

Załącznik 3

Autoreferat

Dr Joanna Gruszczyńska-Biegała

Pracownia Biologii Molekularnej
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego, Polska Akademia Nauk

Warszawa 2019

1. Imię i Nazwisko: **Joanna Gruszczyńska-Biegała**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 01.2008** stopień doktora nauk biologicznych, specjalność: biochemia
nadany przez radę naukową Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego PAN w Warszawie
Promotor: prof. dr hab. H. Strzelecka-Gołaszewska
Tytuł rozprawy: "Udział zmian konformacji aktyny w regulacji skurczu
szkieletowych mięśni kręgowców"
- 07.1999** tytuł magistra inżyniera chemii, specjalizacja: inżynieria bioprosesowa i
środowiskowa
nadany przez dziekana Wydziału Chemicznego, Politechnika Wroclawska
Promotor: prof. dr hab. inż. A. Noworyta

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.

- 09.2018 – obecnie** *adiunkt*, Pracownia Biologii Molekularnej (kierowana przez prof. dr hab. Barbarę Zabłocką), Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im M. Mossakowskiego, PAN, Warszawa, Polska
- 12.2011 – 08.2018** *starszy badacz*, Laboratorium Neurodegeneracji (kierowane przez prof. dr hab. Jacka Kuźnickiego), Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, Polska (z przerwą na urlop macierzyński 03.2013-02.2014)
- 02.2008 – 11.2011** *pracownik typu post-doc*, Laboratorium Neurodegeneracji (pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Kuźnickiego), Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, Polska
- 11.2007 – 01.2008** *badacz*, Laboratorium Neurodegeneracji, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa, Polska
- 07-09.2007** *badacz*, Zakład Biochemii (pod kierunkiem doc. dr hab. Jolanty Rędownicz), Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, Warszawa, Polska
- 07.2002 – 06.2003** *asystent naukowy*, Zakład Biochemii (pod kierunkiem prof. Anny Zólkiewskiej), Stanowy Uniwersytet w Kansas, Manhattan, USA
- 07.2001 – 06.2007** *doktorant*, Zakład Biochemii Mięśni (pod kierunkiem prof. dr hab. Hanny Strzeleckiej-Gołaszewskiej), Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, Warszawa, Polska (z ok. 2,5-letnią przerwą na wyjazdy zagraniczne oraz urlop macierzyński 10.2006-04.2007)
- 09.2000 – 06.2001** *asystent naukowy*, Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, Warszawa, Polska

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.

Tytuł osiągnięcia: **STIM jako białka regulatorowe jonów wapnia w neuronach – występowanie, funkcja, białka docelowe**

Osiągnięcie naukowe, które przedkładam ubiegając się o uzyskanie stopnia doktora habilitowanego nauk medycznych, składa się z powiązanych tematycznie czterech artykułów oryginalnych oraz jednej pracy poglądowej opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR).

Opis indywidualnego wkładu habilitantki w powstanie każdej z wyżej wymienionych publikacji znajduje się w załączniku 4. Oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku 5.

1. Klejman M.*, **Gruszczynska-Biegała J.***, Skibinska-Kijek A., Wisniewska M.B., Misztal K., Blazejczyk M., Bojarski L., Kuznicki J. (2009) Expression of STIM1 in brain and puncta-like colocalization of STIM1 and ORAI1 upon depletion of Ca²⁺ store in neurons. *Neurochem Int.*; 54:49-55, Elsevier, * pierwszy współautor
2. **Gruszczynska-Biegała J.**, Pomorski P., Wisniewska M.B., Kuznicki J. (2011) Differential Roles for STIM1 and STIM2 in Store-Operated Calcium Entry in Rat Neurons. *PLOS ONE*; 6:e19285, PLOS.
3. **Gruszczynska-Biegała J.**, Kuznicki J. (2013) Native STIM2 and ORAI1 proteins form a calcium-sensitive and thapsigargin-insensitive complex in cortical neurons. *J Neurochem.* 126(6):727-38, Wiley.
4. **Gruszczynska-Biegała J.***, Sladowska M., Kuznicki J. (2016) AMPA Receptors Are Involved in Store-Operated Calcium Entry and Interact with STIM Proteins in Rat Primary Cortical Neurons. *Front. Cell. Neurosci.* 10:251, Frontiers, * autor korespondujący
5. Serwach K., **Gruszczynska-Biegała J.*** (2019) STIM Proteins and Glutamate Receptors in Neurons: Role in Neuronal Physiology and Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2289, MDPI, * autor korespondujący; artykuł poglądowy napisany na zaproszenie

Pod koniec 2007 roku dołączyłam do zespołu prof. J. Kuźnickiego w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie, który prowadził badania nad molekularnymi mechanizmami degeneracji neuronów. W ramach grantu polsko-niemieckiego rozpoczęłam badania dotyczące ówczynie nowo-odkrytych białek STIM, które stały się podstawą mojej pracy habilitacyjnej.

WSTĘP

Jony wapnia (Ca^{2+}) są wszechobecnym wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem sygnałów odpowiedzialnym za kontrolowanie licznych procesów komórkowych, takich jak zapłodnienie, proliferacja, rozwój, uczenie się i pamięć (Berridge i wsp. 2000). Utrzymanie wewnątrzkomórkowej homeostazy Ca^{2+} ma kluczowe znaczenie dla przeżycia komórek (Sammels i wsp. 2010), przy czym równie ważnym jak lokalne stężenie Ca^{2+} czynnikiem jest źródło tych jonów. Głównym magazynem jonów Ca^{2+} w komórce jest siateczka śródplazmatyczna (ER). W komórkach niepobudliwych, takich jak np. limfocyty, kanały wapniowe zależne od magazynów wapniowych (SOCC, ang. *Store-Operated Calcium Channel*) są główną ścieżką napływu Ca^{2+} z zewnątrz komórki. Zewnątrzkomórkowy napływ Ca^{2+} przez te ściśle regulowane kanały znajdujące się w błonie plazmatycznej (PM) są podstawą napływu Ca^{2+} zależnego od opróżnienia magazynów Ca^{2+} (SOCE, ang. *Store-Operated Calcium Entry*).

Proces SOCE polega na napływie jonów Ca^{2+} ze środowiska zewnątrzkomórkowego przez kanały błony komórkowej (PM) i na uzupełnieniu poziomu tych jonów w ER po jego wcześniejszym obniżeniu i uwolnieniu do cytoplazmy (Blaustein i Golovina 2001, Putney 2003). SOCE inicjowany jest przez czujniki poziomu Ca^{2+} zlokalizowane w ER - białka STIM1 i STIM2 (z ang. *Stromal Interacting Molecules*) (Liou i wsp. 2005, Roos i wsp. 2005, Zhang i wsp. 2005), które zostały odkryte jako potencjalne białka supresorowe nowotworów (Williams i wsp. 2001). Po aktywacji receptorów rianodynowych i receptorów IP_3 dochodzi do opróżnienia magazynów wapniowych ER z jonów Ca^{2+} (Berridge i wsp. 2000), co powoduje oligomeryzację białek STIM i ich przemieszczanie się w kierunku PM (Liou i wsp. 2005, Zhang i wsp. 2005, Wu i wsp. 2006). Tam tworzą one kompleksy, tzw. „punkty”, z białkami kanału wapniowego SOC - ORAI1, co prowadzi do aktywacji tego kanału (Liou i wsp. 2005, Mercer i wsp. 2006, Liao i wsp. 2008, Soboloff i wsp. 2006). W ten sposób uruchamiany jest napływ Ca^{2+} do cytoplazmy komórek niepobudliwych (Prakriya i wsp. 2006), skąd Ca^{2+} pobierany jest do ER przez pompy SERCA (ATP-aza wapniowa retikulum sarko/-endoplazmatycznego), co prowadzi do ponownego napełnienia jonami Ca^{2+} opróżnionych magazynów ER. Powszechnie uznaje się, że interakcja białek STIM z ORAI1 ma zasadnicze znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania SOCE w komórkach niepobudliwych, ale w neuronach jego mechanizm nie był znany gdy podejmowałam badania. Obecnie nadal nie jest on do końca wyjaśniony ze względu na bardziej złożony proces regulacji napływu Ca^{2+} poprzez różne receptory i kanały wapniowe w PM.

STIM1 i STIM2 są integralnymi białkami błonowymi typu I zlokalizowanymi w ER (Varnai i wsp. 2009). N-końcowy fragment STIM1 zawiera domenę wiążącą Ca^{2+} typu EF-hand i jest odpowiedzialny za wykrywanie zmian w poziomie Ca^{2+} wewnątrz ER i oligomeryzację białek STIM. C-końcowy fragment (reszty aminokwasowe 234-685) skierowany jest do cytoplazmy i zawiera m. in. dwie domeny typu „coiled-coil”. Białko STIM2 cechuje się identyczną topologią i dużym stopniem podobieństwa na poziomie sekwencji aminokwasowej, zasadniczo różniąc się od białka STIM1 jedynie w C-końcowym fragmencie za domenami coiled-coil. STIM1 oddziałuje i aktywuje kanał ORAI1 w PM poprzez fragment obejmujący drugą domenę coiled-coil (aminokwasy 342-448), nazwaną domeną CAD (ang. *CRAC activation domain*; Park i wsp. 2009). Białka STIM reagują także z niektórymi kanałami wapniowymi z rodziny TRP (ang. *Transient Receptor Potential*), co sugeruje, że mają więcej białek efektorowych (Varnai i wsp. 2009).

Większość wiedzy o SOCE i działaniu białek STIM pochodzi z badań nad komórkami niepobudliwymi, znacznie mniej wiadomo o molekularnych podstawach tego zjawiska w komórkach mięśniowych. Natomiast do roku 2009, dopóki nie pojawiły się prace naszego zespołu, nic nie było wiadomo na temat zależnego od białek STIM mechanizmu SOCE w neuronach. W przypadku komórek neuronalnych zagadnienie to stało się ówczesnie przedmiotem intensywnych badań, m. in. w związku z zaburzeniami homeostazy wapniowej obserwowanymi w chorobach neurodegeneracyjnych (Bojarski i wsp. 2009, Bojarski i wsp. 2008, Wojda i wsp. 2008). Przypuszcza się, że zmiany w SOCE odgrywają ważną rolę w patogenezie choroby Alzheimera (AD), jakkolwiek molekularne mechanizmy AD nie są do końca poznane.

CELE NAUKOWE CYKLU OMAWIANYCH PRAC

W komórkach niepobudliwych białka STIM są sensorami poziomu jonów Ca^{2+} w ER, biorącymi udział w SOCE. Przez długi czas myślano, że proces SOCE nie występuje w neuronach ze względu na łatwy i nieograniczony dostęp do zewnątrzkomórkowych źródeł Ca^{2+} poprzez kanały bramkowane napięciem (z ang. *Voltage-Gated Ca^{2+} Channels*, VGCC) oraz kanały sterowane receptorem (z ang. *Receptor-Operated Ca^{2+} Channels*, ROCC). Niemniej jednak, w kilku pracach zademonstrowano, że SOCE może występować także w komórkach pobudliwych takich jak komórki mięśni gładkich (Albert i wsp. 2007) oraz komórki neuronalne hipokampa (Baba i wsp. 2003, Emptage i wsp. 2001). Jednakże molekularny mechanizm SOCE w neuronach pozostawał nieznany i nie wiadomo było

również nic o białkach, które mogłyby być zaangażowane w ten proces w neuronach. W związku z powyższym, celem naukowym prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe habilitantki było:

- zbadanie, czy białka STIM występują w mózgu i w neuronach
- określenie roli białek STIM w neuronalnym SOCE
- znalezienie nowych białek oddziałujących z białkami STIM, a tym samym poznanie mechanizmu SOCE w homeostazie wapniowej neuronów.

Występowanie białek STIM1 i STIM2 w mózgu i w neuronach

1. Klejman M.*, **Gruszczyńska-Biegała J.***, Skibinska-Kijek A., Wisniewska M.B., Misztal K., Blazejczyk M., Bojarski L., Kuznicki J. (2009) Expression of STIM1 in brain and puncta-like colocalization of STIM1 and ORAI1 upon depletion of Ca²⁺ store in neurons. *Neurochem Int.*; 54:49-55, Elsevier, * pierwszy współautor
2. **Gruszczyńska-Biegała J.**, Pomorski P., Wisniewska M.B., Kuznicki J. (2011) Differential Roles for STIM1 and STIM2 in Store-Operated Calcium Entry in Rat Neurons. *PLOS ONE*; 6:e19285, PLOS.

W momencie rozpoczęcia przeze mnie zaplanowanych badań nie było żadnych danych literaturowych dotyczących występowania białek STIM w neuronach. Nasze badania rozpoczęliśmy od poszukiwania białek STIM w różnych strukturach mózgu myszy. W pierwszej pracy opublikowanej w 2009 roku wykryłam metodą western blot obecność białek STIM1 w mózdku, we wzgórzu, w hipokampie, w korze oraz w ciele migdałowatym. Również przy użyciu Real Time PCR zidentyfikowaliśmy *Stim1* mRNA w różnych strukturach mózgu. Stosując obie metody wykazaliśmy, że zarówno poziom białka jak i mRNA dla STIM1 był około dwukrotnie wyższy w mózdku w porównaniu do poziomu STIM1 w pozostałych strukturach, gdzie był podobny. Immunohistochemiczna analiza skrawków mózgowych myszy wykazała obecność STIM1 głównie w neuronach piramidalnych w warstwie V kory oraz w neuronach Purkiniego mózdku (**Klejman, Gruszczyńska-Biegała i wsp. 2009**).

Podobne badania przeprowadziliśmy *in vitro* w pierwotnych hodowlach szczurzych neuronów hipokampalnych i korowych oraz w astrocytów korowych mózgu. Przy zastosowaniu metody Real Time PCR pokazaliśmy, że neurony korowe i hipokampalne a także astrocyty korowe zawierają znaczne ilości *Stim1* i *Stim2* mRNA. Podczas gdy poziom *Stim1* mRNA był we wszystkich komórkach zbliżony, to poziom *Stim2* był około dwukrotnie wyższy w neuronach hipokampalnych niż w astrocytach. Laserowa mikrodyssekcja neuronów

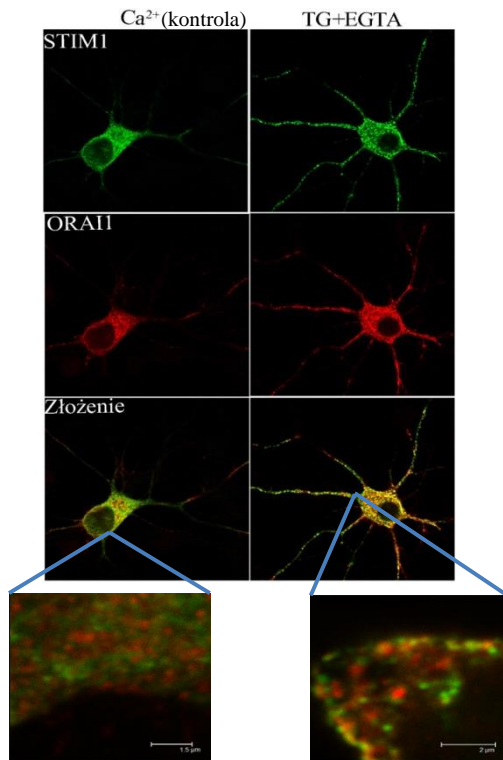
korowych i hipokampalnych potwierdziła, że *Stim1* i *Stim2* są ekspresjonowane w neuronach, przy tym wyższy poziom mRNA zaobserwowano także dla *Stim2*. Oszacowaliśmy, że w 50-u neuronach hipokampalnych znajduje się około 65 kopii *Stim1* i 307 kopii *Stim2* mRNA (**Gruszczynska-Biegała i wsp. 2011**). Badając lokalizację białek STIM1 w neuronach metodą immunobarwienia zaobserwowałam jego ekspresję głównie w ciele komórki, ale i w wypustkach neuronalnych. Ponadto zaobserwowałam częściową ko-lokalizację STIM1 z kalretikulina (markerem ER), co sugerowało obecność białka STIM1 w ER i wskazywało na jego rolę jako sensora Ca^{2+} w neuronalnym ER (**Klejman, Gruszczynska-Biegała i wsp. 2009**). Stosując analizę western blot subkomórkowych frakcji izolowanych z neuronów korowych, wykazałam, że endogenne białka STIM1 i STIM2 zlokalizowane są we frakcjach błonowych neuronów (**Gruszczynska-Biegała i wsp. 2011**).

Powyższe wyniki (wraz z wynikami naszych prac niewchodzących w cykl prac stanowiących osiągnięcie naukowe; Skibinska-Kijek i wsp. 2009 oraz Steinbeck i wsp. 2011) wykazały, że STIM1 i STIM2 są ekspresjonowane w mózgu i w neuronach gryzoni zarówno na poziomie mRNA jaki i białka. W momencie zakończenia przez nas powyższych prac, zaczęły pojawiać się doniesienia potwierdzające występowanie białek STIM w mózgu gryzoni: neuronach korowych (Keil i wsp. 2010, Ng i wsp. 2011), jak również w neuronach mózdzku (Hartmann i wsp. 2014) i hipokampa (Berna-Erro i wsp. 2009, Park i wsp. 2010), neuronach zwoju rdzeniowego (Gemes i wsp. 2011) oraz w neuronach muszki owocowej (Venkiteswaran i Hasan 2009).

Rola białek STIM w pojemnościowym napływie Ca^{2+} (SOCE) w szczurzych neuronach korowych

1. Klejman M.*, **Gruszczynska-Biegała J.***, Skibinska-Kijek A., Wisniewska M.B., Misztal K., Blazejczyk M., Bojarski L., Kuznicki J. (2009) Expression of STIM1 in brain and puncta-like colocalization of STIM1 and ORAI1 upon depletion of Ca^{2+} store in neurons. *Neurochem Int.*; 54:49-55, Elsevier, * pierwszy współautor
2. **Gruszczynska-Biegała J.**, Pomorski P., Wisniewska M.B., Kuznicki J. (2011) Differential Roles for STIM1 and STIM2 in Store-Operated Calcium Entry in Rat Neurons. *PLOS ONE*; 6:e19285, PLOS.
3. **Gruszczynska-Biegała J.**, Kuznicki J. (2013) Native STIM2 and ORAI1 proteins form a calcium-sensitive and thapsigargin-insensitive complex in cortical neurons. *J Neurochem.* 126(6):727-38, Wiley.

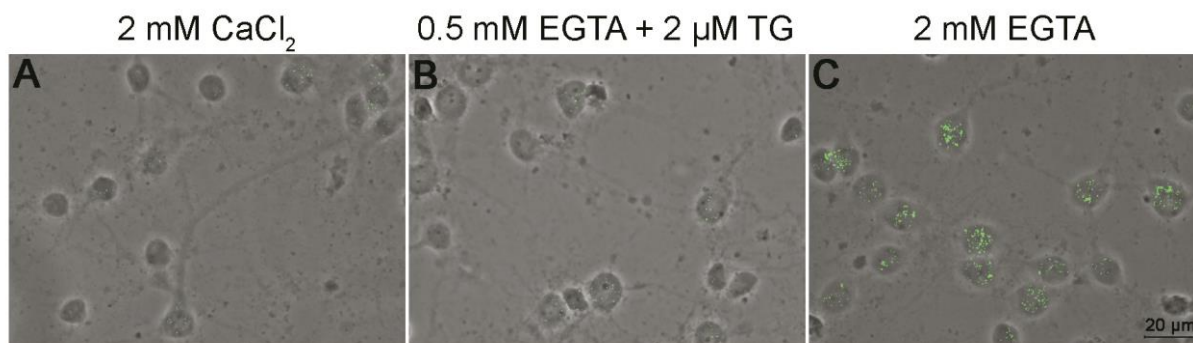
Powyżej opisane wyniki skłoniły mnie do zadania pytania o funkcje białek STIM w neuronach. W ramach tych badań postanowiliśmy sprawdzić, czy STIM1 i STIM2 biorą udział w neuronalnym SOCE. W niepobudliwych komórkach interakcja białek STIM z ORAI1 jest kluczowym elementem SOCE (Liou i wsp. 2005, Mercer i wsp. 2006, Soboloff i wsp. 2006), ale w neuronach jego mechanizm nie był wyjaśniony. Dlatego w celu realizacji tego zadania zdecydowałam się na wykonanie analizy lokalizacji białek STIM i ORAI1 w komórkach kontrolnych (Ca^{2+} znajduje się w ER), w komórkach stymulowanych tapsygariną (TG) - inhibitorem Ca^{2+} -ATPazy w ER (aby opróżnić ER z Ca^{2+}) oraz w komórkach inkubowanych 2 mM EGTA (w celu obniżenia stężenia Ca^{2+} w przestrzeni zewnątrzkomórkowej powodując również pasywny niewielki wypływ Ca^{2+} z ER do cytozolu) oraz na zastosowaniu systemu przejściowej nadprodukcji białka STIM i ORAI1 w neuronach. Konstrukty kodujące prawidłowe i zmutowane białka STIM z metką YFP na N-końcu (za peptydem sygnałowym) otrzymaliśmy z laboratorium Tobiasa Meyera z Stanford University. W neuronach kontrolnych z nadekspresją YFP-STIM1, YFP-STIM2 i ORAI1 białka były równomiernie rozmieszczone. Natomiast pod wpływem zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} pojawiły się miejsca ko-lokalizacji YFP-STIM1 i YFP-STIM2 z ORAI1 w błonie komórkowej tzw. „punkta” na skutek translokacji białek w komórce. Wyrzut Ca^{2+} z ER przez TG spowodował znaczny wzrost liczby punktów STIM1/ORAI1 w porównaniu do liczby punktów utworzonych przez STIM2 i ORAI1 (**Klejman, Gruszczynska-Biegała i wsp. 2009, Gruszczynska-Biegała i wsp. 2011**) (Ryc. 1). W ten sposób ujawniono różną wrażliwość w/w kompleksów na TG, co z kolei sugerowało różne funkcje białka STIM1 i STIM2. Ponadto, dominujący pozytywnie mutant YFP-STIM1(D76A), który przesyła sygnał o braku Ca^{2+} niezależnie od rzeczywistego poziomu Ca^{2+} w ER, indukował tworzenie punktów z ORAI1 nawet przed opróżnieniem Ca^{2+} z ER. Warto zauważyć, że barwienie ORAI1 było jednakowo rozłożone i nie zmieniało się po opróżnieniu ER przez TG w neuronach transfekowanych wyłącznie ORAI1 (**Klejman, Gruszczynska-Biegała i wsp. 2009**). W przypadku obniżenia zewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} przy użyciu 2 mM EGTA obserwowałam wzrost liczby kompleksów YFP-STIM2/ORAI1 a obniżenie YFP-STIM1/ORAI1 (**Gruszczynska-Biegała i wsp. 2011**). Na podkreślenie zasługuje fakt, że nasz zespół był pierwszym, który pokazał, iż mechanizm SOCE, oparty o białka STIM i który został odkryty w komórkach niepobudliwych, funkcjonuje również w neuronach (**Klejman, Gruszczynska-Biegała i wsp. 2009**).



Ryc. 1. Interakcja YFP-STIM1 z ko-ekspresjonowanym ORAI1 w neuronach traktowanych 2 mM Ca^{2+} lub 3 μM tapsyarginą (TG) w obecności 0,5 mM EGTA wzrasta po opróżnieniu ER z Ca^{2+} .

Aby potwierdzić opisane interakcje białek sztucznie ekspresjonowanych w dalszej kolejności podjęłam się badania białek endogennych wykorzystując czułą metodę ligacji zbliżeniowej (ang. *Proximity Ligation Assay*, PLA) (Söderberg i wsp. 2006). Metoda PLA umożliwia detekcję, wizualizację i ocenę ilościową oddziaływań między dwoma endogennymi białkami *in situ* za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (Gruszczyńska-Biegała J., Kuźnicki J. 2013), jednak aby otrzymać wiarygodne wyniki potrzebna jest optymalizacja i dostosowanie metody do własnego układu badawczego. Zestaw odczynników do PLA zawiera drugorzędowe przeciwciała z dołączonymi do nich oligonukleotydami. Sygnał od każdej pary drugorzędowych przeciwciał wizualizowany jest jako pojedynczy fluorescencyjny punkt tylko w przypadku związania się przeciwciał w bardzo niewielkiej odległości od siebie (<40 nm). W opisanym badaniu, te punkty to kompleksy między białkami STIM i ORAI1. Pokazałam, że w hodowlach neuronów kory mózgu szczura białko STIM1 i STIM2 może wchodzić w interakcję z białkiem ORAI1 tworząc kompleksy. Aby potwierdzić, że obserwowane punkty PLA stanowią autentyczne kompleksy STIM/ORAI1 użyłam różnych par przeciwciał anti-STIM1, anti-STIM2 i anti-ORAI1. Liczba punktów STIM2/ORAI1 zwiększyła się w odpowiedzi na obniżony poziom zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} (przy użyciu 2 mM EGTA lub 5 μM BAPTA-AM), ale już nie w odpowiedzi na TG (Ryc. 2). Wynik ten potwierdziłam metodą ko-immunoprecypitacji endogennych białek STIM2 i ORAI1. Wykazałam również silną korelację pomiędzy liczbą kompleksów STIM2/ORAI1 a odpowiedzią wapniową badaną w tej samej komórce neuronalnej. W przypadku STIM1, zaobserwowałam mały wzrost punktów po potraktowaniu neuronów EGTA. Jednak największa liczba kompleksów STIM1/ORAI1 tworzyła się po indukcji SOCE przy użyciu TG, a inkubacja tych komórek z inhibitorem SOCE – ML9 spowodowała spadek liczby punktów prawie do poziomu przed indukcją SOCE. Wyniki te silnie wskazują, że endogenne STIM1 lub STIM2 i endogenne ORAI1

oddziałują ze sobą w neuronach tworząc heterokompleksy głównie w ciele neuronów. Wyniki te pokazały, że z pomocą PLA możliwa jest detekcja oddziaływań endogennych białek w odpowiedzi na różne czynniki (**Gruszczynska-Biegała J., Kuźnicki J. 2013**). Ponadto liczba tych kompleksów dobrze korelowała z liczbą kompleksów egzogennych białek w transfekowanych neuronach (**Gruszczynska-Biegała i wsp. 2011**).



Ryc. 2. Identyfikacja kompleksów utworzonych między endogennym STIM2 i ORAI1 przy użyciu PLA. Po opróżnieniu Ca^{2+} ze środowiska zewnętrznego liczba tworzonych kompleksów STIM2-ORAI1 widocznych jako zielone punkta wzrasta (C).

By dalej potwierdzić różne funkcje białek STIM1 i STIM2 w neuronalnym SOCE, o czym świadczył zróżnicowany udział STIM w tworzeniu kompleksów z ORAI, postanowiłam zbadać wpływ tych białek na wewnątrzkomórkowy poziom Ca^{2+} w neuronach. W tym celu zastosowałam technikę przyżyciowego obrazowania wapnia i sondę jonów Ca^{2+} - Fura-2AM. Badałam zmiany homeostazy wapniowej w odpowiedzi na TG aby opróżnić Ca^{2+} z ER, a następnie napływ zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} przez kanały SOC po dodaniu Ca^{2+} . Aby sprawdzić udział białek STIM w neuronalnym SOCE, poziom białek STIM1, STIM2 i ORAI1 był podwyższany przez transfekcje plazmidami kodującymi te białka. Pod wpływem TG poziom SOCE był inny w neuronach transfekowanych YFP-STIM1 i ORAI1, w porównaniu z neuronami transfekowanymi YFP-STIM2 i ORAI1 lub odpowiednimi neuronami kontrolnymi. Wyrzut wapnia z ER przez TG spowodował bowiem zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} w neuronach z nadekspresją YFP-STIM1 i ORAI1, ale nie YFP-STIM2 i ORAI1 w porównaniu do poziomu Ca^{2+} neuronów kontrolnych. Ponadto, inhibitory SOCE (ML9 i 2-APB) redukowały napływ Ca^{2+} do neuronów z YFP-STIM1 i ORAI oraz neuronów kontrolnych, ale nie wpływały na komórki transfekowane YFP-STIM2 i ORAI1. Natomiast w neuronach transfekowanych konstrukcjami YFP-STIM2/ORAI1 zaobserwowałam większy poziom spoczynkowego Ca^{2+} oraz większy wzrost konstytutywnego napływu Ca^{2+} niż dla neuronów z nadekspresją YFP-STIM1/ORAI1 (**Gruszczynska-Biegała i wsp. 2011**). Wyniki te pokazują, że cytoplazmatyczny

spoczynkowy poziom Ca^{2+} oraz SOCE w neuronach można modulować poprzez nadekspresję białek STIM. Ponadto, wyniki zawarte w pracy dodały też istotną wiedzę na temat funkcjonowania białek STIM1 i STIM2 w neuronach oraz wykazały, że SOCE zależne od białek STIM istnieje w szczurzych neuronach korowych (**Gruszczynska-Biegała i wsp. 2011**) tak jak w komórkach niebudliwych (Soboloff i wsp. 2006, Brandman i wsp. 2007). Praca ta jest do roku 2019 najczęściej cytowaną pracą mojego autorstwa z ponad 100 cytowaniami w bazie Google Scholar i ok. 80 cytowaniami w bazach Web of Science czy Scopus.

Podsumowując, w prezentowanych dotychczas badaniach wykazałam, że oba białka STIM1 i STIM2 odgrywają rolę w neuronalnej homeostazie wapniowej, ale mimo podobnej struktury i występowania w ER białka te pełnią różną funkcję. W szczurzych neuronach korowych STIM1 głównie tworzy kompleksy z ORAI1 i aktywuje SOCE dopiero po całkowitym opróżnieniu Ca^{2+} z ER, czyli odpowiedzialny jest za utrzymanie poziomu jonów Ca^{2+} w ER. Natomiast, STIM2 reguluje spoczynkowy poziom wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} i aktywuje konstytutywny napływ Ca^{2+} po niewielkim opróżnieniu Ca^{2+} z ER.

Oddziaływanie białek STIM z kanałami wapniowymi

4. **Gruszczynska-Biegała J.***, Sładowska M., Kuznicki J. (2016) AMPA Receptors Are Involved in Store-Operated Calcium Entry and Interact with STIM Proteins in Rat Primary Cortical Neurons. *Front. Cell. Neurosci.* 10:251, *Frontiers*, * autor korespondujący
5. Serwach K., **Gruszczynska-Biegała J.*** (2019) STIM Proteins and Glutamate Receptors in Neurons: Role in Neuronal Physiology and Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2289, *MDPI*, * autor korespondujący; artykuł poglądowy napisany na zaproszenie

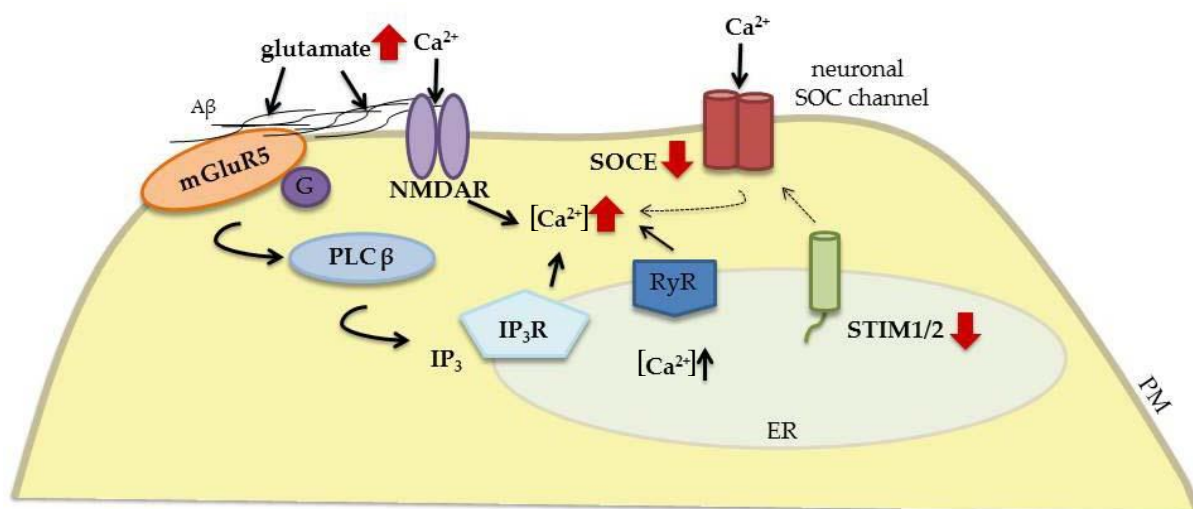
Oddziaływanie białek STIM z ORAI w błonie komórkowej, jak wspomniałam wyżej, jest kluczowym elementem homeostazy wapniowej w komórkach niebudliwych (Soboloff i wsp. 2006). W przeciwieństwie do nich, w neuronach napływ Ca^{2+} odbywa się głównie poprzez dobrze zdefiniowane napięciowo-zależne kanały wapniowe (VGCC), jak również poprzez receptorowe kanały jonowe sprzężone z neuroprzekaznikami (np. receptory glutaminianowe takie jak receptory AMPA lub NMDA) lub wymienniki jonowe (Putney 2003).

Z tego względu, iż neurony cechują się znacznie szerszym spektrum kanałów wapniowych niż komórki niebudliwie, a regulacja stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia pełni u nich szczególnie istotną rolę, zaczęłam zastanawiać się, czy w neuronach białka STIM będą aktywować i wiązać się z kanałami wapniowymi innymi niż kanały ORAI. W trakcie realizacji projektu habilitacyjnego w literaturze pojawiły się prace podejmujące ten temat, w tym nasze badania (**Gruszczynska-Biegała i wsp. 2016**). Po objęciu przeze mnie stanowiska adiunkta w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej i. M. Mossakowskiego PAN skorzystałam z zaproszenia do napisania pracy pogładowej do specjalnego numeru *International Journal of Molecular Sciences*. Dokonałiśmy w niej przeglądu aktualnego stanu wiedzy na temat związku między białkami STIM a receptorami wapniowymi w neuronach zarówno w warunkach fizjologicznych (np. plastyczność synaptyczna, transmisja synaptyczna i transport receptorów), jak i patologicznych (np. urazowe uszkodzenie mózgu, niedokrwienie mózgu, choroba Alzheimera (Ryc. 3) i choroba Huntingtona) (**Serwach i Gruszczynska-Biegała 2019**). W omawianej pracy, przeprowadziliśmy interpretację tych wyników oraz wyników własnych.

Różne doniesienia literaturowe pokazują, że białka STIM1, poza ORAI, oddziałują również z podjednostkami VGCC typu L ($Ca_v1.2$) (Park i wsp. 2010, Harraz i Altier 2014) i typu T ($Ca_v3.1$) (Nguyen i wsp. 2013) hamując ich aktywność i prowadząc do ich internalizacji, co związane jest z całkowitą utratą funkcji przez te kanały. Ostatnie badania pokazują również, że aktywacja NMDAR i VGCC w neuronach indukuje wpływ Ca^{2+} z ER aktywując białka STIM1, które to z kolei hamują VGCC i zwiększają objętość ER w kolcach dendrytycznych, powiększając tym samym rozmiar samych kolców dendrytycznych (Dittmer i wsp. 2017). Inne badania postulują, że synaptopodina reguluje sygnały Ca^{2+} rekrutując STIM1 do gęstości postsynaptycznej (PSD; Korkotian i wsp. 2014, Segal i Korkotian 2014). Ng i wsp. wykazał, że aktywacja receptorów mGluR z grupy I stymuluje oligomeryzację STIM1 i jego transport do PM (Ng i wsp. 2011). Jest to zgodne z badaniami grupy Hartmann, która odkryła, że STIM1 jest odpowiedzialne za zależną od mGluR1 aktywację TRPC, transmisję synaptyczną w neuronach Purkinjego mózdzku i koordynację ruchową (Hartmann i wsp. 2014). STIM1 w kompleksie z TRPC1 asocjuje i hamuje VGCC typu L jak $Ca_v3.1$, co jest niezbędne do ochrony neuronów dopaminergicznych w regionie istoty czarnej (Sun i wsp. 2017).

W przypadku STIM2 zaobserwowano obniżenie jego poziomu w stanach patologicznych w hipokampie myszy w modelu choroby Alzheimera (AD) i korze pacjentów z AD (Sun i wsp. 2014, Popugaeva i wsp. 2015) (Ryc. 3) oraz jego wzrost w padaczkę

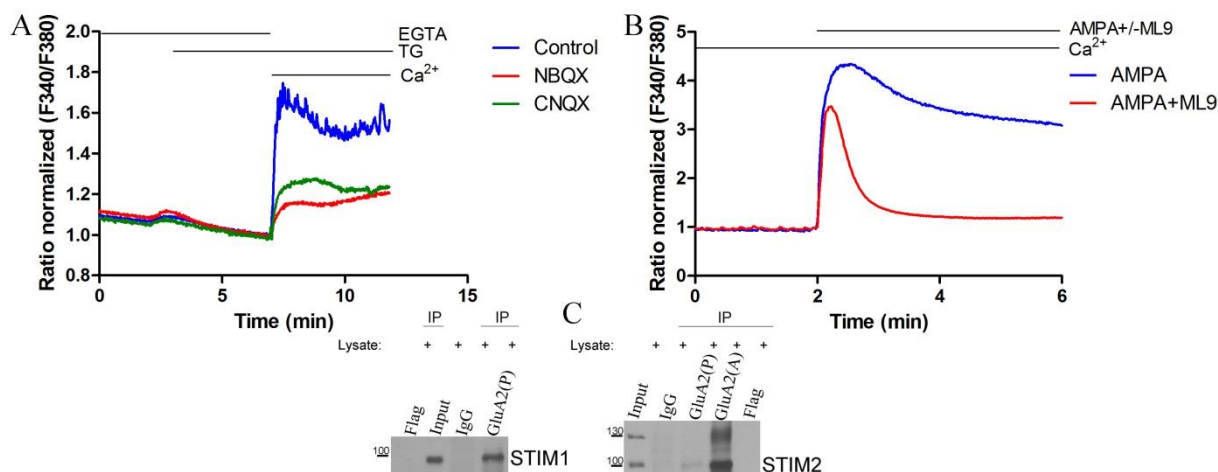
(Steinbeck i wsp. 2011). Ponadto, zaburzenia szlaku sygnałowego obejmującego STIM2 doprowadziły do utraty grzybkowatych kolców dendrytycznych (Sun i wsp. 2014, Popugaeva i wsp. 2015, Garcia-Alvarez i wsp. 2015, Zhang i wsp. 2015), poważnych uszkodzeń mózgu (Gemes i wsp. 2011, Rao i wsp. 2015) i deficytu pamięci przestrzennej (Berna-Erro i wsp. 2009). Powszechnie uważa się, że stabilizacja grzybkowatych kolców dendrytycznych zapobiega utracie pamięci u pacjentów z AD. Nadekspresja zarówno białka STIM1 jak i STIM2 zapobiega utracie tych kolców (Tong i wsp. 2016, Zhang i wp. 2015). Te obserwacje wskazują, że białka STIM są ważnym składnikiem procesów molekularnych związanych z tworzeniem połączeń neuronalnych i uczeniem się.



Ryc. 3. Udział białek STIM, SOCE oraz receptorów glutaminianowych w zaburzeniu regulacji stężenia Ca^{2+} cytozolu w chorobie Alzheimera. Zwiększenie ekspresji β -amyloidu ($\text{A}\beta$) jak i uwalniania glutaminianu prowadzi do nadmiernej stymulacji receptorów glutaminianowych (np. NMDAR i mGluR5). Nadaktywacja NMDAR powoduje nadmierny napływ Ca^{2+} do komórki (czerwone strzałki skierowane w górę). Z kolei aktywacja mGluR5 zwiększa stężenie Ca^{2+} w ER. Oba szlaki przyczyniają się do przeładunku komórki jonami Ca^{2+} . Skutkiem wzrostu Ca^{2+} w ER jest obniżenie ekspresji białek STIM, a w konsekwencji obniżenie SOCE (czerwone strzałki skierowane w dół).

Nasze badania ujawniły, że w pierwotnych neuronach korowych szczura zarówno STIM1 jak i STIM2 potrafią oddziaływać z endogennymi podjednostkami receptora AMPA – GluA1 i GluA2 (Gruszczynska-Biegała i wsp. 2016) (Ryc. 4C). Ponadto, uzyskałam dane sugerujące, że białka STIM mogą kontrolować aktywowany przez AMPA napływ wapnia do neuronów jako część procesu SOCE. W badaniach wykorzystałam technikę przyżyciowego pomiaru zawartości cytozolu Ca^{2+} w pojedynczych komórkach z użyciem indykatora ratiometrycznego Fura-2AM. W celu zbadania związku pomiędzy białkami SOCE a receptorami AMPA przeprowadziłam pomiary z indukcją SOCE w obecności inhibitora receptorów AMPA (NBQX i CNQX). W ten sposób wykazałam hamujący wpływ antagonistów AMPAR na napływ Ca^{2+} w procesie SOCE w neuronach korowych (Ryc. 4A).

Efektu takiego nie zaobserwowaliśmy w komórkach Hela, co potwierdza, iż ich wpływ na homeostazę wapniową w neuronach dokonuje się za pośrednictwem kanałów jonotropowych. Powyższe wyniki sugerują, że AMPAR są zaangażowane w SOCE w neuronach korowych szczura i mogą być aktywowane po wyczerpaniu zapasów Ca^{2+} indukowanych przez TG (Gruszczynska-Biegała i wsp. 2016). Z drugiej strony STIM2 wydaje się funkcjonować w sposób niezależny od SOCE (Garcia-Alvarez i wsp. 2015). Garcia-Alvarez i wsp. wykazali, że STIM2 może oddziaływać z 1-ą podjednostką AMPAR (GluA1) regulując jej zależną od cAMP / PKA fosforylację oraz zwiększając poziom GluA1 w błonie komórkowej poprzez stymulowanie egzocytozy i hamowanie endocytozy (Garcia-Alvarez i wsp. 2015, Yap i wsp. 2017). Moje badania wykazały również, że inhibitory SOCE (ML9 i SKF96365) zmniejszają napływ Ca^{2+} indukowany przez AMPA (Gruszczynska-Biegała i wsp. 2016). Wyniki omawianej pracy sugerują, że w hodowlach neuronalnych napływ Ca^{2+} po stymulacji przez AMPA zachodzi głównie przez receptory AMPA i kanały SOC, a nie przez receptory NMDA ani przez VGCCs (Ryc. 4B). Wskazują one również na powiązanie napływu Ca^{2+} podczas SOCE z aktywacją jonotropowych receptorów AMPA.



Ryc. 4. Związek pomiędzy SOCE, białkami STIM a receptorem AMPA. (A) SOCE jest obniżone w obecności antagonistów receptorów AMPA. (B) Napływ Ca^{2+} indukowany przez AMPA jest obniżony w obecności inhibitora SOCE. (C) Endogenne białka STIM1 i STIM2 asocjują z GluA2 (2 podjednostką receptora AMPA).

Wyniki opisane w tej części pokazują, że mechanizmy homeostazy wapniowej w neuronach są bardziej skomplikowane niż przewidywano, a między receptorem AMPA lub VGCC i SOCE zależnym od białek STIM istnieją dodatkowe związki. Dane te są szczególnie istotne dla lepszego zrozumienia roli białek STIM w homeostazie wapniowej neuronów jak również dla poznania mechanizmu SOCE, który jest zaburzony w różnych chorobach neurodegeneracyjnych. Warto też podkreślić, że pojawiające się dowody wskazują na rolę białek STIM i receptorów glutaminianowych w fizjologii i patologii neuronów, czyniąc je potencjalnymi celami terapeutycznymi.

PODSUMOWANIE

Prace badawcze przedstawione jako osiągnięcie naukowe habilitantki zbliżają nas do zrozumienia mechanizmów regulujących pojemnościowy napływ Ca^{2+} (SOCE) w neuronach, ze szczególnym uwzględnieniem udziału białek STIM w tym procesie i w homeostazie wapniowej neuronów oraz ich roli w funkcjonowaniu komórek nerwowych. Powyższe badania wykazały, że białka STIM1 i STIM2:

- są obecne w neuronach korowych i hipokampalnych mózgow gryzoni (choć mają różne występowanie),
- są zaangażowane w homeostazę wapniową i mogą funkcjonować w neuronach jak w komórkach niepobudliwych,
- mogą aktywować kanały ORAI1 pełniąc przy tym różne role w procesie SOCE,
- mogą oddziaływać z AMPAR regulując napływ Ca^{2+} do komórki.

Te i inne doniesienia wskazują, że problem białek STIM oraz SOCE w homeostazie wapniowej neuronów wymaga dalszych szczegółowych badań, które pozwolą nam lepiej zrozumieć specyfikę tych procesów w neuronach. Nasze wyniki stanowią również punkt wyjścia do bardziej szczegółowych badań mających na celu np. zidentyfikowanie kolejnych białek biorących udział w SOCE jako efektorów tego procesu lub modulatorów poziomu i aktywności białek STIM, co może dalej być wykorzystane do znalezienia związków chemicznych przeciwdziałających zmianom homeostazy wapniowej związanym np. z AD – chorobą będącą najbardziej popularną formą otępienia osób po 65 roku życia. Przykładem mogą być nasze najnowsze nieopublikowane dane, które wskazują, że białka STIM regulują napływ Ca^{2+} przez receptor NMDA tworząc z nim kompleksy, co z kolei może być istotne w chorobach związanych z ekscytotoksycznością i zwiększeniem liczby jonów Ca^{2+} wchodzących do komórki występujących przy udarze mózgu lub chorobach neurodegeneracyjnych np. AD (Gruszczyńska-Biegała i wsp., w przygotowaniu). Jest to o tyle istotne, iż dotychczasowe badania kliniczne skierowane na białko beta-amyloid nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Stąd konieczność zidentyfikowania innych celów terapeutycznych. Zatem, oprócz wartości poznawczej wyniki tego osiągnięcia mogą znaleźć w przyszłości zastosowanie kliniczne.

LITERATURA

- Albert A. P., Saleh S. N., Peppiatt-Wildman C. M., Large W. A. (2007) Multiple activation mechanisms of store-operated TRPC channels in smooth muscle cells. *J. Physiol.* 583, 25–36.
- Baba A., Yasui T., Fujisawa S., Yamada R. X., Yamada M. K., Nishiyama N., Matsuki N., Ikegaya Y. (2003) Activity-evoked capacitative Ca²⁺ entry: implications in synaptic plasticity. *J Neurosci* 23:7737-7741.
- Berna-Erro A., Braun A., Kraft R., Kleinschnitz C., Schuhmann M.K., Stegner D., Wultsch T., Eilers J., Meuth SG., Stoll G., Nieswandt B. (2009) STIM2 regulates capacitative Ca²⁺ entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. *Sci Signal* 2, ra67.
- Berridge M. J., Lipp P., Bootman M. D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21.
- Blaustein M. P., Golovina V. A. (2001) Structural complexity and functional diversity of endoplasmic reticulum Ca(2+) stores. *Trends Neurosci* 24:602-608.
- Bojarski L., Herms J., Kuznicki J. (2008) Calcium dysregulation in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 52:621-633.
- Bojarski L., Pomorski P., Szybinska A., Drab M., Skibinska-Kijek A., Gruszczynska-Biegała J., Kuznicki J. (2009) Presenilin-dependent expression of STIM proteins and dysregulation of capacitative Ca²⁺ entry in familial Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1793:1050-1057.**
- Brandman O., Liou J., Park W.S., Meyer T. (2007) STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell*, 131, 1327-1339.
- Dittmer P. J., Wild A. R., Dell'Acqua M. L., Sather W. A. (2017) STIM1 Ca²⁺ Sensor Control of Ltype Ca²⁺-Channel-Dependent Dendritic Spine Structural Plasticity and Nuclear Signaling. *Cell Rep.* 19:321-334
- Emptage N. J., Reid C. A. and Fine A. (2001) Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca²⁺ entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron* 29, 197-208.
- Garcia-Alvarez G., Lu B., Yap K.A., et al. (2015) STIM2 regulates PKA dependent phosphorylation and trafficking of AMPARs. *Mol Biol Cell* 26, 1141-1159
- Gemes G., Bangaru M.L., Wu H.E., Tang Q., Weihrauch D., Koopmeiners A.S., Cruikshank JM., Kwok WM., Hogan QH. (2011) Store-operated Ca²⁺ entry in sensory neurons: functional role and the effect of painful nerve injury. *J Neurosci* 31, 3536-3549.
- Harraz O. F. and Altier C. (2014) STIM1-mediated bidirectional regulation of Ca(2+) entry through voltage-gated calcium channels (VGCC) and calcium-release activated channels (CRAC). *Front Cell Neurosci.* 24;8:43.
- Hartmann J., Karl R.M., Alexander R.P., Adelsberger H., Brill M.S., Ruhlmann C., Ansel A., Sakimura K., Baba Y., Kurosaki T., Misgeld T., Konnerth A. (2014) STIM1 controls neuronal Ca²⁺ signaling, mGluR1-dependent synaptic transmission, and cerebellar motor behavior. *Neuron* 82, 635-644.
- Liao Y., Erxleben C., Abramowitz J., Flockerzi V., Zhu M. X., Armstrong D. L., Birnbaumer L. (2008) Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2895-2900.
- Liou J., Kim M. L., Heo W. D., Jones J. T., Myers J. W., Ferrell J. E., Jr., Meyer T. (2005) STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol* 15:1235-1241.
- Keil J. M., Shen Z., Briggs S. P., Patrick G.N. (2010) Regulation of STIM1 and SOCE by the Ubiquitin-Proteasome System (UPS). *PLoS ONE*, 5, e13465.
- Korkotian E., Frotscher M. and Segal M. (2014) Synaptopodin regulates spine plasticity: mediation by calcium stores. *J Neurosci* 34, 11641-11651.
- Mercer J. C., Dehaven W. I., Smyth J. T., Wedel B., Boyles R. R., Bird G. S., Putney J. W., Jr. (2006) Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J Biol Chem* 281:24979-24990.
- Ng A. N., Krogh M., Toresson H. (2011) Dendritic EGFP-STIM1 activation after type I metabotropic glutamate and muscarinic acetylcholine receptor stimulation in hippocampal neuron. *J Neurosci Res.* 89(8):1235-44.
- Nguyen N., Biet M., Simard E., Beliveau E., Francoeur N., Guillemette G., Dumaine R., Grandbois M., Boulay G. (2013) STIM1 participates in the contractile rhythmicity of HL-1 cells by moderating T-type Ca²⁺ channel activity. *Biochim Biophys Acta* 1833, 1294-1303.
- Park C. Y., Hoover P. J., Mullins F. M., Bachhawat P., Covington E. D., Raunser S., Walz T., Garcia K. C., Dolmetsch R. E., Lewis R. S. (2009) STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* 136:876-890.
- Park C. Y., Sheheglvitov A., Dolmetsch R. (2010) The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels. *Science* 330:101-105.

- Popugaeva E., Pchitskaya E., Speshilova A., Alexandrov S., Zhang H., Vlasova O., Bezprozvanny I. (2015) STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity. *Mol Neurodegener* 10, 37.
- Prakriya M., Feske S., Gwack Y., Srikanth S., Rao A., Hogan P. G. (2006) Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443:230-233.
- Putney J. W., Jr. (2003) Capacitative calcium entry in the nervous system. *Cell Calcium* 34:339-344.
- Rao W., Zhang L., Peng C., Hui H., Wang K., Su N., Wang L., Dai SH., Yang YF., Chen T., Luo P., Fei Z. (2015) Downregulation of STIM2 improves neuronal survival after traumatic brain injury by alleviating calcium overload and mitochondrial dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 1852, 2402-2413.
- Roos J., DiGregorio P. J., Yeromin A. V., Ohlsen K., Lioudyno M., Zhang S., Safrina O., Kozak J. A., Wagner S. L., Cahalan M. D., Velicelebi G., Stauderman K. A. (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* 169:435-445.
- Sammels E., Parys J. B., Missiaen L., De Smedt H., Bultynck G. (2010) Intracellular Ca²⁺ storage in health and disease: a dynamic equilibrium. *Cell Calcium* 47:297-314.
- Segal M. and Korkotian E. (2014) Endoplasmic reticulum calcium stores in dendritic spines. *Front Neuroanat* 8, 64.
- Skibinska-Kijek A., Wisniewska M.B., Gruszczynska-Biegała J., Methner A. and Kuznicki J. (2009) Immunolocalization of STIM1 in the mouse brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 69, 413-428.**
- Soboloff J., Spassova M. A., Tang X. D., Hewavitharana T., Xu W., Gill D. L. (2006) Orai1 and STIM1 reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* 281:20661-20665.
- Söderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstråle K, Leuchowius K-J et al (2006) Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* 3:995–1000.
- Steinbeck J.A., Henke N., Opatz J., Gruszczynska-Biegała J., Schneider L., Theiss S., Hamacher N., Steinfarz B., Golz S., Brüstle O., Kuznicki J., Methner A. (2011) Store-operated calcium entry modulates neuronal network activity in a model of chronic epilepsy. *Exp Neurol* 232, 185-194.**
- Sun S., Zhang H., Liu J., Popugaeva E., Xu N., Feske S., White C., Bezprozvanny I. (2014) Reduced Synaptic STIM2 Expression and Impaired Store-Operated Calcium Entry Cause Destabilization of Mature Spines in Mutant Presenilin Mice. *Neuron*, 82, 79–93.
- Sun Y., Zhang H., Selvaraj S., Sukumaran P., Lei S., Birnbaumer L., Singh B.B. (2017) Inhibition of L-Type Ca²⁺ Channels by TRPC1-STIM1 Complex Is Essential for the Protection of Dopaminergic Neurons. *J Neurosci.*, 37, 3364–3377.
- Tong B.C., Lee C.S., Cheng W.H., Lai K.O., Foskett J.K., Cheung K.H. (2016) Familial Alzheimer's disease-associated presenilin 1 mutants promote-secretase cleavage of STIM1 to impair store-operated Ca²⁺ entry. *Sci. Signal* 9, ra89.
- Williams R. T., Manji S. S., Parker N. J., Hancock M. S., Van Stekelenburg L., Eid J. P., Senior P. V., Kazenwadel J. S., Shandala T., Saint R., Smith P. J., Dziadek M. A. (2001) Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochem J* 357:673-685.
- Wojda U., Salinska E., Kuznicki J. (2008) Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life* 60:575-590.
- Wu M. M., Buchanan J., Luik R. M., Lewis R. S. (2006) Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol* 174:803-813.
- Varnai P., Hunyady L., Balla T. (2009) STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends Pharmacol Sci* 30:118-128.
- Venkiteswaran G., Hasan G. (2009) Intracellular Ca²⁺ signaling and store-operated Ca²⁺ entry are required in *Drosophila* neurons for flight. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 10326–10331.
- Yap K. A., Shetty M. S., Garcia-Alvarez et al. (2017) STIM2 regulates AMPA receptor trafficking and plasticity at hippocampal synapses. *Neurobiol Learn Mem.* 138:54-61.
- Zhang H., Wu L., Pchitskaya E., Zakharova O., Saito T., Saido T., Bezprozvanny I. (2015) Neuronal Store-Operated Calcium Entry and Mushroom Spine Loss in Amyloid Precursor Protein Knock-In Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 35(39):13275-86.
- Zhang S. L., Yu Y., Roos J., Kozak J. A., Deerinck T. J., Ellisman M. H., Stauderman K. A., Cahalan M. D. (2005) STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature* 437:902-905.

4b. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Poniżej przedstawiłam w skrócie moje pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze, związane tematycznie z osiągnięciem naukowym będącym podstawą ubiegania się o stopień

doktora habilitowanego, i powstałe po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, w wyniku uczestnictwa w zakończonych projektach.

Szczegółowa lokalizacja białka STIM1 w mózgu

Skibinska-Kijek A., Wisniewska M.B., **Gruszczynska-Biegała J.**, Methner A., Kuznicki J. (2009) Immunolocalization of STIM1 in the mouse brain. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* vol. 69, 413-28

W ramach przeprowadzonych badań opisaliśmy szczegółowo lokalizację białka STIM1 w skrawkach mózgu myszy, wykazując, iż istnieją rejony mózgu, w których neurony zawierają albo niski, albo wysoki poziom tego białka (**Skibinska-Kijek i wsp. 2009**). Immunohistochemiczna analiza skrawków pokazała, że STIM1 ma szerokie występowanie w mózgu myszy C57Bl6/J, jednak największą jego immunoreaktywność obserwujemy w neuronach Purkiniego mózdzku. Wysoki i umiarkowany poziom STIM1 zaobserwowano w podwzgórzcu, hipokampie, korze mózgowej i w korowo-przyśrodkowym ciele migdałowatym. Wzgórze i podstawno-boczne ciało migdałowate charakteryzowało się niskim immunosygnalem STIM1. W celu sprawdzenia specyficzności przeciwciała przeciw STIM1, kontrolne barwienia wykonano na skrawkach z mózgowi myszy STIM1^{-/-} (bez STIM1). Wyniki te potwierdziliśmy metodą western blot i Real Time PCR, wykazując obecność STIM1 i STIM2 w różnych strukturach mózgu. Wysoki poziom białka STIM w niektórych regionach mózgu sugeruje ważną rolę, jaką może pełnić STIM1 w tych obszarach mózgu np. w procesie SOCE (**Skibinska-Kijek i wsp. 2009**).

SOCE i białka STIM w chorobach neurodegeneracyjnych

Grzeczkwicz A.*, **Gruszczynska-Biegała J.***, Czeredys, M., Kwiatkowska, A., Strawski, M. Szklarczyk, M. Koźbiał, M., Kuźnicki, J., Granicka L.H. (2019) Polyelectrolyte Membrane Scaffold Sustains Growth of Neuronal Cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107A: 839–850, * pierwszy współautor

Bojarski L., Pomorski P., Szybinska A., Skibinska-Kijek A., **Gruszczynska-Biegała J.** and Kuznicki J. (2009) Presenilin-dependent expression of STIM proteins and dysregulation of capacitative Ca²⁺ entry in familial Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*; 1793:1050-1057.

Czeredys M., **Gruszczynska-Biegała J.**, Schacht T., Methner A. And Kuznicki J. (2013) Expression of genes encoding the calcium signalosome in cellular and transgenic models of Huntington's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 6:42.

Steinbeck J., Henke N., Opatz J., **Gruszczynska-Biegała J.**, Schneider L., Theiss S., Hamacher N., Steinfarz B., Golz S., Brüstle O., Kuźnicki J., & Methner A. (2011) Store-operated calcium entry modulates neuronal network activity in a model of chronic epilepsy. *Experimental Neurology*; 232(2):185-194.

W trakcie realizacji projektów badawczych, współpracowałam również z zespołem badawczym kierowanym przez Prof. Ludomirę Granicką z Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcz PAN w Warszawie. W ramach tej współpracy powstała publikacja, w której metodą western blot oraz immunofluorescencji wykazałam, że zakładane przeze mnie pierwotne hodowle szczurzych neuronów korowych mogą wzrastać również na podłożach z polielektrolitowymi membranami. Membrany te mogą stanowić w przyszłości dobre biokompatybilne i biodegradalne podłoże dla wzrostu neuronów np. podczas leczenia uszkodzeń mózgu (**Grzeczkwicz, Gruszczynska-Biegała i wsp. 2019**).

Liczba osób dotkniętych chorobami neurodegeneracyjnymi zwiększa się w związku ze starzeniem się populacji ludzkiej. Choroba Alzheimera (AD), podobnie jak Huntingtona (HD), jest postępującym zaburzeniem neurodegeneracyjnym. HD jest dziedziczną chorobą neurodegeneracyjną wywoływaną przez nadmiernie wydłużony poliglutaminianowy N-koniec białka huntingtyny (HTT). Istnieje wiele hipotez próbujących wytłumaczyć mechanizm powstawania AD. Najbardziej powszechną jest hipoteza uznająca za główny czynnik wywołujący śmierć neuronów w chorobie AD - peptyd beta-amyloid₄₂, powstający w wyniku proteolizy APP. Jednak mimo bardzo intensywnych badań nie ma leków na te choroby, jak również nie ma leków opóźniających ich rozwój. Uważamy, iż ścieżki związane z homeostazą jonów wapnia (Ca^{2+}) mogą być potencjalnym miejscem dla nowych metod leczenia tych chorób, ponieważ jednym ze zjawisk obserwowanych na poziomie komórkowym w tych chorobach są zaburzenia homeostazy i sygnalizacji wapniowej. Celem naszych badań było dążenie do wyjaśnienia molekularnych mechanizmów tych zjawisk oraz identyfikacja genów i białek biorących udział w tych procesach. W szczególności identyfikujemy te geny i białka, które biorą udział w procesie SOCE, i sprawdzamy, które z nich mogą stać się miejscem uchwytu dla nowych leków.

Większość pacjentów z otępieniem to osoby z AD, której głównym czynnikiem ryzyka jest wiek. Presenilina jest głównym składnikiem γ -sekreazy, której zmieniona w wyniku mutacji aktywność uznawana jest za kluczową w rozwoju rodzinnej (genetycznie uwarunkowanej) AD. Nasze badania nad wpływem preseniliny 1 (PS1) i preseniliny 2 (PS2) na procesy komórkowej homeostazy wapniowej potwierdziły, iż w przypadku wszystkich analizowanych mutacji w PS1 ludzkich limfocytów B pochodzących od pacjentów z rodzinną

postacią choroby Alzheimera (FAD) ma miejsce statystycznie istotne obniżenie SOCE oraz ekspresji białka STIM2 (**Bojarski i wsp. 2009**). W wyniku kolejnych badań stwierdziliśmy, iż mutacje w PS1 w transfekowanych ludzkich embrionalnych komórkach nerkowych HEK293 prowadzą do obniżenia SOCE w tych komórkach podobnie jak czynią to mutacje w endogennej PS1 w limfocytach B. Wykazano, że poziom białka STIM2 jest również obniżony w komórkach z mutacją w preseniline 1. Z kolei, w liniach mysich embrionalnych fibroblastów (MEF), pozbawionych przynajmniej jednej z presenilin lub obydwu, miało miejsce zwiększenie napływu wapnia do cytoplazmy, w porównaniu z linią kontrolną. Potwierdziło to udział presenilin w utrzymaniu prawidłowej homeostazy wapniowej komórki. W komórkach MEF pozbawionych obydwu presenilin poziom ekspresji białka STIM2 był obniżony, zaś STIM1 - podwyższony. Powyższe wyniki wskazują na rolę białek STIM w zależnych od preseniliny zmianach SOCE w AD (**Bojarski i wsp. 2009**).

Badania, w których miałam możliwość uczestniczyć podczas dwumiesięcznego stażu w laboratorium profesora Axela Methner'a na Uniwersytecie Heinrich Heine w Dusseldorfie w Niemczech wykazały, że w komórkach PC12 potraktowanych Ponasteronem A w celu indukowania ekspresji zmutowanej formy ludzkiej huntingtyny (HTT) napływ Ca^{2+} z przestrzeni zewnątrzkomórkowej po opróżnieniu przez tapsigarginę wewnątrzkomórkowych zapasów Ca^{2+} był znacznie zmniejszony względem komórek nieindukowanych. Wyniki te świadczą o obniżeniu SOCE na skutek zwiększonej ekspresji zmutowanej huntingtyny. Warto podkreślić jest fakt, że te badania stały się podstawą do poprowadzenia w naszym laboratorium dalszych badań na różnych modelach HD i opublikowaniem pracy eksperymentalnej (**Czeredys i wsp. 2013**). Następnie staraliśmy się znaleźć przyczynę tych różnic. Stosując ilościową analizę PCR w czasie rzeczywistym, zbadano ekspresję mRNA genów związanych z SOCE w komórkach indukowanych i nieindukowanych. Dane z PCR następnie potwierdzono metodą ilościowej analizy western blot. Zatem zmniejszoną aktywność SOCE, którą wykazałam w indukowanych komórkach PC12, można wytłumaczyć obniżoną w nich ekspresją Orai2, Septyny 4 i Kalmoduliny 3. Ponadto, użyliśmy specjalnie zaprojektowane mikromacierze TaqMan o niskiej gęstości zawierające sondy dla 96 genów do badania tych genów w prążkowie modelu myszy HD YAC128 (z nadekspresją zmutowanej huntingtyny). W ten sposób wykazaliśmy tam zwiększoną ekspresję białka CacyBP/SIP oraz białka związanego z huntingtyną 1 (HAP1) na poziomie mRNA i na poziomie białka, które można uznać za potencjalny cel terapeutyczny w HD. Powyższe dane wskazują, że rozregulowanie homeostazy Ca^{2+} w HD koreluje ze zmianami w ekspresji genów sygnalizacji wapniowej (**Czeredys i wsp. 2013**).

Zaburzenia homeostazy wapniowej obserwuje się w przebiegu wielu chorób ośrodkowego układu nerwowego, nie tylko w AD czy HD ale również w przebiegu niedokrwienia, urazowego uszkodzenia mózgu (TBI) oraz napadów padaczkowych. Nasze badania nad mechanizmem SOCE i białkami STIM prowadziliśmy równoległe w współpracy z grupą Axela Methner'a z Uniwersytetu Heinrich Heine w Dusseldorfie. Wyniki zostały opisane w pracy **Steinbeck i wsp. 2011** i dotyczyły związku SOCE z epilepsją. Nasze wyniki potwierdziły obecność SOCE i ekspresję czujników wapnia STIM1 i STIM2 w neuronach i astrocytach. Badając ekspresję STIM1 i STIM2 w ludzkich tkankach, po raz pierwszy wykazaliśmy bardzo wyraźną ekspresję STIM1 mRNA w ludzkim mózgu. Wykazałam także, iż neurony i astrocyty różnią się drastycznie pod względem regulacji wewnątrzkomórkowej homeostazy Ca^{2+} , a szczególnie SOCE. W neuronach bowiem, ale nie w astrocytach, SOCE wydaje się być zaangażowany w utrzymanie Ca^{2+} w stanie stacjonarnym. Wyniki kolejnych doświadczeń z wykorzystaniem płytki pokrytej elektrodami MEA (multi-electrode arrays) sugerowały udział SOCE w aktywności sieci neuronowej będącej ważnym wyznacznikiem epilepsji. To skłoniło nas do zbadania poziomu ekspresji białek STIM1 i STIM2 w warunkach patologicznej nadpobudliwości, która okazała się być podwyższona w szczurzych modelach padaczki i próbkach mózgu uzyskanych od pacjentów z padaczką. Nasze wyniki wskazują na SOCE, który moduluje aktywność sieci neuronowych *in vitro* i *in vivo*, jako potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu przewlekłej padaczki (**Steinbeck i wsp. 2011**). Z przedstawionych danych możemy wywnioskować, że białka STIM oraz SOCE w znaczący sposób przyczyniają się do homeostazy jonów Ca^{2+} i aktywności sieci neuronowej w warunkach fizjologicznych i patologicznych.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji tych badań wyjaśniają molekularne podstawy procesu SOCE oraz pozwalają lepiej zrozumieć rolę białek STIM1 i STIM2 w homeostazie wapniowej komórek. Ponadto, dane przedstawione w moim autoreferacie sugerują, że zmiany w homeostazie wapniowej, w tym i w SOCE zależnym od białek STIM, mogą być przyczyną niektórych zmian patologicznych obserwowanych w niektórych chorobach. Jak wspomniałam wcześniej, do tej pory nie wynaleziono skutecznego sposobu leczenia chorób neurodegeneracyjnych, dlatego istnieje zapotrzebowanie na nowe skuteczne terapie. W związku z powyższym, badając SOCE i białka STIM można będzie być może wyjaśnić mechanizmy patogenezы uczestniczące w rozwoju tych chorób.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

a) Aktywny udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

Poniżej umieszczono jedynie konferencje, na których habilitantka przedstawiła prezentacje plakatowe osobiście:

1. **Gruszczynska-Biegala J.**, Strucinska K., Majewski L., Maciag F., Kuznicki J. (2018) NMDA receptors – the new partners of STIM proteins in rat primary cortical neurons. XIV International Symposium on Molecular basis of pathology and therapy in neurological disorders, Warszawa, Polska, *Folia Neuropathologica*. Vol. 56(3), 237
2. **Gruszczynska-Biegala J.**, Sladowska M., Kuznicki J. (2017) Store-Operated Calcium Entry is modified by ionotropic receptors in rat primary cortical neurons. 2nd Nencki Symposium on: Neurons in action, Warszawa, Polska
3. **Gruszczynska-Biegala J.**, Sladowska M., Maciag F., Kuznicki J. (2017) Cross-talk between STIM proteins and ionotropic receptors in neurons. XIII Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego (PTBUN), Warszawa, Polska; *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, Suppl.1 , Vol. 77, p. CXIII
4. **Gruszczynska-Biegala J.**, Sladowska M., Kuznicki J. (2016) AMPA receptors are involved in STIM-dependent Store-Operated Calcium Entry in rat primary cortical neurons. XIII International Symposium on Molecular basis of pathology and therapy in neurological disorders, Warszawa, Polska, *Folia Neuropathologica*. Vol. 54(3), 314
5. **Gruszczynska-Biegala J.**, Sladowska M., Kuznicki J. (2016) AMPA receptors modulate Store-Operated Calcium Entry and interact with STIMs in rat cortical neurons. Polish-French scientific Conference “Alzheimer’s disease and neurodegenerative disorders: what challenges for tomorrow?”, Warszawa, Polska, *Folia Neuropathologica*. Vol. 54(4), 435
6. **Gruszczynska-Biegala J.**, Sladowska M., Kuznicki J. (2016) Relationship between AMPA receptors and STIM-dependent Store-Operated Calcium Entry in neurons. 14th International Meeting of the European Calcium Society “Calcium Signaling in Renaissance”, Valladolid, Hiszpania
7. **Gruszczynska-Biegala J.**, Sladowska M., Kuznicki J. (2016) Involvement of AMPA receptors in STIM-dependent Store-Operated Calcium Entry in Neurons. FASEB Science Research Conference “Calcium and Cell Function”, Lizbona, Portugalia
8. **Gruszczynska-Biegala J.**, Sladowska M., Kuznicki J. (2015) Sensitivity of Store-Operated Calcium Entry to antagonists of ionotropic receptors. XII Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego (PTBUN), Gdańsk, Polska, *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. Vol. 75(S), 40
9. **Gruszczynska-Biegala J.**, Sladowska M., Kuznicki J. (2015) Effect of ionotropic receptors on neuronal SOCE. EMBO Young Scientists Forum, Warszawa, Polska
10. **Gruszczynska-Biegala J.**, Sladowska M., Kuznicki J. (2014) Involvement of calcium channels and receptors in neuronal SOCE. XII International Symposium on Molecular basis of pathology and therapy in neurological disorders. Warszawa, Polska, *Folia Neuropathologica*. Vol. 52(3), 330-331
11. **Gruszczynska-Biegala J.**, Kuznicki J. (2012) Endogenous STIM2 and endogenous ORAI1 form a calcium-sensitive and thapsigargin-insensitive complex in cortical neurons. XI International Symposium on Molecular basis of pathology and therapy in neurological disorders. Warszawa, Polska, *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. Vol. 73(1), 49
12. **Gruszczynska-Biegala J.**, Kuznicki J. (2012) In neurons endogenous STIM2 interacts with endogenous ORAI1 independently of Ca²⁺ store depletion. 12th Symposium of

- the European Ca²⁺ Society on Calcium-Binding Proteins in Normal and Transformed Cells. Toulouse, Francja
13. **Gruszczyńska-Biegała J.**, Kuznicki J. (2012) Interaction between endogenous STIM2 and ORAI1 proteins in primary cortical neurons. 4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels, Isparta, Turcja, *Cell Membranes and Free Radical Research* Vol. 4(1), 37
 14. **Gruszczyńska-Biegała J.**, Pomorski P., Kuznicki J. (2012) Stim1 and Stim2 behave differently in neurons during store-operated calcium channel. HEALTH-PROT/SMM Workshop: "From gene to phenotype - interdisciplinary research in molecular biology and biomedicine", Warszawa, Polska
 15. **Gruszczyńska-Biegała J.**, Kuznicki J. (2011) Proximity Ligation Assay visualizes in cultured neurons the interaction between endogenous ORAI1 and STIM proteins. X Międzynarodowy Kongres Polskiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego (PTBUN), Łódź, Polska, *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. Vol. 71(S), 45
 16. **Gruszczyńska-Biegała J.**, Jaworska A., Szybińska A., Honarnejad K., Herms J., Kuznicki J. (2011) Ca²⁺ release from ER stores in Alzheimer's disease models. 8th IBRO, Florencja, Włochy
 17. **Gruszczyńska-Biegała J.**, Pomorski P., Kuznicki J. (2011) STIM1 and STIM2 behave differently in neurons during store operated calcium entry. EMBO Young Scientists Forum, Warszawa, Polska
 18. **Gruszczyńska-Biegała J.**, Pomorski P., Kuznicki J. (2010) STIM1 and STIM2 behave differently in neurons during store operated calcium entry. X International Symposium on Molecular Basis of Pathology and Therapy in Neurological Disorders, Warszawa, Polska, *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. Vol. 71(1), 160
 19. **Gruszczyńska-Biegała J.**, Pomorski P., Kuznicki J. (2010) Function of STIM2 in neurons. 11th Symposium of the European Ca²⁺ Society on Calcium-Binding Proteins in Normal and Transformed Cells, Warszawa, Polska, *Acta Biochimica Polonica*. Vol. 57, 6
 20. **Gruszczyńska-Biegała J.**, Klejman M., Skibińska-Kijek A., Pomorski P., Wisniewska M., Misztal K., Blazejczyk M., Bojarski L. & Kuznicki J. (2009) STIM1 exhibits different neuronal expression than STIM2 and shows puncta-like colocalization with ORAI1 upon depletion of ER calcium store. Gordon Research Conference on Ca²⁺ Signaling, Lucca, Włochy
 21. **Gruszczyńska-Biegała J.**, Klejman M., Skibińska-Kijek A., Pomorski P., Wisniewska M., Misztal K., Blazejczyk M., Bojarski L. & Kuznicki J. (2009) STIM1 exhibits different neuronal expression than STIM2 and shows puncta-like colocalization with ORAI1 upon depletion of ER calcium store. 8th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Getynga, Niemcy
 22. **Gruszczyńska-Biegała J.**, Klejman M., Skibińska-Kijek A., Pomorski P., Wisniewska M., Kuznicki J. (2009) STIM1 and STIM2 in mouse brain. Polish-Ukrainian research collaboration meeting, Warszawa, Polska
 23. **Gruszczyńska-Biegała J.**, Klejman M., Skibińska-Kijek A., Wisniewska M.B., Misztal K., Blazejczyk M., Bojarski L., Kuznicki J. (2008) STIM1 and STIM2 are present in mouse brain neurons and show puncta-like colocalization with ORAI1 upon calcium depletion of ER. 10th Symposium of the European Ca²⁺ Society on Calcium-Binding Proteins in Normal and Transformed Cells, Leuven, Belgia
 24. Klejman M., Skibińska-Kijek A., **Gruszczyńska-Biegała J.**, Wisniewska M., Bojarski L., Kuznicki J. (2008) ER calcium sensor STIM2, but not STIM1 is preferentially expressed in hippocampus of mouse brain. *PROMEMORIA – General Assembly*, Milton Keynes, Anglia

25. **Gruszczyńska-Biegała J.**, Burgess S.A., Strzelecka-Golaszewska H. and Trinick J. (2005) Structure of modified actin filaments studied by electron microscopy and single particle image processing. XXXIV European Muscle Conference, Debrecen, Węgry
26. **Gruszczyńska-Biegała J.**, Burgess S.A., Knight P.J., Strzelecka-Golaszewska H. and Trinick J. (2004) Single particle image processing of muscle thin filaments. XXXIII European Muscle Conference, Elba, Włochy

b) Międzynarodowe i krajowe nagrody za działalność naukową

1. Nagroda naukowa za publikacje o wysokim IF wykazane w sprawozdaniu półrocznym za 2019 r. w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
2. Grant SONATA BIS 7, Narodowe Centrum Nauki, 2018-2023
3. Nagroda za wybitne wystąpienie ustne ogłoszone podczas konferencji (the 14th International Symposium on Molecular basis of pathology and therapy in neurological disorders), Warsaw, Poland, 10.2018
4. Stypendium Federacji Amerykańskich Towarzystw Biologii Eksperymentalnej (FASEB) na udział w konferencji (FASEB Science Research Conference on Calcium and Cell Function), Lizbona, Portugalia, 06.2016
5. Nagroda za 3-ie miejsce w kategorii najlepszy poster na konferencji (4th International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels), Isparta, Turcja, 06.2012
6. Grant SONATA 1, Narodowe Centrum Nauki, 2011-2018
7. Stypendium Przewodniczącego Gordonowskiej Konferencji Naukowej (GRC) na udział w konferencji (Gordon Research Conference on Calcium Signalling), Lucca, Włochy, 06.2009
8. Stypendium Niemieckiego Towarzystwa Badań Układu Nerwowego dla młodych badaczy na udział w konferencji (8th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society oraz 32nd Göttingen Neurobiology Conference) Getynga, Niemcy, 03.2009
9. Stypendium Europejskiego Towarzystwa Wapniowego (ECS) dla młodych naukowców za ich zaangażowanie w nauce i na udział w konferencji (10th Symposium of the European Calcium Society on Calcium-Binding Proteins in Normal and Transformed Cells), Leuven, Belgia, 09.2008
10. Nagroda zespołowa Dyrektora Wydziału Nauk Biologicznych Polskiej Akademii Nauk za cykl badań „Strukturalne podstawy generacji ruchu przez białka motoryczne miozynę i aktynę”. Warszawa, Polska, 10.2005
11. Stypendium Uni Europejskiej z programu *Marie Skłodowska-Curie Actions* (6-y Program ramowy) na odbycie stażu badawczego na Uniwersytecie w Leeds, Anglia, 02.2005 - 05.2005
12. Nagroda Dyrektora Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN za wybitne dokonania naukowe oraz za szczególnie wydajną pracę na rzecz Instytutu w roku 2004, Warszawa, Polska, 02.2005
13. Stypendium Uni Europejskiej z programu *Marie Skłodowska-Curie Actions* (6-ty Program ramowy) na odbycie stażu badawczego na Uniwersytecie w Leeds, Anglia, 10.2003 - 05.2004
14. Stypendium naukowe, Politechnika Wrocławska, Polska, 1994 – 1999 (w trakcie studiów magisterskich)
15. Dyplom Akademickiego Stowarzyszenia Studentów Chemii, Politechnika Wrocławska, Polska 1995

Pozostałe informacje o aktywności naukowej habilitantki znajdują się w załączniku 4 (Wykaz osiągnięć naukowych).

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę.

Moja praca dydaktyczna jest ograniczona w związku z pracą w instytutach o charakterze *stricte* badawczym bez obowiązku dydaktycznego. Jednak staram się przekazywać swoją wiedzę studentom, dla których byłam/jestem opiekunem naukowym i/lub promotorem prac magisterskich i doktorskiej.

a) Opieka naukowa nad studentami w toku specjalizacji

1. Opiekun naukowy (05.2014-08.2015) i promotor pracy magisterskiej pani Marii Śladowskiej pt. „Pojemnościowy napływ Ca^{2+} i receptory AMPA w szczurzych neuronach korowych”, praca obroniona z wynikiem bardzo dobrym we wrześniu 2015 roku w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu
2. Opiekun naukowy (06.2017-06.2018) i promotor pracy magisterskiej pani Klaudii Strucińskiej pt. „Badanie oddziaływań białek STIM z receptorem NMDA w szczurzych neuronach korowych”, z uwagi na wyjazd studentki do USA na roczny staż w ramach programu BioLAB Fullbright (do otrzymania tego wyróżnienia w dużej mierze przyczyniło się doświadczenie naukowe laureatki zdobyte podczas wykonywania badań pod moim kierunkiem) praca obroniona z wynikiem bardzo dobrym w terminie późniejszym (po powrocie magistrantki ze stażu) we wrześniu 2019 roku w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Zwierzętach
3. Opiekun naukowy praktykantów: Anna Szydłowska (07.2011), Paulina Rowicka (09.2012), Dagmara Kaczyńska (08.2014), Małgorzata Lubas (07-08.2017), Julia Dziubek (07.2018), Izabela Kulig (06-07.2019)
4. Opiekun naukowy laureatów programu „Grasz o staż”: Łukasz Bijoch (11-12.2015), Agata Szłaga (08.2016), Katarzyna Kita (09.2016)

b) Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego

mgr. Karolina Serwach – doktorantka II roku studiów szkoły doktorskiej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie; od 10.2018; tytuł rozprawy doktorskiej pt. „Rola białek STIM w transporcie receptorów NMDA w kolcach dendrytycznych szczurzych neuronów korowych”, rola habilitantki: aktualnie opiekun naukowy i promotor pomocniczy
– doktorantka II roku studiów Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich POWER Och!DOK w Warszawie; od 10.2018; rola habilitantki: opiekun naukowy

c) Pozostałe osiągnięcia dydaktyczne i w zakresie popularyzacji nauki

1. Zaplanowanie i prowadzenie pokazowych doświadczeń z wykorzystaniem techniki western blot dla doktorantów Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich POWER Och!DOK, IMDiK (10.2019, 11.2019)
 2. Przygotowanie i prowadzenie zajęć dla uczniów szkół podstawowych podczas XXIII Festiwalu Nauki, IMDiK (2019)
 3. Joanna Gruszczyńska-Biegała (2018) – biogram wydany w Złotej Księdze 100 rocznicy powstania Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego; Wydawnictwo Helion S.A.
 4. Joanna Gruszczyńska-Biegała (2011) „Badania nad wapniem przybliżają do wyjaśnienia choroby Alzheimera” – artykuł popularnonaukowy, który ukazał się na stronie PAP Nauka w Polsce
(<http://naukawpolsce.pap.pl/aktualnosci/news.383254.badania-nad-wapniem-przyblizaja-do-wyjasnienia-choroby-alzheimera.html>)
 5. Joanna Gruszczyńska-Biegała, Jacek Kuźnicki (2011) „Odkrycie polskiego zespołu pomoże w diagnostyce choroby Alzheimera” - artykuł popularnonaukowy, który ukazał się na stronie Fundacji na rzecz Nauki Polskiej
 6. Zaplanowanie i prowadzenie zajęć laboratoryjnych dla stypendystów Krajowej Fundacji na Rzecz Dzieci w MIBMiK, Warszawa (2008)
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.
1. Przygotowanie wniosku o uzyskanie zgody Ministra Środowiska na zamknięte użycie mikroorganizmów genetycznie zmodyfikowanych zaliczonych do II kategorii zagrożenia w Pracowni Biologii Molekularnej IMDiK (decyzja nr 141/2018)
 2. Działalność organizacyjna: we wrześniu 2018 r. po uzyskaniu stanowiska adiunkta w Pracowni Biologii Molekularnej IMDiK zorganizowałam samodzielnie funkcjonujące miejsce pracy: zakup wyposażenia (umeblowania, plastików, odczynników, drobnego sprzętu), rekrutacja doktoranta, wdrażanie nowych procedur, kierowanie grantem NCN
 3. Przygotowanie zgłoszenia udziału jako pracodawca w ogólnopolskim programie „Grasz o staż”, czego wynikiem było przyjęcie dwóch stypendystów na płatne praktyki (2016)
 4. Uzyskanie w roku 2015 od Polskiego Towarzystwa Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych wyznaczeń dla osoby planującej procedury i doświadczenia oraz wykonującej procedury na zwierzętach wg. wymagań ujętych Ustawą z dnia 15 stycznia 2015 r.
 5. Przygotowanie wniosków o uzyskanie zgody I Warszawskiej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach na przeprowadzanie doświadczeń na zwierzętach w Laboratorium Neurodegeneracji MIBMiK (uchwała nr 900/2008, nr 10/2010, nr 206/2011, nr 656/2015).

.....
y. Gruszczyńska-Biegała
.....
(podpis wnioskodawcy)