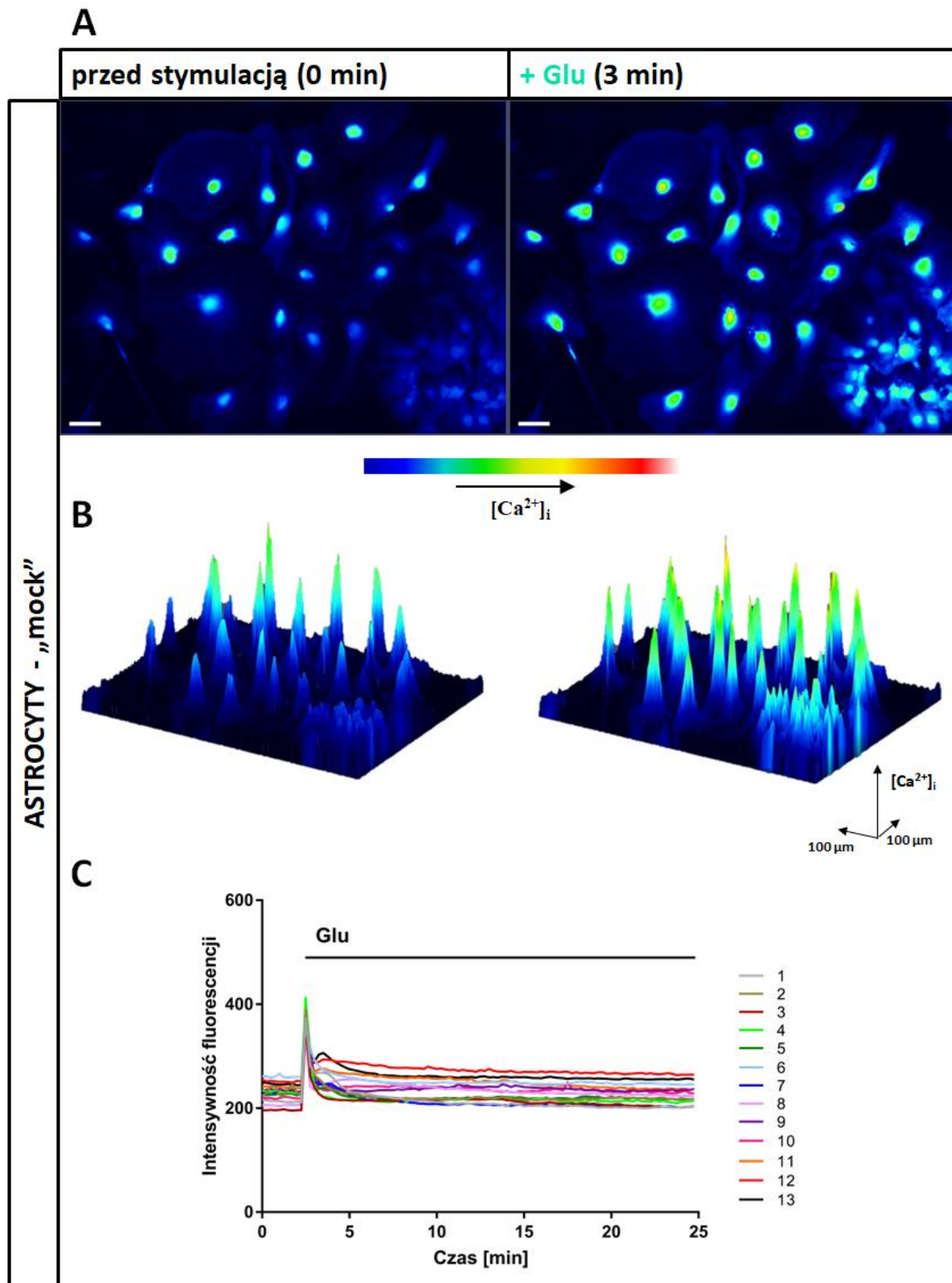
Ryc.29 Wpływ NMDA na fluorescencję Fluo3 (zmiany $[Ca^{2+}]_i$) w hodowanych astrocytach mysich hodowanych w obecności odczynnika do transfekcji HiPerFect („mock”).

(A) Obrazy spod mikroskopu semikonfokalnego przedstawiają komórki nietraktowane (0 min, panel lewy) oraz po stymulacji NMDA (3 min, panel prawy). Skala, 50 μ m. Intensywność fluorescencji Fluo3 przedstawiono jako pseudokolorы reprezentujące względne zmiany $[Ca^{2+}]_i$, co ilustruje skala pseudokoloru.

(B) Przestrzenne obrazowanie profilu intensywności świecenia obrazu (2.5 D) przed (0 min, panel lewy) i po stymulacji NMDA (3 min, panel prawy).

(C) Przykładowy przebieg zmian intensywności fluorescencji Fluo3 po stymulacji NMDA w 13 wybranych komórkach poddanych analizie.

W suplemencie zamieszczono film dokumentujący zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w astrocytach hodowanych w obecności odczynnika do transfekcji HiPerFect („mock”) po stymulacji NMDA (S6 Video 6).



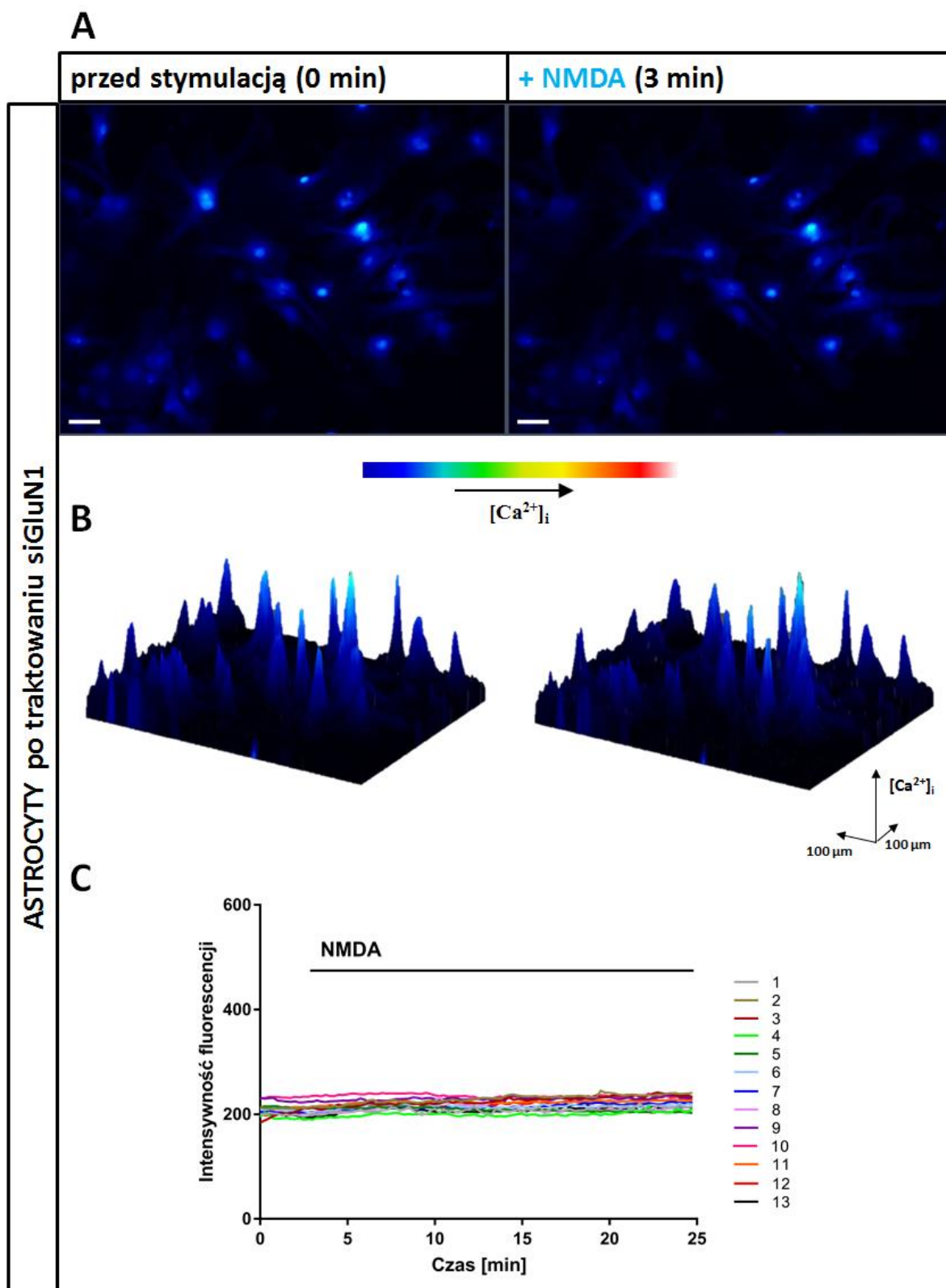
Ryc.30 Wpływ Glu na fluorescencję Fluo3 (zmiany $[Ca^{2+}]_i$) w hodowanych astrocytach mysich hodowanych w obecności odczynnika do transfekcji HiPerFect („mock”).

(A) Obrazy spod mikroskopu semikonfokalnego przedstawiają komórki nietraktowane (0 min, panel lewy) oraz po stymulacji Glu (3 min, panel prawy). Skala, 50 μ m. Intensywność fluorescencji Fluo3 przedstawiono jako pseudokolorы reprezentujące względne zmiany $[Ca^{2+}]_i$, co ilustruje skala pseudokoloru.

(B) Przestrzenne obrazowanie profilu intensywności świecenia obrazu (2.5 D) przed (0 min, panel lewy) i po stymulacji Glu (3 min, panel prawy).

(C) Przykładowy przebieg zmian intensywności fluorescencji Fluo3 po stymulacji Glu w 13 wybranych komórkach poddanych analizie.

W suplemencie zamieszczono film dokumentujący zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w astrocytach hodowanych w obecności odczynnika do transfekcji HiPerFect („mock”) po stymulacji Glu (S7 Video 7).



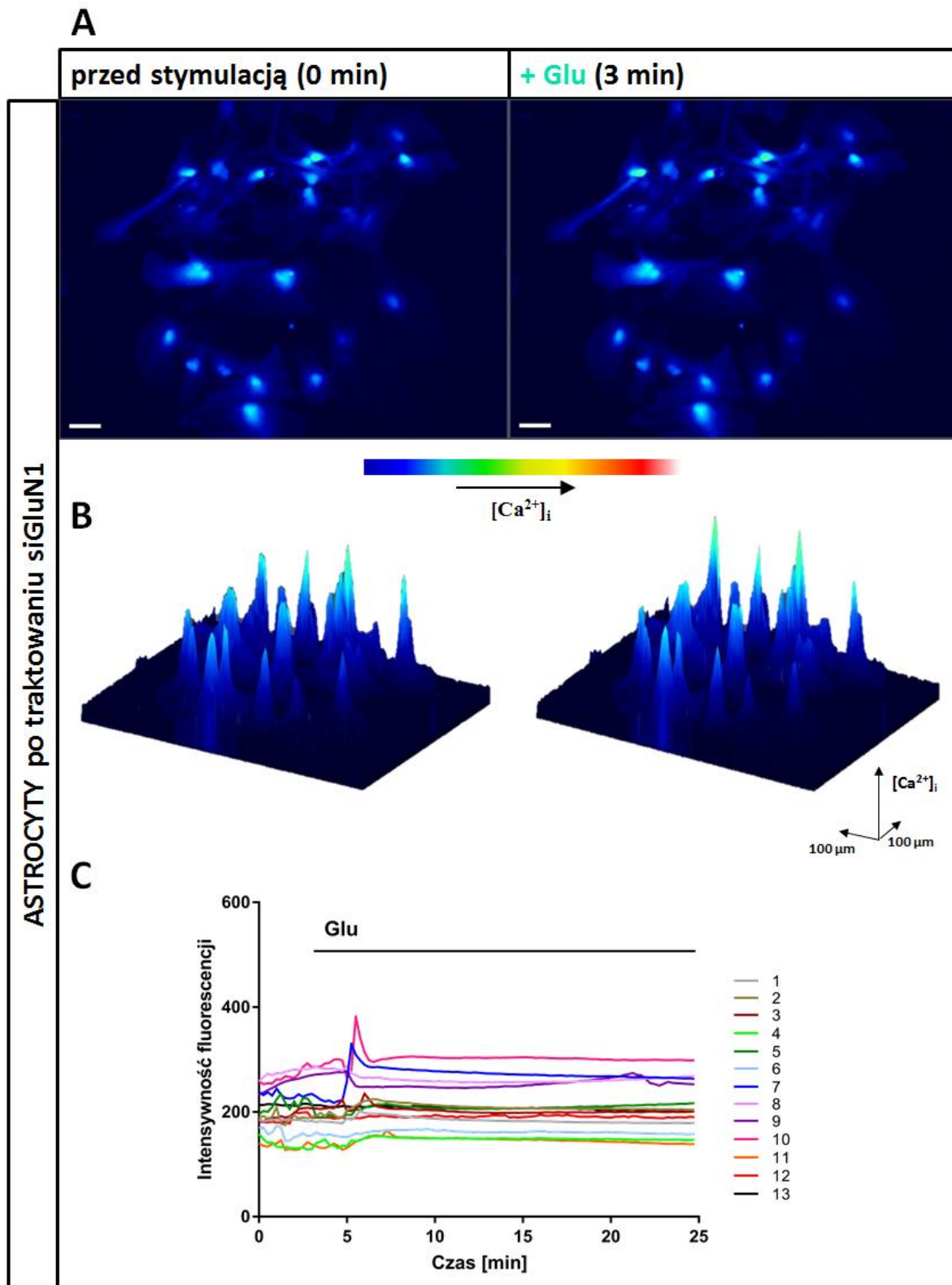
Ryc.31 Wpływ NMDA na fluorescencję Fluo3 (zmiany $[Ca^{2+}]_i$) w hodowanych astrocytach mysich z wyciszoną podjednostką GluN1 (siGluN1).

(A) Obrazy spod mikroskopu semikonfokalnego przedstawiają komórki nietraktowane (0 min, panel lewy) oraz po stymulacji NMDA (3 min, panel prawy). Skala, 50 μ m. Intensywność fluorescencji Fluo3 przedstawiono jako pseudokolorы reprezentujące względne zmiany $[Ca^{2+}]_i$, co ilustruje skala pseudokoloru.

(B) Przestrzenne obrazowanie profilu intensywności świecenia obrazu (2.5 D) przed (0 min, panel lewy) i po stymulacji NMDA (3 min, panel prawy).

(C) Przykładowy przebieg zmian intensywności fluorescencji Fluo3 po stymulacji NMDA w 13 wybranych komórkach poddanych analizie.

W suplemencie zamieszczono film dokumentujący zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w astrocytach z wyciszoną podjednostką GluN1 (siGluN1) po stymulacji NMDA (S8 Video 8).



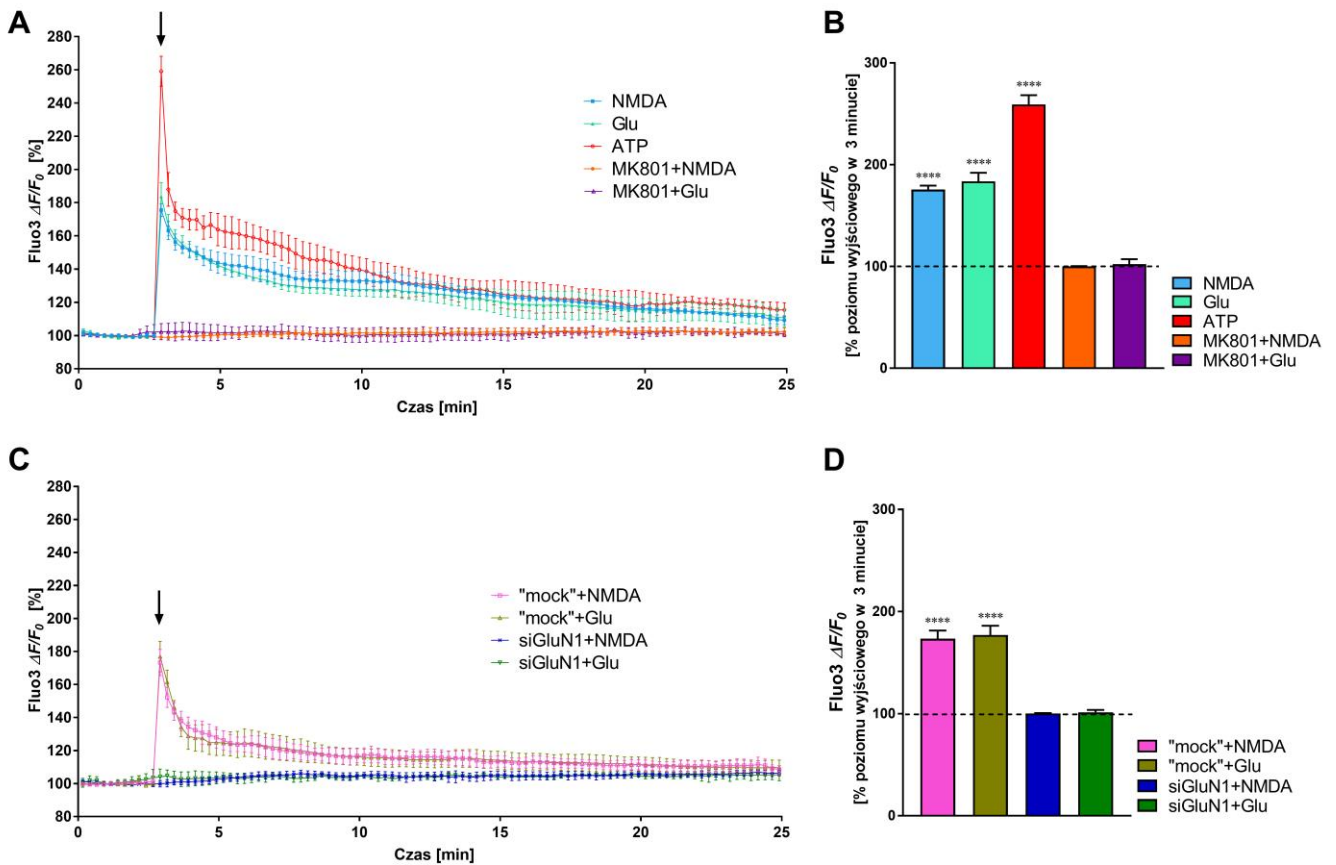
Ryc.32 Wpływ Glu na fluorescencję Fluo3 (zmiany $[Ca^{2+}]_i$) w hodowanych astrocytach mysich z wyciszoną podjednostką GluN1 (siGluN1).

(A) Obrazy spod mikroskopu semikonfokalnego przedstawiają komórki nietraktowane (0 min, panel lewy) oraz po stymulacji Glu (3 min, panel prawy). Skala, 50 μm . Intensywność fluorescencji Fluo3 przedstawiono jako pseudokolorowy reprezentujące względne zmiany $[Ca^{2+}]_i$, co ilustruje skala pseudokoloru.

(B) Przestrzenne obrazowanie profilu intensywności świecenia obrazu (2.5 D) przed (0 min, panel lewy) i po stymulacji Glu (3 min, panel prawy).

(C) Przykładowy przebieg zmian intensywności fluorescencji Fluo3 po stymulacji Glu w 13 wybranych komórkach poddanych analizie.

W suplemencie zamieszczono film dokumentujący zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w astrocytach z wyciszoną podjednostką GluN1 (siGluN1) po stymulacji Glu (S9 Video 9).



Ryc.33 Wywołane przez NMDA, Glu, ATP zmiany fluorescencji Fluo3 - markera zmian $[Ca^{2+}]_i$ w hodowanych astrocytach mysich zmierzone za pomocą mikroskopu semikonfokalnego.

(A,B) W warunkach kontrolnych oraz astrocytach traktowanych przed eksperymentem MK801.

(C,D) W astrocytach hodowanych w obecności odczynnika do transfekcji HiPerFect („mock”) lub z wyciszoną podjednostką GluN1 (siGluN1).

(A,C) Strzałka wskazuje moment podania substancji badanych. Fluorescencję Fluo3 wyrażono jako procent poziomu wyjściowego ($\Delta F/F_0$ %).

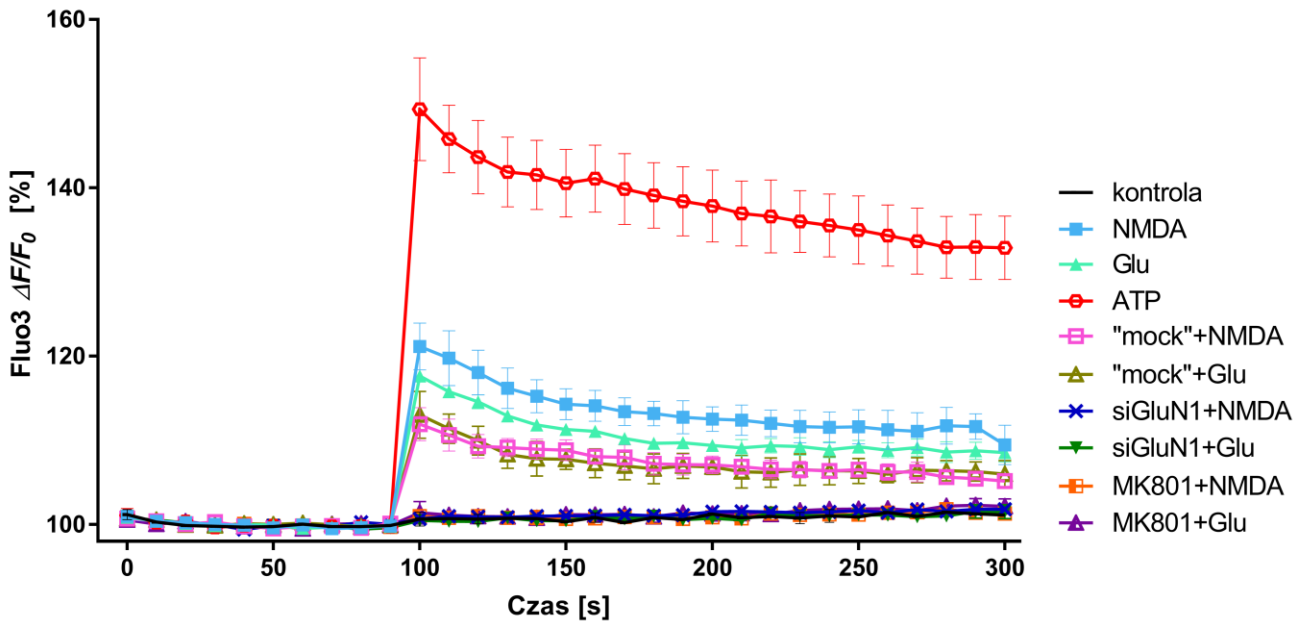
(B,D) Zmiany fluorescencji Fluo3 i różnice między poszczególnymi grupami eksperymentalnymi, gdzie fluorescencję Fluo3 wyrażono jako procent poziomu wyjściowego ($\Delta F/F_0$ %) w 3 minucie eksperymentu. Poziom wyjściowy fluorescencji zaznaczono przerywaną linią.

Wyniki są średnią (\pm SD) z 3 niezależnych doświadczeń.

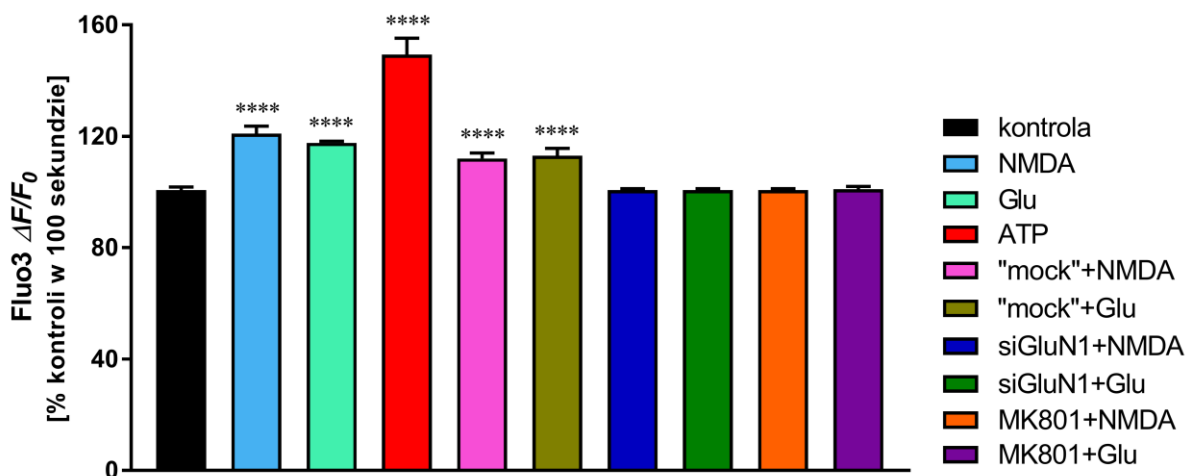
**** $p < 0,0001$ jednokierunkowa analiza ANOVA z testem *post hoc* Dunnett'a względem poziomu wyjściowego.

VII.5.2.2. Pomiar uzyskane za pomocą czytnika fluorescencji

Zmiany $[Ca^{2+}]_i$ w poszczególnych grupach eksperymentalnych otrzymane z wykorzystaniem czytnika fluorescencji są analogiczne do uzyskanych za pomocą mikroskopu semikonfokalnego (Ryc. 34). Wyniki uzyskane dzięki wykorzystaniu czytnika fluorescencji oraz różnice między grupami eksperymentalnymi podsumowuje Rycina 35.



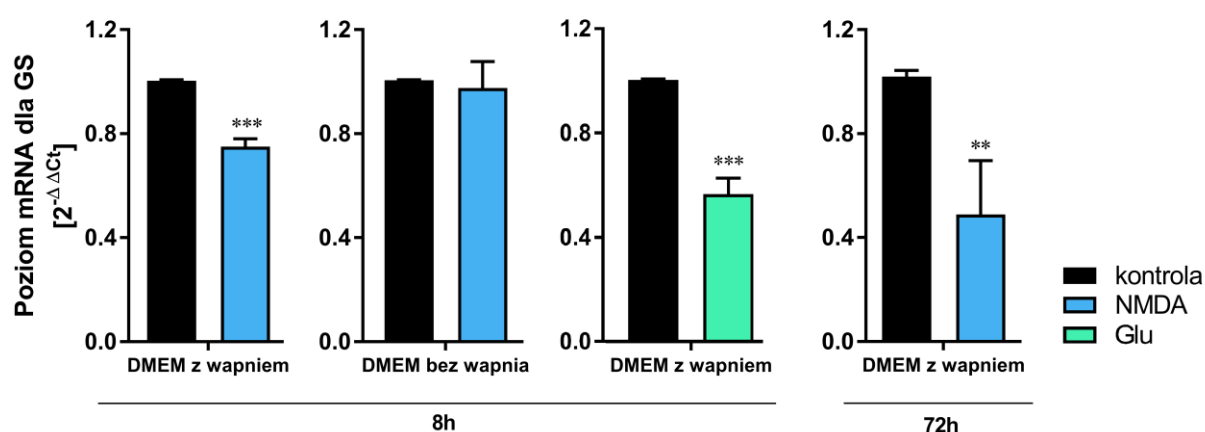
Ryc.34 Wywołane przez NMDA, Glu, ATP zmiany fluorescencji Fluo3 - markera zmian $[Ca^{2+}]_i$ w hodowanych astrocytach mysich z niewyciszoną lub wyciszoną podjednostką GluN1 (siGluN1) oraz w astrocytach hodowanych w obecności odczynnika do transfekcji HiPerFect („mock”) lub traktowanych przed eksperymentem MK801, zmierzone za pomocą czytnika fluorescencji. Fluorescencję Fluo3 wyrażono jako procent poziomu wyjściowego ($\Delta F/F_0$ %). Wyniki są średnią (\pm SD) z 3 niezależnych doświadczeń.



Ryc.35 Wpływ NMDA, Glu, ATP na fluorescencję Fluo3 - markera zmian $[Ca^{2+}]_i$ w astrocytach mysich z niewyciszoną lub wyciszoną podjednostką GluN1 (siGluN1) oraz w astrocytach hodowanych w obecności odczynnika do transfekcji HiPerFect („mock”) lub traktowanych przed eksperymentem MK801, zmierzone za pomocą czytnika fluorescencji. Fluorescencję Fluo3 wyrażono jako procent poziomu wyjściowego ($\Delta F/F_0$ %) w 100 s eksperymentu. Wyniki są średnią (\pm SD) z 3 niezależnych doświadczeń. **** $p < 0,0001$ jednokierunkowa analiza ANOVA z testem *post hoc* Dunnett'a.

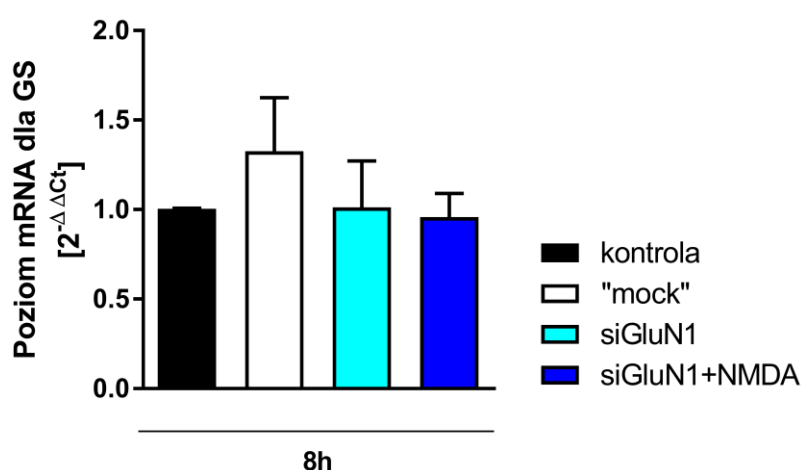
VII.6. Wpływ NMDA lub Glu na poziom mRNA, ekspresję białka i aktywność syntetazy glutaminy w pierwotnych korowych astrocytach mysich z niewyciszoną i wyciszoną podjednostką GluN1 (siGluN1): rola zewnątrzkomórkowego wapnia

NMDA powodował obniżenie poziomu mRNA dla GS o 25% po 8 godzinach i o 52% po 72 godzinach (Ryc. 36) traktowania astrocytów mysich tylko w obecności zewnątrzkomórkowych Ca^{2+} . Nie zaobserwowano zmian w poziomie mRNA dla GS w astrocytach traktowanych NMDA przez 8 godzin w pożywce bezwapniowej. Z kolei po 8 godzinach inkubacji astrocytów mysich z Glu zaobserwowano obniżenie o 44% poziomu mRNA dla GS (Ryc. 36).



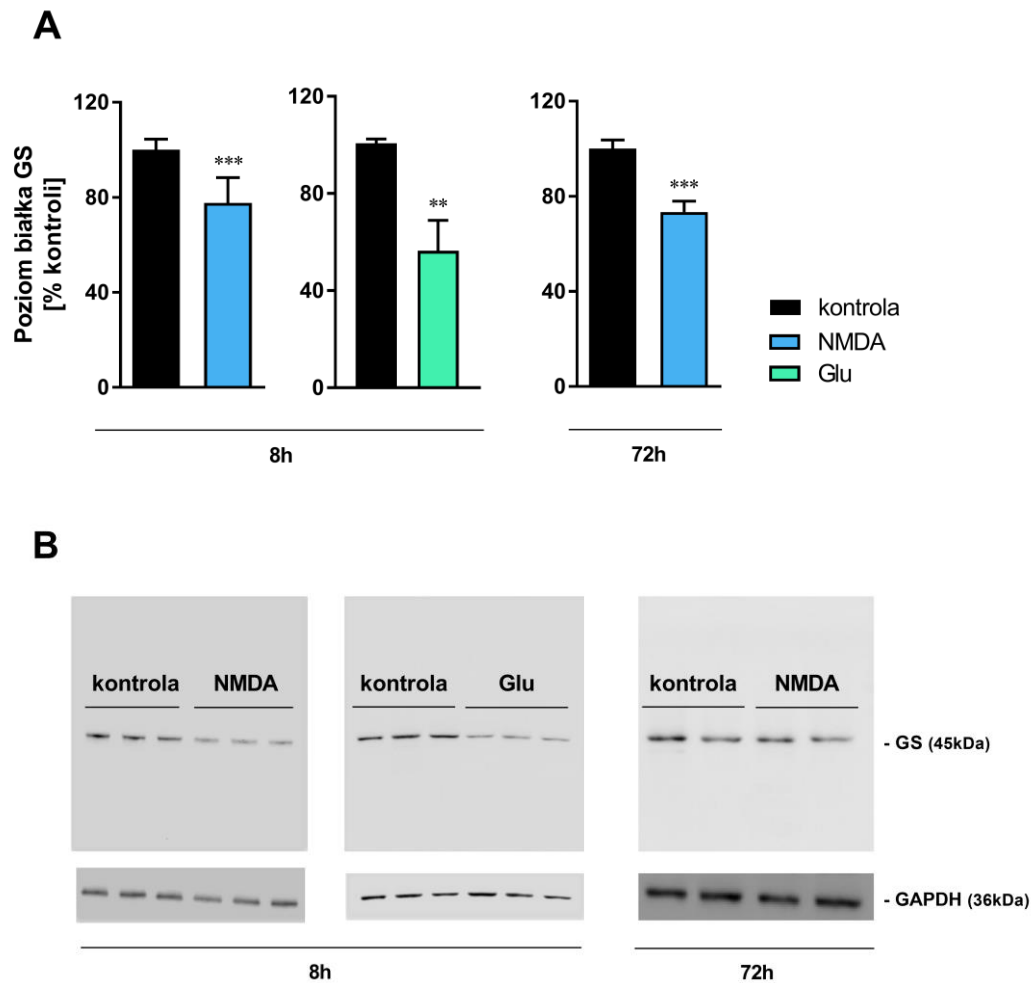
Ryc.36 Wpływ NMDA lub Glu na poziom mRNA dla GS po 8 i 72 godzinach inkubacji w pożywce z wapniem i bez wapnia. Wyniki są średnią (\pm SD) z 3-4 niezależnych doświadczeń. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ test t-Studenta.

Wyciszenie ekspresji podjednostki GluN1 za pomocą siRNA zapobiegało indukowanemu przez 8-godzinne traktowanie NMDA obniżeniu poziomu mRNA dla GS (Ryc. 37).



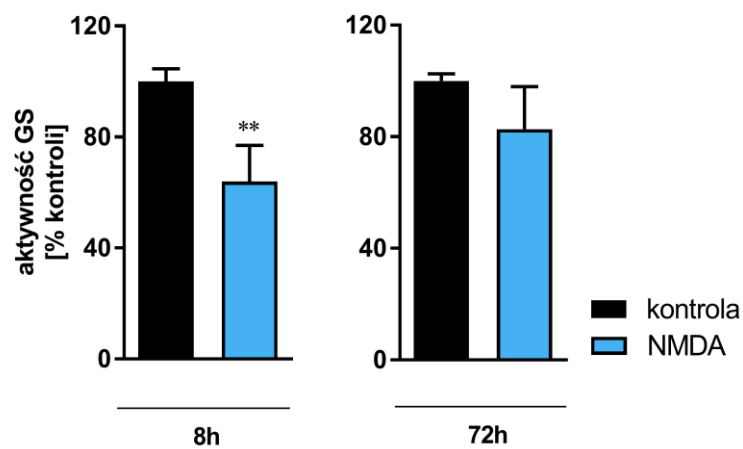
Ryc.37 Wpływ 8-godzinnej inkubacji z NMDA na poziom mRNA dla GS w astrocytach traktowanych siGluN1 oraz samym odczynnikiem transfekującym („mock”). Uzyskane wyniki są średnią (\pm SD) z 3 niezależnych doświadczeń.

Ekspresja GS na poziomie białka została obniżona o 26% po 8-godzinnej i o 27% po 72-godzinnej inkubacji z NMDA (Ryc. 38). Ekspresja GS na poziomie białka została również obniżona o 44% po 8-godzinnej inkubacji z Glu (Ryc. 38).



Ryc.38 (A) Wpływ NMDA lub Glu na poziom białka GS po 8- i 72-godzinnej inkubacji. (B) Przykładowy obraz immunodetekcji białek GS i GAPDH. Wyniki są średnią (\pm SD) z 3-7 niezależnych doświadczeń. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ test t-Studenta.

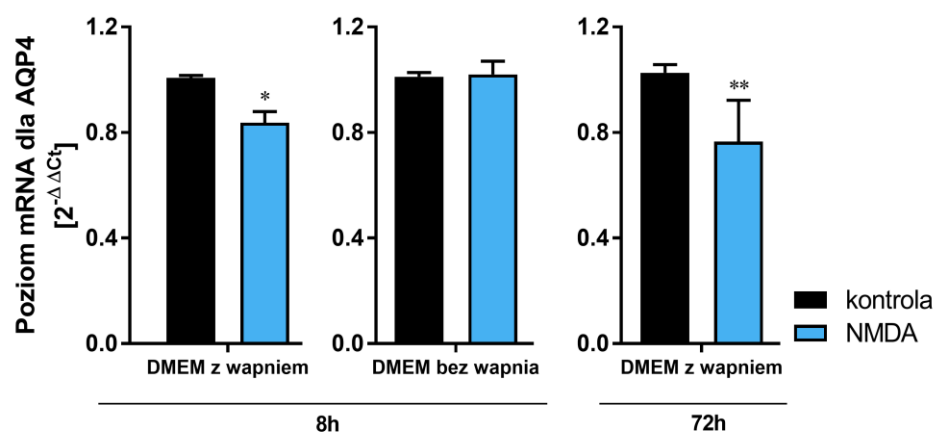
Inkubacja komórek z NMDA przez 8 godzin zmniejszała o 36% aktywność GS, natomiast po 72-godzinnej inkubacji nie zaobserwowano efektu NMDA na aktywność GS (Ryc. 39).



Ryc.39 Wpływ NMDA po 8- i 72-godzinnej inkubacji na aktywność GS. Uzyskane wyniki są średnią (\pm SD) z 4 niezależnych doświadczeń. ** $p < 0,01$ test t-Studenta.

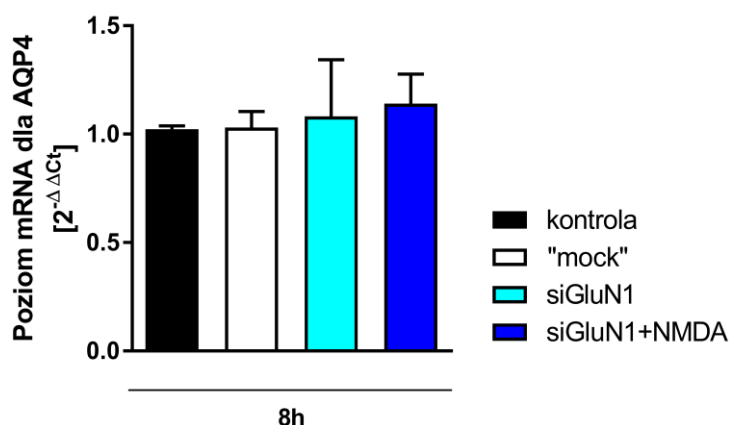
VII.7. Wpływ NMDA na poziom mRNA i ekspresję białka kanału wodnego akwaporyny 4 w pierwotnych korowych astrocytach mysich z niewyciszoną i wyciszoną podjednostką GluN1 (siGluN1): rola zewnątrzkomórkowego wapnia

Traktowanie astrocytów NMDA skutkowało obniżeniem poziomu mRNA dla AQP4 o 17%, po 8 godzinach i o 26% po 72 godzinach tylko w obecności zewnątrzkomórkowych Ca^{2+} (Ryc. 40). Nie zaobserwowano zmian w poziomie mRNA dla AQP4 w astrocytach traktowanych NMDA przez 8 godzin w pożywce bezwapniowej (Ryc. 40).



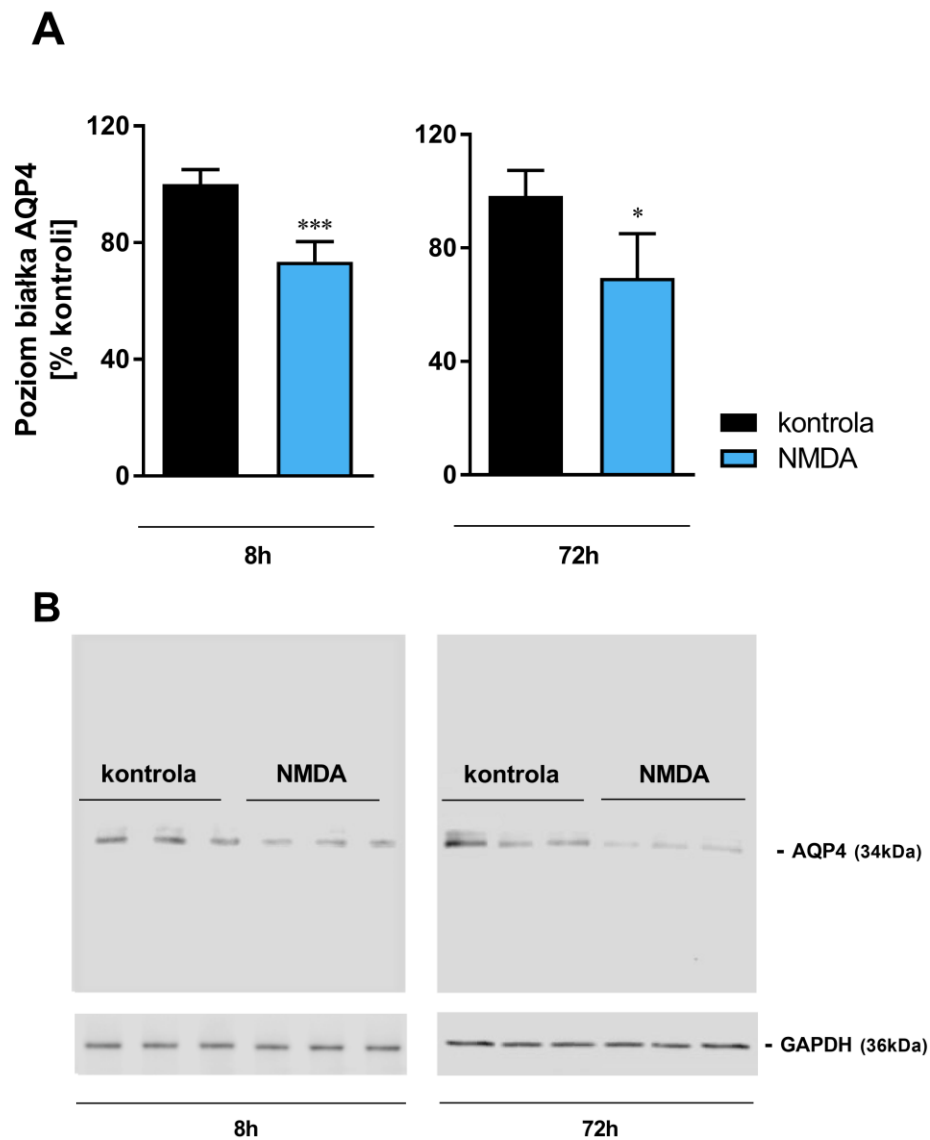
Ryc.40 Wpływ NMDA na poziom mRNA dla AQP4 po 8 i 72 godzinach inkubacji w pożywce z wapniem i bez wapnia. Wyniki są średnią (\pm SD) z 4-5 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ test t-Studenta.

Wyciszenie ekspresji podjednostki GluN1 za pomocą siRNA zapobiegało wywoływanemu przez 8-godzinne traktowanie NMDA obniżeniu poziomu mRNA dla AQP4 (Ryc. 41).



Ryc.41 Wpływ 8-godzinnej inkubacji z NMDA na poziom mRNA dla AQP4 w astrocytach traktowanych siGluN1 oraz samym odczynnikiem transfekującym („mock”). Uzyskane wyniki są średnią (\pm SD) z 3 niezależnych doświadczeń.

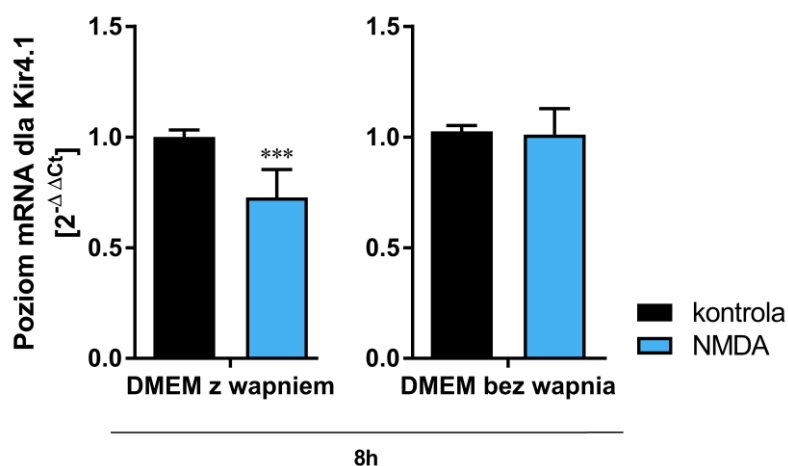
Inkubacja komórek z NMDA przez 8 godzin powodowała obniżenie o 26,5%, a przez 72 godziny obniżenie o 22% ekspresji AQP4 na poziomie białka (Ryc. 42).



Ryc.42 (A) Wpływ NMDA na poziom białka AQP4 po 8- i 72-godzinnej inkubacji. (B) Przykładowy obraz immunodetekcji białek AQP4 i GAPDH. Wyniki są średnią (\pm SD) z 4 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ test t-Studenta.

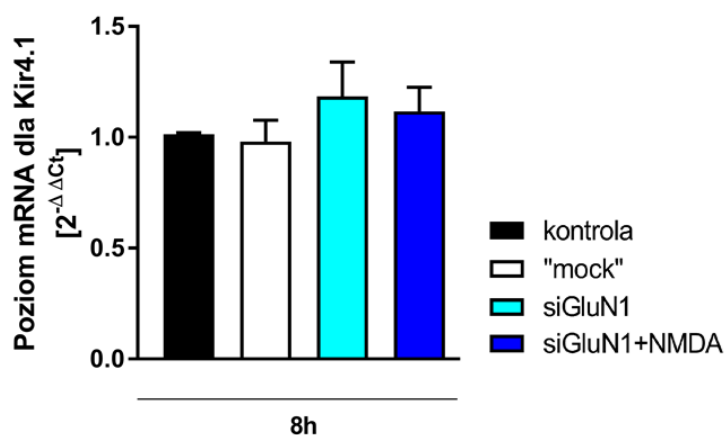
VII.8. Wpływ NMDA na poziom mRNA i ekspresję białka kanału potasowego Kir4.1 w pierwotnych korowych astrocytach mysich z niewyciszoną i wyciszoną podjednostką GluN1 (siGluN1): rola zewnątrzkomórkowego wapnia

Traktowanie astrocytów mysich NMDA przez 8 godzin w obecności zewnątrzkomórkowych Ca^{2+} spowodowało obniżenie o 28% poziomu mRNA dla Kir4.1. Nie zaobserwowano zmian w poziomie mRNA dla Kir4.1 w astrocytach traktowanych NMDA przez 8 godzin w pożywce bezwapniowej (Ryc. 43).



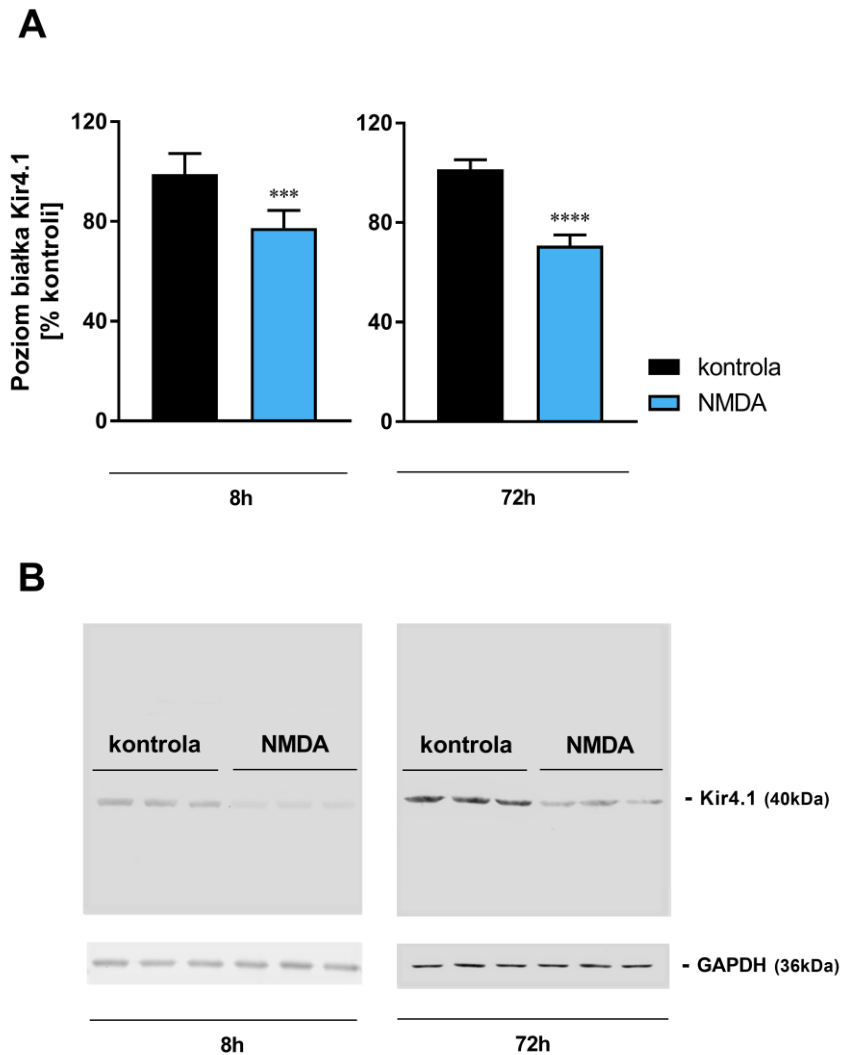
Ryc.43 Wpływ NMDA na poziom mRNA dla Kir4.1 po 8 godzinach inkubacji w pożywce z wapniem i bez wapnia. Wyniki są średnią (\pm SD) z 3-6 niezależnych doświadczeń. *** $p < 0,001$ test t-Studenta.

Wyciszenie ekspresji podjednostki GluN1 za pomocą siRNA zapobiegało wywołanemu przez 8-godzinne traktowanie NMDA obniżeniu poziomu mRNA dla Kir4.1 (Ryc. 44).



Ryc.44 Wpływ 8-godzinnej inkubacji z NMDA na poziom mRNA dla Kir4.1 w astrocytach traktowanych siGluN1 oraz samym odczynnikiem transfekującym („mock”). Uzyskane wyniki są średnią (\pm SD) z 3 niezależnych doświadczeń.

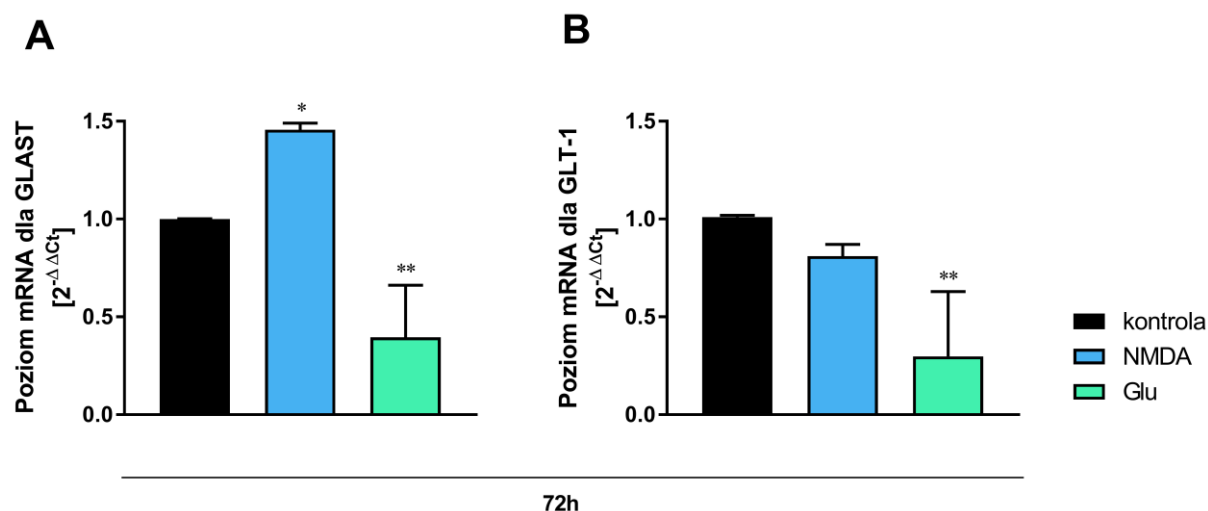
Ekspresja Kir4.1 na poziomie białka została obniżona o 22% po 8 godzinach i o 29% po 72 godzinach inkubacji z NMDA (Ryc. 45).



Ryc.45 (A) Wpływ NMDA na poziom białka Kir4.1 po 8- i 72-godzinnej inkubacji. (B) Przykładowy obraz immunodetekcji białek Kir4.1 i GAPDH. Wyniki są średnią (\pm SD) z 4 niezależnych doświadczeń. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ test t-Studenta.

VII.9. Wpływ NMDA lub Glu na poziom mRNA kodujących transportery glutaminianu: GLAST i GLT-1 w pierwotnych korowych astrocytach mysich

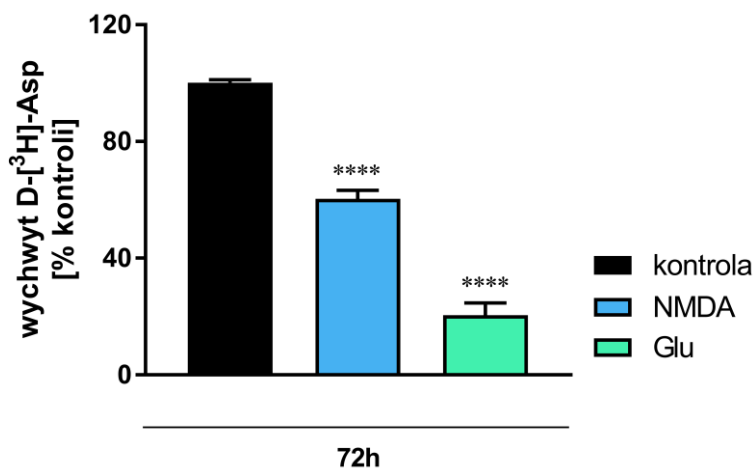
Traktowanie hodowli astrocytów mysich przez 72 godziny NMDA powodowało podwyższenie o 45% poziomu mRNA dla transportera GLAST (Ryc. 46A), nie wpływając na poziom mRNA dla GLT-1 (Ryc. 46B). Inkubacja z Glu powodowała obniżenie poziomu mRNA dla obu transporterów (o 61% - GLAST, 71% - GLT-1) (Ryc. 46A i B).



Ryc.46 Wpływ NMDA lub Glu na poziom mRNA dla GLAST (A) i GLT-1 (B) po 72-godzinnej inkubacji. Wyniki są średnią (\pm SD) z 3-4 niezależnych doświadczeń. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ jednokierunkowa analiza ANOVA z testem *post hoc* Dunnett'a.

VII.10. Wpływ NMDA i Glu na wychwyt D-[2,3- 3 H]-asparagianu w pierwotnych korowych astrocytach mysich

Długotrwałe (72h) działanie NMDA spowodowało obniżenie zdolności astrocytów do wychwytu D-[3 H]-Asp (nie podlegającego metabolizowaniu analogu Glu) o 40% (Ryc. 47). Natomiast Glu, obecny w pożywce hodowlanej przez 72h, spowodował obniżenie zdolności astrocytów do wychwytu D-[3 H]-Asp o 80% (Ryc. 47), w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach kontrolnych.



Ryc.47 Wpływ 72-godzinnej inkubacji z NMDA lub Glu na wychwyt D-[3 H]-Asp w hodowanych astrocytach mysich. Wyniki są średnią (\pm SD) z 4 niezależnych doświadczeń. **** $p < 0,0001$ jednokierunkowa analiza ANOVA z testem *post hoc* Dunnett'a.

Parametry kinetyczne wychwytu D-[3 H]-Asp przez hodowane astrocyty mysie: szybkość maksymalna wychwytu (V_{max}) oraz odpowiadająca stężeniu substratu, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej jest równa połowie V_{max} reakcji (K_m) dla komórek hodowanych w warunkach kontrolnych wynosiły: $V_{max} = 31,56$ nmole/min/mg białka, $K_m = 255,3$ μ M.

VIII. DYSKUSJA

Badania opisane w niniejszej dysertacji wykonano na pierwotnych hodowlach astrocytów mysich. Postawiona w pracy hipoteza skłoniła nas w pierwszej kolejności do zbadania obecności NMDAR w tym materiale badawczym, gdyż jak dotąd nie badano NMDAR w hodowanych astrocytach mysich – dostępne dane dotyczą astrocytów szczurzych *in vitro* i *ex vivo* oraz astrocytów mysich *ex vivo*. Wykorzystując markery astrocytarne: GFAP (Ryc. 12A) i GS (Ryc. 14) wykazano ekspresję tych białek w hodowanych astrocytach mysich, potwierdzając homogenność wyprowadzonej hodowli. Ponadto stosując markery dla neuronów – NF200 (Ryc. 12B) i mikroleju – Iba-1 (Ryc. 12C), wykazano brak tych komórek, czym potwierdzono czystość wyprowadzonej pierwotnej hodowli astrocytów. Następnie wykazano ekspresję wszystkich podjednostek NMDAR na poziomie mRNA w hodowanych astrocytach mysich (Ryc. 17), co pozostaje w zgodzie z wcześniejszymi danymi literaturowymi (GluN1, GluN2B i GluN2C - Schipke i wsp., 2001, GluN1, GluN2C i GluN3A - Cahoy i wsp., 2008, wszystkie podjednostki - Lee i wsp., 2010b, GluN1, GluN2A i GluN2B - Zhou i wsp., 2010, GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D i GluN3A - Rusnakova i wsp., 2013, GluN2C i GluN3A - Orre i wsp., 2014, wszystkie podjednostki z przeważającą ilością GluN1, GluN2C i GluN3A - Zhang i wsp., 2014, wszystkie podjednostki - Dzamba i wsp., 2015, GluN1, GluN2A i GluN2B - Jimenez-Blasco i wsp., 2015, wszystkie podjednostki - Montes de Oca Balderas i Aguilera, 2015]. Pierwsze wysiłki w celu zidentyfikowania białek NMDAR nie przyniosły powodzenia [Schipke i wsp., 2001]. Udana próba przeprowadzona w latach późniejszych stosując barwienia immunochemiczne poszczególnych podjednostek [GluN1, GluN2B - Krebs i wsp., 2003, wszystkie podjednostki - Lee i wsp., 2010b, GluN2B - Gerard i Hansson, 2012, GluN3A - Dzamba i wsp., 2015, wszystkie podjednostki - Montes de Oca Balderas i Aguilera, 2015]. Dopiero całkiem niedawno udokumentowano obecność niektórych podjednostek metodą WB [GluN2A i GluN2B - Jimenez-Blasco i wsp., 2015, GluN1 - Montes de Oca Balderas i Aguilera, 2015, Maneshi i wsp., 2017].

Badania własne zogniskowano na białku podjednostki GluN1 NMDAR, której wyciszenie stało się narzędziem inaktywacji receptora w badaniach funkcjonalnych. Wykorzystując metodę immunocytochemiczną, jako pierwsi potwierdziliśmy obecność podjednostki GluN1 NMDAR w błonie komórkowej astrocytów mysich (Ryc. 18). Jak dotąd, błonową lokalizację białka GluN1 NMDAR udokumentowano w hodowanych astrocytach szczurzych [Montes de Oca Balderas i Aguilera, 2015] i ludzkich [Lee i wsp., 2010b], oraz w szczurzych astrocytach hipokampa *in situ* [Krebs i wsp., 2003]. Oprócz udokumentowania błonowej lokalizacji podjednostki GluN1 NMDAR metodą immunocytochemiczną, zidentyfikowano swoisty dla GluN1 sygnał metodą WB. Sygnał ten, obserwowany na wysokości ~130 kDa (Ryc. 19), odpowiada białku GluN1 NMDAR, co jest zgodne z wcześniej raportowanymi wynikami dotyczącymi ekspresji białka tej podjednostki w homogenatach

mózgu szczurów i myszy [Zaric i wsp., 2018, Xu i wsp., 2017, Liu i wsp., 2018, Wang i wsp., 2018, Gerecsei i wsp., 2019]. Poprzednio, obecność białka GluN1 wykazano w hodowanych astrocytach szczurzych [Montes de Oca Balderas i Aguilera, 2015, Maneshi i wsp., 2017]. Ponadto, badacze Ci zaobserwowali sygnał na wysokości ~65 kDa [Montes de Oca Balderas i Aguilera, 2015], co według niektórych autorów miałyby odpowiadać potranslacyjnie zmodyfikowanej podjednostce GluN1 receptora neuronalnego [Holmes i wsp., 2002, Vazhappilly i Sucher, 2002, Mao i wsp., 2011, Lichnerova i wsp., 2015]. Natomiast zespół Maneshi [2017] wykorzystał w swoich badaniach przeciwciało rozpoznające 564 aminokwasy. Analiza metodą MS nie wykazała obecności podjednostki GluN1 NMDAR w lizatach białkowych z hodowanych astrocytów mysich (Tabela 6). Może to być spowodowane zbyt małą ilością białka GluN1 NMDAR w badanych lizatach (analizie poddano 5 µg lizatu białkowego), jak również ograniczeniami algorytmów systemu MASCOT. Analiza metodą MS nie wykazała także obecności Kir4.1 w lizatach białkowych pochodzących z hodowanych astrocytów mysich, wielokrotnie potwierdzanej innymi metodami (analiza immunocytochemiczna, Real-Time PCR, WB) oraz innych (z wyjątkiem GluN1) podjednostek NMDAR w lizatach białkowych pochodzących z hodowanych neuronów mysich. Obecnie pracuje się nad oprogramowaniami umożliwiającymi uzyskanie większej ilości poprawnych wyników niż z użyciem systemu MASCOT [Paczkowska, 2014 – praca magisterska]. Przeprowadzona analiza MS wykazała jednocześnie występowanie podjednostki GluN2D NMDAR (Tabela 6) w lizatach białkowych z hodowanych astrocytów mysich. Potwierdza to wcześniej zaobserwowaną dominację ekspresji tej podjednostki w preparatach astrocytów różnego pochodzenia i izolowanych różnymi metodami [Krebs i wsp., 2003, Lee i wsp., 2010b, Gerard i Hansson, 2012, Jimenez-Blasco i wsp., 2015, Montes de Oca Balderas i Aguilera, 2015].

Aktywację NMDAR w wyprowadzonej hodowli astrocytów mysich sprawdzano badając zmiany $[Ca^{2+}]_i$ poprzez pomiar zmian fluorescencji Fluo3, sondy wapniowej będącej markerem zmian wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} . Wykazano, że NMDA (Ryc. 24) wywołuje wzrost $[Ca^{2+}]_i$ w astrocytach. Ponadto, uzyskane wyniki pokazują, że efekt NMDA był receptorowo-swoisty, co potwierdza prawie całkowite zablokowanie jego odpowiedzi po zastosowaniu blokera kanału NMDAR – MK801 (Ryc. 27). Obserwacje te zweryfikowano dokumentując, że wyciszenie ekspresji podjednostki GluN1 za pomocą siRNA, również zahamowało wzrost $[Ca^{2+}]_i$ w astrocytach pod wpływem NMDA (Ryc. 31). Należy podkreślić, że transfekcja („mock”) nie hamowała odpowiedzi astrocytów na NMDA (Ryc. 29) w porównaniu z komórkami nietransfekowanymi, co dodatkowo podkreśla specyficzność wyciszenia podjednostki GluN1 NMDAR i autentyczność wyników uzyskanych w transfekowanych astrocytach. Zbiorcza analiza wyników pomiarów zmian $[Ca^{2+}]_i$ przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego i czytnika fluorescencji, pozwala stwierdzić, że NMDAR w hodowanych astrocytach są funkcjonalne. Zarówno fluorescencyjna mikroskopia konfokalna (Ryc.33)

jak i wyniki uzyskane za pomocą czytnika fluorescencji (Ryc. 34 i 35) wskazują na zależne od NMDA podwyższenie $[Ca^{2+}]_i$ w astrocytach. Wszystkie efekty podania NMDA udało się odtworzyć przy użyciu Glu, który w doświadczeniach użyto dla porównania jako agonistę naturalnego (Ryc. 25, 28, 30, 32).

Wyniki prezentowane w niniejszej dysertacji potwierdzają obserwacje innych autorów w różnych układach doświadczalnych. W wielu niżej opisanych badaniach aktywność NMDAR w astrocytach potwierdzano dodatkowo mierząc efekty elektrofizjologiczne. Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ oraz generowanie prądów jonowych w astrocytach stymulowanych NMDA jako pierwsi pokazali Schipke i wsp., [2001] w skrawkach mózgu myszy; do mierzenia przepływu wapnia autorzy Ci użyli sondy wapniowej Fluo4. Zarówno prądy jonowe, jak i odpowiedź wapniowa ulegały obniżeniu po zastosowaniu MK801, a także były zależne od aktywności neuronów, odpowiedzi były bowiem hamowane przez tetradotoksynę (TTX; ang. *tetradotoxin*). W podobnym układzie doświadczalnym, inna grupa badaczy wykazała, iż odpowiedź wapniowa na NMDA generowana jest w sposób wrażliwy na AP5 i memantynę, a jednocześnie niewrażliwy na bloker AMPAR - NBQX [Dzamba i wsp., 2015]. Lalo i wsp., [2006] potwierdzili zdolność NMDA do indukowania prądów jonowych w astrocytach mysich, wykazując jednocześnie, że Glu wywoływał dwa typy odpowiedzi: jedną wynikającą z zaangażowania iGluR, w głównej mierze dotyczącej NMDAR (zahamowanie odpowiedzi przez AP5 i MK801), a drugą indukowaną przez transportery Glu [zahamowanie odpowiedzi przez inhibitor transportu Glu - DL-TBOA (ang. *DL-threo-beta-Benzoyloxyaspartate*)]. Ponadto, analiza właściwości astrocytarnych NMDAR przeprowadzona przez tę grupę badawczą wykazała, że prądy jonowe generowane przez stymulację NMDA ulegają wzmocnieniu przez glicynę. Należy podkreślić, że astrocyty generowały także spontaniczne miniaturowe prądy jonowe w obecności TTX lub pikrotoksyny. Prądy te były wrażliwe na AP5 i NBQX, ale nie na DL-TBOA, co świadczy o zaangażowaniu NMDAR i AMPAR. Obecność miniaturowych prądów jonowych świadczy o lokalnej, bezpośredniej komunikacji neuron-astrocyt [Lalo i wsp., 2006]. Wywołane przez NMDA lub Glu prądy jonowe w astrocytach w skrawkach lub izolowanych z kory mózgowej myszy zaobserwował także zespół Palygina [Palygin i wsp., 2010; 2011]. W badaniach tej grupy, zastosowanie AP5, UBP141 (selektywny antagonist receptorów zawierających podjednostkę GluN2D) [Palygin i wsp., 2010; 2011], memantyny (antagonista NMDAR zbudowanych z GluN2C i GluN2D) czy MK801 [Palygin i wsp., 2011] obniżało odpowiedź wapniową oraz pobudzenie aktywności elektrycznej. Astrocytarny NMDAR wykazywał stosunkowo niską przepuszczalność dla Ca^{2+} , a blok magnezowy był nieobecny [Palygin i wsp., 2010; 2011]. Jak wspomniano we Wstępie, ta stosunkowo niska przepuszczalność Ca^{2+} może wskazywać na obecność di-merycznych (GluN1/GluN3) lub tri-heteromerycznych (GluN1/GluN2/GluN3) NMDAR, zawierających podjednostkę GluN3, której obecność znacznie obniża przepuszczalność Ca^{2+} i podatność kanału na

blok Mg^{2+} [Henson i wsp., 2010]. Dwie grupy badawcze [Zhang i wsp., 2003, Hu i wsp., 2004] wykazały, że $[Ca^{2+}]_i$ wzrasta po stymulacji przez Glu lub NMDA również w hodowanych astrocytach szczurzych. Odpowiedź ta była obniżona po zastosowaniu AP5 lub antagonisty AMPAR - CNQX (ang. 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) dowodząc o zaangażowaniu NMDAR i AMPAR. Ponadto w doświadczeniach obu grup badawczych odpowiedź na Glu była wrażliwa na zastosowanie pożywki bezwapniowej, co świadczy o udziale mechanizmu jonotropowego, a także na zastosowanie tapsygarginy, wskazując na uwalniania wapnia z puli wewnątrzkomórkowej [Zhang i wsp., 2003, Hu i wsp., 2004]. Podobnie, inni autorzy zaobserwowali, że w hodowanych astrocytach szczurzych wzrost $[Ca^{2+}]_i$ po traktowaniu NMDA jest hamowany przez AP5 czy kwas kynureninowy (KYNA, inhibitor miejsca wiązania Gly w GluN1; ang. *kynurenic acid*) oraz jest obniżony po wyciszeniu podjednostki GluN1 NMDAR za pomocą siRNA, co potwierdzało wcześniejsze obserwacje o zaangażowaniu NMDAR w generowaniu sygnału wapniowego w astrocytach [Montes de Oca Balderas i Aguilera, 2015]. W doświadczeniach tych wykazano ponadto, że źródłem Ca^{2+} były zasoby wewnątrzkomórkowe, ponieważ odpowiedź wapniowa była wrażliwa na zastosowanie inhibitorów receptorów IP3 i rianodynowych (odpowiednio: ksestosponginy C i rianodyny), natomiast nie zależała od jonotropowej (tzn. zależnej od Ca^{2+} zewnątrzkomórkowego) aktywności receptora, gdyż zastosowany bloker kanału NMDAR - MK801 i pożywka bezwapniowa jej nie blokowały [Montes de Oca Balderas i Aguilera, 2015].

Podwyższenie $[Ca^{2+}]_i$ po traktowaniu NMDA wykazano także w astrocytach szczurzych współhodowanych z komórkami śródbłonna naczyń mózgowych. Odpowiedź ta była znacznie obniżona po zastosowaniu AP5 i ifenprodilu. Co ciekawe, odpowiedź na NMDA ulegała obniżeniu nie tylko w astrocytach hodowanych w pożywce bezwapniowej lub zawierającej jony Cd^{2+} , ale także po zastosowaniu kofeiny, tapsygarginy czy ksestosponginy, co wskazuje, że źródłem Ca^{2+} były zasoby wewnątrzkomórkowe [Gerard i Hansson, 2012]. W szczurzych astrocytach współhodowanych z neuronami również obserwowano podwyższenie $[Ca^{2+}]_i$ po stymulacji przez NMDA lub Glu. W tym modelu doświadczalnym zastosowanie MK801 zapobiegało odpowiedzi na Glu, a zastosowanie CNQX nie hamowało odpowiedzi wywołanej przez Glu, świadcząc o wyłącznym udziale NMDAR w zwiększaniu $[Ca^{2+}]_i$. Jednocześnie stymulacja NMDA pod nieobecność wapnia zewnątrzkomórkowego również powodowała podwyższenie $[Ca^{2+}]_i$, na które nie wpływało zastosowanie tapsygarginy hamującej działanie kanałów SERCA w ER, co sugeruje, że głównym źródłem Ca^{2+} w tym układzie doświadczalnym była ER [Jimenez-Blasco i wsp., 2015]. Ponadto zastosowanie pożywki bezwapniowej łącznie z tapsygarginą całkowicie blokowało odpowiedź wapniową na NMDA dodatkowo potwierdzając wniosek o uwalnianiu Ca^{2+} z ER. Wrażliwy na AP5 i ifenprodil wzrost $[Ca^{2+}]_i$ po stymulacji NMDA wykazano także w hipokampalnych astrocytach szczurzych *in vitro* po anoksji i *in vivo* po ischemii [Krebs i wsp., 2003].

Dwie grupy badawcze wykazały, że wzrost $[Ca^{2+}]_i$ i/lub generowanie prądów jonowych w odpowiedzi na NMDA dotyczy nie tylko astrocytów gryzoni, ale także hodowanych astrocytów ludzkich. Zaobserwowana odpowiedź wapniowa nie była wrażliwa na dodanie AP5 lub KYNA i tylko częściowo wrażliwa na zubożenie zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} w pożywce hodowlanej [Nishizaki i wsp., 1999, Kondoh i wsp., 2001], wskazując, że w hodowanych astrocytach ludzkich NMDA wywoływał odpowiedź poprzez NMDAR regulowany przez receptory sprzężone z białkiem G, co sugeruje ich wrażliwość na inhibitor białka G. Inny zespół wykazał, że w hodowanych astrocytach ludzkich pochodzących zarówno od płodów, jak i osób dorosłych wzrost $[Ca^{2+}]_i$ indukowany przez Glu lub kwas chinolinowy (QUIN, agonista NMDAR; ang. *quinolinic acid*) był wrażliwy na memantynę lub MK801 [Lee i wsp., 2010b].

Mechanizm aktywacji NMDAR testowano także poprzez badanie wiązania znakowanego trytem blokera kanału receptora – MK801 do hodowanych astrocytów. Po raz pierwszy udokumentowaliśmy, że podanie NMDA lub Glu powoduje znaczny wzrost wiązania $[^3H]$ -MK801 w hodowanych astrocytach mysich (Ryc. 23). Ponieważ MK801 ma powinowactwo wyłącznie do miejsca wewnątrz kanału receptora, wywołany przez NMDA wzrost specyficznego wiązania $[^3H]$ -MK801 wskazuje na aktywację NMDAR w hodowanych astrocytach mysich. Wyniki te dokumentują, że NMDA otwiera kanał jonowy receptora, a więc rzeczywiście aktywuje NMDAR w hodowanych astrocytach. Zastosowanie agonisty tego miejsca receptorowego, Gly, nie wzmacniało efektu NMDA. Może to świadczyć o tym, że miejsce wiązania Gly do GluN1 zostało uprzednio zaktywowane przez Gly obecną w pożywce hodowlanej. Podobny brak efektu Gly był już uprzednio opisany w hodowanych astrocytach szczurzych [Montes de Oca Balderas i Aguilera, 2015] i mysich [Dzamba i wsp., 2015] oraz w komórkach gleju Bergmanna mózdzku myszy [Müller i wsp., 1993]. Wzmocnienie wewnątrzkomórkowych prądów jonowych aktywowanych przez NMDA w obecności Gly lub D-seryny obserwowano natomiast w astrocytach ludzkich [Nishizaki i wsp., 1999, Kondoh i wsp., 2001] oraz astrocytach izolowanych z kory mózgu myszy w warunkach *in situ* [Lalo i wsp., 2006, Palygin i wsp., 2011]. Dalsze badania nad przyczynami zróżnicowanej wrażliwości astrocytarnego NMDAR na Gly i/lub D-serynę będą musiały uwzględnić czynniki znane z wcześniejszych badań nad NMDAR zlokalizowanym w neuronach. Czynniki te opisano poniżej.

Zdolność do aktywacji NMDAR przez Gly, a zatem i D-serynę, o wyższej sile działania niż Glu opisywano wcześniej dla NMDAR diheteromerycznych zbudowanych z GluN1/GluN3 [Chatterton i wsp., 2002]. Jak opisano we Wstępie, NMDAR jest wrażliwy na różnych koagonistów, takich jak Gly lub D-seryna, jony (Mg^{2+} , Zn^{2+} , H^+) czy poliaminy. Aktywacja NMDAR wymaga jednoczesnego wiązania dwóch różnych agonistów, Glu i Gly/D-seryny [Kleckner i Dingledine, 1988, Williams i wsp., 1996, Anson i wsp., 1998]. Uważa się, że zewnątrzkomórkowa Gly (lub D-seryna) jest ciągle obecna w OUN. To, czy Gly lub D-seryna, służy jako endogenny koagonista, może zależeć

od okolicy mózgu i przedziału podkomórkowego [Wolosker, 2007, Oliet i Mothet, 2009, Mothet i wsp., 2015]. Sugeruje się, że D-seryna jest dominującym koagonistą w synapsach, podczas gdy Gly jest bardziej rozpowszechniona w miejscach pozasynaptycznych [Papouin i wsp., 2012]. Ponadto Gly i D-seryna nie występują w stężeniach, które w pełni nasycają miejsca wiązania agonistów NMDAR, przynajmniej w niektórych okolicach mózgu [Bergeron i wsp., 1998, Billups i Attwell, 2003]. Uwrażliwienie NMDAR zależne od Gly można zaobserwować w obecności nasyconych jej stężeń i jest ono zniesione w wysycającym stężeniu pozakomórkowej Gly [Mayer i wsp., 1989].

Zasadniczym przedmiotem badań podjętych w dysertacji była analiza skutków długotrwałego pobudzenia NMDAR na funkcje homeostatyczne astrocytów. Jak dotąd zagadnienie to było poruszane tylko w nielicznych pracach. Jak wspomniano we wstępie do rozprawy, 8-godzinna stymulacja astrocytów przez NMDA aktywowała szlak NMDAR-Cdk5-Nrf2, co prowadziło do zwiększenia w nich syntezy GSH, a to chroniło neurony przed stresem oksydacyjnym i poprawiało ich przeżycie [Jimenez-Blasco i wsp., 2015]. Kilka prac wskazywało na rolę długotrwałego pobudzenia NMDAR w astrocytach w ujawnianiu się stanów patologicznych w mózgu. M.in. wykazano, że astrocytarne NMDAR pośredniczą w zwiększonym wydzielaniu cytokin prozapalnych w komórkach poddanych stymulacji zapalnej [Gerard i Hansson, 2012, Sühs i wsp., 2016], wzmagają wydzielanie β -NGF w hipokampie po traktowaniu amyloidem β 1-40 [Li i wsp., 2016] i przyczyniają się do zwiększonego generowania sygnałów wapniowych w astrocytach poddanych wydłużonej ekspozycji na amoniak [Haack i wsp., 2014].

W niniejszej pracy sprawdzano hipotezę, że długotrwałe pobudzenie NMDAR w astrocytach wpływa na ekspresję i/lub aktywność wybranych białek astrocytarnych biorących zdefiniowany udział w regulacji homeostazy neuroprzebieżnikowej i wodno-jonowej w mózgu. Punktem wyjścia stały się wcześniejsze badania przeprowadzone w Zakładzie Neurotoksykologii IMDiK PAN na astrocytach szczurzych, w których wykazano, że ich 72-godzinna ekspozycja na Glu lub NMDA obniża ekspresję kanału potasowego Kir4.1 [Obara-Michlewska i wsp., 2015]. Przeprowadzona analiza immunocytochemiczna potwierdziła obecność w astrocytach mysich białka Kir4.1 (Ryc. 16), oraz wykazała ekspresję dwóch innych białek o szczególnym znaczeniu dla funkcji homeostatycznych astrocytów: GS (Ryc. 14) i AQP4 (Ryc. 15). Analiza metodą MS (Tabela 6) potwierdziła obecność w lizatach białkowych z hodowanych astrocytów mysich białek GS, i AQP4, a ponadto dwóch swoistych dla astrocytów transporterów Glu: GLAST i GLT-1, którym poświęcono uwagę w dalszej części dyskusji.

Dowodzono, że długotrwała ekspozycja hodowanych astrocytów mysich na NMDA obniża ekspresję zarówno na poziomie mRNA i białka: GS (Ryc. 36 i 38), AQP4 (Ryc. 40 i 42) i Kir4.1 (Ryc. 43 i 45). W przypadku GS udało się potwierdzić, że obniżenie ekspresji przekłada się na zahamowanie aktywności enzymu po 8 godzinach traktowania NMDA (Ryc. 39). Brak zmian w

aktywności GS po 72-godzinnej inkubacji z NMDA (Ryc. 39) może stanowić reakcję kompensacyjną wobec obniżonej ekspresji GS (Ryc. 36, 38). Ponadto, wyciszenie podjednostki GluN1 NMDAR (Ryc. 37, 41 i 44) za pomocą siRNA spowodowało zniesienie indukowanych przez NMDA zmian w poziomie mRNA dla GS, Aqp4 i Kir4.1, co wzmacnia argument o rzeczywistym udziale NMDAR w obserwowanych zmianach. Uzyskane wyniki poszerzają listę białek astrocytarnych, których ekspresja w hodowanych astrocytach mysich ulega obniżeniu na skutek długotrwałego pobudzenia NMDAR o GS i AQP4, a ponadto potwierdzają obniżenie ekspresji białka Kir4.1, wcześniej opisanego w tych samych warunkach w hodowanych astrocytach szczurzych [Obara-Michlewska i wsp., 2015].

Jak wspomiano, zmiany indukowane przez NMDA nie wystąpiły w astrocytach z wyciszoną podjednostką GluN1. Ponadto, obniżenie ekspresji GS, AQP4 i Kir4.1 było zależne od obecności Ca^{2+} w pożywce hodowlanej, co wskazywało na zależny od obecności Ca^{2+} zewnątrzkomórkowego charakter działania receptora (Ryc. 36, 40 i 43).

Ponieważ Gln jest zarówno prekursorem neuroprzekaźników Glu i GABA dla neuronów jak i końcowym produktem ich inaktywacji w astrocytach [Albrecht i wsp., 2007, Schousboe i wsp., 2013], prezentowane w niniejszej pracy obniżenie ekspresji i aktywności GS może mieć wpływ na zaburzenie homeostazy astrocytów. W szczególności, utrata GS może mieć znaczenie w towarzyszącej różnym schorzeniom [Jayakumar i Norenberg, 2016] kaskadzie procesów prowadzących do ekscytotoksycznego uszkodzenia tkanki. Dane literaturowe wskazują, że aktywacja NMDAR w mózgu szczurów eksponowanych na amoniak zmniejszała syntezę Gln w mózgu [Kosenko i wsp. 1994]. Obserwację tę pierwotnie wiązano z aktywacją NMDAR w neuronach, jednakże wyniki niniejszej dysertacji skłaniają do rozważenia udziału długotrwałego pobudzenia NMDAR w astrocytach. Można spekulować, że zwiększona stymulacja NMDAR w astrocytach przyczynia się również do spadku ekspresji/aktywności GS w ogniskach padaczkowych w procesie rozwoju padaczki, schorzenia związanego z okresowym wzrostem neuroprzekaźnictwa pobudzającego [Eid i wsp. 2008, Swamy i wsp. 2011, van der Hel i wsp. 2014]. Z drugiej strony, podwyższoną aktywność GS zanotowano w zakręcie zębatym hipokampa w szczurzym modelu padaczki wywoływanej elektryczną stymulacją ciała migdałowatego [Sun i wsp., 2013].

Ekscytotoksyczność może się wiązać z utratą GS obserwowaną w przebiegu AD u ludzi [Smith i wsp., 1991, Hensley i wsp., 1995, Robinson, 2000] i w astrocytach zwierząt z doświadczalną AD [Olabarria i wsp., 2011, Kulijewicz-Nawrot i wsp., 2013]. Z drugiej strony wykazano, że ilość białka GS w mózgach chorych z AD jest tym niższa im wyższa jest liczba blaszek β -amyloidowych [Le Prince i wsp., 1995], a w mysim modelu AD spadek GS również wiąże się z obecnością złogów β -amyloidu w astrocytach [Olabarria i wsp., 2011]. Spadek ekspresji GS stwierdzono także w prądkowiu u szczurów w modelu dominującego drżenia typu idiopatycznej PD [Yu i wsp., 2012]. Obniżenie ekspresji GS obserwowano także w innych schorzeniach, które cechuje składowa

ekscytotoksyczna, w tym w mózgach chorych ze schizofrenią [Steffek i wsp., 2008], z depresją [Klempan i wsp., 2009, Sequeira i wsp., 2009], czy we wczesnych stadiach cukrzycy [Yu i wsp., 2009, Fernandez i wsp., 2012].

Utrata AQP4 może powodować zaburzenie homeostazy wodno-jonowej, poprzez osłabione usuwanie metabolitów przez układ glimfatyczny, zjawisko opisywane w mózgach myszy pozbawionych genu *Aqp4* [Iloff i wsp., 2012]. Podobnie jak w przypadku GS, ekspresja AQP4 w różnych modelach konkretnego schorzenia może być zróżnicowana. Zmiany w ekspresji AQP4 obserwuje się w modelach padaczki [Lee i wsp., 2004; 2012, Eid i wsp., 2005], niedokrwieniu/niedotlenieniu [Aoki i wsp. 2003, Hoshi i wsp., 2011] czy encefalopatii wątrobowej [Rama Rao i wsp., 2010, Saadoun i Papadopoulos, 2010, Wright i wsp., 2010, Badaut i wsp., 2014, Potokar i wsp., 2016]. W kilku stanach patologicznych odnotowano zmiany w subkomórkowej dystrybucji AQP4 i jej poziomie ekspresji w astrocytach, co może być związane ze zmienioną ekspresją genu *Aqp4*. Znaczne obniżenie ilości kanałów AQP4 wykryto w okołonaczyniowej błonie komórkowej astrocytów w obszarze hipokampalnym chorych z padaczką [Eid i wsp., 2005]. Spadek ten przypisano zmniejszonej ekspresji białka kotwiczącego AQP4, mimo że ekspresja mRNA dla AQP4 wzrastała w tych samych reaktywowanych astrocytach [Lee i wsp. 2004, Eid i wsp., 2005]. Czy i w jakim stopniu powyższe zmiany wynikają z nadpobudzenia astrocytarnego NMDAR pozostaje niewyjaśnione. Niezależnie od przyczyn, tam gdzie obniżenie ekspresji AQP4 u chorych z padaczką występuje, jest ono prawdopodobną przyczyną zaburzonej homeostazy wodno-jonowej, prowadząc do zwiększonej skłonności do drgawek i zaburzeń funkcji poznawczych [Yang i wsp., 2011]. Widoczne rozbieżności odnotowano w kilku badaniach dotyczących ekspresji AQP4 w błonie komórkowej astrocytów u chorych z AD [Moftakhar i wsp., 2010, Yang i wsp., 2011]. Przyczyny obserwowanego podwyższenia lub obniżenia ekspresji AQP4 w błonie plazmatycznej wymagają wyjaśnienia. Sugeruje się, że mogą one być spowodowane pochodzeniem badanych próbek z różnych stadiów choroby i różnych regionów mózgu.

Dane literaturowe potwierdzają istotną rolę astrocytarnych kanałów Kir w skutecznym buforowaniu nadmiaru zewnątrzkomórkowego K^+ . Farmakologiczne hamowanie kanału Kir4.1 upośledza transbłonowy przepływ K^+ w hodowanych astrocytach [D'Ambrosio i wsp., 2002, Kucheryavykh i wsp., 2007], powodując jednocześnie hamowanie wychwytu Glu [Kucheryavykh i wsp., 2007]. Badania z zastosowaniem warunkowego nokautu kanału Kir4.1 [Djukic i wsp., 2007, Chever i wsp., 2010] oraz z mutacją zerową (ang. *null mutation*) w genie kanału Kir4.1 u myszy [Neusch i wsp., 2006] również wykazały upośledzenie zdolności pobierania K^+ przez astrocyty. Pomimo licznych danych literaturowych o głównej roli kanałów Kir4.1 w utrzymywaniu homeostazy K^+ [Haj-Yasein i wsp., 2015], ich uniwersalny wkład w usuwanie K^+ nie został jednoznacznie udowodniony; niektóre grupy badawcze nie zaobserwowały istotnego udziału Kir4.1 w buforowaniu

astrocytarnego K^+ w takich strukturach, jak nerw wzrokowy [Ransom i wsp., 2000] i zakręt zębaty hipokampa [Xiong i Stringer, 2000]. Według najnowszych danych kanały Kir4.1 w dojrzałych astrocytach hipokampa są odpowiedzialne za około 45% zdolności buforowania K^+ [Bellot-Saez i wsp., 2017]. W sumie, dostępne dane sugerują, że względne znaczenie mechanizmów homeostazy K^+ różni się w zależności od okolicy mózgu i poziomu ekspresji kanału Kir4.1.

Dysfunkcja kanału Kir4.1 jest jednym z czynników sprawczych wielu schorzeń neurologicznych. Badania prowadzone w Zakładzie Neurotoksykologii IMDiK PAN wykazały, iż ekspresja Kir4.1 spada w mózgu w warunkach hiperamonemii [Obara-Michlewska i wsp., 2011; 2015], a wymuszona nadekspresja Kir4.1 w komórkach HEK 293T zwiększa ich odporność na wywołane przez amoniak zmiany w objętości komórek i transporcie K^+ [Obara-Michlewska i wsp., 2010]. U zwierząt z nokautem Kir4.1 opisywano ciężkie upośledzenia motoryczne (ataksja, drżenie), objawy padaczkowe (napady drgawkowe) i przedwczesną śmiertelność (w ciągu 3 tygodni po urodzeniu) [Neusch i wsp., 2001, Coulter i Steinhäuser, 2015]. Ponadto wykazano, że ekspresja Kir4.1 w astrocytach jest obniżona w zwierzęcych modelach padaczki w okolicach mózgu związanych z wystąpieniem napadów drgawkowych [Ferraro i wsp., 2004, Inyushin i wsp., 2010, Harada i wsp., 2013]. Mutacje powodujące utratę funkcji w ludzkim genie *Kcnj10* kodującym Kir4.1 powodują zaburzenia padaczkowe typu "EAST" (Padaczka, Ataksja, Głuchota sensoryczna i Tubulopatia; ang. *Epilepsy, Ataxia, Sensorineural deafness and Tubulopathy*) lub inaczej "SeSAME" (Drgawki, Głuchota sensoryczna, Ataksja, Niedorozwój umysłowy i Zaburzenie elektrolitowe; ang. *Seizures, Sensorineural deafness, Ataxia, Mental retardation and Electrolyte imbalance*) [Scholl i wsp., 2009, Reichold i wsp., 2010]. Genetyczne powiązanie z polimorfizmem genu *Kcnj10* lub obniżoną ekspresją Kir4.1 obserwowano również u chorych z idiopatyczną padaczką uogólnioną [Phani i wsp., 2014, Guo i wsp., 2015] i TLE [Das i wsp., 2012, Steinhäuser i wsp., 2012]. W sumie, powyższe dane sugerują istnienie związku przyczynowego pomiędzy powodowanymi przez dysfunkcję astrocytarnych kanałów Kir4.1 zakłóceniami przestrzennego buforowania K^+ a padaczkowemu nadpobudzeniu neuronów. Zmiany w funkcjonowaniu astrocytarnych kanałów Kir4.1 wykazano również w schorzeniach neurodegeneracyjnych z komponentą ekscytotoksyczną, takich jak AD [Wilcock i wsp., 2009], ALS [Kaiser i wsp., 2006, Bataveljić i wsp., 2012] i HD [Tong i wsp., 2014]. Związek powyższych zmian z nadaktywnością astrocytarnego NMDAR wymaga dalszych badań.

Uzyskanie efektów stymulacji astrocytów przez NMDA wymaga zastosowania znacznie wyższych stężeń agonisty niż ma to miejsce w przypadku neuronów. Zastosowane w niniejszych badaniach stężenie NMDA (100 μ M) jest dla hodowanych neuronów toksyczne [Papadia i wsp., 2008]. Warto wspomnieć, że stężenie NMDA identyczne do użytego w dysertacji wykorzystywane było w wielu doświadczeniach dobrze dokumentujących różne cechy astrocytarnego NMDAR [Schipke i wsp., 2001, Ficker i wsp., 2014, Dzamba i wsp., 2015, Obara-Michlewska i wsp., 2015].

Inne grupy badawcze stosowały stężenie 500 μM [Dzamba i wsp., 2015] lub 1 mM [Nishizaki i wsp., 1999, Kondoh i wsp., 2001, Krebs i wsp., 2003, Lee i wsp., 2010b, Montes de Oca Balderas i Aguilera, 2015], jednakże należy podkreślić, że w żadnym z opisanych przypadków NMDA nie uszkadzało komórek astrogleju.

W świetle wyników uzyskanych w dysertacji postanowiono sprawdzić czy zaobserwowany mechanizm regulacji trzech charakterystycznych dla astrocytów białek (GS, AQP4, Kir4.1) przez NMDAR odnosi się również do innych białek astrocytarnych o zdefiniowanej funkcji. W tym celu prześledzono reakcję na traktowanie NMDA astrocytarnych transporterów Glu: GLAST i GLT-1. Ze względu na ich wstępny charakter, badania ograniczono do ekspozycji 72-godzinnej, po której uzyskanie pozytywnego efektu wydało się bardziej prawdopodobne. Wykazano, że traktowanie hodowanych astrocytów mysich NMDA podwyższa poziom mRNA dla GLAST, nie wpływając na poziom mRNA dla GLT-1 (Ryc. 46), a inkubacja z Glu powoduje obniżenie poziomu mRNA obu transporterów (Ryc. 46), przy czym zarówno NMDA jak i Glu znacznie obniżały zdolność astrocytów do wychwytu D-Asp (Ryc. 47). Powyższe obserwacje sugerują, że regulacja przez NMDAR nie jest zjawiskiem wspólnym dla wszystkich białek astrocytarnych – możliwe są różne mechanizmy transdukcji sygnału generowanego przez aktywację NMDAR w astrocytach.

W podsumowaniu, w niniejszej dysertacji wykazano, że hodowane astrocyty mysie posiadają funkcjonalny NMDAR, którego pobudzenie skutkuje napływem jonów wapnia do wnętrza komórki. Wynik ten wspiera pogląd, że astrocyty są aktywnymi uczestnikami w procesie przekazywania sygnałów w mózgu, zgodnie z hipotezą synapsy trójdzielnej [Araque i wsp., 1999, Eroglu i wsp., 2008, Haydon i Nedergaard, 2015, Haydon, 2016, Deemyad i wsp., 2018, Farhy-Tselnicker i Allen, 2018]. W szczególności, NMDAR indukując oscylacje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ może regulować zależne od wapnia uwalnianie do szczeliny synaptycznej różnych glioprzebieżników, takich jak np. D-seryna [Pantier i wsp., 2006, Henneberger i wsp., 2010, Kang i wsp., 2013], ATP czy Glu [Jeremic i wsp., 2001, Reyes i Parpura, 2009, Koizumi, 2010, Pantier i wsp., 2011, Covelo i Araque, 2018]. Ponadto w pracy wykazano, że Długotrwała ekspozycja astrocytów *in vitro* na NMDA obniża ekspresję trzech białek astrocytarnych, krytycznych w regulacji homeostazy jonowej (Kir4.1), wodnej (AQP4) i utrzymaniu równowagi neuroprzebieżników (GS). Prezentowane badania ujawniają zatem pewne nowe aspekty plastyczności astrogleju powodowanej przez aktywację NMDAR w odpowiedzi na sygnał ekscytotoksyczny. W zależności od charakteru i czasu działania czynnika patogenicznego, indukowane przez NMDAR zmiany w funkcjonowaniu astrocytów mogą być neuroprotektoryjne lub szkodliwe dla mózgu. Dalsze doświadczenia prowadzone w bardziej złożonych układach, w tym w warunkach *in vivo*, pozwolą ocenić czy i w jakim stopniu zależne od NMDAR obniżenie ekspresji GS, AQP4 i Kir4.1 wpływa na specyficzne funkcje tych białek w astrocytach w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych mózgu.

IX. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

1. Potwierdzono obecność funkcjonalnego NMDAR w hodowanych astrocytach mysich poprzez wykazanie:

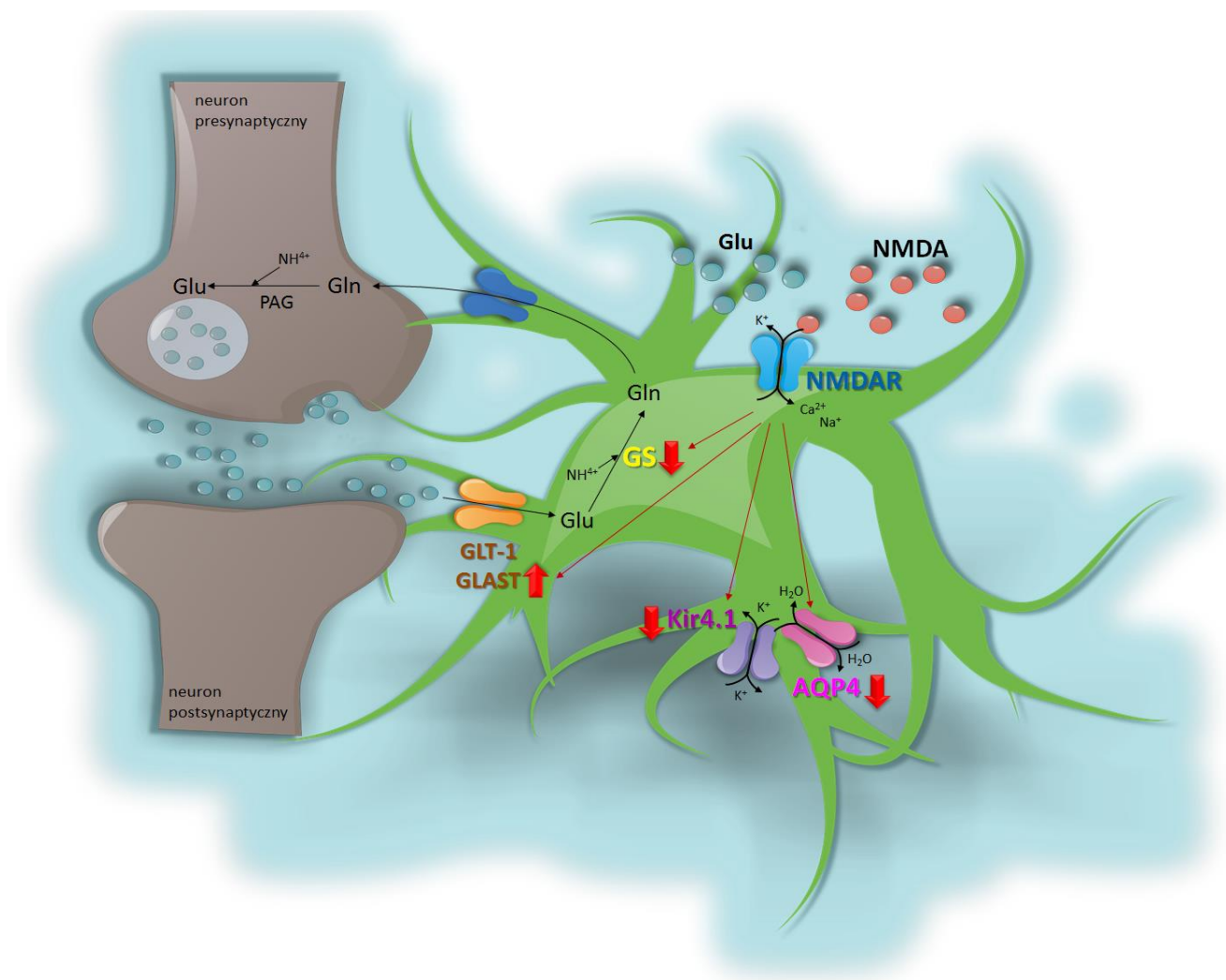
- a) ekspresji na poziomie mRNA wszystkich podjednostek NMDAR;
- b) ekspresji podjednostki GluN1 NMDAR na poziomie białka;
- c) wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} w odpowiedzi na stymulację NMDA;
- d) zwiększonego wiązania [^3H]-MK801 po traktowaniu NMDA;
- e) braku zmian w poziomach mRNA dla GS, AQP4 i Kir4.1 po traktowaniu NMDA w komórkach z wyciszoną ekspresją podjednostki GluN1 NMDAR.

2. Po raz pierwszy wykazano, że długotrwała ekspozycja astrocytów na NMDA hamuje ekspresję białek astrocytarnych (GS, AQP4, Kir4.1), których aktywność jest istotna dla utrzymania homeostazy wodno-jonowej w OUN. W przypadku GS udało się potwierdzić, że obniżenie ekspresji przekłada się na zahamowanie aktywności enzymu.

3. Całkowita zależność obniżenia poziomu mRNA dla GS, AQP4 i Kir4.1 przez NMDA od obecności wapnia zewnątrzkomórkowego wskazuje na jonotropowy mechanizm działania NMDAR.

4. Brak zmian w transkrypcji podjednostek NMDAR po stymulacji NMDA świadczy, iż jego wpływ na ekspresję mRNA kodujących badane białka astrocytarne wynikał z przyczyn innych niż zmiany składu podjednostkowego.

5. Wpływ NMDA na obniżenie zdolności astrocytów do wychwytu D-Asp, może wynikać ze zmian w ekspresji astrocytarnych transporterów Glu wywoływanych długotrwałym traktowaniem NMDA. Odmienny niż w przypadku mRNA dla GS, AQP4, Kir4.1, wpływ NMDA na ekspresję mRNA dla transporterów Glu (wzrost GLAST, brak zmian GLT-1), świadczy o możliwości istnienia różnych mechanizmów transdukcji sygnału generowanego przez aktywację NMDAR w astrocytach. Identyfikacja tych mechanizmów oraz stopień ich przełożenia na ekspresję białek wymaga podjęcia odrębnych badań.



Ryc.48 Graficzne podsumowanie niniejszej rozprawy doktorskiej.

X. OPIS SUPLEMENTU

Na płycie DVD dołączonej do niniejszej rozprawy zamieszczono przykładowe filmy przedstawiające zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w hodowanych astrocytach mysich:

S1 Video 1. Przykładowy film dokumentujący zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w astrocytach po stymulacji NMDA

S2 Video 2. Przykładowy film dokumentujący zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w astrocytach po stymulacji Glu.

S3 Video 3. Przykładowy film dokumentujący zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w astrocytach po stymulacji ATP.

S4 Video 4. Przykładowy film dokumentujący zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w astrocytach traktowanych MK801 po stymulacji NMDA.

S5 Video 5. Przykładowy film dokumentujący zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w astrocytach traktowanych MK801 po stymulacji Glu.

S6 Video 6. Przykładowy film dokumentujący zmiany fluorescencji Fluo3 w astrocytach hodowanych w obecności odczynnika do transfekcji HiPerFect („mock”) po stymulacji NMDA.

S7 Video 7. Przykładowy film dokumentujący zmiany fluorescencji Fluo3 w astrocytach hodowanych w obecności odczynnika do transfekcji HiPerFect („mock”) po stymulacji Glu.

S8 Video 8. Przykładowy film dokumentujący zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w astrocytach z wyciszoną podjednostką GluN1 (siGluN1) po stymulacji NMDA.

S9 Video 9. Przykładowy film dokumentujący zmiany intensywności fluorescencji Fluo3 w astrocytach z wyciszoną podjednostką GluN1 (siGluN1) po stymulacji Glu.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Aarts M.M., Tymianski M. 2003. Novel treatment of excitotoxicity: Targeted disruption of intracellular signalling from glutamate receptors. *Biochemical Pharmacology*. 66: 877-886.
2. Abbott N.J., Patabendige A.A.K., Dolman D.E.M., Yusof S.R., Begley D.J. 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37: 13-25.
3. Abe K., Saito H. 2001. Possible linkage between glutamate transporter and mitogen-activated protein kinase cascade in cultured rat cortical astrocytes. *Journal of Neurochemistry*. 76 (1): 217-223.
4. Agre P., Kozono D. 2003. Aquaporin water channels: Molecular mechanisms for human diseases 1. *FEBS Lett.* 555, 72-78.
5. Albrecht J., Norenberg M.D. 2006. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology* 44: 788-794.
6. Albrecht J., Sonnewald U., Waagepetersen H.S., Schousboe A. 2007. Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction. *Front Biosci.* 12: 332-343.
7. Albrecht J., Sidoryk-Węgrzynowicz M., Zielińska M., Aschner M. 2010. Roles of glutamine in neurotransmission. *Neuron Glia Biol.* 6: 263-276.
8. Alexander J.J., Bao L., Jacob A., Kraus D.M., Holers V.M., Quigg R.J. 2003. Administration of the soluble complement inhibitor, Crry-Ig, reduces inflammation and aquaporin 4 expression in lupus cerebritis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1639: 169-176.
9. Amiry-Moghaddam M., Ottersen O.P. 2003. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 991-1001.
10. Amiry-Moghaddam M., Lindland H., Zelenin S., Roberg B.A., Gundersen B.B., Petersen P., Rinvik E., Torgner I.A., Ottersen O.P. 2005. Brain mitochondria contain aquaporin water channels: evidence for the expression of a short AQP9 isoform in the inner mitochondrial membrane. *FASEB J.* 19(11): 1459-1467.
11. András I.E., Deli M.A., Veszelka S., Hayashi K., Hennig B., Toborek M. 2007. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27: 1431-1443.
12. Anlauf E., Derouiche A. 2013. Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 4: 144.
13. Anson L.C., Chen P.E., Wyllie D.J.A., Colquhoun D., Schoepfer R. 1998. Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J. Neurosci.* 18(2): 581-589
14. Aoki K., Uchihara T., Tsuchiya K., Nakamura A., Ikeda K., Wakayama Y. 2003. Enhanced expression of aquaporin 4 in human brain with infarction. *Acta Neuropathol.* 106:121-124.
15. Aoyama M., Kakita H., Kato S., Tomita M., Asai K. 2012. Region-specific expression of a water channel protein, aquaporin 4, on brain astrocytes. *J Neurosci Res.* 90(12):2272-2280.
16. Atlason P.T., Garside M.L., Meddows E., Whiting P., McIlhinney R.A. 2007. N-Methyl-D aspartate (NMDA) receptor subunit NR1 forms the substrate for oligomeric assembly of the NMDA receptor. *J. Biol. Chem.* 282 (35): 25299-25307.
17. Araque A., Parpura V., Sanzgiri R. P., Haydon P. G. 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22: 208-215.
18. Arciénega I.I., Brunet J.F., Bloch J., Badaut J. 2010. Cell locations for AQP1, AQP4 and 9 in the non-human primate brain. *Neuroscience* 167:1103-1114.
19. Arriza J.L., Kavanaugh M.P., Fairman W.A., Wu Y.N., Murdoch G.H., North R.A., Amara S.G. 1993. Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *J. Biol. Chem.* 268: 15329-15332.
20. Arriza J.L., Fairman W.A., Wadiche J.I., Murdoch G.H., Kavanaugh M.P., Amara S.G. 1994. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J. Neurosci.* 14: 5559-5569.
21. Arriza J.L., Eliasof S., Kavanaugh M.P., Amara S.G. 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94: 4155-4160.
22. Backus K., Kettenmann H., Schachner M. 1989. Pharmacological characterization of the glutamate receptor in cultured astrocytes. *Journal of Neuroscience Research.* 282: 274-282.
23. Badaut J., Hirt L., Granziera C., Bogousslavsky J., Magistretti P.J., Regli L. 2001. Astrocyte-specific expression of aquaporin-9 in mouse brain is increased after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21: 477-482.

24. Badaut J., Lasbennes F., Magistretti P.J., Regli L. 2002. Aquaporins in brain: Distribution, physiology, and pathophysiology. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22: 367–378.
25. Badaut J., Petit J.M., Brunet J.F., Magistretti P.J., Charriaut-Marlangue C., Regli L. 2004. Distribution of aquaporin 9 in the adult rat brain: Preferential expression in catecholaminergic neurons and in glial cells. *Neuroscience* 128: 27–38.
26. Badaut J., Fukuda A.M., Jullienne A., Petry K.G. 2014. Aquaporin and brain diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1840: 1554–1565.
27. Bading H. 2013. Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nat. Rev. Neurosci.* 14: 593–608.
28. Bading H. 2017. Therapeutic targeting of the pathological triad of extrasynaptic NMDA receptor signaling in neurodegenerations. *J. Exp. Med.* 214(3): 569–578.
29. Bak L.K., Schousboe A., Waagepetersen H.S. 2006. The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* 98: 641–653.
30. Balaban R. S., Bader, J. P. 1984. Studies on the relationship between glycolysis and (Na⁺+K⁺)-ATPase in cultured cells. *Biochim. Biophys. Acta* 804: 419–426.
31. Barr C.A., Burdette S.C. 2017. The zinc paradigm for metalloneurochemistry. *Essays Biochem.* 61(2): 225-235.
32. Bataveljić D., Nikolić L., Milosević M., Todorović N., Andjus P. R. 2012. Changes in the astrocytic aquaporin-4 and inwardly rectifying potassium channel expression in the brain of the amyotrophic lateral sclerosis SOD1G93A rat model. *Glia* 60: 1991–2003.
33. Bauer D. E., Jackson J. G., Genda E. N., Montoya M. M., Yudkoff M., Robinson M. B. 2012. The glutamate transporter, GLAST, participates in a macromolecular complex that supports glutamate metabolism. *Neurochemistry International.* 61(4): 566–574.
34. Bay V., Butt A.M. 2012. Relationship between glial potassium regulation and axon excitability: a role for glial Kir4.1 channels. *Glia* 60: 651–660.
35. Bellot-Saez A., Kékesi O., Morley J.W., Buskila Y. 2017. Astrocytic modulation of neuronal excitability through K⁺ spatial buffering. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 77: 87-97.
36. Benfenati V., Ferroni S. 2010. Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. *Neuroscience* 168: 926–940.
37. Berger U.V., Hediger M.A., 2000. Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges and dorsal root ganglia. *J. Comp. Neurol.* 421: 385-399.
38. Bergeron R., Meyer T.M., Coyle J.T., Greene R.W. 1998. Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(26): 15730–15734.
39. Bergles D.E., Tzingounis A.V., Jahr C.E. 2002. Comparison of coupled and uncoupled currents during glutamate uptake by GLT-1 transporters. *J. Neurosci.* 22: 10153-10162.
40. Bezprozvanny I., Bezprozvannaya S., Ehrlich B.E. 1994. Caffeine-induced inhibition of inositol(1,4,5)-trisphosphate-gated calcium channels from cerebellum. *Mol Biol Cell.* 5(1): 97–103.
41. Bichet D., Haass F.A., Jan L.Y. 2003. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K⁺ channels. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 957–967.
42. Billups D., Attwell D. 2003. Active release of glycine or D-serine saturates the glycine site of NMDA receptors at the cerebellar mossy fibre to granule cell synapse. *Eur. J. Neurosci.* 18(11): 2975–2980.
43. Binder D.K., Oshio K., Ma T., Verkman A.S., Manley G.T. 2004. Increased seizure threshold in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Neuroreport* 15: 259–262.
44. Binder DK., Yao X., Zador Z., Sick T.J., Verkman A.S., Manley G.T. 2006. Increased seizure duration and slowed potassium kinetics in mice lacking aquaporin-4 water channels. *Glia* 53: 631–636.
45. Borgnia M., Nielsen S., Engel A., Agre P. 1999. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 425–458.
46. Borgnia M.J., Agre P. 2001. Reconstitution and functional comparison of purified GlpF and AqpZ, the glycerol and water channels from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(5): 2888-2893.
47. Bowman C.L., Kimelberg H.K. 1984. Excitatory amino acids directly depolarize rat brain astrocytes in primary culture. *Nature.* 311: 656-659.

48. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
49. Braissant O. 2010. Ammonia toxicity to the brain: Effects on creatine metabolism and transport and protective roles of creatine. *Mol. Genet. Metab.* 100: S53-S58.
50. Bringmann A., Grosche A., Pannicke T., Reichenbach A. 2013. GABA and glutamate uptake and metabolism in retinal Glial (Müller) cells. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 4: 48.
51. Broer S., Brookes N. 2001. Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J. Neurochem.* 77: 705-719.
52. Brown G.R., Sayers L.G., Kirk C.J., Michell R.H., Michelangeli F. 1992. The opening of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} channel in rat cerebellum is inhibited by caffeine. *Biochem. J.* 282: 309-312.
53. Brown D.G., Krupp J.J. 2006. N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) antagonists as potential pain therapeutics. *Curr Topics Med. Chem.* 6: 749.
54. Burzomato V., Frugier G., Pérez-Otaño I., Kittler J.T., Attwell D. 2010. The receptor subunits generating NMDA receptor mediated currents in oligodendrocytes. *J. Physiol.* 588: 3403-3414.
55. Bushong E.A., Martone M.E., Jones Y.Z., Ellisman M.H. 2002. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci.* 22: 183-192.
56. Buskila Y., Amitai Y. 2010. Astrocytic iNOS-dependent enhancement of synaptic release in mouse neocortex. *J. Neurophysiol.* 103: 1322-1328.
57. Butt A.M., Kalsi A. 2006. Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J. Cell. Mol. Med.* 10: 33-44.
58. Butterfield D. A., Poon H. F., St. Clair, D., Keller J. N., Pierce W. M., Klein J. B., Markesbery, W. R. 2006. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 22: 223-232.
59. Cahoy J.D., Emery B., Kaushal A., Foo L.C., Zamanian J.L., Christopherson K.S., Christopherson K.S., Xing Y., Lubischer J.L., Krieg P.A., Krupenko S.A., Thompson W.J., Barres B.A. 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: A new resource for understanding brain development and function. *The Journal of Neuroscience.* 28: 264-278.
60. Cai S.X. 2006. Glycine/NMDAR antagonists as potential CNS therapeutic agents: ACEA-1021 and related compounds. *Curr. Topics Med. Chem.* 6: 651.
61. Chatterton J.E., Awobuluyi M., Premkumar L.S., Takahashi H., Talantova M., Shin Y., Cui J., Tu S., Sevarino K.A., Nakanishi N., Tong G., Lipton S.A., Zhang D. 2002. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415: 793-798.
62. Chaudhry F.A., Lehre K.P., van Lookeren Campagne M., Ottersen O.P., Danbolt N.C., Storm-Mathisen J. 1995. Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15: 711-720.
63. Chazot P.L. 2004. The NMDAR NR2B subunit: a valid therapeutic target for multiple CNS pathologies. *Curr. Med. Chem.* 11: 389.
64. Chen L., Huang L.Y. 1992. Protein kinase C reduces Mg^{2+} block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 356: 521-523.
65. Chen Y.C., Cadnapaphornchai M.A., Schrier R.W. 2005. Clinical update on renal aquaporins. *Biol. Cell.* 97: 357-371.
66. Chever O., Djukic B., McCarthy K.D., Amzica F. 2010. Implication of Kir4.1 channel in excess potassium clearance: an in vivo study on anesthetized glial-conditional Kir4.1 knock-out mice. *J. Neurosci.* 30: 15769-15777.
67. Choi D.W. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623-634.
68. Cholet N., Pellerin L., Magistretti P. J., Hamel E. 2002. Similar perisynaptic glial localization for the Na^+ , K^+ -ATPase alpha 2 subunit and the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the rat somatosensory cortex. *Cereb. Cortex* 12: 515-525.
69. Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159.
70. Chu H., Huang C., Ding H., Dong J., Gao Z., Yang X., Tang Y., Dong Q. 2016. Aquaporin-4 and Cerebrovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 1249.

71. Conti F., Minelli A., Molnar M., Brecha N.C. 1994. Cellular localization and laminar distribution of NMDAR1 mRNA in the rat cerebral cortex. *The Journal of Comparative Neurology*. 343: 554-565.
72. Conti F., DeBiasi S., Minelli A., Melone M. 1996. Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. *Glia* 17: 254–258.
73. Cooper A.J. 2012. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in cerebral ammonia homeostasis. *Neurochem. Res.* 37: 2439–2455.
74. Cooper A.J. 2013. Quantitative analysis of neurotransmitter pathways under steady state conditions—A perspective. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 4: 179.
75. Cooper A.J., Jeitner T.M. 2016. Central role of glutamate metabolism in the maintenance of nitrogen homeostasis in normal and hyperammonemic brain. *Biomolecules*. 6(2): E16.
76. Coulter D.A., Steinhäuser C. 2015. Role of astrocytes in epilepsy. *Cold. Spring Harb. Perspect. Med.* 5(3): a022434.
77. Covelo A., Araque A. 2018. Neuronal activity determines distinct gliotransmitters release from a single astrocyte. *Elife*. 7. pii: e32237.
78. Cull-Candy S.G., Leszkiewicz D.N. 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE*. 2004(255): re16.
79. Curi R., Lagranha C.J., Doi S.Q., Sellitti D.F., Procopio J., Pithon-Curi T.C., Corless M., Newsholme P. 2005. Molecular mechanisms of glutamine action. *J. Cell. Physiol.* 204: 392–401.
80. D'Ambrosio R., Gordon D.S., Winn H.R. 2002. Differential role of KIR channel and Na(+)/K(+)-pump in the regulation of extracellular K (+) in rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* 87: 87–102.
81. Dai A.I., Akcali A., Koska S., Oztuzcu S., Cengiz B., Demiryürek A.T. 2015. Contribution of KCNJ10 gene polymorphisms in childhood epilepsy. *J. Child Neurol.* 30 (3): 296–300.
82. Danbolt N.C. 1994. The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Prog. Neurobiol.* 44: 377-396.
83. Danbolt N.C. 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65: 1–105.
84. Danbolt N. C., Furness D. N., Zhou Y. 2016. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. *Neurochem. Int.* 98: 29–45.
85. Dani J.W., Chernavsky A., Smith S.J. 1992. Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocytic networks. *Neuron*. 8: 429-440.
86. Das A., Wallace G. C., Holmes C., McDowell M. L., Smith J. A., Marshall J. D., Bonilha L., Edwards J.C., Glazier S.S., Ray S.K., Banik N.L. 2012. Hippocampal tissue of patients with refractory temporal lobe epilepsy is associated with astrocyte activation, inflammation, and altered expression of channels and receptors. *Neuroscience* 220: 237–246.
87. Day R.E., Kitchen P., Owen D.S., Bland C., Marshall L., Conner A.C., Bill R.M., Conner M.T. 2014. Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow. *Biochim. Biophys. Acta* 1840: 1492–1506.
88. Dehnes Y., Chaudhry F.A., Ullensvang K., Lehre K.P., Storm-Mathisen J., Danbolt N.C. 1998. The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J. Neurosci.* 18: 3606–3619.
89. Deemyad T., Lüthi J., Spruston N. 2018. Astrocytes integrate and drive action potential firing in inhibitory subnetworks. *Nat Commun.* 9(1): 4336.
90. Devinsky O., Vezzani A., Najjar S., De Lanerolle N. C., Rogawski M. A. 2013. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci.* 36: 174–184.
91. Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis S.F. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51(1): 7–61.
92. Divito C.B., Underhill S.M. 2014. Excitatory amino acid transporters: roles in glutamatergic neurotransmission. *Neurochem. Int.* 73: 172-180.
93. Djukic B., Casper K.B., Philpot B.D., Chin L-S., McCarthy K.D. 2007. Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J Neurosci* 27: 11354–11365.
94. Dolgodilina E., Imobersteg S., Laczko E., Welt T., Verrey F., Makrides V. 2016. Brain interstitial fluid glutamine homeostasis is controlled by blood-brain barrier SLC7A5/LAT1 amino acid transporter. *J Cereb Blood Flow Metab.* 36(11): 1929-1941.

95. Dolińska M., Zabłocka B., Sonnewald U., Albrecht J. 2004. Glutamine uptake and expression of mRNA's of glutamine transporting proteins in mouse cerebellar and cerebral cortical astrocytes and neurons. *Neurochem Int.* 44(2): 75-81.
96. Domingues A.M.D.J., Taylor M., Fern R. 2010. Glia as transmitter sources and sensors in health and disease. *Neurochemistry International.* 57(4): 359–366.
97. Dore K., Aow J., Malinow R. 2016. The Emergence of NMDA Receptor Metabotropic Function: Insights from Imaging. *Front Synaptic Neurosci.* 8: 20.
98. Duan S., Anderson C. M., Stein B. A., Swanson R. A. 1999. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *The Journal of Neuroscience.* 19(23): 10193–10200.
99. Dzamba D., Honsa P., Valny M., Kriska J., Valihrach L., Novosadova V., Kubista M., Anderova M. 2015. Quantitative analysis of glutamate receptors in glial cells from the cortex of GFAP/EGFP mice following ischemic injury: Focus on NMDA receptors. *Cellular and Molecular Neurobiology.* 35: 1187-1202.
100. Ehrlich B.E., Kaftan E., Bezprozvannaya S., Bezprozvanny I. 1994. The pharmacology of intracellular Ca²⁺-release channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 86-89.
101. Eid T., Thomas M. J., Spencer D. D., Runden-Pran E., Lai J. C. K., Malthankar G. V., Kim J.H., Danbolt N.C., Ottersen O.P., de Lanerolle N.C. 2004. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: Possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet*, 363: 28–37.
102. Eid T., Lee T.S., Thomas M.J., Amiry-Moghaddam M., Bjørnsen L.P., Spencer D.D., Agre P., Ottersen O.P., de Lanerolle N.C. 2005. Loss of perivascular aquaporin 4 may underlie deficient water and K⁺ homeostasis in the human epileptogenic hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 1193–1198.
103. Eid T., Ghosh A., Wang Y., Beckström H., Zaveri H.P., Lee T.S., Lai J.C., Malthankar-Phatak G.H., de Lanerolle N.C. 2008. Recurrent seizures and brain pathology after inhibition of glutamine synthetase in the hippocampus in rats. *Brain* 131: 2061–2070.
104. Eid T., Tu N., Lee T.S.W., Lai J.C.K. 2013. Regulation of astrocyte glutamine synthetase in epilepsy. *Neurochemistry International* 63: 670–681.
105. Eisenberg D., Gill H.S., Pfluegl G.M., Rotstein S.H. 2000. Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim. Biophys. Acta* 1477: 122–145.
106. Eroglu C., Barres B.A., Stevens B. 2008. Glia as Active Participants in the Development and Function of Synapses. W książce "Structural and Functional Organization of the Synapse" edytowanej przez: J.W. Hell, M.D. Ehlers. Springer US. 1: 683-714. DOI : 10.1007/978-0-387-77232-5_23.
107. Eulenburg V., Gomez J. 2010. Neurotransmitter transporters expressed in glial cells as regulators of synapse function. *Brain Research Reviews.* 63(1-2): 103–112.
108. Fahlke C., Körtzak D., Machtens J.P. 2016. Molecular physiology of EAAT anion channels. *Pflugers Arch.* 468: 491-502.
109. Fairman W. A., Vandenberg R. J., Arriza J. L., Kavanaugh M. P., Amara S. G. 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature.* 375(6532): 599–603.
110. Fan Y., Zhang J., Sun X.L., Gao L., Zeng X.N., Ding J.H., Cao C., Niu L., Hu G. 2005. Sex- and region-specific alterations of basal amino acid and monoamine metabolism in the brain of aquaporin-4 knockout mice. *J. Neurosci. Res.* 82: 458–464.
111. Farb C.R., Aoki C., Ledoux J.E. 1995. Differential localization of NMDA and AMPA receptor subunits in the lateral and basal nuclei of the amygdala: A light and electron microscopic study. *The Journal of Comparative Neurology.* 362: 86-108.
112. Farhy-Tselnicker I., Allen N.J. 2018. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Dev.* 13(1): 7.
113. Farlow M.R. 2004. NMDAR antagonists. A new therapeutic approach for Alzheimer's disease. *Geriatrics.* 59: 22.
114. Fedoroff S., Neal J., Opas M., Kalnins VI. 1984. Astrocyte cell lineage. III. The morphology of differentiating mouse astrocytes in colony culture. *J Neurocytol.* 13(1): 1-20.
115. Fernandez D.C., Pasquini L.A., Dorfman D., Aldana Marcos H.J., Rosenstein R.E. 2012. Ischemic conditioning protects from axoglial alterations of the optic pathway induced by experimental diabetes in rats. *PLoS ONE* 7: e51966.
116. Ferraro T. N., Golden G. T., Smith G. G., Martin J. F., Lohoff F. W., Gieringer T. A., Zamboni D., Schwebel C.L., Press D.M., Kratzer S.O., Zhao H., Berrettini W.H., Buono R.J. 2004. Fine mapping of a seizure susceptibility locus on mouse Chromosome 1: nomination of Kcnj10 as a causative gene. *Mamm. Genome* 15: 239–251.

117. Ficker C., Rozmer K., Kató E., Andó R.D., Schumann L., Krügel U., Franke H., Sperlágh B., Riedel T., Illes P. 2014. Astrocyte-neuron interaction in the substantia gelatinosa of the spinal cord dorsal horn via P2X7 receptor-mediated release of glutamate and reactive oxygen species. *Glia*. 62(10): 1671-1686.
118. Finn R.N., Cerdà J. 2015. Evolution and functional diversity of aquaporins. *Biol Bull*. 229(1): 6-23.
119. Frigeri A., Nicchia G. P., Svelto M. 2007. Aquaporins as targets for drug discovery. *Curr. Pharm. Des.* 13: 2421–2427.
120. Fukaya M., Kato A., Lovett C., Tonegawa S., Watanabe M. 2003. Retention of NMDA receptor NR2 subunits in the lumen of endoplasmic reticulum in targeted NR1 knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100(8): 4855–4860.
121. Furness D.N., Dehnes Y., Akhtar A.Q., Rossi D.J., Hamann M., Grutle N.J., Gundersen V., Holmseth S., Lehre K.P., Ullensvang K., Wojewodzic M., Zhou Y., Attwell D., Danbolt N.C. 2008. A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes: new insights into a neuronal role for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Neuroscience* 157: 80–94.
122. Furuta A., Rothstein J.D., Martin L.J. 1997. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.* 17: 8363-8375.
123. Garcia-Munoz M., Lopez-Huerta V.G., Carrillo-Reid L., Arbuthnott G.W. 2015. Extrasynaptic glutamate NMDA receptors: key players in striatal function. *Neuropharmacology*. 89: 54-63.
124. Gegelashvili G., Bjerrum O. J. 2014. High-affinity glutamate transporters in chronic pain: an emerging therapeutic target. *The Journal of Neurochemistry*. 131(6): 712–730.
125. Gegelashvili M., Rodriguez-Kern A., Sung L., Shimamoto K., Gegelashvili G. 2007. Glutamate transporter GLAST/EAAT1 directs cell surface expression of FXYD2/gamma subunit of Na, K-ATPase in human fetal astrocytes. *Neurochemistry International*. 50(7-8): 916–920.
126. Gerard F., Hansson E. 2012. Inflammatory activation enhances NMDA-triggered Ca²⁺ signalling and IL-1β secretion in primary cultures of rat astrocytes. *Brain Res.* 1473:1–8.
127. Gerecsei L.I., Balázsa T., Echevarría D., Ádám Á., Zachar G., Csillag A. 2019. Selective neuronal death following exposure to methylenedioxypyrovalerone is accompanied by an inhibition of NMDA receptor NR2B subunit expression. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 79(1): 92-100.
128. Gilliam D., O'Brien D.P., Coates J.R., Johnson G.S., Johnson G.C., Mhlanga- Mutangadura T., Hansen L., Taylor J.F., Schnabel R.D. 2014. A homozygous KCNJ10 mutation in Jack Russell Terriers and related breeds with spinocerebellar ataxia with myokymia, seizures, or both. *J. Vet. Intern. Med.* 28 (3): 871–877.
129. Gladding C.M., Raymond L.A. 2011. Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. *Mol. Cell. Neurosci.* 48: 308–320.
130. González M. I., Ortega A. 2000. Regulation of high-affinity glutamate uptake activity in Bergmann glia cells by glutamate. *Brain Research*. 866(1-2): 73–81.
131. Gottlieb M., Matute C. 1997. Expression of ionotropic glutamate receptor subunits in glial cells of the hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 17: 290-300.
132. Görg B., Wettstein M., Metzger S., Schliess F., Häussinger D. 2005. Lipopolysaccharide-induced tyrosine nitration and inactivation of hepatic glutamine synthetase in the rat. *Hepatology* 41: 1065–1073.
133. Gracy K.N., Pickel V.M. 1995. Comparative ultrastructural localization of the NMDAR1 glutamate receptor in the rat basolateral amygdala and bed nucleus of the stria terminalis. *Journal of Comparative Neurology*. 362: 71-85.
134. Grewer C., Watzke N., Wiessner M., Rauen T. 2000. Glutamate translocation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 occurs within milliseconds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 9706-9711.
135. Grunewald M., Kanner B.I. 2000. The accessibility of a novel reentrant loop of the glutamate transporter GLT-1 is restricted by its substrate. *J. Biol. Chem.* 275: 9684–9689.
136. Gunnarson E., Zelenina M., Axehult G., Song Y., Bondar A., Krieger P., Brismar H., Zelenin S., Aperia A. 2008. Identification of a molecular target for glutamate regulation of astrocyte water permeability. *Glia*. 56(6): 587–596.
137. Gunnarsen D., Haley B. 1992. Detection of glutamine synthetase in the cerebrospinal fluid of Alzheimer diseased patients: a potential diagnostic biochemical marker. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89: 11949–11953.
138. Guo Y., Yan K. P., Qu Q., Qu J., Chen Z. G., Song T., Luo X.Y., Sun Z.Y., Bi C.L., Liu J.F. 2015. Common variants of KCNJ10 are associated with susceptibility and anti-epileptic drug resistance in Chinese genetic generalized epilepsies. *PLOS ONE* 10(4):e0124896.

139. Haack N., Dublin P., Rose C.R. 2014. Dysbalance of astrocyte calcium under hyperammonemic conditions. *PLoS One*. 9(8), e105832.
140. Haj-Yasein N.N., Bugge C.E., Jensen V., Østby I., Ottersen O.P., Hvalby Ø., Nagelhus E.A. 2015. Deletion of aquaporin-4 increases extracellular K⁺ concentration during synaptic stimulation in mouse hippocampus. *Brain Struct. Funct.* 220: 2469–2474.
141. Halassa M.M., Fellin T., Takano H., Dong J.H., Haydon P.G. 2007. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J. Neurosci.* 27: 6473–6477.
142. Hammer J., Alvestad S., Osen K. K., Skare O., Sonnewald U., Ottersen, O. P. 2008. Expression of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in the latent phase and chronic phase in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Glia*. 56: 856–868.
143. Hanson E., Armbruster M., Cantu D., Andresen L., Taylor A., Danbolt N.C., Dulla C.G. 2015. Astrocytic glutamate uptake is slow and does not limit neuronal NMDA receptor activation in the neonatal neocortex. *Glia*. 63: 1784–1796.
144. Hansson E. 1989. Regulation of glutamine synthetase synthesis and activity by glucocorticoids and adrenoceptor activation in astroglial cells. *Neurochem. Res.* 14: 585–587.
145. Harada Y., Nagao Y., Shimizu S., Serikawa T., Terada R., Fujimoto M., Okuda A., Mukai T., Sasa M., Kurachi Y., Ohno Y. 2013. Expressional analysis of inwardly rectifying Kir4.1 channels in Noda epileptic rat (NER). *Brain Res.* 1517: 141–149.
146. Hardingham G.E., Bading H. 2010. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: Implications for neurodegenerative disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*. 11: 682–696.
147. Hasegawa H., Ma T., Skach W., Matthey M.A., Verkman A.S. 1994. Molecular cloning of a mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J. Biol. Chem.* 269: 5497–5500.
148. Hawkins R.A. 2009. The blood-brain barrier and glutamate. *Am. J. Clin. Nutr.* 90: 867S–874S.
149. Hawkins R.A., Viña J.R. 2016. How Glutamate Is Managed by the Blood-Brain Barrier. *Biology (Basel)*. 5(4): E37.
150. Haydon P.G. 2016. The Evolving View of Astrocytes. *Cerebrum*. 2016: cer-12-16
151. Haydon P.G., Nedergaard M. 2015. How do astrocytes participate in neural plasticity? *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7(3):a020438.
152. Häberle J., Görg B., Toutain A., Rutsch F., Benoist J.F., Gelot A., Suc, A.L., Koch, H.G., Schliess, F., Häussinger D. 2006. Inborn error of amino acid synthesis: Human glutamine synthetase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29: 352–358.
153. Häussinger D. 1990. Liver glutamine metabolism. *JPEN* 14: 56s–62s.
154. Häussinger D., Schliess F. 2007. Glutamine metabolism and signaling in the liver. *Front. Biosci.* 12: 371–391.
155. Heller K.B., Lin E.C., Wilson T.H. 1980. Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 144(1): 274–278.
156. Henneberger C., Papouin T., Oliet S.H., Rusakov D.A.. 2010. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*. 463(7278): 232–236.
157. Hensley K., Hall N., Subramaniam R., Cole P., Harris M., Aksenov M., Aksenova M., Gabbita S.P., Wu J.F., Carney J.M., Lovell M., Markesbery W.R., Butterfield D.A. 1995. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J. Neurochem.* 65: 2146–2156.
158. Henson M.A., Roberts A.C., Perez-Otano I., Philpot B.D. 2010. Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog. Neurobiol.* 91: 23–37.
159. Hertz L. 2013. The glutamate-glutamine (GABA) cycle: importance of late postnatal development and potential reciprocal interactions between biosynthesis and degradation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 4: 59.
160. Hertz L., Juurlink B.H.J., Hertz E., Fosmark H., Schousboe A.S. 1989. Preparation of primary cultures of mouse (rat) astrocytes. Shahar A., DeVellis J., Vernadakis A., Haber B. 105–108. Alan R. Liss. A dissection and tissue culture manual for the nervous system.
161. Hetman M., Kharebava G. 2006. Survival signaling pathways activated by NMDA receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* 6(8): 787–799.
162. Heuser K., Nagelhus E.A., Taubøll E., Indahl U., Berg P.R., Lien S., Nakken S., Gjerstad L., Ottersen O.P. 2010. Variants of the genes encoding AQP4 and Kir4.1 are associated with subgroups of patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 88: 55–64.

163. Hibino H., Horio Y., Inanobe A., Doi K., Ito M., Yamada M., Gotow T., Uchiyama Y., Kawamura M., Kubo T., Kurachi Y. 1997. An ATP-dependent inwardly rectifying potassium channel, KAB-2 (Kir4.1), in cochlear stria vascularis of inner ear: its specific subcellular localization and correlation with the formation of endocochlear potential. *J. Neurosci.* 17(12): 4711–4721.
164. Hibino H., Fujita A., Iwai K., Yamada M., Kurachi Y. 2004. Differential assembly of inwardly rectifying K⁺ channel subunits, Kir4.1 and Kir5.1, in brain astrocytes. *J. Biol. Chem.* 279: 44065–44073.
165. Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I., Kurachi Y. 2010. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol. Rev.* 90: 291–366.
166. Higashi K., Fujita A., Inanobe A., Tanemoto M., Doi K., Kubo T., Kurachi Y. 2001. An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 281: C922–C931.
167. Hille B. 2001. Ion channels of excitable membranes. 3rd edition. Sunderland (Mass.): Sinauer associates.
168. Hiroaki Y., Tani K., Kamegawa A., Gyobu N., Nishikawa K., Suzuki H., Walz T., Sasaki S., Mitsuoka K., Kimura K., Mizoguchi A., Fujiyoshi Y. 2006. Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion. *J. Mol. Biol.* 355: 628–639.
169. Hogan-Cann A.D., Anderson C.M. 2016. Physiological roles of non-neuronal NMDA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 37: 750–767.
170. Hollmann M., Heinemann S. 1994. Cloned glutamate receptors. *Annual Review of Neuroscience.* 17: 31–108.
171. Holmes K.D., Mattar P.A., Marsh D.R., Weaver L.C., Dekaban G.A. 2002. The N-methyl-D-aspartate receptor splice variant NR1-4 C-terminal domain. Deletion analysis and role in subcellular distribution. *J Biol Chem.* 277(2): 1457-1468.
172. Holmseth S., Dehnes Y., Huang Y.H., Follin-Arbelet V. V., Grutle N.J., Mylonakou M.N., Plachez C., Zhou Y., Furness D.N., Bergles D.E., Lehre K.P., Danbolt N.C. 2012. The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS. *J Neurosci* 32: 6000–6013.
173. Holzwarth J.A., Gibbons S.J., Brorson J.R., Philipson L.H., Miller R.J. 1994. Glutamate receptor agonists stimulate diverse calcium responses in different types of cultured rat cortical glial cells. *The Journal of Neuroscience* 14:1879-1891.
174. Hoshi A., Yamamoto T., Shimizu K., Sugiura Y., Ugawa Y. 2011. Chemical preconditioning-induced reactive astrocytosis contributes to the reduction of post-ischemic edema through aquaporin-4 downregulation. *Exp. Neurol.* 227: 89–95.
175. Hu B., Sun S.G., Tong E.T. 2004. NMDA and AMPA receptors mediate intracellular calcium increase in rat cortical astrocytes 1. *Acta Pharmacologica Sinica.* 25: 714-720.
176. Hub J.S., de Groot B.L. 2008. Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 1198–1203.
177. Hubbard J.A., Szu J.I., Yonan J.M., Binder D.K. 2016. Regulation of astrocyte glutamate transporter-1 (GLT1) and aquaporin-4 (AQP4) expression in a model of epilepsy. *Exp. Neurol.* 283: 85–96.
178. Hunt D.L., Castillo P.E. 2012. Synaptic plasticity of NMDA receptors: mechanisms and functional implications. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22(3): 496-508.
179. Ikeshima-Kataoka H. 2016. Neuroimmunological Implications of AQP4 in Astrocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 1306.
180. Ikonomidou C., Bosch F., Miksa M., Bittigau P., Vöckler J., Dikranian K., Tenkova T.I., Stefovskva V., Turski L., Olney J.W. 1999. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283(5398): 70-74.
181. Iliff J.J., Wang M., Liao Y., Plogg B.A., Peng W., Gundersen G.A., Benveniste H., Vates G.E., Deane R., Goldman S.A., Nagelhus E.A., Nedergaard M. 2012. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci. Transl. Med.* 4(147): 147ra111.
182. Inyushin M., Kucheryavykh L.Y., Kucheryavykh Y.V., Nichols C.G., Buono R.J., Ferraro T.N., Skatchkov S.N., Eaton M.J. 2010. Potassium channel activity and glutamate uptake are impaired in astrocytes of seizure-susceptible DBA/2 mice. *Epilepsia* 51: 1707–1713.
183. Ishii M., Horio Y., Tada Y., Hibino H., Inanobe A., Ito M., Yamada M., Gotow T., Uchiyama Y., Kurachi Y. 1997. Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying potassium channel, KAB-2/Kir4.1, on mammalian retinal Müller cell membrane: their regulation by insulin and laminin signals. *J. Neurosci.* 17(20): 7725–7735.
184. Ishii M., Fujita A., Iwai K., Kusaka S., Higashi K., Inanobe A., Hibino H., Kurachi Y. 2003. Differential expression and distribution of Kir5.1 and Kir4.1 inwardly rectifying K⁺ channels in retina. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 285: C260–C267.
185. Ito M., Inanobe A., Horio Y., Hibino H., Isomoto S., Ito H., Mori K., Tonosaki A., Tomoike H., Kurachi Y. 1996. Immunolocalization of an inwardly rectifying K⁺ channel, K(AB)-2 (Kir4.1), in the basolateral membrane of renal distal tubular epithelia. *FEBS Lett.* 388(1): 11–15.

186. Jayakumar A.R., Norenberg M.D. 2016. Glutamine synthetase: role in neurological disorders. *Adv. Neurobiol.* 13: 327–350.
187. Jansen M., Dannhardt G. 2003. Antagonists and agonists at the glycine site of the NMDAR for therapeutic interventions. *Eur. J. Med. Chem.* 38: 661.
188. Jeitner T.M., Battaile K., Cooper A.J. 2015. Critical evaluation of the changes in glutamine synthetase activity in models of cerebral stroke. *Neurochem. Res.* 40: 2544–2556.
189. Jeremic A., Jeftinija K., Stevanovic J., Glavaski A., Jeftinija S. 2001. ATP stimulates calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes. *J. Neurochem.* 77(2): 664–675.
190. Jessen N.A., Munk A.S.F., Lundgaard I., Nedergaard M. 2015. The glymphatic system – a beginner’s guide. *Neurochem. Res.* 40: 2583–2599.
191. Jimenez-Blasco D., Santofimia-Castaño P., Gonzalez A., Almeida A., Bolaños J.P. 2015. Astrocyte NMDA receptors' activity sustains neuronal survival through a Cdk5-Nrf2 pathway. *Cell Death Differ.* 22(11): 1877–1889.
192. Ju P., Cui D. 2016. The involvement of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) subunit NR1 in the pathophysiology of schizophrenia. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 48(3): 209–219.
193. Jung J.S., Bhat R.V., Preston G.M., Guggino W.B., Baraban J.M., Agre P. 1994. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: Candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 13052–13056.
194. Jungblut M., Tiveron M.C., Barral S., Abrahamsen B., Knobel S., Pennartz S., Schmitz J., Perraut M., Pfrieger F.W., Stoffel W., Cremer H., Bosio A. 2012. Isolation and characterization of living primary astroglial cells using the new GLAST-specific monoclonal antibody ACSA-1. *Glia.* 60: 894–907.
195. Kaiser M., Maletzki I., Hülsmann S., Holtmann B., Schulz-Schaeffer W., Kirchhoff F., Bähr M., Neusch C. 2006. Progressive loss of a glial potassium channel (KCNJ10) in the spinal cord of the SOD1 (G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 99: 900–912.
196. Kalsi A.S., Greenwood K., Wilkin G., Butt A.M. 2004. Kir4.1 expression by astrocytes and oligodendrocytes in CNS white matter: a developmental study in the rat optic nerve. *J. Anat.* 204: 475–485.
197. Kang N., Peng H., Yu Y., Stanton P.K., Guilarte T.R., Kang J. 2013. Astrocytes release D-serine by a large vesicle. *Neuroscience.* 240:243–257.
198. Kárádóttir R., Cavalier P., Bergersen L.H., Attwell D. 2005. NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* 438: 1162–1166.
199. Karki P., Smith K., Johnson Jr. J., Aschner M., Lee E. 2015. Role of transcription factor yin yang 1 in manganese-induced reduction of astrocytic glutamate transporters: putative mechanism for manganese-induced neurotoxicity. *Neurochem Int.* 88: 53–59.
200. Kaur C., Sivakumar V., Ang L.S., Sundaresan A. 2006. Hypoxic damage to the periventricular white matter in neonatal brain: role of vascular endothelial growth factor, nitric oxide and excitotoxicity. *J. Neurochem.* 98(4): 1200–1216.
201. Kazi R., Gan Q., Talukder I., Markowitz M., Salussolia C.L., Wollmuth L. P. 2013. Asynchronous movements prior to pore opening in NMDA receptors. *J. Neurosci.* 33: 12052–12066.
202. Kemp J.A., McKernan R.M. 2002. NMDAR pathways as drug targets. *Nature Neurosci.* 5: 1039.
203. Kessels H.W., Malinow R. 2009. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* 61: 340–350.
204. Kessels H.W., Nabavi S., Malinow R. 2013. Metabotropic NMDA receptor function is required for β -amyloid-induced synaptic depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110: 4033–4038.
205. Kettenmann H., Schachner M. 1985. Pharmacological properties of gamma-aminobutyric acid-, glutamate-, and aspartate-induced depolarizations in cultured astrocytes. *The Journal of Neuroscience.* 5: 3295–3301.
206. Kew J.N., Kemp J.A. 2005. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berlin)*, 179: 4–29.
207. Kinboshi M., Mukai T., Nagao Y., Matsuba Y., Tsuji Y., Tanaka S., Tokudome K., Shimizu S., Ito H., Ikeda A., Inanobe A., Kurachi Y., Inoue S., Ohno Y. 2017. Inhibition of Inwardly Rectifying Potassium (Kir) 4.1 Channels Facilitates Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Expression in Astrocytes. *Front. Mol. Neurosci.* 10: 408. doi: 10.3389/fnmol.2017.00408.
208. Kiryk A., Aida T., Tanaka K., Banerjee P., Wilczynski G.M., Meyza K., Knapska E., Filipkowski R.K., Kaczmarek L., Danysz W. 2008. Behavioral characterization of GLT1 (t^{-}) mice as a model of mild glutamatergic hyperfunction. *Neurotox. Res.* 13: 19–30.

209. Kleckner N.W., Dingledine R 1988. Requirement for glycine in activation of NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, 241(4867): 835–837.
210. Klempan T.A., Sequeira A., Canetti L., Lalovic A., Ernst C., French-Mullen J., Turecki G. 2009. Altered expression of genes involved in ATP biosynthesis and GABAergic neurotransmission in the ventral prefrontal cortex of suicides with and without major depression. *Mol. Psychiatry* 14: 175–189.
211. Kofuji P., Newman E.A. 2004. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*. 129(4): 1045–1056.
212. Kofuji P., Ceelen P., Zahs K.R., Surbeck L.W., Lester H.A., Newman E.A. 2000. Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J. Neurosci.* 20: 5733–5740.
213. Koizumi S. 2010. Synchronization of Ca²⁺ oscillations: involvement of ATP release in astrocytes. *FEBS J.* 277(2): 286–292.
214. Kondoh T., Nishizaki T., Aihara H., Tamaki N. 2001. NMDA-responsive, APV-insensitive receptor in cultured human astrocytes. *Life Sci.* 68(15): 1761–1767.
215. Kosenko E., Kaminsky Y., Grau E., Miñana M.D., Marcaida G., Grisolia S., Felipe V. 1994. Brain ATP depletion induced by acute ammonia intoxication in rats is mediated by activation of the NMDA receptor and of Na/K-ATPase. *J. Neurochem.* 63: 2172–2178.
216. Krajewski W.W., Collins R., Holmberg-Schiavone L., Jones T.A., Karlberg T., Mowbray S.L. 2008. Crystal structures of mammalian glutamine synthetases illustrate substrate-induced conformational changes and provide opportunities for drug and herbicide design. *J. Mol. Biol.* 375: 217–228.
217. Krampla W., Aboul-Enein F., Jecel J., Lang W., Fertl E., Hruby W., Kristoferitsch, W. 2009. Spinal cord lesions in patients with neuromyelitis optica: a retrospective long-term MRI follow-up study. *Eur. Radiol.* 19: 2535–2543.
218. Krizbai I.A., Deli M.A., Pestenác A., Siklós L., Szabó C.A., András I., Joó F. 1998. Expression of glutamate receptors on cultured cerebral endothelial cells. *J. Neurosci. Res.* 54(6): 814–819.
219. Krebs C., Fernandes H.B., Sheldon C., Raymond L.A., Baimbridge K.G. 2003. Functional NMDA receptor subtype 2B is expressed in astrocytes after ischemia in vivo and anoxia in vitro. *The Journal of Neuroscience.* 23: 3364–3372.
220. Kuang Q., Purhonen P., Hebert H. 2015. Structure of potassium channels. *Cell. Mol. Life Sci.* 72(19): 3677–3693.
221. Kubo Y., Baldwin T.J., Jan Y.N., Jan L.Y. 1993. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362: 127–133.
222. Kucheryavykh Y.V., Kucheryavykh L.Y., Nichols C.G., Maldonado H.M., Baksi K., Reichenbach A., Skatchkov S.N., Eaton M.J. 2007. Downregulation of Kir4.1 inward rectifying potassium channel subunits by RNAi impairs potassium transfer and glutamate uptake by cultured cortical astrocytes. *Glia* 55(3): 274–281.
223. Kuffler S.W., Nicholls J.G., Orkand R.K. 1966. Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J. Neurophysiol.* 29: 768–787.
224. Kulijewicz-Nawrot M., Syková E., Chvátal A., Verkhatsky A., Rodríguez J.J. 2013. Astrocytes and glutamate homeostasis in Alzheimer's disease: a decrease in glutamine synthetase, but not in glutamate transporter-1, in the prefrontal cortex. *ASN Neuro* 5: 273–282.
225. Labow B.I., Souba W.W., Abcouwer S.F. 2001. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism—Glutaminase and glutamine synthetase. *J. Nutr.* 131: 2467S–2474S.
226. Lachheb S., Cluzeaud F., Bens M., Genete M., Hibino H., Lourdel S., Kurachi Y., Vandewalle A., Teulon J., Paulais M. 2008. Kir4.1/Kir5.1 channel forms the major K⁺ channel in the basolateral membrane of mouse renal collecting duct principal cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 294(6): 1398–1407.
227. Lachmann V., Görg B., Bidmon H.J., Keitel V., Häussinger D. 2013. Precipitants of hepatic encephalopathy induce rapid astrocyte swelling in an oxidative stress dependent manner. *Arch. Biochem. Biophys.* 536: 143–151.
228. Lalo U., Pankratov Y., Kirchoff F., North R.A., Verkhatsky A. 2006. NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 26(10): 2673–2683.
229. Lange S.C., Bak L.K., Waagepetersen H.S., Schousboe A., Norenberg M.D. 2012. Primary cultures of astrocytes: their value in understanding astrocytes in health and disease. *Neurochem Res.* 37(11): 2569–2588.
230. Larsen B.R., Macaulay N. 2014. Kir4.1-mediated spatial buffering of KC: experimental challenges in determination of its temporal and quantitative contribution to KC clearance in the brain. *Channels* 8: 1–7.
231. Lauriat T.L., McInnes L.A. 2007. EAAT2 regulation and splicing: relevance to psychiatric and neurological disorders. *Molecular Psychiatry* 12(12): 1065–1078.

232. Le Prince G.L., Delaere P., Fages C., Lefrançois T., Touret M., Salanon M., Tardy M. 1995. Glutamine synthetase (GS) expression is reduced in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurochem. Res.* 20: 859–862.
233. Lee T.S., Eid T., Mane S., Kim J.H., Spencer D.D., Ottersen O.P., de Lanerolle N.C. 2004. Aquaporin-4 is increased in the sclerotic hippocampus in human temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol.* 108: 493–502.
234. Lee A., Lingwood B.E., Bjorkman S.T., Miller S.M., Poronnik P., Barnett N.L., Colditz P., Pow D.V. 2010a. Rapid loss of glutamine synthetase from astrocytes in response to hypoxia: implications for excitotoxicity. *J. Chem. Neuroanat.* 39: 211–220.
235. Lee M.C., Ting K.K., Adams S., Brew B.J., Chung R., Guillemain G.J. 2010b. Characterisation of the expression of NMDA receptors in human astrocytes. *PLoS One* 5:e14123.
236. Lehre K.P., Danbolt N.C. 1998. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J. Neurosci.* 18: 8751–8757.
237. Lehre K.P., Levy L.M., Ottersen O.P., Storm-Mathisen J., Danbolt N.C. 1995. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 15: 1835–1853.
238. Lennon V.A., Kryzer T.J., Pittock S.J., Verkman A.S., Hinson S.R. 2005. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J. Exp. Med.* 202: 473–477.
239. Lenzen K.P., Heils A., Lorenz S., Hempelmann A., Höfels S., Lohoff F.W., Schmitz B., Sander T. 2005. Supportive evidence for an allelic association of the human KCNJ10 potassium channel gene with idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res.* 63(2–3): 113–118.
240. Li J., Verkman A.S. 2001. Impaired hearing in mice lacking aquaporin-4 water channels. *J. Biol. Chem.* 276: 31233–31237.
241. Li Y.K., Wang F., Wang W., Luo Y., Wu P.F., Xiao J.L., Hu Z.L., Jin Y., Hu G., Chen J.G. 2012. Aquaporin-4 deficiency impairs synaptic plasticity and associative fear memory in the lateral amygdala: Involvement of downregulation of glutamate transporter-1 expression. *Neuropsychopharmacology* 37(8): 1867–1878.
242. Li Y., Chang L., Song Y., Gao X., Roselli F., Liu J., Zhou W., Fang Y., Ling W., Li H., Almeida O.F., Wu Y. 2016. Astrocytic GluN2A and GluN2B oppose the synaptotoxic effects of amyloid- β 1-40 in hippocampal cells. *J. Alzheimers Dis.* 54: 135-148.
243. Lichnerova K., Kaniakova M., Park S.P., Skrenkova K., Wang Y.X., Petralia R.S., Suh Y.H., Horak M. 2015. Two N-glycosylation Sites in the GluN1 Subunit Are Essential for Releasing NMDA Receptors from the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 290(30): 18379-18390.
244. Lin C.L.G., Bristol L.A., Jin L., Dykes-Hoberg M., Crawford T., Clawson L., Rothstein J.D. 1998. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 20(3): 589–602.
245. Lipton S.A. 2006. NMDA receptors, glial cells, and clinical medicine. *Neuron* 50: 9–11.
246. Listrom C.D., Morizono H., Rajagopal B.S., McCann M.T., Tuchman M., Allewell N.M. 1997. Expression, purification, and characterization of recombinant human glutamine synthetase. *Biochem. J.* 328: 159–163.
247. Liu Z., Shen J., Carbrey J.M., Mukhopadhyay R., Agre P., Rosen B.P. 2002. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(9): 6053-6058.
248. Liu J.T., Wu S.X., Zhang H., Kuang F. 2018. Inhibition of MyD88 Signaling Skews Microglia/Macrophage Polarization and Attenuates Neuronal Apoptosis in the Hippocampus After Status Epilepticus in Mice. *Neurotherapeutics.* 15(4): 1093-1111.
249. Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
250. López-Colomé A.M., Martínez-Lozada Z., Guillem A.M., López E., Ortega A. 2012. Glutamate transporter-dependent mTOR phosphorylation in Müller glia cells. *ASN Neuro* 4(5): 331–342.
251. Luckey M. 2014. *Membrane Structural Biology: With Biochemical and Biophysical Foundations.* Wydanie drugie. Cambridge University Press.
252. Ma B., Buckalew R., Du Y., Kiyoshi C.M., Alford C.C., Wang W., McTigue D.M., Enyeart J.J., Terman D., Zhou M. 2016. Gap junction coupling confers isopotentiality on astrocyte syncytium. *Glia,* 64(2): 214-226.
253. Mader S., Brimberg L. 2019. Aquaporin-4 Water Channel in the Brain and Its Implication for Health and Disease. *Cells.* 8(2): 90.
254. Maneshi M.M., Maki B., Gnanasambandam R., Belin S., Popescu G.K., Sachs F., Hua S.Z. 2017. Mechanical stress activates NMDA receptors in the absence of agonists. *Sci. Rep.* 7: 39610.

255. Manley G.T., Fujimura M., Ma T., Noshita N., Filiz F., Bollen A.W., Chan P., Verkman A.S. 2000. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat. Med.* 6: 159–163.
256. Mao L.M., Guo M.L., Jin D.Z., Fibuch E.E., Choe E.S., Wang J.Q. 2011. Post-translational modification biology of glutamate receptors and drug addiction. *Front Neuroanat.* 5: 19.
257. Martinez-Hernandez A., Bell K.P., Norenberg M.D. 1977. Glutamine synthetase: Glial localization in brain. *Science* 195: 1356–1358.
258. Martínez-Lozada Z., Hernández-Kelly L.C., Aguilera J., López-Bayghen E., Ortega A. 2011. Signaling through EAAT-1/GLAST in cultured Bergmann glia cells. *Neurochemistry International* 59(6): 871–879.
259. Matsugami T.R., Tanemura K., Mieda M., Nakatomi R., Yamada K., Kondo T., Ogawa M., Obata K., Watanabe M., Hashikawa T., Tanaka K. 2006. Indispensability of the glutamate transporters GLAST and GLT1 to brain development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 12161-12166.
260. Mauceri D., Freitag H.E., Oliveira A.M.M., Bengtson C.P., Bading H. 2011. Nuclear calcium-VEG FD signaling controls maintenance of dendrite arborization necessary for memory formation. *Neuron* 71: 117– 130.
261. Mayer M.L., Westbrook G.L., Guthrie P.B. 1984. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309(5965): 261–263.
262. Mayer M.L., Vyklicky L. Jr, Clements J. 1989. Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. *Nature*, 338(6214): 425–427.
263. Mennerick S., Dhond R.P., Benz A., XuW., Rothstein J.D., Danbolt N.C., Isenberg K.E., Zorumski C.F. 1998. Neuronal expression of the glutamate transporter GLT-1 in hippocampal microcultures. *J. Neurosci.* 18: 4490–4499.
264. Missale C, Fiorentini C., Busi C., Collo G., Spano P.F. 2006. The NMDA/D1 receptor complex as a new target in drug development. *Curr. Topics Med. Chem.* 6(8): 801-808.
265. Mitterauer B.J. 2010. Significance of the astrocyte domain organization for qualitative information structuring in the brain. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 1: 391-397.
266. Mobasher A., Marples D., Young I.S., Floyd R.V., Moskaluk C.A., Frigeri A. 2007. Distribution of the AQP4 water channel in normal human tissues—Protein and tissue microarrays reveal expression in several new anatomical locations, including the prostate gland and seminal vesicles. *Channels.* 1: 29-38.
267. Moftakhar P., Lynch M.D., Pomakian J.L., Vinters H.V. 2010. Aquaporin expression in the brains of patients with or without cerebral amyloid angiopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69: 1201–1209.
268. Montes de Oca Balderas P., Aguilera P. 2015. A metabotropic-like flux-independent NMDA receptor regulates Ca²⁺ exit from endoplasmic reticulum and mitochondrial membrane potential in cultured astrocytes. *PLoS One.* 10(5):e0126314.
269. Montes de Oca Balderas P., González Hernández J.R. 2018. Rozdział 4: NMDA Receptors in Astroglia: Chronology, Controversies, and Contradictions from a Complex Molecule. W książce “Astrocyte Physiology and Pathology” edytowanej przez: Maria Teresa Gentile, Luca Colucci D’Amato. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.72975.
270. Morquette P., Verdier D., Kadala A., Féthière J., Philippe A.G., Robitaille R., Kolta A. 2015. An astrocyte-dependent mechanism for neuronal rhythmogenesis. *Nature Neuroscience* 18: 844-854.
271. Mothet J.P., Le Bail M., Billard J.M. 2015. Time and space profiling of NMDA receptor co-agonist functions. *J. Neurochem.* 135(2): 210–225.
272. Mulders S.M., van der Kemp A.J., Terlouw S.A., van Boxtel H.A., van Os C.H., Deen P.M. 1998. The exchange of functional domains among aquaporins with different transport characteristics. *Pflugers. Arch.* 436: 599–607.
273. Müller T., Grosche J., Ohlemeyer C., Kettenmann H. 1993. NMDA-activated currents in Bergmann glial cells. *Neuroreport* 4: 671–674.
274. Müller T., Fritschy J., Grosche G.D., Pratt H., Mohler H., Kettenmann H. 1994. Developmental regulation of voltage gated K⁺ channel and GABAA receptor expression in Bergmann glial cells. *J. Neurosci.* 14: 2503–2514.
275. Nabavi S., Kessels H.W., Alfonso S., Aow J., Fox R., Malinow R. 2013. Metabotropic NMDA receptor function is required for NMDA receptor-dependent long-term depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110: 4027–4032.
276. Nagao Y., Harada Y., Mukai T., Shimizu S., Okuda A., Fujimoto M., Ono A., Sakagami Y., Ohno Y. 2013. Expressional analysis of the astrocytic Kir4.1 channel in a pilocarpine-induced temporal lobe epilepsy model. *Front. Cell. Neurosci.* 7: 104.
277. Nagelhus E.A., Ottersen O.P. 2013. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol. Rev.* 93: 1543–1562.

278. Nagelhus E.A., Horio Y., Inanobe A., Fujita A., Haug F.M., Nielsen S., Kurachi Y., Ottersen O.P. 1999. Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺-siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* 26: 47–54.
279. Nagelhus E.A., Mathiisen T.M., Ottersen O.P. 2004. Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with Kir4.1. *Neuroscience* 129: 905–913.
280. Nedergaard M., Ransom B., Goldman S.A. 2003. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 26: 523-530.
281. Neusch C., Rozengurt N., Jacobs R.E., Lester H.A., Kofuji P. 2001. Kir4.1 potassium channel subunit is crucial for oligodendrocyte development and in vivo myelination. *J. Neurosci.* 21: 5429–5438.
282. Neusch C., Papadopoulos N., Müller M., Maletzki I., Winter S.M., Hirrlinger J., Handschuh M., Bähr M., Richter D.W., Kirchhoff F., Hüsmann S. 2006. Lack of the Kir4.1 channel subunit abolishes K⁺ buffering properties of astrocytes in the ventral respiratory group: impact on extracellular K⁺ regulation. *J. Neurophysiol.* 95: 1843–1852.
283. Newman E.A. 1993. Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Müller) cells. *J. Neurosci.* 13: 3333–3345.
284. Nguyen T.V., Lee J.E., Sweredoski M.J., Yang S.J., Jeon S.J., Harrison J.S., Yim J.H., Lee S.G., Handa H., Kuhlman B., Jeong J.S., Reitsma J.M., Park C.S., Hess S., Deshaies R.J. 2016. Glutamine triggers acetylation-dependent degradation of glutamine synthetase via the thalidomide receptor cereblon. *Mol. Cell* 61: 809–820.
285. Nicchia G.P., Rossi A., Mola M.G., Procino G., Frigeri A., Svelto M. 2008. Actin cytoskeleton remodeling governs aquaporin-4 localization in astrocytes. *Glia* 56: 1755–1766.
286. Nicchia G.P., Ficarella R., Rossi A., Giangreco I., Nicolotti O., Carotti A., Pisani F., Estivill X., Gasparini P., Svelto M. Frigeri A. 2011. D184E mutation in aquaporin-4 gene impairs water permeability and links to deafness. *Neuroscience.* 197: 80–88
287. Nichols C.G., Lopatin A.N. 1997. Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 59: 171–191.
288. Nishizaki T., Matsuoka T., Nomura T., Kondoh T., Tamaki N., Okada Y. 1999. Store Ca²⁺ depletion enhances NMDA responses in cultured human astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259(3): 661–664.
289. Nissim I. 1999. Newer aspects of glutamine/glutamate metabolism: The role of acute pH changes. *Am. J. Physiol.* 277: 493–497.
290. Nwaobi S.E., Lin E., Peramsetty S.R., Olsen M.L. 2014. DNA methylation functions as a critical regulator of Kir4.1 expression during CNS development. *Glia* 62: 411–427.
291. Nwaobi S.E., Cuddapah V.A., Patterson K.C., Randolph A.C., Olsen M.L. 2016. The role of glial-specific Kir4.1 in normal and pathological states of the CNS. *Acta Neuropathol.* 132(1): 1–21.
292. Obara-Michlewska M., Jiang H., Aschner M., Albrecht J. 2010. Gain of function of Kir4.1 channel increases cell resistance to changes of potassium fluxes and cell volume evoked by ammonia and hypoosmotic stress. *Pharmacol. Rep.* 62(6):1237-1242.
293. Obara-Michlewska M., Pannicke T., Karl A., Bringmann A., Reichenbach A., Szeliga M., Hilgier W., Wrzosek A., Szewczyk A., Albrecht J. 2011. Down-regulation of Kir4.1 in the cerebral cortex of rats with liver failure and in cultured astrocytes treated with glutamine: Implications for astrocytic dysfunction in hepatic encephalopathy. *J. Neurosci. Res.* 89(12): 2018-2027.
294. Obara-Michlewska M., Ruskiewicz J., Zielińska M., Verkhatsky A., Albrecht J. 2015. Astroglial NMDA receptors inhibit expression of Kir4.1 channels in glutamate-overexposed astrocytes in vitro and in the brain of rats with acute liver failure. *Neurochem Int.* 88: 20-25.
295. Oberheim N.A., Tian G.-F., Han X., Peng W., Takano T., Ransom B., Nedergaard M. 2008. Loss of astrocytic domain organization in the epileptic brain. *J. Neurosci.* 28: 3264-3276.
296. Ohno Y., Tokudome K., Kunisawa N., Iha H.A., Kinboshi M., Mukai T., Serikawa T., Shimizu S. 2015. Role of astroglial Kir4.1 channels in the pathogenesis and treatment of epilepsy. *Ther. Targets Neurol. Dis.* 2: e476.
297. Olabarria M., Noristani H.N., Verkhatsky A., Rodríguez J.J. 2011. Age-dependent decrease in glutamine synthetase expression in the hippocampal astroglia of the triple transgenic Alzheimer's disease mouse model: mechanism for deficient glutamatergic transmission? *Mol. Neurodegener.* 6: 55.
298. Oliet S.H., Mothet J.P. 2009. Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by astrocytic D-serine. *Neuroscience.* 158(1): 275–283.
299. Olsen M. L., Sontheimer H. 2008. Functional implications for Kir4.1 channels in glia biology: from K⁺ buffering to cell differentiation. *J. Neurochem.* 107: 589–601.

300. Ong W.Y., Garey L.J., Leong S.K., Reynolds R. 1995. Localization of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase in the human cerebral cortex and subcortical white matter – a double immunolabelling and electron microscopic study. *Journal of Neurocytology* 24: 602–610.
301. Orre M., Kamphuis W., Osborn L.M., Melief J., Kooijman L., Huitinga I., Klooster J., Bossers K., Hol E.M. 2014. Acute isolation and transcriptome characterization of cortical astrocytes and microglia from young and aged mice. *Neurobiology of Aging*. 35: 1–14.
302. O’Shea RD. 2002. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29: 1018–1023.
303. Otis T.S., Jahr C.E. 1998. Anion currents and predicted glutamate flux through a neuronal glutamate transporter. *J. Neurosci.* 18: 7099–7110.
304. Otis T.S., Kavanaugh M.P. 2000. Isolation of current components and partial reaction cycles in the glial glutamate transporter EAAT2. *J. Neurosci.* 20: 2749-2757.
305. Owe S.G., Marcaggi P., Attwell D. 2006. The ionic stoichiometry of the GLAST glutamate transporter in salamander retinal glia. *J. Physiol.* 577: 591-599.
306. Ozawa S., Kamiya H., Tsuzuki K. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54: 581–618.
307. Paczkowska K.M. 2014. Metoda identyfikacji modyfikacji potranslacyjnych białek na podstawie danych ze spektrometrii mas. Politechnika Warszawska Wydział Elektroniki i Technik Informacyjnych Instytut Informatyki. Praca magisterska.
308. Padmawar P., Yao X., Bloch O., Manley G.T., Verkman A.S. 2005. K⁺ waves in brain cortex visualized using a long-wavelength K⁺-sensing fluorescent indicator. *Nat. Methods* 2: 825–827.
309. Palygin O., Lalo U., Verkhratsky A., Pankratov Y. 2010. Ionotropic NMDA and P2X1/5 receptors mediate synaptically induced Ca²⁺ signalling in cortical astrocytes. *Cell Calcium*. 48(4): 225-231.
310. Palygin O., Lalo U., Pankratov Y. 2011. Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* 163(8): 1755-1766.
311. Palygin O., Pochynyuk O., Staruschenko A. 2017. Role and mechanisms of regulation of the basolateral K(ir) 4.1/K(ir) 5.1 K(+) channels in the distal tubules. *Acta Physiol. (Oxf)*. 219(1): 260-273.
312. Panatier A., Theodosis D.T., Mothet J.P., Touquet B., Pollegioni L., Poulain D.A., Oliet S.H. 2006. Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell*. 125:775–784.
313. Panatier A., Vallee J., Haber M., Murai K.K., Lacaille J.C., Robitaille R. 2011. Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses. *Cell*. 146: 785–798.
314. Paoletti P. 2011. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur. J. Neurosci.* 33(8): 1351-1365.
315. Paoletti P., Neyton J. 2007. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7: 39–47.
316. Paoletti P., Bellone C., Zhou Q. 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14: 383–400.
317. Papadia S., Soriano F.X., Léveillé F., Martel M.A., Dakin K.A., Hansen H.H., Kaindl A., Siffringer M., Fowler J., Stefovská V., McKenzie G., Craigon M., Corriveau R., Ghazal P., Horsburgh K., Yankner B.A., Wyllie D.J., Ikonomidou C., Hardingham G.E. 2008. Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat. Neurosci.* 11(4): 476-487.
318. Papadopoulos M.C., Verkman A.S. 2005. Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J. Biol. Chem.* 280: 13906–13912.
319. Papadopoulos M.C., Verkman A.S. 2007. Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* 22: 778–784.
320. Papadopoulos M.C., Verkman A.S. 2013. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 14(4): 265-277.
321. Papadopoulos M.C., Manley G.T., Krishna S., Verkman A.S. 2004a. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J.* 18: 1291–1293.
322. Papadopoulos M.C., Saadoun S., Binder D.K., Manley G.T., Krishna S., Verkman A.S. 2004b. Molecular mechanisms of brain tumor edema. *Neuroscience* 129: 1011–1020.
323. Papageorgiou I.E., Gabriel S., Fetani A.F., Kann O., Heinemann U. 2011. Redistribution of astrocytic glutamine synthetase in the hippocampus of chronic epileptic rats. *Glia* 59: 1706–1718.

324. Papouin T., Ladepeche L., Ruel J., Sacchi S., Labasque M., Hanini M., Groc L., Pollegioni L., Mothet J.P., Oliet S.H. 2012. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell*, 150(3): 633–646.
325. Parfenova H., Fedinec A., Leffler C.W. 2003. Ionotropic glutamate receptors in cerebral microvascular endothelium are functionally linked to heme oxygenase. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23(2): 190–197.
326. Parker I., Ivorra I. 1991. Caffeine inhibits inositol trisphosphate-mediated liberation of intracellular calcium in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 433: 229–240.
327. Parpura V., Zorec R. 2010. Gliotransmission: exocytotic release from astrocytes. *Brain Res. Rev.* 63: 83–92.
328. Parpura V., Verkhratsky A. 2012. Neuroglia at the crossroads of homeostasis, metabolism and signalling: evolution of the concept. *ASN Neuro.* 4(4): 201–205.
329. Paulson O.B., Newman E.A. 1987. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science*, 237(4817): 896–898.
330. Pearce B., Albrecht J., Morrow C., Murphy S. 1986. Astrocyte glutamate receptor activation promotes inositol phospholipid turnover and calcium flux. *Neurosci. Lett.* 72(3): 335–340.
331. Perea G., Navarrete M., Araque A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32(8): 421–431.
332. Perea G., Sur M., Araque A. 2014. Neuron glia networks: integral gear of brain function. *Front. Cell. Neurosci.* 8: 378.
333. Petralia R.S., Wang Y.X., Zhao H.M., Wenthold R.J. 1996. Ionotropic and metabotropic glutamate receptors show unique postsynaptic, presynaptic, and glial localizations in the dorsal cochlear nucleus. *The Journal of Comparative Neurology.* 372: 356–383.
334. Petralia R.S., Wang Y.X., Hua F., Yi Z., Zhou A., Ge L., Stephenson F.A., Wenthold R.J. 2010. Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations. *Neuroscience* 167: 68–87.
335. Phani N.M., Acharya S., Xavy S., Bhaskaranand N., Bhat M. K., Jain A., Rai P.S., Satyamoorthy K. 2014. Genetic association of KCNJ10 rs1130183 with seizure susceptibility and computational analysis of deleterious non-synonymous SNPs of KCNJ10 gene. *Gene* 536(2): 247–253.
336. Pines G., Danbolt N.C., Bjørås M., Zhang Y., Bendahan A., Eide L., Koepsell H., Storm-Mathisen J., Seeberg E., Kanner B.I. 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360: 464–467.
337. Poopalasundaram S., Knott C., Shamotienko O.G., Foran P.G., Dolly J.O., Ghiani C.A., Gallo V., Wilkin G.P. 2000. Glial heterogeneity in expression of the inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, in adult rat CNS. *Glia* 30: 362–372.
338. Posati T., Pistone A., Saracino E., Formaggio F., Mola M.G., Troni E., Sagnella A., Nocchetti M., Barbalinardo M., Valle F., Bonetti S., Caprini M., Nicchia G.P., Zamboni R., Muccini M., Benfenati V. 2016. A nanoscale Interface Promoting Molecular and functional differentiation of neural cells. *Sci Rep.* 6: 31226.
339. Potokar M., Stenovec M., Jorgačevski J., Holen T., Kreft M., Ottersen O.P., Zorec R. 2013. Regulation of AQP4 surface expression via vesicle mobility in astrocytes. *Glia* 61: 917–928.
340. Potokar M., Jorgačevski J., Zorec R. 2016. Astrocyte aquaporin dynamics in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* 17(7): E1121.
341. Previch L.E., Ma L., Wright J.C., Singh S., Geng X., Ding Y. 2016. Progress in AQP research and new developments in therapeutic approaches to ischemic and hemorrhagic stroke. *Int. J. Mol. Sci.* 17: E1146.
342. Rama Rao K.V., Jayakumar A.R., Tong X., Curtis K.M., Norenberg M.D. 2010. Brain aquaporin-4 in experimental acute liver failure. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 69: 869–879.
343. Rambhadran A., Gonzalez J., Jayaraman V. 2010. Subunit arrangement in N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *J Biol Chem.* 285(20): 15296–15301.
344. Ransom C.B., Ransom B.R., Sontheimer H. 2000. Activity-dependent extracellular K⁺ accumulation in rat optic nerve: the role of glial and axonal Na⁺ pumps. *J Physiol.* 522: 427–442.
345. Rapedius M., Paynter J.J., Fowler P.W., Shang L., Sansom M.S., Tucker S.J., Baukowitz T. 2007. Control of pH and PIP₂ gating in heteromeric Kir4.1/Kir5.1 channels by H-bonding at the helix-bundle crossing. *Channels* 1: 327–330.
346. Rash J.E. 2010. Molecular disruptions of the panglial syncytium block potassium siphoning and axonal saltatory conduction: Pertinence to neuromyelitis optica and other demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroscience.* 168: 982–1008.
347. Rash J.E., Yasumura T., Hudson C.S., Agre P., Nielsen S. 1998. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11981–11986.

-
348. Rauen T. 2000. Diversity of glutamate transporter expression and function in the mammalian retina. *Amino Acids* 19: 53-62.
349. Ravikrishnan A., Gandhi P.J., Shelkar G.P., Liu J., Pavuluri R., Dravid S.M. 2018. Region-specific expression of NMDA receptor GluN2C subunit in parvalbumin-positive neurons and astrocytes: analysis of GluN2C expression using a novel reporter model. *NeuroScience*. 380: 49–62.
350. Regan M.R., Huang Y.H., Kim Y.S., Dykeshoberg M.I., Jin L., Watkins A.M., Bergles D.E., Rothstein J.D. 2007. Variations in promoter activity reveal a differential expression and physiology of glutamate transporters by glia in the developing and mature CNS. *J. Neurosci.* 27: 6607-6619.
351. Reichold M., Zdebek A.A., Lieberer E., Rapedius M., Schmidt K., Bandulik S., Sterner C., Tegtmeyer I., Penton D., Baukrowitz T., Hulton S.A., Witzgall R., Ben-Zeev B., Howie A.J., Kleta R., Bockenbauer D., Warth R. 2010. KCNJ10 gene mutations causing EAST syndrome (epilepsy, ataxia, sensorineural deafness, and tubulopathy) disrupt channel function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(32): 14490–14495.
352. Reyes R.C., Parpura V. 2009. The trinity of Ca²⁺ sources for the exocytotic glutamate release from astrocytes. *Neurochem. Int.* 55(1–3): 2–8.
353. Rimmele T.S., Rosenberg P.A. 2016. GLT-1: the elusive presynaptic glutamate transporter. *Neurochem. Int.* 98: 19–28.
354. Roberts R.C., Roche J.K., McCullumsmith R.E. 2014. Localization of excitatory amino acid transporters EAAT1 and EAAT2 in human postmortem cortex: a light and electron microscopic study. *Neuroscience* 277: 522–540.
355. Robinson S.R. 2000. Neuronal expression of glutamine synthetase in Alzheimer's disease indicates a profound impairment of metabolic interactions with astrocytes. *Neurochem. Int.* 36: 471–482.
356. Robinson M.B., Jackson J.G. 2016. Astroglial glutamate transporters coordinate excitatory signaling and brain energetics. *Neurochem. Int.* 98: 56-71.
357. Robinson S.R., Lee A., Bishop G.M., Czerwinska H., Dringen R. 2015. Inhibition of Astrocytic Glutamine Synthetase by Lead is Associated with a Slowed Clearance of Hydrogen Peroxide by the Glutathione System. *Front. Integr. Neurosci.* 9: 61.
358. Rose E.M., Koo J. C. P., Antflick J. E., Ahmed S.M., Angers S., Hampson D. R. 2009. Glutamate transporter coupling to Na,KATPase. *The Journal of Neuroscience* 29(25): 8143–8155.
359. Rose C.F., Verkhratsky A., Parpura V. 2013. Astrocyte glutamine synthetase: Pivotal in health and disease. *Biochem. Soc. Trans.* 41: 1518–1524.
360. Rosier F., Lambert D., Mertens-Strijthagen M. 1996. Effect of glucose deprivation on rat glutamine synthetase in cultured astrocytes. *Biochem. J.* 315: 607–612.
361. Rothman S.M., Olney J.W. 1995. Excitotoxicity and the NMDA receptor is still lethal after eight years. *Trends Neurosci.* 18(2): 57-58.
362. Rothstein J.D., Martin L., Levey A.I., Dykes-Hoberg M., Jin L., Wu D., Nash N., Kuncl R.W. 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13: 713–725.
363. Rozengurt N., Lopez I., Chiu C.S., Kofuji P., Lester H.A., Neusch C. 2003. Time course of inner ear degeneration and deafness in mice lacking the Kir4.1 potassium channel subunit. *Hear. Res.* 177(1–2): 71–80.
364. Rusnakova V., Honsa P., Dzamba D., Ståhlberg A., Kubista M., Anderova M. 2013. Heterogeneity of astrocytes: From development to injury - single cell gene expression. *PLoS One.* 8(8):e69734.
365. Saadoun S., Papadopoulos M.C. 2010. Aquaporin-4 in brain and spinal cord oedema. *Neuroscience* 168: 1036–1046.
366. Saadoun S., Papadopoulos M.C., Davies D.C., Bell B.A., Krishna S. 2002. Increased aquaporin 1 water channel expression in human brain tumours. *Br. J. Cancer* 87: 621–623.
367. Saadoun S., Papadopoulos M.C., Hara-Chikuma M., Verkman A.S. 2005a. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature* 434: 786-792.
368. Saadoun S., Papadopoulos M.C., Watanabe H., Yan D., Manley G.T., Verkman A.S. 2005b. Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *J. Cell. Sci.* 118(Pt 24): 5691-5698.
369. Sachdeva R., Singh B. 2014. Insights into structural mechanisms of gating induced regulation of aquaporins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 114: 69–79.
370. Salter M.W., Kalia L.V. 2004. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 317–328.
371. Santello M., Cali C., Bezzi P. 2012. Gliotransmission and the tripartite synapse. *Adv. Exp. Med. Biol.* 970: 307-331.

372. Sánchez Gomar I., Díaz Sánchez M., Uclés Sánchez A.J., Casado Chocán J.L., Suárez-Luna N., Ramírez-Lorca R., Villadiego J., Toledo-Aral J.J., Echevarría M. 2016. Comparative analysis for the presence of IgG anti-Aquaporin-1 in patients with NMO-spectrum disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 17(8): E1195.
373. Saparov S.M., Liu K., Agre P., Pohl P. 2007. Fast and selective ammonia transport by aquaporin-8. *J. Biol. Chem.* 282(8): 5296-5301.
374. Satoh J., Tabunoki H., Yamamura T., Arima K., Konno H. 2007. Human astrocytes express aquaporin-1 and aquaporin-4 in vitro and in vivo. *Neuropathology* 27: 245-256.
375. Schipke C.G., Ohlemeyer C., Matyash M., Nolte C., Kettenmann H., Kirchhoff F. 2001. Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *FASEB J.* 15(7): 1270-1272.
376. Schmitt A., Asan E, Püschel B., Kugler P. 1997. Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: nonradioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *J. Neurosci.* 17: 1-10.
377. Scholl U.I., Choi M., Liu T., Ramaekers V.T., Häusler M.G., Grimmer J., Tobe S.W., Farhi A., Nelson-Williams C., Lifton R.P. 2009. Seizures, sensorineural deafness, ataxia, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAME syndrome) caused by mutations in KCNJ10. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (14): 5842-5847.
378. Schousboe A., Meier E., Drejer J., Hertz L. 1989. Preparation of primary cultures of mouse (rat) cerebellar granule cells. In: Shahar A., de Vellis J., Vernadakis A., Haber B. (Eds.) *A Dissection and Tissue Culture Manual of the Nervous System*. Liss, New York. 203-206.
379. Schousboe A., Frandsen A., Krogsgaard-Larsen P. 1992. Pharmacological and functional characterization of excitatory amino acid mediated cytotoxicity in cerebral cortical neurons. *Cell Biol Toxicol.*, 8(3): 93-100.
380. Schousboe A., Bak L.K., Waagepetersen H.S. 2013. Astrocytic control of biosynthesis and turnover of the neurotransmitters glutamate and GABA. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 4: 102.
381. Schousboe A., Scafidi S., Bak L.K., Waagepetersen H.S., McKenna M.C. 2014. Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes. *Adv. Neurobiol.* 11: 13-30.
382. Schrier R.W. 2007. Aquaporin-related disorders of water homeostasis. *Drug News Perspect.* 20: 447-453.
383. Schüler T., Mesic I., Madry C., Bartholomäus I., Laube B. 2008. Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *J. Biol. Chem.* 283: 37-46.
384. Schwarzschild M.A., Cole R.L., Meyers M.A., Hyman S.E. 1999. Contrasting calcium dependencies of SAPK and ERK activations by glutamate in cultured striatal neurons. *Journal of Neurochemistry* 72: 2248-2255.
385. Seifert G., Steinhäuser C. 1995. Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca²⁺ permeability. *The European Journal of Neuroscience.* 7: 1872-1881.
386. Seifert G., Hüttmann K., Binder D.K., Hartmann C., Wyczynski A, Neusch C., Steinhäuser C. 2009. Analysis of astroglial K⁺ channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the Kir4.1 subunit. *J. Neurosci.* 29: 7474-7488.
387. Sekine S., Lan B.Y., Bedolli M., Feng S., Hebrok M. 2006. Liver-specific loss of beta-catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome p450 expression in mice. *Hepatology* 43: 817-825.
388. Sepúlveda F.V., Pablo Cid L., Teulon J., Niemeyer M.I. 2015. Molecular aspects of structure, gating, and physiology of pH-sensitive background K2P and Kir K⁺-transport channels. *Physiol Rev.* 95(1): 179-217.
389. Sequeira A., Mamdani F., Ernst C., Vawter M.P., Bunney W.E., Lebel V., Rehal S., Klempan T., Gratton A., Benkelfat C., Rouleau G.A., Mechawar N., Turecki G. 2009. Global brain gene expression analysis links glutamatergic and GABAergic alterations to suicide and major depression. *PLoS ONE* 4(8): e6585.
390. Shafiqat S., Tamarappoo B.K., Kilberg M.S., Puranam R.S., McNamara J.O., Guadaño-Ferraz A., Fremeau R.T. 1993. Cloning and expression of a novel Na⁺-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na⁺/glutamate cotransporters. *J. Biol. Chem.* 268: 15351-15355.
391. Sharma R., Fischer M.T., Bauer J., Felts P.A., Smith K.J., Misu T., Fujihara K., Bradl M., Lassmann H. 2010. Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination. *Acta Neuropathol.* 120(2): 223-236.
392. Sharp C.D., Hines I., Houghton J., Warren A., Jackson T.H. 4th, Jawahar A., Nanda A., Elrod J.W., Long A., Chi A., Minagar A., Alexander J.S. 2003. Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through activation of NMDA receptor. *Am. J. Physiol.* 285(6), H2592-H2598.
393. Sheldon A.L., Robinson M.B. 2007. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem. Int.* 51: 333-355.

394. Shigetomi E., Kracun S., Sofroniew M.V., Khakh B.S. 2010. A genetically targeted optical sensor to monitor calcium signals in astrocyte processes. *Nat. Neurosci.* 13(6): 759–766.
395. Shin J.H., Linden D.J. 2005. An NMDA receptor/nitric oxide cascade is involved in cerebellar LTD but is not localized to the parallel fiber terminal. *J. Neurophysiol.* 94: 4281–4289.
396. Sicca F., Imbrici P., D'Adamo M.C., Moro F., Bonatti F., Brovedani P., Grottesi A., Guerrini R., Masi G., Santorelli F.M., Pessia M. 2011. Autism with seizures and intellectual disability: possible causative role of gain-of-function of the inwardly-rectifying K⁺ channel Kir4.1. *Neurobiol. Dis.* 43(1): 239–247.
397. Simard M., Nedergaard M. 2004. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129: 877–896.
398. Simpson P.B., Challiss R.A.J., Nahorski S.R. 1995. Neuronal Ca²⁺ stores: activation and function. *Trends Neurosci.* 18: 299–306.
399. Skowrońska M., Albrecht J. 2013. Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity. *Neurochem. Int.* 62: 731–737.
400. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150(1): 76–85.
401. Smith C.D., Carney J.M., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Stadtman E.R., Floyd R.A., Markesbery W.R. 1991. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 10540–10543.
402. Soeters P.B., Grecu I. 2012. Have we enough glutamine and how does it work? A clinician's view. *Ann. Nutr. Metab.* 60: 17–26.
403. Sofroniew M.V. 2009. Molecular dissection of reactive astro-gliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32: 638–647.
404. Solbu T.T., Boulland J.L., Zahid W., Lyamouri Bredahl M.K., Amiry-Moghaddam M., Storm-Mathisen J., Roberg B.A., Chaudhry F.A. 2005. Induction and targeting of the glutamine transporter SN1 to the basolateral membranes of cortical kidney tubule cells during chronic metabolic acidosis suggest a role in pH regulation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 869–877.
405. Sosunov A.A., Wu X., Tsankova N.M., Guilfoyle E., McKhann G.M., Goldman J.E. 2014. Phenotypic heterogeneity and plasticity of isocortical and hippocampal astrocytes in the human brain. *Journal of Neuroscience.* 34: 2285–2298.
406. Spodenkiewicz M., Diez-Fernandez C., Rüfenacht V., Gemperle-Britschgi C., Häberle J. 2016. Minireview on Glutamine Synthetase Deficiency, an Ultra-Rare Inborn Error of Amino Acid Biosynthesis. *Biology (Basel)*. 5(4). pii: E40.
407. Stanfield P.R., Sutcliffe M.J. 2003. Spermine is fit to block inward rectifier (Kir) channels. *J. Gen. Physiol.* 122: 481–484.
408. Steffek A.E., McCullumsmith R.E., Haroutunian V., Meador-Woodruff J.H. 2008. Cortical expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase is decreased in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 103: 71–82.
409. Steinhäuser C., Seifert G., Bedner P. 2012. Astrocyte dysfunction in temporal lobe epilepsy: KC channels and gap junction coupling. *Glia* 60: 1192–1202.
410. Storck T., Schulte S., Hofmann K., Stoffel W. 1992. Structure, expression, and functional analysis of a Na⁽⁺⁾-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10955–10959.
411. Strehlow V., Heyne H.O., Lemke J.R. 2015. The spectrum of GRIN2A-associated disorders. *Epileptologie* 32(3): 147–151.
412. Sullivan R., Rauen T., Fischer F., Wiessner M., Grewer C., Bicho A., Pow D.V. 2004. Cloning, transport properties, and differential localization of two splicevariants of GLT-1 in the rat CNS: implications for CNS glutamate homeostasis. *Glia* 45: 155–169.
413. Sun L., June Liu S. 2007. Activation of extrasynaptic NMDA receptors induces a PKC-dependent switch in AMPA receptor subtypes in mouse cerebellar stellate cells. *J. Physiol.* 583(2): 537–553.
414. Sun H.L., Zhang S.H., Zhong K., Xu Z.H., Feng B., Yu J., Fang Q., Wang S., Wu D.C., Zhang J.M., Chen Z. 2013. A transient upregulation of glutamine synthetase in the dentate gyrus is involved in epileptogenesis induced by amygdala kindling in the rat. *PLoS ONE* 8(6):e66885.
415. Sühs K.W., Gudi V., Eckermann N., Fairless R., Pul R., Skripuletz T., Stangel M. 2016. Cytokine regulation by modulation of the NMDA receptor on astrocytes. *Neurosci. Lett.* 629: 227–233.
416. Swale D.R., Kharade S.V., Denton J.S. 2014. Cardiac and renal inward rectifier potassium channel pharmacology: emerging tools for integrative physiology and therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* 15: 7–15.
417. Swamy M., Yusof W.R., Sirajudeen K.N., Mustapha Z., Govindasamy C. 2011. Decreased glutamine synthetase, increased citrulline-nitric oxide cycle activities, and oxidative stress in different regions of brain in epilepsy rat model. *J. Physiol. Biochem.* 67: 105–113.

418. Takumi T., Ishii T., Horio Y., Morishige K., Takahashi N., Yamada M., Yamashita T., Kiyama H., Sohmiya K., Nakanishi S., Kurachi Y. 1995. A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. *J. Biol. Chem.* 270(27): 16339–16346.
419. Talukder I., Borker P., Wollmuth L.P. 2010. Specific sites within the ligand-binding domain and ion channel linkers modulate NMDA receptor gating. *J. Neurosci.* 30: 11792–11804.
420. Tanaka K., Watase K., Manabe T., Yamada K., Watanabe M., Takahash, K., Iwama H., Nishikawa T., Ichihara N., Hori S., Takimoto M., Wada K. 1997. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT- 1. *Science* 276: 1699-1702.
421. Tang X., Taniguchi K., Kofuji P. 2009. Heterogeneity of Kir4.1 channel expression in glia revealed by mouse transgenesis. *Glia* 57: 1706–1715.
422. Tao X., Avalos, J.L., Chen J., MacKinnon R. 2009. Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier K⁺ channel Ki2.2 at 3.1 Å resolution. *Science* 326(5960): 1668–1674.
423. Tapia R. 1996. Release and uptake of glutamate as related to excitotoxicity. *Rev. Bras. Biol.* 56(1): 165-174.
424. Ting K.K., Brew B.J., Guillemin G.J. 2009. Effect of quinolinic acid on human astrocytes morphology and functions: implications in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 6: 36–48.
425. Tong X., Ao Y., Faas G. C., Nwaobi S. E., Xu J., Haustein M. D., Anderson M.A., Mody I., Olsen M.L., Sofroniew M.V., Khakh B.S. 2014. Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nat. Neurosci.* 17: 694–703.
426. Tovar K.R., Westbrook G.L. 2002. Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron.* 34: 255–264.
427. Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J., Menniti F.S., Vance K.M., Ogden K.K., Hansen K.B., Yuan H., Myers S.J., Dingledine R. 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* 62(3): 405–496.
428. Tsacopoulos M., Magistretti P.J. 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* 16: 877-885.
429. Tzingounis A.V., Wadiche J.I. 2007. Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* 8: 935–947.
430. Ullensvang K., Lehre K.P., Storm-Mathisen J., Danbolt N.C. 1997. Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter proteins GLAST and GLT. *Eur. J. Neurosci.* 9: 1646-1655.
431. Usowicz M.M., Gallo V., Cull-Candy S.G. 1989. Multiple conductance channels in type-2 cerebellar astrocytes activated by excitatory amino acids. *Nature.* 339: 380-383.
432. van Bockstaele E.J., Colago E.E.O. 1996. Selective distribution of the NMDA-R1 glutamate receptor in astrocytes and presynaptic axon terminals in the nucleus locus coeruleus of the rat brain: An immunoelectron microscopic study. *The Journal of Comparative Neurology.* 369: 483-496.
433. van der Hel W.S., Hessel E.V., Bos I.W., Mulder S.D., Verlinde S.A., van Eijsden P., de Graan P.N. 2014. Persistent reduction of hippocampal glutamine synthetase expression after status epilepticus in immature rats. *Eur J Neurosci* 40: 3711–3719.
434. Vandenberg R.J., Ryan R.M. 2013. Mechanisms of glutamate transport. *Physiol. Rev.* 93: 1621-1657.
435. Vazhappilly R., Sucher N.J. 2002. Turnover analysis of N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 protein in PC12 cells. *Neurosci Lett.* 318(3):153-157.
436. Venero J.L., Vizuete M.L., Machado A., Cano J. 2001. Aquaporins in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 63: 321–336.
437. Verkhratsky A., Butt A.M. 2013. *Glial Physiology and Pathophysiology.* 1st edition. Chichester: Wiley-Blackwell. 560. ISBN 978-0-470-97852-8.
438. Verkhratsky A., Kirchhoff F. 2007. NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist.*13: 28-37.
439. Verkhratsky A., Steinhäuser C. 2000. Ion channels in glial cells. *Brain Res. Rev.* 32: 380–412.
440. Verkman A.S. 2003. Role of aquaporin water channels in eye function. *Exp. Eye Res.* 76: 137-143.
441. Virchow R. 1858. *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische and pathologische Gewebelehre.* Zwanzig Vorlesungen gehalten während der Monate Februar, März und April 1858 im pathologischen Institut zu Berlin. 1st edition. August Hirschwald, Berlin.
442. Vyklicky V., Korinek M., Smejkalova T., Balik A., Krausova B., Kaniakova M., Lichnerova K., Cerny J., Krusek J., Dittert I., Horak M., Vyklicky L. 2014. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res.* 63(1): S191-203.

443. Wallraff A., Köhling R., Heinemann U., Theis M., Willecke K., Steinhäuser C. 2006. The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *J. Neurosci.* 26: 5438-5447.
444. Walls A.B., Waagepetersen H.S., Bak L.K., Schousboe A., Sonnewald U. 2015. The glutamine-glutamate/GABA cycle: Function, regional differences in glutamate and GABA production and effects of interference with GABA metabolism. *Neurochem. Res.* 40: 402-409.
445. Wang C., Pralong W.F., Schulz M.F., Rougon G., Aubry J.M., Pagliusi S., Robert A., Kiss J.Z. 1996. Functional N-methyl-D-aspartate receptors in O-2A glial precursor cells: a critical role in regulating polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression and cell migration. *J. Cell Biol.* 135: 1565-1581.
446. Wang H., Wang X., Li Y., Yu H., Wang C., Feng C., Xu G., Chen J., You J., Wang P., Wu X., Zhao R., Zhang G. 2018. Chronic ethanol exposure induces SK-N-SH cell apoptosis by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor expression and intracellular calcium. *Exp Ther Med.* 15(4): 3791-3800.
447. Wang Y., Tajkhorshid E. 2007. Molecular mechanisms of conduction and selectivity in aquaporin water channels. *J. Nutr.* 137: 1509S-1515S.
448. Wang Y., Watford M. 2007. Glutamine, insulin and glucocorticoids regulate glutamine synthetase expression in C2C12 myotubes, Hep G2 hepatoma cells and 3T3 L1 adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1770: 594-600.
449. Weilinger N.L., Lohman A.W., Rakai B.D., Ma E.M., Bialecki J., Maslieieva V., Rilea T., Bandet M.V., Ikuta N.T., Scott L., Colicos M.A., Teskey G.C., Winship I.R., Thompson R.J. 2016. Metabotropic NMDA receptor signaling couples Src family kinases to pannexin-1 during excitotoxicity. *Nat. Neurosci.* 19: 432-442.
450. West A.E., Greenberg M.E. 2011. Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(6). pii: a005744.
451. Wilcock D. M., Vitek M. P., Colton C. A. 2009. Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer's disease. *Neuroscience* 159: 1055-1069.
452. Williams K., Chao J., Kashiwagi K., Masuko T., Igarashi K. 1996. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors by glycine: role of an aspartate residue in the M3-M4 loop of the NR1 subunit. *Mol. Pharmacol.* 50(4): 701-708.
453. Wolosker H. 2007. NMDA receptor regulation by D-serine: new findings and perspectives. *Mol. Neurobiol.* 36(2): 152-164.
454. Wood P.L. 2005. The NMDAR complex: a long and winding road to therapeutics. *IDrugs.* 8(3): 229-235.
455. Wright G., Soper R., Brooks H.F., Stadlbauer V., Vairappan B., Davies N.A., Andreola F., Hodges S., Moss R.F., Davies D.C., Jalan R. 2010. Role of aquaporin-4 in the development of brain oedema in liver failure. *J. Hepatol.* 53: 91-97.
456. Wroge C.M., Hogins J., Eisenman L., Mennerick S. 2012. Synaptic NMDA receptors mediate hypoxic excitotoxic death. *J. Neurosci.* 32: 6732-6742.
457. Xiong Z.Q., Stringer J.L. 2000. Sodium pump activity, not glial spatial buffering, clears potassium after epileptiform activity induced in the dentate gyrus. *J Neurophysiol.* 83(3): 1443-1451.
458. Xu X., Zheng C., Li N., Shen H., Wang G. 2017. The decrease of NMDAR subunit expression and NMDAR EPSC in hippocampus by neonatal exposure to desflurane in mice. *Behav Brain Res.* 317:82-87.
459. Yan H.T., Wu N., Lu X.Q., Su R.B., Zheng J.Q., Li J. 2013. Aquaporin-4 deficiency attenuates opioid dependence through suppressing glutamate transporter-1 down-regulation and maintaining glutamate homeostasis. *CNS Neurosci. Ther.* 19: 12-19.
460. Yang J., Lunde L.K., Nuntagij P., Oguchi T., Camassa L.M., Nilsson L.N., Lannfelt L., Xu Y., Amiry-Moghaddam M., Ottersen O.P., Torp R. 2011. Loss of astrocyte polarization in the tg-ArcSwe mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 27(4): 711-722.
461. Yang J., Zhang R., Shi C., Mao C., Yang Z., Suo Z., Torp R., Xu Y. 2017. AQP4 association with amyloid deposition and astrocyte pathology in the Tg-ArcSwe mouse model of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 57(1): 157-169.
462. Yoneda K., Yamamoto N., Asai K., Sobue K., Fujita Y., Fujita M., Mase M., Yamada K., Nakanishi M., Tada T., Miura Y., Kato T. 2001. Regulation of aquaporin-4 expression in astrocytes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 89: 94-102.
463. Yu X.H., Zhang H., Wang Y.H., Liu L.J., Teng Y., Liu P. 2009. Time-dependent reduction of glutamine synthetase in retina of diabetic rats. *Exp. Eye Res.* 89: 967-997.
464. Yu X., He G.R., Sun L., Lan X., Shi L.L., Xuan Z.H. Du G.H. 2012. Assessment of the treatment effect of baicalein on a model of Parkinsonian tremor and elucidation of the mechanism. *Life Sci.* 91: 5-13.
465. Zador Z., Stiver S., Wang V., Manley G.T. 2009. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb. Exp. Pharmacol.* 190: 159-170.

466. Zaric M., Drakulic D., Stojanovic I.G., Mitrovic N., Grkovic I., Martinovic J. 2018. Regional-specific effects of cerebral ischemia/reperfusion and dehydroepiandrosterone on synaptic NMDAR/PSD-95 complex in male Wistar rats. *Brain Res.* 1688: 73-80.
467. Zeidel M.L., Ambudkar S.V., Smith B.L., Agre P. 1992. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry* 31: 7436-7440.
468. Zeng X.N., Sun X.L., Gao L., Fan Y., Ding J.H., Hu G. 2007. Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes. *Mol. Cell Neurosci.* 34: 34–39.
469. Zeppenfeld D.M., Simon M., Haswell J.D., D'Abreo D., Murchison C., Quinn J.F., Grafe M.R., Woltjer R.L., Kaye J., Iliff J.J. 2017. Association of perivascular localization of aquaporin-4 with cognition and Alzheimer Disease in aging brains. *JAMA Neurol.* 74(1): 91-99.
470. Zerangue N., Kavanaugh M. P. 1996. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383: 634–637.
471. Zhang H., He C., Yan X., Mirshahi T., Logothetis D.E. 1999. Activation of inwardly rectifying K⁺ channels by distinct PtdIns(4,5)P₂ interactions. *Nat. Cell Biol.* 1: 183–188.
472. Zhang Q., Hu B., Sun S., Tong E. 2003. Induction of increased intracellular calcium in astrocytes by glutamate through activating NMDA and AMPA receptors. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences.* 23: 254-257.
473. Zhang S.J., Steijaert M.N., Lau D., Schütz G., Delucinge-Vivier C., Descombes P., Bading H. 2007. Decoding NMDA receptor signaling: identification of genomic programs specifying neuronal survival and death. *Neuron.* 53: 549–562.
474. Zhang Y., Chen K., Sloan S.A., Bennett M.L., Scholze A.R., O'Keefe S., Phatnani H.P., Guarnieri P., Caneda C., Ruderisch N., Deng S., Liddelow S.A., Zhang Ch., Daneman R., Maniatis T., Barres B.A., Wu J.Q. 2014. An RNA sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience.* 34: 11929-11947.
475. Zhou Y., Li H.L., Zhao R., Yang L.T., Dong Y., Yue X., Ma Y.Y., Wang Z., Chen J., Cui C.L., Yu A.C. 2010. Astrocytes express N-methyl-D-aspartate receptor subunits in development, ischemia and post-ischemia. *Neurochem. Res.* 35(12): 2124-2134.
476. Zhou Y., Waanders L.F., Holmseth S., Guo C., Berger U.V., Li Y., Lehre A.-C., Lehre K.P., Danbolt N.C. 2014. Proteome analysis and conditional deletion of the EAAT2 glutamate transporter provide evidence against a role of EAAT2 in pancreatic insulin secretion in mice. *J. Biol. Chem.* 289: 1329-1344.
477. Zhu S., Paoletti P. 2015. Allosteric modulators of NMDA receptors: multiple sites and mechanisms. *Curr. Opin. Pharmacol.* 20: 14-23.

XI.1. E-źródła

1. <http://www.matrixscience.com>.
2. <https://reactome.org/PathwayBrowser/#/R-HSA-112315&SEL=R-HSA-112310&PATH=R-HSA-112316>.