

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. LUDWIKA HIRSZFELDA POLSKIEJ AKADEMII NAUK



Joanna Skrzymowska

**„Ocena biochemiczna i czynnościowa
efektów mutacji punktowej Arg1098Gln
łańcucha alfa II spektryny w modelach *in vitro* i *in vivo*”**

„Biochemical and functional assessment
of the spectrin alpha II chain Arg1098Gln point mutation effects
in *in vitro* and *in vivo* models”

Rozprawa doktorska
napisana pod kierunkiem
prof. dr. hab. Arkadiusza Miążka

Wrocław 2023

Podziękowania

Pragnę podziękować mojemu promotorowi Panu prof. dr hab. Arkadiuszowi Miązkowi za przyjęcie mnie do swojego laboratorium, zapewnienie swobody działania, przekazaną wiedzę oraz za motywację i merytoryczne dyskusje będące wielką pomocą w zrealizowaniu pracy doktorskiej.

Dziękuję mgr Michałowi Zalasowi i mgr Miriam Hippner-Kunickiej za wspólną zgodną pracę i wszelkie okazane mi wsparcie. Dziękuję również dr Marcie Lisowskiej za wprowadzenie mnie w działanie laboratorium.

Dziękuję dr hab. Tomaszowi Goszczyńskiemu, dr hab. Krzysztofowi Grzymajło i dr Michałowi Majkowskiemu za chęć współpracy i umożliwienie mi dostępu do wielu metod instrumentalnych.

Bardzo dziękuję wszystkim członkom zespołu Laboratorium Immunologii Molekularnej i Komórkowej: dr hab. Małgorzacie Cebrat, dr Agnieszce Łaszkiewicz, dr Joannie Niedbalskiej-Tarnowskiej, mgr Kindze Adamczyk-Węglarzy i mgr Robertowi Mroczkowi za wspaniałą atmosferę pracy, wszelką pomoc i porady jakich mi udzielili.

W związku z realizacją pracy doktorskiej powstały następujące publikacje:

1. Miazek A, Zalas M, **Skrzymowska J**, Bogin BA, Grzymajło K, Goszczynski TM, Levine ZA, Morrow JS, Stankewich MC. Age-dependent ataxia and neurodegeneration caused by an α II spectrin mutation with impaired regulation of its calpain sensitivity. *Sci Rep*. 2021 Mar 31; 11(1):7312.
2. **Skrzymowska J**, Zalas M, Goszczyński TM, Miazek A. An alpha II spectrin mutant peptide with unstable scaffold structure and increased sensitivity to calpain cleavage. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Oct 8; 581:68-73.
3. Zalas M, **Skrzymowska J**, Miążek A, Miazek A. Progressive Ataxia, Memory Impairments, and Seizure Episodes in Spna2 R1098Q Mouse Variant Affecting Alpha II Spectrin's Scaffold Stability. *Brain Sciences*. 2023 Feb 3; 13(2):261.

Badania przeprowadzono w ramach projektu:

Opus 2017/25/B/NZ3/03012 – „Charakterystyka fenotypu myszy niosących spontaniczną, dominującą mutację punktową genu Spna2, kodującego łańcuch alfa II spektryny nieerytrocytarnej”; Kierownik projektu: prof. dr hab. Arkadiusz Miążek

Spis treści

1. Wykaz skrótów	11
2. Streszczenie	16
Summary	17
3. Wstęp	18
3.1. Spektryny jako białka cytoszkieletu komórkowego (ewolucja i konserwacja ewolucyjna spektryn, budowa powtórzenia spektrynowego, znaczenie struktury spektryn dla pełnionej funkcji)	18
3.1.1 Spektryny erytrocytarne versus spektryny nieerytrocytarne zbieżności i różnice w budowie	18
3.1.2 Powtórzenie spektrynowe, struktura, funkcja	19
3.1.3 Inne domeny funkcjonalne spektryn	25
Domena ABD	25
Motyw EF	25
Domena PH	25
Domena SH3	26
Domena CCC	26
3.1.4 Białka oddziałujące ze spektrynami i znaczenie fizjologiczne tych oddziaływań	27
Kalmodulina	27
Ankiryna	27
Aktyna	28
Białko 4.1	28
Adducyna	29
3.1.5 Degradacja proteolityczna spektryn (znaczenie w zdrowiu i chorobie, mechanizmy regulacji)	30
Kalpainy	30
Degradacja spektryn przez kalpainy	31
Regulacja kalpainowej proteolizy spektryn przez kalmodulinę	32
Regulacja kalpainowej proteolizy spektryn przez fosforylację	32
Fizjologiczne role kalpainy	33
Patologiczna aktywność kalpainy	34
Kalpastatyna	36
Alternatywne metody modulowania proteolizy	37
Degradacja spektryn przez kaspazy	37

3.2. Spontaniczne mutacje α II-spektryny zaburzające stabilność powtórzenia spektrynowego i ich konsekwencje fizjologiczne.....	38
3.3. Myszy szczepu R1098Q jako model zwierzęcy ludzkich dominujących spektrynopatii <i>SPTAN1</i>	41
3.3.1 Opisane modele spektrynopatii <i>SPTAN1</i>	41
3.3.2 Myszy szczepu R1098Q.....	42
3.3.3 Modelowanie strukturalne fragmentu z mutacją R1098Q.....	42
3.3.4 Myszy transgeniczne Prp-hCAST.....	43
4. Cel pracy.....	45
5. Materiały i metody.....	46
5.1. Materiały.....	46
5.1.1 Odczynniki.....	46
5.1.2 Składy buforów, żeli rozdzielających i pożywek:.....	49
5.1.3 DNA.....	52
Wektor pGEX-6P-1.....	52
Sekwencje oligonukleotydów.....	52
Sekwencja cDNA.....	52
5.1.4 Bakterie.....	53
E. coli HST08Stellar™ Competent Cells.....	53
E. coli BL21 CodonPlus®-RIL.....	53
5.1.5 Myszy.....	53
5.1.6 Pierwotne hodowle komórkowe.....	54
5.1.7 Białka.....	54
Kalmodulina.....	54
Kalpaina.....	54
Kaspaza 3.....	54
Kinaza c-Src.....	54
5.1.8 Zestaw do pomiaru aktywności kalpainowej.....	54
5.2. Metody.....	55
5.2.1 Modelowanie strukturalne.....	55
5.2.2 Otrzymywanie białek rekombinowanych.....	55
Klonowanie.....	55
Transformacja bakterii.....	55
Hodowla i indukcja ekspresji białek rekombinowanych.....	55

Oczyszczanie białek fuzyjnych.....	56
Trawienie enzymatyczne białek fuzyjnych w celu odciążenia transferazy glutationowej (GST)	56
5.2.3 Chromatografia size-exclusion (SEC).....	56
5.2.4 Dichroizm kołowy (CD)	57
5.2.5 Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)	57
5.2.6 Rezonans Plazmonów Powierzchniowych (SPR).....	57
5.2.7. Pomiary stabilności białek - Prometheus	58
5.2.8 Rozdział i wizualizacja białek	59
5.2.9 Fosforylacja kinazą c-Src – western blot anti-PY	59
5.2.10 Trawienie kalpainą – western blot anti myc-tag.....	60
5.2.11 Trawienie kaspazą 3	61
5.2.12 Trawienie kalpainą w protokole ELISA.....	62
5.2.13 Trawienie kaspazą 3 w protokole ELISA	62
5.2.14 Pierwotna hodowla komórek neuronalnych.....	63
5.2.15 Barwienie komórek neuronalnych	63
5.2.16 Genotypowanie myszy R1098Q+hCAST	64
5.2.17 Test aktywności kalpainsy w lizatach z mózdków myszy R1098Q+hCAST	64
5.2.18 Test dot blot anti-SNTF na lizatach z mózdków myszy R1098Q+hCAST	65
5.2.19 Test rotarod myszy R1098Q+hCAST.....	65
5.2.20 Test siły mięśniowej myszy R1098Q+hCAST.....	65
5.2.21 Test footprint analizy chodu myszy R1098Q+hCAST	66
5.2.22 Metody statystyczne	66
6. Wyniki.....	68
6.1 Białka SPTAN1.2/myc.....	68
6.2 Modelowanie strukturalne	69
6.3 Dichroizm kołowy, DLS i chromatografia size-exclusion.....	70
6.3 SPR – Rezonans plazmonów powierzchniowych.....	74
6.4 Pomiary stabilności białek - Prometheus	77
6.5 Fosforylacja kinazą c-Src – western blot	79
6.6 Trawienie kalpainą – western blot.....	80
6.7 Trawienie kalpainą - ELISA	81
6.8 Trawienie kaspazą 3 - ELISA.....	83
6.9 Trawienie kaspazą 3 – barwienie azotanem srebra	84
6.10 Barwienie komórek mózgowych na obecność produktów degradacji alfa spektryny	85

6.11 Genotypowanie myszy R1098Q+hCAST.....	86
6.12 Test aktywności kalpainowej.....	87
6.13 Test dot blot anty-SNTF na lizatach z mózdków myszy R1098Q+hCAST	88
6.14 Rotarod myszy R1098Q+hCAST	89
6.15 Siła chwytu.....	89
6.16 Test footprint - analiza chodu	91
7. Dyskusja i wnioski.....	93
7.1 Stabilność struktury	93
7.2 Oddziaływania regulacyjne	94
7.3 Proteoliza	95
7.4 Produkty proteolizy	96
7.5 Aktywność kalpajny i proteoliza α II-spektryny a stany neurodegeneracyjne.....	97
7.6 Znaczenie udziału proteolizy α II-spektryny wobec neurodegeneracji.....	99
7.7 Inhibicja kalpajny przez kalpastatynę a fenotyp R1098Q	99
7.8 Ataksja u myszy R1098Q.....	101
7.9 Utrata komórek Purkiniego.....	102
7.10 Znaczenie proteolizy domeny CCC.....	103
7.11 Znaczenie proteolizy α II-spektryny dla wariantu R1098Q.....	104
8. Podsumowanie	105
9. Spis rycin i tabel.....	106
10. Piśmiennictwo	108

1. Wykaz skrótów

A - alanina

aa. (ang.aminoacids) - aminokwasy

ABD (ang.actin binding domain) – domena wiążąca aktynę

AE (ang. anion exchanger) – wymiennik jonowy

AgNO₃ – azotan srebra

AIS (ang.axon inicial segment) – początkowy fragment aksonu

AMPA (ang. α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) – receptor kwasu glutaminowego aktywowany przez jego sztuczny analog AMPA

APS (ang. ammonium persulfate) – nadsiarczan amonu

Arp 2/3 - (ang. Actin related protein) – kompleks białkowy, uczestniczący w regulacji cytoszkieletu aktynowego

Arp1 - (ang. Actin related protein) – mini filament, składnik dynaktyny, części kinezyn, białek kroczących poruszających się po cytoszkielecie

Asn – asparagina

ATP (ang. adenosine triphosphate) - adozynotrifosforan

ATPaza (ang. ATPase – adenosine triphosphatase) – adozynotrifosfataza

BSA (ang. bovine serum albumin) – surowicza albumina wołowa

C – cysteina – oznaczenie jednoliterowe

C. elegans - Caenorhabditis elegans – gatunek niepaszytniczego nicienia, żyjącego w błocie

C57BL/6Spna2mutR1098Q – mysz model z mutacją R1098Q w genie Spna2

C57BL6J – (C57 black 6 Jackson laboratory) szczep myszy laboratoryjnych

Ca²⁺ - kation wapnia

CaCl₂ - chlorek wapnia

CaM (ang. calmodulin - calcium-modulated protein) – kalmodulina

CaMK – (ang. Calmodulin dependent protein kinase) – kinaza białek zależna od kalmoduliny

CaMK2 - (ang. Calmodulin dependent protein kinase II) – druga kinaza białek zależna od kalmoduliny

CAPN1 – (ang. Calcium Activated Protein) – białko aktywowane jonami wapnia – podjednostka 1

CAPN2 - (ang. Calcium Activated Protein) – białko aktywowane jonami wapnia – podjednostka 2

CAPN4 - (ang. Calcium Activated Protein) – białko aktywowane jonami wapnia – podjednostka 4

CARD – (ang. caspase activation and recruitment domain) – domena aktywująca i rekrutująca kaspazy

CCC (ang. Ca²⁺-dependent binding site for calmodulin and cleavage sites for caspases and calpain domain) – domena z miejscem wiązania kalmoduliny zależnym od wapnia i z miejscami wiązania dla kaspaz i kalpajny

CD (ang. circular dichroism)

CD (ang. cluster of differentiation)

CD151 - platelet-endothelial tetraspan antigen 3

CD4 - T-cell surface glycoprotein CD4

CD8 - T-cell surface glycoprotein CD8

CD80 - T- activation antigen CD80

CD86 - T lymphocyte -lymphocyte activation antigen CD86

Cdk5- (ang. cyclin-dependent kinase 5) – kinaza cyklinozależna 5

c-Fos – czynnik transkrypcyjny

CH (ang. calponin homology domain) 1,2– domena homologiczna do kalponiny 1,2

CHAPS – (ang.3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)

- 3-[(3-cholamidopropyl)dimetyloammonio]-1-propanosulfonian)

- CHL1** - (ang. ATP-dependent DNA helicase CHL1) – helikaza DNA zależna od ATP-CHL1
- c-Jun** – czynnik transkrypcyjny
- C-koniec** – karboksylowy koniec peptydu
- CM5** – chip do SPR pokryty dekstranem z resztami karboksymetylowymi
- CRMP-2** (ang. Collapsin response mediator protein 2) – białko pośredniczące w odpowiedzi na kolapsynę
- c-Src** (ang. proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src) – proto-onkogenowa kinaza białek tyrozynowych Src
- CTD** (ang. carboxy-terminal domain) - domena C-końcowa
- D** - asparaginian
- DABCO** (ang. (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane) - 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
- DAPI** (ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole) - 4',6-diamidyno-2-fenylindol
- DBD** (ang. DNA binding domain) – domena wiążąca DNA
- DLS** (ang. dynamic light scattering) – dynamiczne rozpraszanie światła
- DNA** (ang. deoxyribonucleic acid) – kwas deoksyrybonukleinowy
- DTT** (ang. dithiothreitol) - ditiotreitol
- E. coli** (łac. Escherichia coli) – pałeczka okrężnicy
- EAAT4** (ang. excitatory amino acid transporter 4) – transporter glutaminianu
- EDC** (ang. N-Ethyl-N'-dimethylaminopropylcarbodiimide) N-etylo-N'-dimetyloaminopropylkarbodiimid
- EDTA** (ang. ethylenediaminetetraacetic acid) – kwas etylenodiaminotetraoctowy
- EEG** –(ang. electroencephalography) - elektroencefalografia
- EF-hand** – motyw dłoni EF (od helis E i F parwalbuminy)
- EGF** (ang. epidermal growth factor) – epidermalny czynnik wzrostu
- EGTA** (ang. ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) – kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N'-tetraoctowy
- EIEE** (ang. epileptic encephalopathy, early infantile) – wczesna dziecięca epileptyczna encefalopatia
- EIEE5** (ang. epileptic encephalopathy, early infantile, 5) – wczesna dziecięca epileptyczna encefalopatia typu 5
- ELISA** (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) – test immunoenzymosorpcyjny
- ELV** (ang. elovanoid) - elowanoid
- emp24** – (ang. transmembrane emp24 domain-containing protein) białko transbłonowe zawierające domenę emp24
- Ena/VASP** (ang. Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein-like)
- ENaC** (ang. amiloride-sensitive sodium channel) – nabłonkowy kanał sodowy zależny od amilorydu
- ER** (ang. endoplasmic reticulum) – siateczka śródplazmatyczna
- EtOH** – etanol
- EVL** (ang. Enah/Vasp-Like) – białko podobne do Enah/Vasp
- EX/EM** (ang. excitation/emission) – ekscytacja/emisja
- FAK125** (ang. focal adhesion kinase 125) – kinaza ogniskowo-adhezyjna 125
- FANCG** (ang. Fanconi anemia group G protein) – białko G grupy anemii Fanconiego
- FERM** (ang. F - 4.1 protein, E - ezrin, R - radixin and M – moesin) – często występująca domena białek
- FITC** (ang. fluorescein isothiocyanate) - izotiocyjanian fluoresceiny
- FVB/N** (ang. Friend leukemia virus B) - wirus Frienda wywołujący białaczkę typu B, NIH, szczep myszy laboratoryjnych wykorzystywany do tworzenia myszy transgenicznych
- G** - glicyna
- GABA** (ang. gamma-aminobutyric acid) – kwas gamma-aminomastowy
- GDP** (ang. guanosine diphosphate) – guanozyna difosforan
- GluR2** (ang. glutamate receptor 2) – podjednostka 2 receptora kwasu glutaminowego

GSH (ang. gamma-glutamylcysteinylglycine - glutathione) – zredukowany glutation
GSNO (ang. S-nitrosoglutathione) – S-nitrozoglutation
GST (ang. glutathione S-transferase) – transferaza glutationowa
GTPaza (ang. GTPase – guanosine triphosphatase) – guanozynotrifosfataza
H₂O₂ – nadtlenek wodoru
HBS-NHS – bufor zawierający HEPES, NHS
hCAST (ang. *human*CAST) – ludzki gen CAST kodujący kalpastatynę
HEPA (ang. high efficiency particulate air filter) – wysokowydajny filtr cząstek stałych
Hepes (ang. 4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid) - kwas 4- (2-hydroksyetylo) -1-piperazynoetanosulfonowy)
His-tag – znacznik białkowy zawierający ciąg histydyn
HPLC (ang. high-performance liquid chromatography)- wysokosprawna chromatografia cieczowa
HRP (ang. horseradish peroxidase) – peroksydaza chrzanowa
Httt (ang. huntingtin) - huntingtyna
IITD – Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
IL-2 (ang. interleukin-2) – interleukina-2
IPTG (ang. isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) – izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozyd
JAK2 (ang. Janus kinase 2) – kinaza tyrozynowa JAK2
K - lizyna
ka – stała asocjacji
KCl – chlorek potasu
KCNN (ang. potassium calcium-activated channel subfamily N) – podrodzina N kanałów potasowych aktywowanych wapniem
KD – stała równowagi dysocjacji
kd – stała dysocjacji
kDa (ang. kilodalton) -kilodalton
KH₂PO₄ (ang. potassium dihydrogen phosphate) – diwodorofosforan potasu
KQT – kanał potasowy bramkowany napięciem
L - leucyna
LB (ang. lysogeny broth) – pożywka hodowlana Lurii
Lck (ang. lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) – kinaza tyrozynowa specyficzna dla limfocytów
LD (ang. loading dye) – bufor do nanoszenia próbek na żel agarozowy
LMW-PTP (ang. low molecular weight – protein tyrosine phosphatase)- fosfataza tyrozynowa o niskiej masie molekularnej
Lys - lizyna
MAD (ang. membrane association domain) – domena wiążąca błonę
MAP2 – (ang. Microtubule-associated protein 2) – białko wiążące microtubule 2 typu
mCAST (ang. *mouse*CAST) – myszy gen CAST kodujący kalpastatynę
MCS (ang. multiple cloning site) – sekwencja polilinkera
MgCl₂ – chlorek magnezu
MPS (ang. membrane-associated periodic skeleton) – cykliczny szkielet przybłonowy
MQ – woda MilliQ
mRNA (ang. messenger RNA) – przekaźnikowy RNA
MSD (ang. membrane-spanning domain) – domena obejmująca błonę
Myc-tag – znacznik białkowy otrzymany z genu c-myc o sekwencji: [EQKLISEEDL]
MYLK (ang. Myosin light chain kinase) – kinaza lekkiego łańcucha miozyny
Na⁺ - kation sodowy
Na₂CO₃ – węglan sodu

Na₂HPO₄ - wodorofosforan sodu
Na₂S₂O₃ - tiosiarczan sodu
NaAc (ang. sodium acetate) – octan sodowy
NaCl – chlorek sodu
NaOH – wodorotlenek sodu
Nav (ang. voltage-gated sodium channels) 1.2, 1.5 – kanały sodowe bramkowane napięciem 1.2, 1.5
NBD (ang. nucleotide binding domain) – domena wiążąca nukleotydy
NCAM (ang. neural cell adhesion molecule) – cząsteczka adhezji komórek nerwowych
NCBI (ang. National Center for Biotechnology Information) – Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej
NCK1 (ang. Non-Catalytic Region Of Tyrosine Kinase) – białko cytoplazmatyczna NCK1
NFκB (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – czynnik jądrowy wzmacniacz transkrypcji lekkiego łańcucha kappa aktywowanych B
NgCAM (neuron-glia cell adhesion molecule) – cząsteczka adhezji komórek nerwowych i gleju
NHS (ang. N-Hydroxysuccinimide) – N- hydroksysukcynoimid
N-koniec – aminowy koniec peptydu
NMDA (ang. N-methyl-D-aspartate receptor)- receptor N-metylo-D-asparaginowy
nNOS (ang. neuronal nitric oxide synthase) – neuronalna syntaza tlenku azotu
NODAL (ang. node – węzeł) – homolog węzłowy
NrCAM (ang. neuronal cell adhesion molecule) – cząsteczka adhezji komórek nerwowych
p25- (ang. P25 protein) – białko p25
p35- (ang. P35 protein) – białko p35
PBS (ang. phosphate buffered saline) – buforowany roztwór soli fizjologicznej
PCR (ang. polymerase chain reaction) – reakcja łańcuchowa polimerazy
PDB (ang. protein data bank) – bank danych białek
PDE1 (ang. phosphodiesterase 1) – fosfodiesteraza 1
PH (ang. pleckstrin homology domain) – domena homologiczna do fragmentu plekstryny
PIPES (ang. piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)) – kwas piperazyneo-N,N'-bis(2-etanosulfonowy)
PKC (ang. protein kinase c) – kinaza białkowa C
PMSF (ang. phenylmethylsulfonyl fluoride) – fluorek fenylometylosulfonylu
PrP (ang. prion proteine) – białko prionu
PY - fosfotyrozyna
Q - glutamina
R1098Q - myszy o mutacji R1098Q w genie SPTAN1 lub fragment αII-spektryny (9-10 powtórzenie) ze zmianą R1098Q
R1098Q+hCAST – myszy o mutacji R1098Q w genie SPTAN1 i nadekspresji ludzkiej kalpastatyny
Rac (ang. Rac protein) – białko Rac
Ras (ang. Ras protein) – białko Ras
RhoA (ang. transforming protein RhoA) – białko przekształcające RhoA -GTPaza
RNA (ang. ribonucleic acid) – kwas rybonukleinowy
RNAza – rybonukleaza
rpm (ang. rounds per minute) – obrotów na minutę
RU (ang. resonance units) – jednostki rezonansu dla SPR
S - seryna
SAB (ang. spectrin actin binding) – domena wiążąca spektrynę i aktynę
SBDP (ang. spectrin breakdown products) – produkty degradacji spektryny
SCA (ang. spinocerebellar ataxia) – ataksja rdzeniowo-mózdkowa
SDS (ang. sodiumdodecylsulfate) – sól sodowa kwasu dodecylosiarkowego

- SDS-PAGE** (ang. SDS polyacrylamide gel electrophoresis) – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących
- SH** (ang. SRC Homology Domain) – domena homologiczna do SRC
- SH3** (ang. SRC Homology 3 Domain) – domena homologiczna do SRC 3
- SH-SY5Y** – linia nerwiaka
- SMAD** (ang. Caenorhabditis elegans SMA ("small" worm phenotype) and Drosophila MAD ("Mothers Against Decapentaplegic")) – nazwa pochodząca od rodziny genów kodujących białka będącymi przekaźnikami sygnału dla receptorów TGF- β
- SNAP** (ang. Synaptosomal-associated protein) – białko związane z synaptosomem
- SNTF** – specyficzny proteolityczny fragment α II-spektryny otrzymywany w reakcji z kalpainą
- SPARCA1** (ang. spectrin associated autosomal recessive ataxia type-1) - autosomalna recesywna ataksja mózdkowa związana ze spektrynami typu 1
- SPF** (ang. specific pathogen free) – strefa wolna od specyficznych patogenów
- SPNA1** (ang. spectrin alpha, erythrocytic 1 gene) – gen kodujący alfa spektrynę erythrocytarną
- SPR** (ang. surface plasmon resonance) – rezonans plazmonów powierzchniowych
- SPTAN1** (ang. spectrin alpha non-erythrocytic 1 gene) – gen kodujący alfa spektrynę nieerythrocytarną
- SPTB** (ang. spectrin beta erythrocytic gene) – gen kodujący beta spektrynę erythrocytarną
- SPTBN** (ang. spectrin beta non-erythrocytic gene) 1,2,4,5– geny kodujący beta spektryny nierythrocytarne
- SUMO** (ang. small ubiquitin-related modifier) – mały modyfikator związany z ubikwityną
- TAE** (ang. tris/acetic acid/EDTA) – oznaczenie buforu zawierającego Tris, kwas octowy i EDTA
- TBI** (ang. traumatic brain injury) – urazowe uszkodzenie mózgu
- TCR** (ang. T-cell receptor) – receptor limfocytu T
- Tec** (ang. Tyrosine-protein kinase Tec) – kinaza tyrozynowa Tec
- TEMED** (ang. N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine)– N, N, N', N' tetrametyloetylenodiamina
- Tes**- testyna
- TGF- β** (ang. transforming growth factor beta) – transformujący czynnik wzrostu beta
- TIMP** (ang. Tissue inhibitor of metalloproteinase) – tkankowy inhibitor metaloproteinazy
- TMB** (ang. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) - 3,3',5,5'-Tetrametylobenzydyna
- TRAF** (ang. TNF receptor-associated factor) – czynnik związany z receptorem TNF
- Tris** (ang. tris(hydroxymethyl)aminomethane) – tris(hydroksymetylo)aminometan
- Trp** - tryptofan
- TRPC4** (ang. short transient receptor potential channel 4) – krótki przejściowy receptorowy kanał potencjałowy 4
- Tyr** - tyrozyna
- UBC9** (ang. Ubiquitin carrier protein 9) – białko przenoszące ubikwitynę 9
- UV** (ang. ultra violet) ultrafiolet
- VGSC** (ang. voltage gated sodium channels) – kanały sodowe bramkowane napięciem
- W** - tryptofan
- WB** (ang. Western blot) – technika western blot
- WT** (ang. wild type) – typ dziki
- Y** – tyrozyna
- 1,2-DAB** (ang. 1,2-diacetylbenzene) – 1,2-diacetylobenzen

2. Streszczenie

Spektryny, jako białka cyklicznego szkieletu przybłonowego, pełnią szereg funkcji. Przede wszystkim ze względu na swoje charakterystyczne właściwości elastyczne wynikające z budowy powtórzenia spektrynowego pełnią rolę amortyzatorów chroniąc błonę komórkową przed naprężeniami mechanicznymi. Są szczególnie ważne w kontekście wydłużonych aksonów, będąc niezbędne dla rozwoju i stabilności komórek nerwowych. Dodatkowo poprzez liczne oddziaływania z innymi białkami uczestniczą m. in. w organizacji kanałów błonowych, procesach adhezji, regulacji dynamiki aktyny i w przekaźnictwie nerwowym. Mutacje w obrębie spektryn powodują liczne objawy chorobowe: mioklonie, mikrocefalię, atrofię mózdkową, hipomielinację[1], neuropatię ruchową, paraplegię spastyczną i ataksję mózdkową[2][3]. Objawy te są rozpoznawane u pacjentów i w modelach mysich w zróżnicowanym spektrum i ze zmiennym nasileniem. Spektryny są również substratem dla kalpain i kaspaz podczas przebudowy cytoszkieletu i apoptozy. Domeny SH3 i CCC znajdujące się w obrębie powtórzeń 9-10 α II-spektryny są ważnym miejscem, w którym krzyżują się szlaki regulacji oparte na stężeniu jonów wapniowych i kalmodulinie oraz na sygnalizacji opartej na fosforylacji stanowiąc rozdroże pomiędzy proteolizą opartą na kalpainach, a kaspazach. Liczne produkty proteolizy spektryn były identyfikowane po urazach neurologicznych oraz w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona, czy Alzheimerera. W niniejszej pracy bazując na modelu mysim R1098Q z mutacją punktową w α II-spektrynie i myszach transgenicznym hCAST z nadekspresją ludzkiej kalpastatyny (naturalnego inhibitora kalpain) oraz wykorzystując białka rekombinowane obejmujące dwa powtórzenia spektrynowe 9-10, na podstawie szeregu analiz instrumentalnych zaobserwowano obniżoną stabilność struktury 10 powtórzenia spektrynowego α II-spektryny oraz obniżone jego powinowactwo wobec kalmoduliny. Wykorzystując metody immunochemiczne wykazano podwyższoną podatność α II-spektryny niosącej mutację R1098Q na swoistą proteolizę przez kalpainę, co uwidoczniono również w barwieniu pierwotnych hodowli komórek z mózgu myszy R1098Q na obecność specyficznego produktu proteolizy α II-spektryny przez kalpainę (SNTF). Ze względu na zwiększony poziom proteolizy α II-spektryny u myszy R1098Q postanowiono wykorzystać myszy hCAST do stworzenia nowej linii myszy przydatnej do oceny efektu obniżenia aktywności kalpainy na fenotyp tych zwierząt. W testach motorycznych udokumentowano poprawę siły mięśniowej myszy R1098Q+hCAST oraz lepszą kontrolę stawiania kroków bez wyraźnej poprawy innych wyników testów niezborności ruchowej.

Summary

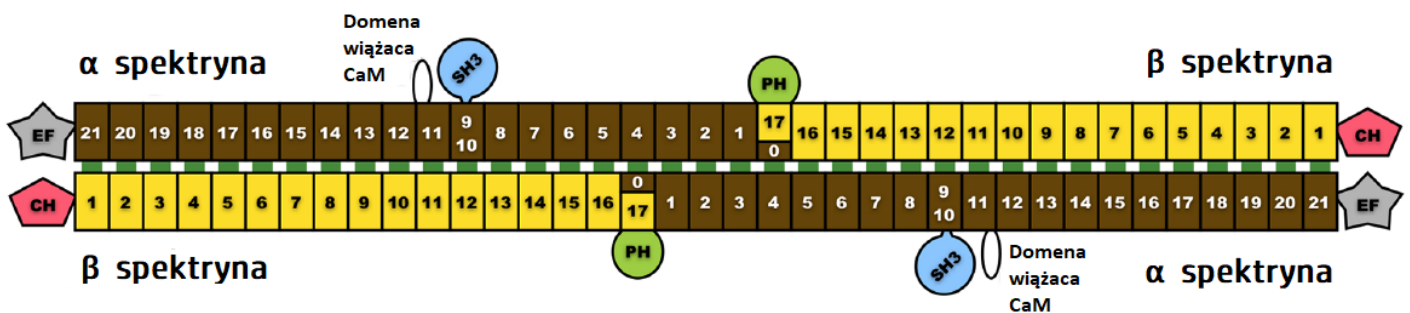
Spectrins, as membrane-associated periodic skeleton proteins, perform a number of functions. First of all, due to their characteristic elastic properties resulting from structure of spectrin repeat, they act as shock absorbers, protecting the cell membrane against mechanical stresses. They are particularly important in elongated axons, being necessary for the development and stability of nerve cells. Additionally, through numerous interactions with other proteins, they participate in the organization of membrane channels, adhesion processes, regulation of actin dynamics and neurotransmission. Mutations of spectrin proteins cause numerous disease symptoms, such as: myoclony, microcephaly, cerebellar atrophy, hypomyelination[1], motor neuropathy, spastic paraplegia and cerebellar ataxia[2][3]. These symptoms are recognized in patients as well as in mouse models in a diverse spectrum and variable severity. Spectrins are also a substrate for calpains and caspases during cytoskeletal remodelling and apoptosis. The SH3 and CCC domains located within 9-10 repeats of an α II-spectrin pose an important crossing point between the regulatory pathways based on the calmodulin and concentration of calcium ions and those of phosphorylation based signaling. It constitutes a metabolic link between calpain-based proteolysis and caspases. Numerous products of spectrin proteolysis have been identified after neurological injuries and in neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's disease. In this study, a survey based on the R1098Q mouse model with a point mutation in α II-spectrin gene and on transgenic hCAST mice with overexpression of human calpastatin (a natural calpain inhibitor) was conducted. Also recombinant proteins containing two 9-10 spectrin repeats were used. A reduced stability of the 10th repeat structure and its reduced affinity for calmodulin was observed based on a series of instrumental analyzes of α -II spectrin. By using immunochemical methods it was demonstrated, that α II-spectrin carrying the R1098Q mutation increased its susceptibility to specific proteolysis by calpain. This fact has been also visualised by immunostaining the primary cell cultures from the brain of R1098Q mice for the presence of a specific proteolysis product of α II-spectrin by calpain (SNTF). Due to the increased level of α II-spectrin proteolysis in R1098Q mice, it was decided to use hCAST mice to create a new mouse line, useful for assessing the effect of reduced calpain activity on the phenotype of these animals. Motor tests revealed an improvement of muscle strength in R1098Q+hCAST mice and better step control without a significant improvement in other tests of motor ataxia severity

3. Wstęp

3.1. Spektryny jako białka cytoszkieletu komórkowego (ewolucja i konserwacja ewolucyjna spektryn, budowa powtórzenia spektrynowego, znaczenie struktury spektryn dla pełnionej funkcji)

3.1.1 Spektryny erythrocytarne versus spektryny nieerythrocytarne zbieżności i różnice w budowie

Spektryny to nadrodzina białek, która wyewoluowała od wspólnego przodka, podobnego do α -aktyniny na drodze elongacji, duplikacji i rearanżacji, których efektem było „rozdzielenie” na dwa łańcuchy dwóch skrajnych N i C końcowych regionów białka[4]. Spektryny to wysoce konserwowane ewolucyjnie białka. Geny je kodujące można znaleźć na wielu gałęziach filogenetycznych. Przykładowo, ulegają ekspresji u *Homo sapiens* ale też u *Drosophila melanogaster* [5][6]. Charakterystyczne jest występowanie wielu izoform różniących się liczbą powtórzeń spektrynowych, jak też występującymi w tych białkach specyficznymi domenami. Dla erythrocytów rozpoznano jeden typ heterodimeru złożony z łańcuchów α I (gen SPNA1) i β I (gen SPTB) spektryny. Heterodimery alfa i beta tworzą tetramery, co pozwala na dalsze wydłużanie filamentów i tworzenie sieci[7]. Komórki posiadające jądra prezentują zaś wachlarz połączeń α - i β -spektryn w zależności od typu tkanki i wybranych przedziałów komórkowych zawierających α II (SPTAN1) i β II (SPTBN1), III(SPTBN2), IV(SPTBN4), V(SPTBN5) spektryny[8]. Przykładowy schemat takiego tetrameru przedstawiono na rycinie 1. [9]



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie tetrameru złożonego z α i β spektryn.

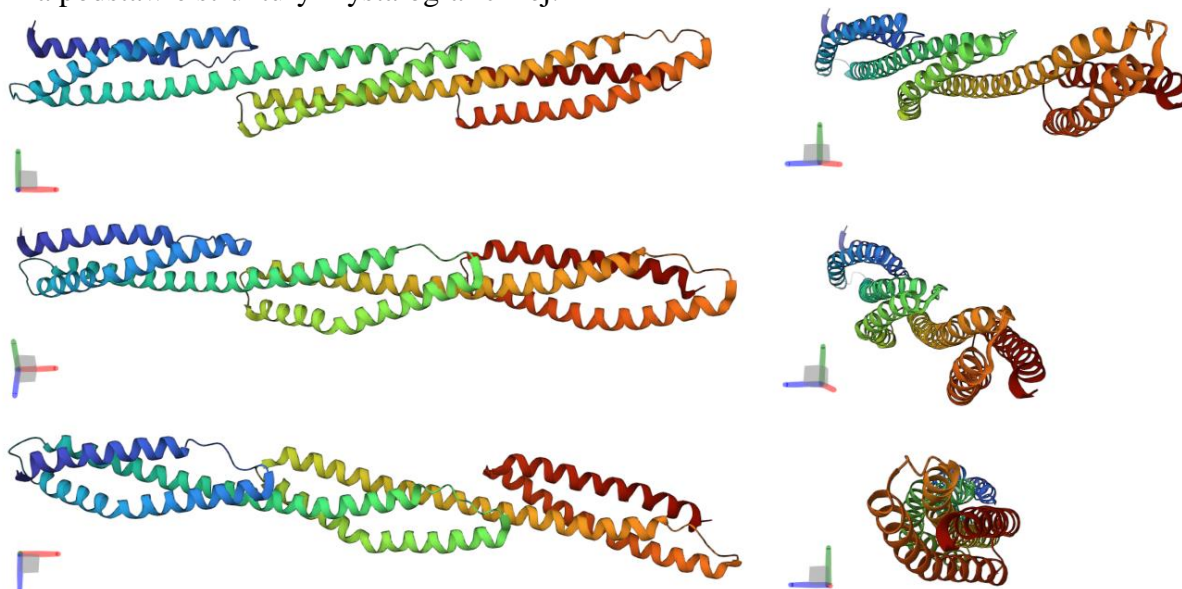
(Modyfikowane na podstawie: Brown, Jeffrey W et al. "The Physiological Molecular Shape of Spectrin: A Compact Supercoil Resembling a Chinese Finger Trap." PLoS computational biology vol. 11,6 e1004302. 11 Jun. 2015, doi:10.1371/journal.pcbi.1004302)

Analizy filogenetyczne wskazują, że spektryny nieerythrocytarne i erythrocytarne u człowieka różnią się między sobą bardziej, niż spektryny nieerythrocytarne człowieka i spektryny *Drosophila melanogaster*[8]. Kręgowce posiadają zestaw genów kodujących spektryny. Do powstania genów spektryn erythrocytarnych doszło dopiero podczas ewolucji kręgowców, chociaż spektryny erythrocytarne udało się rozpoznać i opisać wcześniej

niż nieerytrocytarne[10]. Zarówno erytrocytarne, jak nieerytrocytarne α -spektryny, mają 20 powtórzeń spektrynowych i zawierają motyw dłoni EF oraz domenę SH3. Alfa-spektryny nieerytrocytarne mają zaś dodatkową domenę CCC znajdującą się za domeną SH3 w obrębie powtórzenia spektrynowego[11][12]. Beta-spektryny nieerytrocytarne, w porównaniu do erytrocytarnych, posiadają dodatkową domenę homologiczną do plekstryny (PH) położoną na C końcu. Odpowiada ona za wiązanie fosfoinozytydów [13]. β II-spektryna posiada dodatkowe, skrajnie położone względem całej sekwencji regiony o niskiej złożoności. β III-spektryna ma dodatkową sekwencję występującą za ostatnim powtórzeniem spektrynowym, ale przed domeną PH. W β IV-spektrynie dodatkowe sekwencje, zawierające regiony o niskiej specyficzności, okalają ciąg powtórzeń spektrynowych od strony N i C końca. Co ciekawe, większość β -spektryn ma 16-17 powtórzeń spektrynowych, natomiast β V-spektryna blisko dwa razy tyle powtórzeń, u człowieka jest to 30 powtórzeń[14][15].

3.1.2 Powtórzenie spektrynowe, struktura, funkcja

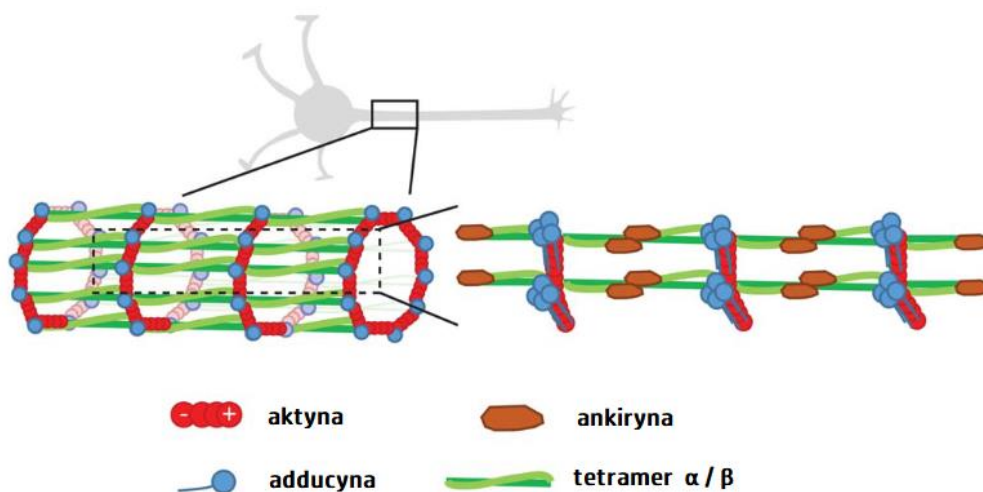
Powtórzenie spektrynowe jest strukturą specyficzną dla tej grupy białek. Pojedyncze powtórzenie składa się z tworzących podłużną strukturę trzech α -helis, splecionych względem siebie przeciwległe, tworząc lewoskrętny superskręt oraz z peptydów tworzących pętle łączące te α -helisy. Pętle są miejscem największego zróżnicowania sekwencji w obrębie spektryn, wpływając na długość i konformację cząsteczek. Wewnątrz powtórzenia spektrynowego zazwyczaj znajduje się stała ilość hydrofobowych reszt aminokwasów aromatycznych[16]. Na rycinie 2 przedstawiono model trzech powtórzeń spektrynowych α -spektryny, stworzony na podstawie struktury krystalograficznej.



Rycina 2. Powtórzenia spektrynowe z różnych perspektyw - 15,16,17 all spektryny z mózgu kurczaka. (Wygenerowano przy pomocy: <https://www.rcsb.org/3d-view> ; Kod PDB :1U4Q)

Skrajnie położone powtórzenia spektrynowe, to jest α 20-21 i β 1-2, tworzą dimery α i β [17]. Główną funkcją strukturalną spektryn jest współtworzenie cyklicznego cytoszkieletu przybłonowego, chroniącego komórki przed stresem mechanicznym. Będąc elementami strukturalnymi, jednocześnie uczestniczą w interakcjach między białkami, uczestnicząc w synchronizacji: dynamiki aktyny, transportu wewnątrzkomórkowego (poprzez oddziaływanie z białkami motorycznymi), aksonalnego transportu pęcherzyków, kierowaniu niektórych białek w szlakach wydzielania i endocytozy, lokalizacji kanałów bramkowanych napięciem, potencjałów czynnościowych. Mają wpływ na wzrost i remodelowanie neurytów oraz cykl komórkowy. Stabilizują również retikulum plazmatyczne i aparat Golgiego. Są miejscem wiązania białek sygnałowych i regulatorowych, koordynując połączenia sygnałowe związane z błoną. Same ulegają również modyfikacjom posttranslacyjnym [8][16][18].

Jak już wyżej wspomniano, spektryny są częścią cyklicznego szkieletu przybłonowego, (MPS) będącego regularnie powtarzającą się strukturą białkową, znajdującą się po wewnętrznej stronie błony komórkowej, zawierającą pierścienie aktynowe i koordynujące je tetrametry spektrynowe, tworzące sieć zakotwiczoną w błonie[19]. Został on poznany i scharakteryzowany po raz pierwszy w czerwonych krwinkach[20]. W otoczeniu błony komórkowej erytrocytów spektryny tworzą pseudoheksagonalną sieć w odstępach co ok. 70 nm. W komórkach dendrytycznych podobny układ występuje w perikarionie, natomiast zmienia się w wypustkach, w szczególności w aksonach, tworząc pierścienie aktynowe rozdzielone co ok. 190 nm przez tetrametry spektrynowe. Prosty schemat prezentujący budowę MPS w aksonach neuronalnych przedstawiono na rycinie 3[21].

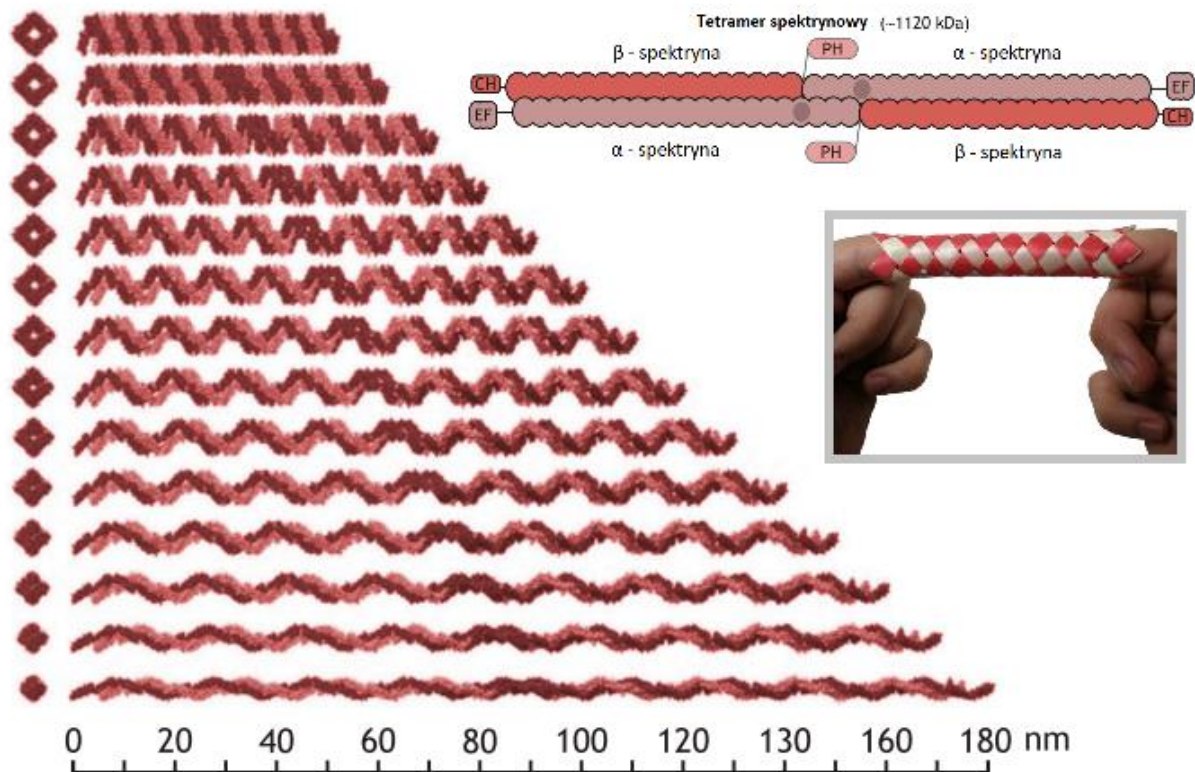


Rycina 3. Schemat budowy MPS.

(Modyfikowano na podstawie: Leite, Sérgio Carvalho, and Mónica Mendes Sousa. "The neuronal and actin commitment: Why do neurons need rings?." Cytoskeleton (Hoboken, N.J.) vol. 73,9 (2016): 424-34. doi:10.1002/cm.21273)

Błona komórkowa sama w sobie nie jest odporna na siły ścinające działające stycznie, równoległe do jej powierzchni. Przykładem mogą być siły spowodowane przepływem krwi, wywierane na komórki śródbłonna naczyń krwionośnych [22]. Spektryny w MPS, poprzez swoją nieliniową elastyczność (odkształcenie struktury nie jest zależne w sposób proporcjonalny od przyłożonej siły zewnętrznej), odpowiadają za kompensowanie sił mechanicznych działających na komórkę. Okres zastępowania spektryny w szkielecie przybliżonym to około pół godziny, co jest wartością wskazującą na dużą dynamikę ukierunkowanej przebudowy struktury MPS. Jednocześnie spektryna jest też zdolna do przenoszenia obciążeń bez potrzeby przebudowy białkowej struktury MPS. Spektryny działają więc jako molekularne amortyzatory. Dzieje się tak ze względu na zdolność pojedynczego powtórzenia spektrynowego do odwracalnego rozwijania się poprzez przejścia konformacyjne pod wpływem rozciągania. Spektryny mają zatem właściwości podobne do półelastycznych polimerów. Powstały modele opisujące te właściwości spektryn – model łańcucha podobnego do robaka i model chińskiej pułapki na palce. Drugi z nich zilustrowano na rycinie 4[23][24]. Elastyczność entropowa przewiduje usztywnienie struktury wraz ze wzrostem energii termicznej oddziałującej na tę strukturę. Okazuje się jednak, że wraz ze wzrostem siły rozciągającej struktura α i β spektryny mięknie rozplatając się i eksponując reszty cysteiny[25]. Zgodnie z tym, aksonalny moduł Younga zmniejsza się wraz ze wzrostem odkształcenia powodowanego stresem, w przeciwieństwie do większości innych typów sieci biopolimerowych, w których ten parametr wzrasta[23][26]. Zdolność ta jest analogiczna do zdolności innych poznanych białek strukturalnych, takich jak tytyna (ang. *titin*) białka mięśniowego[27].

W skali komórkowej między wewnętrzną warstwą lipidową i szkieletem spektrynowym może być generowane napięcie pozwalające na powstawanie krzywizn. Sprzyja to ochronie erytrocytów poddawanych dużemu stresowi w krwioobiegu. W neuronach szczególnie naprężenia rozciągające wymagają kompensacji. Prawdopodobnie dlatego w aksonach tetrametry spektryny są rozmieszczone co ok 190 nm, blisko pełnego rozwinięcia. Są one utrzymywane w napięciu, pełniąc funkcje stabilizujące[23]. Długie aksony są poddawane deformacjom podczas ruchów ciała. Ulegają fizjologicznym i patologicznym odkształceniom, zwłaszcza w obrębie pracujących stawów[28]. Mózg także ulega znacznym odkształceniom, nawet do 5% podczas gwałtownych ruchów całego ciała, a w szczególności przy uderzeniach głową[29]. Rola stabilizująca spektryny dla neuronów została wykazana w eksperymencie, gdzie brak β 2-spektryny w mutancie *C. elegans* skutkowało zrywaniem aksonów, nawet przy fizjologicznych ruchach robaka[30].



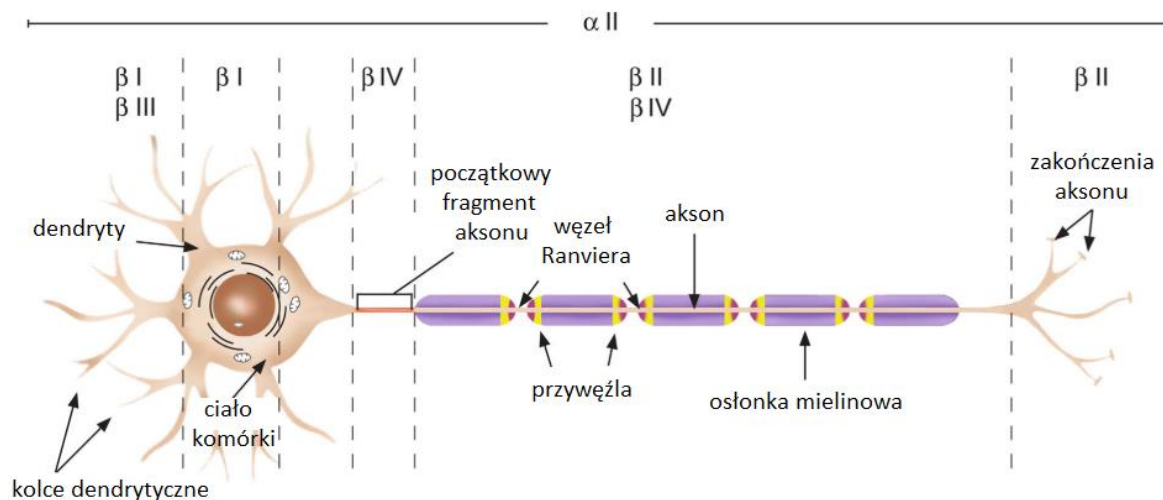
Rycina 4. Model chińskiej pułapki na palce.

(Modyfikowane na podstawie: Letierrier, Christophe, and Pramod A Pullarkat. "Mechanical role of the submembrane spectrin scaffold in red blood cells and neurons." *Journal of cell science* vol. 135,16 (2022): jcs259356. doi:10.1242/jcs.259356 ; pułapka na palce: <https://allegro.pl/oferta/chinska-pulapka-na-palce-zabawka-prezent-13149110725> (17.03.2023-19:25))

Występowanie odmiennych od siebie izoform spektryny w różnych typach komórek oraz zagęszczenie tych izoform w konkretnych strukturach komórkowych, świadczy o ich specjalizacji i zróżnicowaniu funkcjonalnym[31]. W aksonach występują tetramery spektryn α II/ β IV znajdujące się w początkowym segmencie aksonu, podczas gdy spektryny α II/ β III są lokalizowane głównie w dendrytach, a spektryny α II/ β II w pozostałej części aksonu[32][33]. Rozkład umiejscowienia poszczególnych typów spektryn zilustrowano na rycinie 5[18].

Spektryny są niezbędne do prawidłowego rozwoju i pracy dojrzałych neuronów. Jest to uzależnione od ich bezpośrednich i pośrednich oddziaływań w obrębie MPS z szeregiem białek, pełniących role cząsteczek adhezyjnych, receptorów i kanałów jonowych. Do cząsteczek tych należą m. in. CHL1, neurofascyna, NgCAM, NrCAM i neuroglian. Spektryna α II jest niezbędna dla właściwego rozwoju mózgu. Występuje w dużej ilości w okolicach okalających węzły Raniewiera, a jej szczególne zagęszczenie w tych obszarach

pojawia się na wczesnych etapach rozwoju tej struktury. Białko to ma wpływ na właściwy rozwój tych struktur oraz na stabilność powstających skupisk kanałów sodowych VGSC.



Rycina 5. Schemat dystrybucji typów spektryn w neuronie.

(Modyfikowano na podstawie: Morrow, Jon S, and Michael C Stankewich. "The Spread of Spectrin in Ataxia and Neurodegenerative Disease." *Journal of experimental neurology* vol. 2,3 (2021): 131-139)

Domena SH3, występująca w tych białkach, jest związana z sygnałami skutkującymi aktywacją Rac oraz procesami adhezji i rozprzestrzenianiem się komórek. Oddziałuje z ELV uczestniczącymi w polimeryzacji aktyny i białkami ognisk adhezji, jak Tes[31][34]. Tetramery spektrynowe α II/ β II oddziałują poprzez synapsynę 1 z pęcherzykami synaptycznymi, co jest ściśle powiązane z przewodnictwem nerwowym. Przypuszcza się, że następstwem mutacji w α II-spektrynie w zespole Westa są defekty neuroprzebieżności – błędy w regulacji procesu transmisji GABA[31]. Zmniejszenie ilości α II-spektryny powoduje rozległą degenerację aksonów w mózgu, nawet jeśli nie są poddawane dużym naprężeniom mechanicznym[35]. Brak α II-spektryny skutkuje śmiercią na etapie embrionalnym, ze względu na niedorozwój systemu nerwowego i serca. Natomiast ograniczony do obwodowego układu nerwowego manifestuje się przez rozstrojoną pobudliwość neuronów i defekty w obrębie aksonów[18]. Obniżenie ekspresji α II-spektryny skutkowało formowaniem komórek nerwowych o nieregularnym kształcie i cienkimi neurytami w linii nerwiaka SH-SY5Y[34]. Spektryna nieerytrocytarna α jest też odpowiedzialna za łączenie sygnałowania ER i błony komórkowej[36]. Beta-spektryny oddziałują z cząsteczkami NCAM zaangażowanymi w mechaniczną stabilizację połączeń neuronalnych. Oddziaływania te są niezbędne

do tworzenia odpowiedniej liczby synaps i utrzymania właściwego poziomu endocytozy receptorów AMPAR przy podstawowej aktywności. Włączenie do kompleksu tych oddziaływań białka PKC β 2, powoduje stymulację wzrostu neurytów. β II-spektryna oddziałuje również z czynnikiem CHL1 silnie ekspresjonowanym w neuronach i obecnym w astrocytach, komórkach Schwanna i oligodendrocytach, którego endocytoza również powoduje wzrost neurytów [31]. Delecja genu β II-spektryny również jest śmiertelna na etapie embrionalnym. Łączy się z utratą naturalnych komórek macierzystych w strefie podkomorowej[18]. Dysfunkcje spektryn β II i β III wpływają na destabilizację białek błonowych i upośledzenie transportu aksonalnego. Zaburzenia te, rzutujące na prawidłową koncentrację ankiryiny i kanałów sodowych bramkowanych napięciem (VGSC) w AIS, mogłyby skutkować podwyższeniem progu potencjału czynnościowego. Harmonijne działanie kanałów sodowych bramkowanych napięciem zapewnia prawidłową komunikację neuronalną, zaburzoną w procesach padaczkowych. Skupienie kanałów bramkowanych napięciem w AIS i węzłach Raniewiera jest potrzebne do inicjacji i propagacji potencjału czynnościowego w neuronach z osłonką mielinową. W komórkach Purkiniego dochodzi do silnej ekspresji β III-spektryny, która jest odpowiedzialna za stabilizację i lokalizację w błonie transportera glutaminianu EAAT4 oraz podjednostki GluR2 receptora glutaminowego. Elementy te są niezbędne dla właściwej sygnalizacji opartej na glutaminianie. Utrzymujące się nieprawidłowości w tym zakresie mogą prowadzić do śmierci komórek Purkiniego. Innym cennym aspektem funkcji β III-spektryny jest jej obecność w aparacie Golgiego. Oddziałuje ona z podjednostką Arp1 dynaktyny zaangażowanej w transport pęcherzykowy[31]. Delecja β III-spektryny przejawia się w zaburzeniach ustrukturyzowania aparatu Golgiego i retikulum endoplazmatycznego. W jej wyniku dochodzi do błędów w lokalizacji niektórych białek związanych z przewodnictwem nerwowym[18]. β IV-spektryna utrzymuje stabilność błon pobudliwych w mózgu i sercu oraz uczestniczy w regulowaniu lokalizacji kanałów sodowych bramkowanych napięciem. Nieprawidłowości w tej funkcji desynchronizują potencjały czynnościowe i spowalniają propagację. Spektryna β IV może również ulegać fosforylacji przez kinazę białkową II zależną od wapnia i kalmoduliny - CaMK2, co może wpływać na regulację kanałów sodowych Nav1.5[31]. Zaburzenia dotyczące β IV-spektryny mają głęboki wpływ na organizację aksonu, szczególnie w początkowym fragmencie i węzłach Raniewiera, co upośledza przewodnictwo nerwowe. Objawia się to zaburzeniami pracy mięśni i głuchotą. Podobnie, w przypadku dysfunkcji β V-spektryny, dochodzi do utraty zmysłów wzroku i słuchu wynikających z upośledzenia transportu pęcherzykowego [37].

3.1.3 Inne domeny funkcjonalne spektryn

Domena ABD

Domena ABD występuje w β -spektrynach na N-końcu. Zawierają się w niej dwie domeny homologiczne do kalponiny (CH) – białka występującego w mięśni gładkim[38]. Domena ta ma dobrze konserwowany sferyczny kształt o dużym stopniu warstwowego upakowania. Składa się z siedmiu α -helis, trzech krótszych (B,D,F) i czterech dłuższych (A,C,E,G)[39]. Funkcją tych domen w spektrynie jest tworzenie oddziaływań z włóknami f-aktyny[40]. Szczególnie istotna dla tych oddziaływań jest długość łącznika między dwoma domenami CH zapewniająca odpowiednią giętkość układu. Aktyna kotwiczy w trzech miejscach ABD. Dwa z nich odpowiadają pierwszej α -helisie obu domen CH, a trzecie dwóm przedostatnim helisom CH1 [38][41][42]. Domena ta jest niezbędna przy konstruowaniu sieci periodycznego cytoszkieletu.

Motyw EF

Motywy dłoni EF pojawiają się na C-końcach α -spektryn. Region ten jest odpowiedzialny za wiązanie kationów wapniowych poprzez strukturę helisa-pętla-helisa. Związanie jonów wapniowych powoduje zmianę konformacji na otwartą, udostępniając hydrofobowe reszty aminokwasowe do wiązania innych białek[38][43]. Motywy dłoni EF innego rodzaju występują również w dystrofinie i α -aktynie, są jednak pozbawione możliwości wiązania jonów wapniowych, pełniąc głównie funkcje strukturalne[44]. W α II-spektrynie kluczowe reszty motywu EF pozwalają na wiązanie pojedynczego jonu wapniowego do jednej domeny EF, co umożliwia wiązanie kolejnego do drugiej. Motyw EF, gdy spektryny tworzą dimer α/β , kontroluje aktywność domeny ABD w wiązaniu włókien aktyny[43].

Domena PH

Domeny plekstrynowe mają ok 100 aminokwasów. Występują one powszechnie od drożdży do kręgowców. Wiele białek mających domenę PH, zawiera również domeny typu SH lub posiada regiony zdolne do oddziaływania z domenami SH innych białek[13]. Wśród ssaczy białek zawierających tę domenę można znaleźć: białka związane z cytoszkieletem, kinazy serynowo/treoninowe, kinazy tyrozynowe, regulatory małych białek G, GTPazy, adaptory, czy enzymy związane z błoną komórkową[45]. Domeny PH nie są mocno konserwowane w rozumieniu sekwencji aminokwasowej, natomiast posiadają charakterystyczny schemat następstwa poszczególnych typów aminokwasów.

Domeny PH mają znaczenie w kontekście zależnego od wewnątrzkomórkowych kaskad sygnałowych lokalizowania białek w dwuwarstwie lipidowej[13]. Ich struktura to uformowane przez N-koniec białka siedem antyrównoległych β -nici. Na C-końcu występuje konserwowana reszta Trp, a otaczające ją ujemnie naładowane i hydrofobowe aminokwasy formują α -helisę. Cztery pierwsze β -nici tworzą niewielką β -kartkę, a trzy pozostałe drugą odchyloną w dół pod kątem 60° . Alfa-helisa zamyka szerszą część tej struktury, chowając w jej wnętrzu wspomnianą resztę tyrozyny i trzy inne hydrofobowe reszty aminokwasowe, które oddziałują z hydrofobowymi resztami β -kartki, stabilizując strukturę. Występują też bardziej elastyczne regiony pętli. W β -spektrynach w tym obszarze pojawia się krótki ustrukturyzowany fragment helikalny [45][46].

Domena SH3

Domena SH3 zbudowana jest z pięciu β -splotów położonych przeciw równolegle oraz niedługiego fragmentu helikalnego. Struktura ta tworzy dwa, niemal równoległe β -arkusze. Po jednej stronie domeny znajduje się miejsce kotwiczenia ligandów, a po drugiej reszta białka spektrynowego[31]. W α II-spektrynie domena SH3 jest usytuowana wewnątrz dziewiątego powtórzenia spektrynowego przed ostatnią z trzech α -helis[12]. Charakteryzuje się powinowactwem do fragmentów bogatych w prolinę. Stanowi miejsce interakcji z białkami sygnałowymi, między innymi z kinazą tyrozynową c-Src, fosfatazą fosfotyrozyny, czy kanałami ENaC[31]. Bierze udział w takich procesach jak inicjowanie sieci aktynowej, ruch komórek, adhezja, czy reperacja DNA [8]. Ma ok 60 aminokwasów[12].

Domena CCC

Domena CCC (*ang. calmodulin, calpain, caspase*) występuje tylko u kręgowców i charakteryzuje się bardzo wysoką konserwatywnością[47]. Ma długość 36 aminokwasów. Znajduje się w obrębie dziesiątego powtórzenia spektrynowego. Jest obecna tylko w spektrynie α II. Spektryny α I erytrocytarne jej nie zawierają. Region ten nie przyjmuje sztywnej struktury. Ma charakter pętli i zależnie od wapnia wiąże kalmodulinę - białko regulatorowe[12]. Dodatkowo, sekwencja zawiera miejsca wrażliwe na proteolizę kalpainami m i μ oraz kaspazami 2,3,7[48]. Na podatność na cięcie ma wpływ fosforylacja reszt tyrozynowych i oddziaływanie z kalmoduliną, o czym napisano szerzej w kolejnych podrozdziałach[47].

3.1.4 Białka oddziałujące ze spektrynami i znaczenie fizjologiczne tych oddziaływań

Kalmodulina

Kalmodulina to niewielkie białko wewnątrzkomórkowe o wysokiej i powszechnej ekspresji. Stanowi ważny element regulatorowy szlaków opartych na zmianach stężeń jonów wapniowych, gdyż jej aktywacja (zmiana konformacji) jest od nich zależna[49]. Kalmodulina bierze udział w wielu mechanizmach związanych z szerokim spektrum procesów: metabolizmem [50], ruchem wewnątrzkomórkowym, dynamiką cytoszkieletu [51], skurczem mięśni[52], pamięcią [53], jak również stanem zapalnym, odpowiedzią immunologiczną [54][55] i apoptozą [56]. Kalmodulina kontroluje liczne kinazy, w tym zależne od kalmoduliny kinazy (CaMK)[57], kinazy MYLK fosforylujące lekki łańcuch miozyny [58], ale też kalcyneurynę - fosfatazę wpływającą m. in. na apoptozę w neuronach związaną z epilepsją [59]. Białko to bierze udział w regulowaniu cyklu centrosomu [60], reguluje bramkowane napięciem kanały wapniowe [61], wpływa dodatnio na aktywność kanałów potasowych KCNN[62].

Kalmodulina jest zdolna do oddziaływania z wieloma innymi białkami m. in. oddziałuje specyficznie z domeną CCC, położoną w obrębie 10 powtórzenia spektrynowego α II-spektryny. W interakcjach uczestniczą cztery jony wapniowe, po dwa na każdą z pętli wiążących kalmoduliny (pętla N i C). Oddziaływanie obu białek opiera się prawie całkowicie na resztach hydrofobowych i doprowadza do ustrukturyzowania pętli CCC, nieuporządkowanej w roztworze we fragment helikalny, którego położenie jest stabilizowane w kieszeni CaM przez dwie reszty spektrynowe (Lys 1193 i Asn 1206), zaangażowane w wiązania jonowe z sekwencją CaM. Kompleks jest zwarty i ma globularny kształt[63]. Wiązanie kalmoduliny ma wpływ na zdolność spektryny do wiązania błon komórkowych[64]. Domena CCC zawiera też miejsca proteolizy dla kalpajny i kaspazy, a możliwość trawienia jest regulowana przez oddziaływanie z kalmoduliną, która promuje trawienie kalpajną, a hamuje trawienie kaspazami 2,3,7[48]. Więcej informacji na temat proteolizy zawarto w kolejnych podrozdziałach.

Ankiryna

Ankiryna jest białkiem uczestniczącym w tworzeniu kompleksu spektrynowo-ankirynowego, niezbędnego do utrzymania organizacji i funkcji białek błonowych, w tym pomp jonowych[65]. U ssaków występują trzy typy ankiryn nazwane R, B, G. Ankiryny posiadają trzy zasadnicze domeny: domenę wiążącą błonę na N końcu, domenę wiążącą

spektryny oraz domenę śmierci zaangażowaną w szlaki apoptozy. Na drodze alternatywnego splicingu powstają też formy tych białek pozbawione poszczególnych typów domen oraz formy ankiryiny B i G, zawierające insercje między domeną wiążącą spektryny a domeną śmierci aż do 2500 aa. Te formy ankiryiny ulegają ekspresji głównie w aksonach. Domeny wiążące błonę składają się z 4 subdomen, każda po 6 powtórzeń ankirynowych. Szczególna struktura subdomen pozwala na tworzenie wielobiałkowych kompleksów. Sąsiednie powtórzenia ankirynowe są zorganizowane w przeciwrównoległe położone helisy alfa połączone pętlami usytuowanymi po jednej stronie. Pętle te są odpowiedzialne za swoistość oddziaływań białko-białko. Każda z subdomen ma zatem zróżnicowane właściwości wiązania. Partnerami wiązań są m. in. kanały i pompy jonowe, wymienniki anionowe (izoformy AE1 AE2 i AE3), bramkowany napięciem kanał Na^+ , ATP-azę Na^+/K^+ i wymiennik $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ oraz kanały uwalniające Ca^{2+} . Ankiryiny oddziałują też z białkami cytozolowymi, takimi jak tubulina czy klatryna oraz cząsteczkami adhezji komórkowej i czynnikami transkrypcyjnymi[66]. Interakcje ankiryiny z kanałami jonowymi mają znaczenie dla generowania potencjałów czynnościowych w neuronach. Domena wiążąca spektryny oddziałuje z domeną wiążącą ankirynę, położoną w obrębie 14 i 15 powtórzenia spektrynowego w β -spektrynach [67].

Aktyna

Aktyna jest szeroko znana jako element cytoszkieletu komórkowego. Białko to, wspomniane już przy omawianiu MPS, jest wiązane z tetramerami spektrynowymi przez miejsce obecne w łańcuchu β -spektryn[34]. Jej oddziaływania ze spektrynami mają znaczenie w utrzymywaniu kształtu komórek, organizowaniu białek błonowych, stabilizowaniu szkieletu mikrotubulowego i elastyczności kolców dendrytycznych przy transporcie organelli[68]. Występuje w dwóch wzajemnie przemiennych formach aktyny G i F, z których pierwsza to monomer, a druga jest w stanie tworzyć filamenty zależnie od ATP. Formowanie włókien aktyny i polimeryzacja jest kontrolowana przez grupę białek, w tym kompleks Arp 2/3 i forminę [69].

Białko 4.1

Innym białkiem zaangażowanym w interakcję ze spektrynami jest białko 4.1, promujące oddziaływania spektryn z aktyną [70]. U kręgowców ulega ekspresji w większości tkanek. Odpowiada za właściwe położenie białek błonowych, w tym receptorów białek G i kanałów jonowych. Białko to posiada dwie główne domeny: domenę FERM oddziałującą z błoną fosfolipidową i domenę C-końcową (CTD), charakterystyczną dla tych białek. Wyższe

zwierzęta posiadają również domenę wiążącą spektrynę i aktynę (SAB) [71][72]. Domena ta łączy się z β -spektryną w regionie jej N-końcowych domen CH1 i CH 2. Białko 4.1 ma zdolność gromadzenia wielu białek transbłonowych w miejscach łączących aktynę i spektrynę [72].

Adducyna

Adducyna jest powszechnie ekspresjonowanym białkiem, które przyjmuje postać tetramerów złożonych z heterodimerów α/β bądź α/γ . Każda podjednostka adducyny składa się z co najmniej trzech domen, zwanych domeną głowy, szyi i ogona. Dwie ostatnie są zaangażowane w nakrywanie końców filamentów aktynowych i łączenie tych miejsc ze spektrynami. Podobnie jak α II-spektryna, białko to posiada miejsca wiązania dla kalmoduliny. Zarówno aktywność kalmoduliny jak i fosforylacja przez kinazę C działa hamująco na udział adducyny w wiązaniu aktyny i spektryny [73]. Szczególnie duże ilości tego białka ulegają ekspresji w układzie nerwowym, zwłaszcza w kolcach dendrytycznych i stożkach wzrostu aksonów. Występowanie heterodimerów α/β jest specyficzne dla mózgu i tkanek hematopoetycznych[74].

Oprócz omówionych powyżej cząsteczek, ze spektrynami oddziałuje wiele więcej białek o różnorodnych funkcjach. Sumarycznie, wszystkie typy spektryn oddziałują w sposób bezpośredni z co najmniej 273 cząsteczkami, a α II-spektryna z 183[75]. Wybrane grupy interakcji dotyczących α II-spektryny przedstawiono w poniższej tabeli 1.

Tabela 1. Wybrane grupy białek oddziałujące z a II spektryną. [75] [76]

neurofascyna	Talina	kalpaina
synapsyna	Wimentyna	kaspaza 3, 7
białka SMAD	Winkulina	kinaza białkowa aktywowana mitogenem 3,6,8
białko 14-3-3	łańcuch alfa fibrynobogenu	kinaza białkowa C
białko Wnt10B	łańcuchy kolagenu	kinaza tyrozynowa 2
cyklina-T1	cząsteczki adhezyjne komórek nerwowych	kinaza tyrozynowa JAK2
czynnik jądrowy K B	homolog synaptobrewiny YKT6	kinaza tyrozynowa Tec
czynnik krzepnięcia III	aktywator NFkB związany z rodziną TRAF	niereceptorowa fosfataza tyrozynowa
czynniki rybozylacji	białko cytoplazmatyczne NCK1	specyficzna dla lizyny demetylaza 4B
homolog Cdc42	białko podobne do Ena/VASP	GTPazy Hras, Kras, Nras
insulina	białko Rac1 związane z Ras	antygen CD151
alfa-centraktyna	białko wiążące receptor czynnika wzrostu	receptor kwasu foliowego
desmina	embrionalny czynnik wzrostu/różnicowania 1	receptor światła ER zatrzymujący białko 1
dynaktyna	FANCG białko G grupy anemii Fanconiego	integryny
dyneina	inhibitor metalopeptydazy TIMP	nefryna
ezryna	NODAL homolog węzłowy	białko zawierające domenę transbłonową emp24
filamina A	ogólny czynnik transportu pęcherzykowego p115	elementy kompleksu receptora Golgiego SNAP
karioferyna	transformujące białko RhoA	białka oligomerycznego kompleksu Golgiego
lamina B1	dehydrataza GDP-mannozy 4,6	czynnik wymiany nukleotydów G aparatu Golgiego
miozyna	E3 ligazy ubikwitynowo-białkowe SMURF	kanał sodowy
paksylina	enzym UBC9 koniugujący SUMO	kanał sodowy bramkowany napięciem
plakoglobina	białka nakrywające f-aktynę	ATP-aza transportująca sód/potas
plektyna	białka rodziny RP/EB związane z mikrotubulami	kanał potasowy bramkowany napięciem KQT
syntaksyna	białko wchodzące w skład połączeń ścisłych ZO2	kanał wapniowy bramkowany napięciem typu L

3.1.5 Degradacja proteolityczna spektryn (znaczenie w zdrowiu i chorobie, mechanizmy regulacji)

Kalpainy

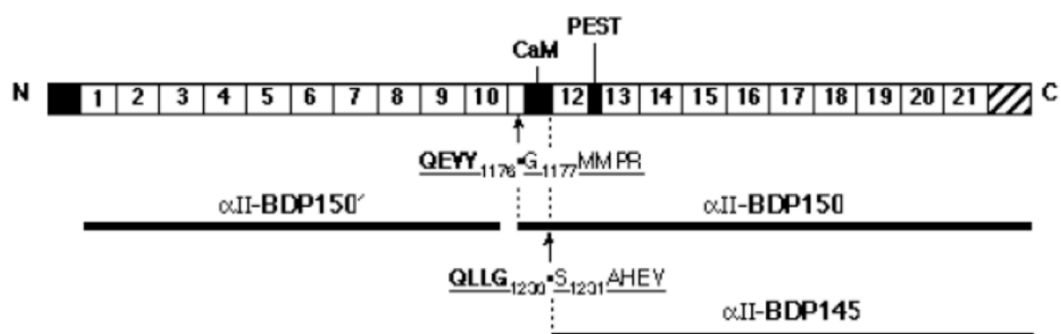
Kalpainy to ulegające powszechnej ekspresji proteazy cysteinowe. Są aktywowane przez wzrost stężenia jonów wapniowych. Spośród kilkunastu form dwie są bardzo dobrze poznane: kalpaina 1 (μ -mikromolarna) oraz kalpaina 2 (m-milimolarna). Różnią się one wymaganym do aktywacji stężeniem jonów wapniowych [77][78]. Oba te enzymy są heterodimerami składającymi się z dwóch podjednostek - dużej katalitycznej, zawierającej miejsce aktywne (~80 kDa) i małej regulatorowej (~28 kDa). Każda z podjednostek zawiera

pięć motywów dłoni EF. Kodują je kolejno geny dla podjednostek katalitycznych CAPN1 i CAPN2, oraz dla regulatorowej CAPN4[79].

Degradacja spektryn przez kalpainy

Kalpaina jest zdolna do proteolizy α II- i β -spektryn. Trawienie wpływa na powstawanie fragmentów niezdolnych do sieciowania, zaburzając wiązanie aktyny, powstawanie tetramerów i kotwiczenie spektryn do błony komórkowej[80]. Postuluje się, że trawienie spektryn przez kalpainy jest związane raczej z fizjologicznymi procesami komórkowymi, w przeciwieństwie do silnie zaangażowanych w procesy apoptotyczne kaspaz[81].

β -spektryny są trawione w następujących miejscach: β I-spektryna - W2061/A2062[82], β II-spektryna - Q1440/S1441, S1447/Q1448, L1482/A1483 i A2066/ A2067[83][84]. Raportowano również proteolizę β IV-spektryny [85]. W warunkach *in vitro* α II-spektryna jest cięta szybciej niż β II-spektryna[83]. Miejsce proteolizy jest ulokowane pomiędzy domeną SH3, a miejscem wiązania kalmoduliny w domenie CCC w szczególnie wrażliwym na trawienie przez peptydazy obszarze[48]. Cięcie następuje pomiędzy resztami Y1176, a G1177. Zlokalizowano też drugie miejsce proteolizy G1230-S1231. Trawienie skutkuje pojawieniem się produktów proteolizy (SBDP-ang. *spectrin breakdown products*). Dla proteolizy α II-spektryny obserwuje się SBDP o długości 145 i 150 kDa, natomiast w przypadku β II-spektryny powstają fragmenty o długościach 220 i 215 kDa. W obecności kalmoduliny najwięcej produktów wspomianej proteolizy ma długość ok. 160 i 120 kDa. Powstają również produkty o długości ok. 60 kDa[83]. Schematyczne przedstawienie degradacji α II-spektryny przez kalpainę przedstawiono na poniższej ilustracji - rycina 6[83].



Rycina 6. Schematyczne przedstawienie degradacji α II-spektryny przez kalpainę.

(Źródło: Glantz, Susan B et al. "Sequential degradation of alphaII and betaII spectrin by calpain in glutamate or maitotoxin-stimulated cells." *Biochemistry* vol. 46,2 (2007): 502-13. doi:10.1021/bi061504y)

Regulacja kalpainowej proteolizy spektryn przez kalmodulinę

Określono, że kalpains działają bardziej na zasadzie powinowactwa do określonych struktur przestrzennych niż jako takiej sekwencji liniowej aminokwasów[86]. Do regulacji proteolizy zarówno α II-spektryny, jak i β -spektryn, wykorzystywana jest kalmodulina[47][87]. Oddziaływanie z nią promuje proteolizę tych białek. Jak wyżej wspomniano, w domenie CCC α II-spektryny blisko siebie są położone miejsca wiązania kalmoduliny oraz specyficzne miejsce dla kalpains. Kalmodulina działa jako allosteryczny regulator, poprzez podniesienie podatności struktury α II-spektryny na proteolizę. Zaobserwowano także, że wzrost temperatury wpływa dodatnio w liniowy sposób na poziom proteolizy α II-spektryny przez kalpainę zarówno w obecności, jak i bez kalmoduliny, co ma związek z rozluźnieniem struktury[88]. β II-spektryna w odizolowanej formie ulega proteolizie w tych samych miejscach, co w formie tetrameru. Sformułowano koncepcję, według której w dimerze sama α II-spektryna może blokować do pewnego stopnia proteolizę β -spektryny, stwarzając zawadę steryczną[83]. Samo trawienie α II-spektryny nie prowadzi do rozpadu tetrameru[88]. Natomiast warto odnotować również obserwację, że kalmodulina jest obecna w kompleksie z α II- i β II-spektryną w momencie proteolizy α II-spektryny, a oddysocjowuje od kompleksu dopiero po cięciu beta spektryny[89] w miejscu oddalonym o ok. 10 nm od miejsca wiązania kalmoduliny. Dopiero cięcie obu struktur doprowadza do rozpadu tetrameru[88].

Regulacja kalpainowej proteolizy spektryn przez fosforylację.

Na trawienie α II-spektryn przez kalpainę ma wpływ również fosforylacja reszty Tyr1176, znajdującej się w miejscu proteolizy. Modyfikacja ta zmniejsza podatność na proteolizę. Kinazy c-Src i Lck są zdolne do oddziaływania z α II-spektryną poprzez domenę SH3. Dodatkowo α II-spektryna wiąże tyrozynową fosfatazę o niskiej masie molekularnej (LMW-PTP), która defosforyluje wskazaną wcześniej resztę tyrozyny i zwiększa podatność na trawienie[90]. Zależność ta sprawia, że α II-spektryna jest kluczowym punktem łączącym regulację opartą na sygnałowaniu wapniowo-kalmodulinowym a szlakami opartymi na kinazach i fosfatazach tyrozynowych. To swoiste skrzyżowanie szlaków metabolicznych ma wpływ na wiele procesów komórkowych np. endocytozę, czy aktywację receptora NMDA (N-metylo-D-asparagianu), będącego kanałem bramkowanym glutaminianem, a uczestniczącym w plastyczności synaps i szybkiej transmisji. Ufosforylowanie reszty Tyr1176 wpływa m. in. na wiązanie α II-spektryny z białkiem 14-3-3 zaangażowanym w plastyczność synaptyczną i migrację neuronów. Modyfikacja ta działa jak przełącznik

regulujący wzrost neurytów w szlaku pobudzonym przez NCAM (cząsteczkę adhezji komórek nerwowych) [8][31].

Fizjologiczne role kalpainy

Nie tylko białka cytoszkieletu są substratami dla kalpainy. Do tego grona zaliczają się również enzymy, receptory przezbłonowe, czynniki transkrypcyjne. Łącznie jest to ok. 5% białek wewnątrzkomórkowych[91]. Kalpaina bierze udział w takich procesach, jak remodelowanie połączeń cytoszkieletu i błony komórkowej przy ruchach komórki i fuzji komórek, przekazywanie sygnału poprzez modyfikację proteolityczną białek, degradacja enzymów kontrolujących bieg cyklu komórkowego, ale też w regulacji ekspresji genów, apoptozie i przebiegu długotrwałego wzmocnienia[92]. Kalpaina 1 jest w związku z tym łączona z takimi zadaniami jak neuroprotekcja, neuroplastyczność, uczenie się i pamięć[93]. Odpowiedni poziom kalpainy 1 jest wymagany do powstawania właściwej liczby połączeń nerwowych, równoległych do synaps komórek Purkiniego i utrzymania prawidłowej wydajności tych połączeń, oraz dojrzewania warstwy ziarnistej. Niedobór zaś prowadzi do ataksji mózdzkowej[79]. Ma ona również istotne znaczenie dla właściwej agregacji płytek krwi [94]. Kalpaina jest też wymagana do utrzymania odpowiedniej liczby i gęstości kolców dendrytycznych w neuronach piramidowych oraz do właściwego długotrwałego wzmocnienia.

Poziomy ekspresji kalpainy 1 i 2 są zmienne w zależności od typu komórek i etapu rozwojowego. W czasie rozwoju embrionalnego mózgu kalpaina 2 uczestniczy w gliogenezie, zaś kalpaina 1 hamuje różnicowanie komórek glejowych i komórek centralnego układu nerwowego. Na tym etapie w trakcie różnicowania poziom ekspresji kalpainy 2 wzrasta, kalpainy 1 natomiast maleje. Wczesny okres postnatalny jest zdominowany przez aktywność kalpainy 1. Uogólniając aktywność kalpainy 2 jest wyższa niż kalpainy 1 i rośnie wraz z wiekiem, szczególnie w korze, prążkowie i mózdzku[79].

W kontekście integralności cytoszkieletu, proteoliza kalpainą powoduje utratę zdolności α II-spektryny do sieciowania filamentów aktynowych i do jej wiązania do błony komórkowej. Wpływa to na plastyczność komórki[95]. W świetle powyższych informacji nie dziwi, iż proteoliza łańcucha α II-spektryny przez kalpainę jest związana z takimi procesami, jak aktywacja receptora NMDA w odpowiedzi na kortykoliberynę [96], egzocytoza, endocytoza, degranulacja neutrofilii, remodelowanie synapsy, aktywacja płytek krwi [90], regulacja kształtu komórki, ruchliwość, różnicowanie komórkowe, czy cytokineza[63]. Proteoliza α II-spektryny przez kalpainę ma miejsce też w procesie aktywacji astrocytów[36].

Jest ona również zaangażowana w procesy związane z adhezją komórki i powstawaniem lamellipodii[8]. Oprócz spektryn kalpaina jest zdolna do sprawnego trawienia również innych białek strukturalnych cytoszkieletu, wpływając na zdolność do sieciowania, w szczególności tych powiązanych z błoną. Do grona tego zalicza się białka 4.1a i 4.1b, ankirynę, adducynę, talinę, winkulinę, filaminę i ezrynę oraz należące do filamentów pośrednich desminę i wimentynę. Proteoliza dotyczy też białek kotwiczących w błonie - receptorów i kanałów. Chociaż α II-spektryna pozostaje głównym substratem dla kalpainy[36], to podobnie kalpaina, jest zdolna do proteolizy grupy kinaz i fosfataz. Przykładami mogą być kinaza CaM II, kinaza receptora EGF, kinaza PKC oraz fosfataza FAK125. W eksperymentach *in vitro* wykazano, że kalpaina doprowadza niektóre cząsteczki do stanu, w którym zachowują większość sekwencji i nie tracą zdolności katalitycznych, natomiast wykluczone zostają ich immanentne mechanizmy regulacji. Dzieje się tak w przypadku fosfodiesterazy PDE1, której aktywność przed proteolizą jest dodatnio regulowana przez kalmodulinę oraz w przypadku kinazy PKC, która w następstwie cięcia jest stale aktywna. Innymi substratami są niektóre czynniki transkrypcyjne jak c-Jun, c-Fos i p53. Produkty degradacji α II-spektryny są obserwowane w przebiegu apoptozy. Dokładne zrozumienie zagadnień związanych z apoptozą, w kontekście integralności cytoszkieletu, jest złożone, przez wzgląd na występowanie w tym procesie również proteolizy α II-spektryny przez kaspazy oraz zdolność kalpain i kaspaz do proteolizy kaspaz, i innych czynników regulujących postęp apoptozy. W niektórych warunkach kalpainy działają jako czynnik sprzyjający apoptozie w innych przeciwnie[92].

Patologiczna aktywność kalpainy

Podwyższoną aktywność kalpainy raportowano, omawiając wiele schorzeń neurologicznych[90]. Poważne uszkodzenia w centralnym układzie nerwowym powstają często na skutek utrzymującego się stanu zapalnego, doprowadzającego poprzez neurodegenerację do śmierci neuronów. Ma to miejsce również na skutek zaburzenia proteostazy i nadmiernej aktywacji kalpainy - dochodzi wtedy do aktywacji szklaku sygnalizacji wewnątrzkomórkowej przez NFkB, co prowadzi do wzrostu poziomu interleukiny prozapalnej IL-2[79]. Układ odpornościowy odpowiada na aktywację kalpainy aktywacją i migracją limfocytów T (CD4+ i CD8+). Ekspresja kalpainy może też regulować cząsteczki kostymulatorowe CD80 i CD86. Aktywność kalpainy prowadzi do odpowiedzi systemu w postaci aktywacji mikrogleju i immobilizacji astrocytów, które są obserwowane w chorobach neurodegeneracyjnych m. in. w chorobie Parkinsona[97]. W schorzeniu tym w specyficznych obszarach mózgu

dochodzi do aktywacji szlaku z udziałem kalpajny, cdk5 i p25, który skutkuje degradacją i agregacją α -synukleiny[98]. Kalpajna wydzielana przez komórki gleju uczestniczy też w obserwowanych w stwardnieniu rozsianym procesach prowadzących do degeneracji otoczki mielinowej aksonów [99]. Oprócz tego jej patologiczna aktywność jest odnotowywana przy urazach, udarze niedokrwiennym mózgu, dystrofii mięśniowej, w tym dystrofii Duchenna, gdzie na skutek utraty funkcji dystrofiny również dochodzi do gwałtownego wzrostu stężenia Ca^{2+} w mięśniach[100]. Przy udarze mózgu niedokrwienie i hipoksja powodują wzrost stężenia Ca^{2+} , co skutkuje degradacją α II-spektryny i MAP2. W tkankach dochodzi wtedy do apoptozy lub nekrozy. Podobnie przy zawale serca, gdzie odnotowano degradację zarówno α II-spektryny jak i desminy[92]. W chorobie Alzheimera wysoka aktywność kalpajny utrzymuje się długo przed śmiercią komórek nerwowych. Jest manifestowana w postaci wysokich poziomów SBPD w mózгах i płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów. W eksperymentach na myszach będących modelem dla choroby Alzheimera, SBPD były lokalizowane w komórkach w otoczeniu płytki amyloidowej[97][101]. Spektryna jest obecna również w ciałkach Lewy'ego w chorobie Parkinsona[18]. W chorobie Huntingtona natomiast, aktywność kalpajnowa prowadzi do powstawania złogów poliglutaminy na skutek proteolizy białka Htt[91][102]. Co ciekawe podwyższona aktywność kalpajny jest też obserwowana w erytrocytach pacjentów z zaburzeniami obsesyjno-kompulsywnymi [103].

Proteolizę α II-spektryny opisano jako skutek uszkodzenia komórek w różnych tkankach[90]. Warto zauważyć, że tkanka mózgu jest szczególnie bogata w spektryny, które stanowią ok 3% obecnych tam białek błonowych[98]. Z powodu urazu neurologicznego dochodzi do gwałtownego wzrostu stężenia jonów wapniowych w komórce. Następstwem tego są zaburzenia w początkowym fragmencie aksonu (AIS), w tym proteoliza β IV-spektryny, szczególnie reprezentowanej w tym odcinku komórki nerwowej. Proteoliza ta wpływa na utratę polaryzacji neuronów i jest zdarzeniem nieodwracalnym, ale zachodzącym niezależnie od procesów śmierci neuronu. Podobnie α II- i β II-spektryny również ulegają proteolizie przez kalpajnę na skutek urazu neuronów[85]. Zaburzenia AIS mogą prowadzić do przekształcenia aksonu w dendryt[104]. Produkty degradacji spektryn będące skutkiem zwiększonej w porównaniu do fizjologicznej aktywności kalpajny są obecne w agregatach białkowych występujących w mózгах chorych w przypadku choroby Alzheimera i choroby Parkinsona[18][98]. Na skutek patologicznie podwyższonej aktywności kalpajny po podwyższeniu stężenia jonów Ca^{2+} może dochodzić do uszkodzeń w błonie mitochondriów co z kolei prowadzi do wycieku cytochromu-c, zainicjowania aktywności kaspaz i rozwoju

apoptozy[105]. Produkty degradacji spektryn mogą służyć jako biomarkery uszkodzenia neuronów, krótko po urazie są obserwowane SBPD 150 i 145, podczas gdy SBPD 120 są obecne przez dłuższy czas[98]. Wzrost poziomu jonów wapniowych i idąca za nią aktywacja kalpajny skutkująca proteolizą wielu białek cytoszkieletu komórkowego w szczególności spektryn jest wspólnym procesem w postępie wielu schorzeń neurodegeneracyjnych. Na razie niejasne jest jeszcze czy proteoliza szkieletu spektrynowego przez kalpainę następuje już jako skutek toczących się procesów chorobowych i uogólnionej neurodegeneracji, czy jednak jest to kluczowe zdarzenie które może stanowić z powodzeniem cel dla potencjalnych terapii w omówionych schorzeniach [18].

Kalpastatyna

Aktywność proteolityczna może być regulowana przez inhibitory kalpajny m. in. przez jedyny znany endogenne peptyd o tej funkcji- kalpastatynę[106]. Kalpastatyna jest obecna jedynie u kręgowców. Istnieją trzy formy splicingowe kalpastatyny działające jako inhibitor typ I,II i III, ale zidentyfikowano również formę która wiąże kalpainę przy braku jonów wapniowych i pełni funkcję ochronną przed jej degradacją[107]. Kalpastatyna nie jest bezwzględnie niezbędna dla normalnie funkcjonującego organizmu, natomiast ma zasadnicze znaczenie w stanach patologicznych. Białko to ma swój udział w proliferacji nerwowych komórek macierzystych i migracji neuroblastów w obszarach, w których neurogeneza trwa całe życie. Eksperymentalny nokaut kalpastatyny prowadził u myszy do zaburzeń lokomocyjnych i lękowych[79]. W kontekście chorób w których występuje przewlekły stan zapalny m. in. w chorobie Alzheimera zastosowanie inhibitorów kalpajny w tym kalpastatyny jest proponowane jako potencjalna strategia terapeutyczna[108][109][110]. Inhibitory mogą też pomóc w zachowaniu struktury cytoszkieletu w AIS po wystąpieniu uszkodzenia mechanicznego, co z kolei może ograniczyć wystąpienie nieprawidłowych połączeń synaptycznych po urazie[85]. Co ważne, nadekspresja kalpastatyny nie wpływa znacząco na uogólniony poziom substratów kalpajny, gdyż proteoliza silnie zależy od konkretnych sygnałów komórkowych i wewnątrzkomórkowej lokalizacji enzymu i jego substratów[92]. Istotnie, kalpastatyna w porównaniu do farmaceutycznych inhibitorów, których celem jest kalpaina charakteryzuje się wyższą selektywnością. W przypadku inhibitorów farmaceutycznych często też występuje problem przepuszczalności bariery krew-mózg oraz niestabilność metaboliczna[111].

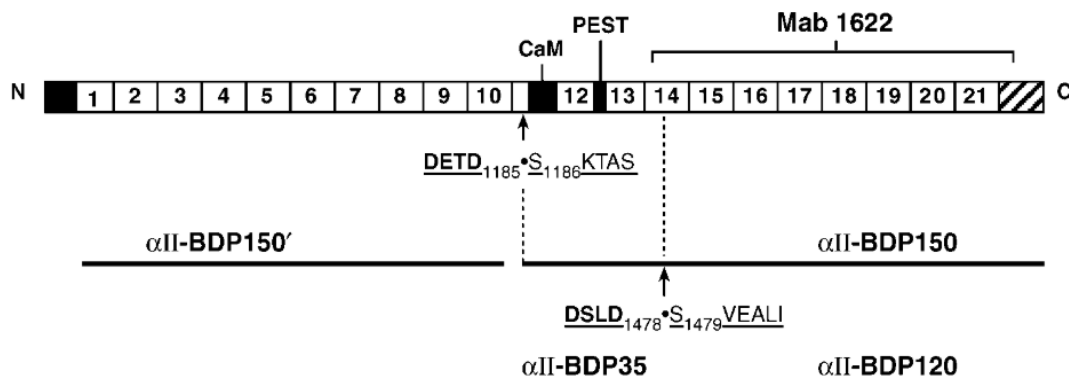
Alternatywne metody modulowania proteolizy

Użycie inhibitorów kalpastatyny czy farmaceutycznych, jest mimo wszystko działaniem uogólnionym. Bardziej precyzyjne podejście może opierać się na wyborze poszczególnych substratów i zmianie ich swoistej podatności na proteolizę np. poprzez wpływ na bardziej specyficzne białka. W przypadku α II-spektryny może to być inhibicja fosfataz odpowiedzialnych za defosforylację reszty Y1176 co spowoduje utrzymywanie większej ilości łańcuchów w stanie ufosforylowanym odpornym na proteolizę, bądź też pobudzenie specyficznych kinaz do wzmożonej fosforylacji tej reszty aminokwasowej[18].

Degradacja spektryn przez kaspazy

Tylko spektryny nieerytrocytarne są substratem dla kaspaz. Tną beta spektryny w następujących miejscach: β II-spektryny- D1457/S1458 i D2146/S2147 [89], natomiast α II-spektryna jest cięta w dwóch miejscach D1185/S1186, D1478/S1479 [47], proteoliza zachodzi z udziałem kaspaz 2,3,7. Kaspaza 3 jest główną kaspazą wykonawczą dla spektryn podczas apoptozy, natomiast kaspaza 2 wykazuje niższą aktywność w cięciu α II-spektryny. Białko to ulega ekspresji w dwóch izoformach krótszej hamującej apoptozę i dłuższej promującej apoptozę, tylko dłuższa forma oddziałuje z α II-spektryną.[48] Proteoliza spektryn następuje stopniowo ze względu na to że nie wszystkie miejsca proteolizy są eksponowane jednocześnie. Jeśli mowa o α II-spektrynie, w pierwszej kolejności dochodzi do proteolizy w miejscu bliskim do domeny wiążącej kalmodulinę zaledwie dziewięć reszt aminokwasowych od miejsca specyficznego dla kalpainy, następnie w miejscu D1478/S1479. Inaczej niż w przypadku kalpainy jednocześnie z proteolizą α II-spektryny dochodzi do proteolizy β II-spektryny w której preferowane jest miejsce D1457/S1458, bliskie miejscu specyficznemu dla kalpainy, taki schemat prowadzi do szybszego rozpuszczenia cytoszkieletu. Proteoliza spektryn jest ważnym zdarzeniem łączącym aktywację kaspaz ze śmiercią komórkową. Inhibitory kaspaz blokują postęp śmierci komórki[89]. Proteoliza α II-spektryny jest hamowana przez jej oddziaływanie z aktywowaną wapniem kalmoduliną silniej wobec kaspaz 2 i 7, a słabiej dla kaspazy 3[48]. Trawienie kaspazami ma związek z tworzeniem pęcherzyków błonowych, fragmentacją błony i apoptozą[112][113][114]. Na skutek proteolizy przez kaspazę 3 powstają kolejno produkty SBPD 150 kDa i 120 kDa. Produkty proteolizy α II-spektryny przez kalpainę (SBPD 145 i 150) również mogą ulegać proteolizie przez kaspazę 3 tworząc mniejsze fragmenty w tym SBPD 120 kDa. Produkt SBPD 120 wskazuje

na apoptotyczny przebieg śmierci komórki[98]. Schemat cięcia łańcucha α II-spektryny przez kaspazy zamieszczono na rycinie 7[89].



Rycina 7. Schematyczne przedstawienie proteolizy α II-spektryny przez kaspazę 3.

(Źródło: Wang, K K et al. "Simultaneous degradation of α II- and β II-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells." The Journal of biological chemistry vol. 273,35 (1998): 22490-7. doi:10.1074/jbc.273.35.22490)

Reasumując informacje zawarte w tym podrozdziale, kalmodulina, kalpaina i kaspazy tworzą razem złożony system sterowany stężeniem jonów wapniowych, a zawiadujący stabilnością cytoszkieletu spektrynowego.

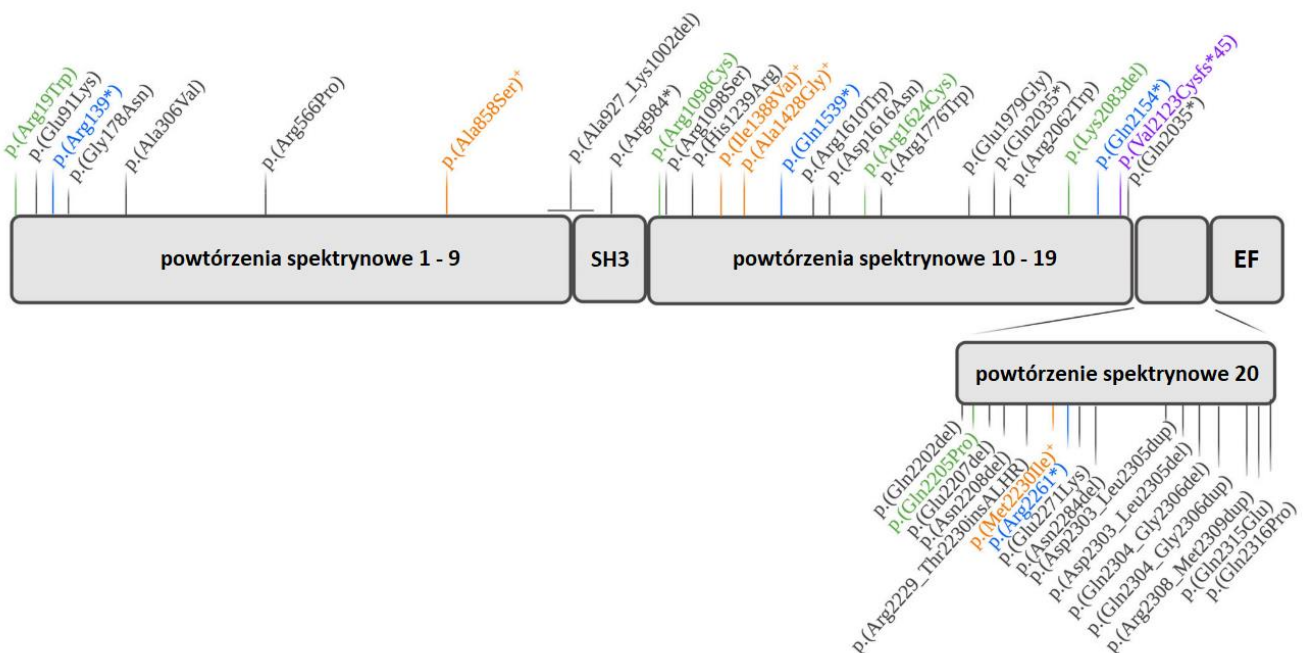
3.2. Spontaniczne mutacje α II-spektryny zaburzające stabilność powtórzenia spektrynowego i ich konsekwencje fizjologiczne

Istnieje szereg dziedzicznych chorób neurodegeneracyjnych wynikających z mutacji w obrębie genów spektrynowych. Do jednych z szerzej omawianych w literaturze należą ataksje mózdkowo rdzeniowe (SCA)[115] oraz wczesne dziecięce epileptyczne encefalopatie (EIEE)[116]. Najbardziej znaną spektrynopatią jest ataksja mózdkowa typu 5 (SCA5). Ma ona związek z mutacjami w obrębie genu β III-spektryny, które odpowiadają za większość spośród rozpoznanych neuropatologii, dotyczących spektryn. Co ciekawe udowodniono że dotknięci tą patologią byli m. in. krewni Abrahama Lincolna, a on sam wykazywał objawy ataksji takie jak nierówny chód[117]. Z genem tym wiąże się również autosomalna recesywna ataksja mózdkowa związana ze spektrynami typu 1 (SPARCA1)[18].

Mutacje w obrębie α II-spektryny prowadzą do wczesnej dziecięcej epileptycznej encefalopatii typu 5 (EIEE5)[118]. Do objawów zalicza się niepadaczkowe mioklonie, dyskinezę, mikrocefalię, utratę słuchu, nieuwagę wzrokową. MRI ujawnia atrofię mózdkową, hipomielinację bądź opóźnioną mielinację. Natomiast w obrazie EEG widoczne jest spowolnienie czynności podstawowej, wyładowania wielogniskowe, czy hipsarytmia[1].

Wśród chorych z mutacjami w obrębie tego białka diagnozuje się również dziedziczną neuropatię ruchową, neuropatię obwodową czuciowo-ruchową, dziedziczną paraplegię spastyczną, niepełnosprawność intelektualną o różnym stopniu nasilenia oraz ataksję mózdkową[2][3]. To duże zróżnicowanie w stawianych diagnozach ma swoje odzwierciedlenie w pierwotnych przyczynach schorzenia. W zależności od miejsca mutacji mogą następować bardzo zróżnicowane skutki molekularne prowadzące na pacjentów neurodegenerację o szerokim spektrum zmian makroskopowych[119]. Jednakże mimo zróżnicowania funkcjonalnego poszczególnych fragmentów łańcucha α II-spektryny, region w którym jest położona mutacja nie decyduje w 100% o skutkach biologicznych[2]. Oczywiście kluczowe znaczenie ma charakter mutacji, jaka konkretna reszta jest nią dotknięta, do jakiego podstawienia aminokwasowego dochodzi. Zdarzają się substytucje, delecje, insercje i duplikacje oraz mutacje nonsensowne i zmiany ramki odczytu wpływające na znaczącą część sekwencji[1][2][119][120]. Te ostatnie często skutkują produkcją całkowicie niefunkcjonalnego peptydu. Nie jest możliwe dokładne określenie fenotypu na podstawie identyfikacji regionu dotkniętego mutacją. Jednak ostatnio podjęto się pewnego przybliżenia opisującego takie zależności.

Dotychczas opisano ok. 40 mutacji w obrębie genu α II-spektryny, z czego znacząca ilość ok. 40% dotyka powtórzenia 20, jak wcześniej wspomniano, zaangażowanego



Rycina 8. Mutacje zidentyfikowane w sekwencji α II-spektryny.

(Modyfikowane na podstawie: Van de Vondel, Liedewei et al. "De Novo and Dominantly Inherited SPTAN1 Mutations Cause Spastic Paraplegia and Cerebellar Ataxia." Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society vol. 37,6 (2022): 1175-1186. doi:10.1002/mds.28959)

w tworzenie heterodimerów, nieprawidłowości w tym regionie mogą prowadzić do powstawania agregatów spektrynowych przez wzgląd na zaburzone oddziaływania między partnerami dimeryzacji. Jest to związane z diagnozowaniem ciężkich przypadków zespołu Westa i EIEE5. Z kolei mutacje nonsensowne, przez wzgląd na haploinsuficjencję, łączą się często z występowaniem dziedzicznej neuropatii ruchowej o średnim stopniu nasilenia. Co istotne zmienność w korelacji między regionem mutacji i fenotypem w przypadku α II-spektryny jest znacznie większa niż w przypadku β -spektryn, gdzie zależności te są ściślej określone. Zidentyfikowano też kilka mutacji w obrębie powtórzeń 9-11, również w towarzyszących im domenach SH3 i CCC [2].

Należy zwrócić szczególną uwagę na fakt iż w przypadku tej samej mutacji, nawet w obrębie jednej rodziny, przy nieznacznie wszakże zmienionym podłożu genetycznym obserwuje się różne nasilenie objawów a nieraz nawet różnorakie objawy chorobowe[121]. Mutacje w α II-spektrynie często prowadzą do nieprawidłowości w funkcjonowaniu i żywotności komórek nerwowych w tym w szczególności komórek Purkiniego, wyspecjalizowanego typu neuronów obecnych w korze mózdzku[122]. Komórki te charakteryzują się licznymi, rozległymi, rozgałęzionymi dendrytami ułożonymi w kształt podobny do wachlarza, jako jedyne wysyłają sygnały wyjściowe z kory mózdzku przez co mają wpływ na hamowanie neuronów w jądrach przedśionkowych i mózdzku[123].

Możliwymi mechanizmami prowadzącymi do tej patologii są brak odpowiedniej ilości funkcjonalnego białka przez wzgląd na haploinsuficjencję, wytrącanie zmutowanego białka z roztworu przez obniżoną rozpuszczalność wynikającą ze zmiany sekwencji aminokwasowej, tworzenie trwałych agregatów heterodimerów α II- i β II- bądź β III- spektryny, bądź też zaburzenie oddziaływania z białkami łączącymi spektryny z błoną komórkową, czy też z białkami regulatorowymi[120][124][125][126]. Łączy się to zstępnie ze zmianami makroskopowymi i objawami ogólnymi diagnozowanymi u pacjentów.

Co ciekawe analogiczną do myszy „R1098Q” pod względem umiejscowienia mutację udało się wykryć u człowieka – R1098C, gdzie długa dodatnio naładowana reszta aminokwasowa została zastąpiona resztą cysteiny zawierającą grupę sulfhydrylową. Ma ona swoje przełożenie w zbieżnych z myszami C57BL/6Spna2mut objawach chorobowych takich jak ataksja mózdzkowa, czy zanik kory mózdzku. U pacjenta zdiagnozowano również niepełnosprawność intelektualną. W swojej publikacji jako przyczynę patologii badacze wskazują na utratę oddziaływań zapewnianych przez dodatnio naładowaną resztę argininy[2].

3.3. Myszy szczepu R1098Q jako model zwierzęcy ludzkich dominujących spektrynopatii *SPTANI*

3.3.1 Opisanie modelei spektrynopatii *SPTANI*

Dotychczas do badań związanych z molekularnymi efektami dysfunkcji α II-spektryny wykorzystywano kilka modeli zwierzęcych. Podjęto próbę wytworzenia linii knock-out pozbawionej α II-spektryny, co jak się okazało, skutkowało letalnym fenotypem u homozygot już na etapie rozwoju zarodkowego, opóźnionym wzrostem i anomaliami w obrębie twarzoczaszki oraz cewy nerwowej i serca. Utrata α II-spektryny spowodowała obniżenie ilości β II- i β III-spektryny o ok 80% oraz błędy w ich dystrybucji, przy czym nie występowało zjawisko kompensacji braków przez α I-spektrynę. Heterozygoty przeciwnie nie wykazywały zmienionego fenotypu, co ograniczyło możliwość ich wykorzystania w badaniach nad funkcjonalnością α II-spektryny. Prowadzono również hodowlę *in vitro* mysich fibroblastów płodowych pozbawionych α II-spektryny. Wykazały one upośledzony wzrost i adhezję do podłoża, wrzecionowatą morfologię i rzadkie lamellipodia [127]. Innym przykładem jest linia, w której usunięto domenę CCC. Co ciekawe nawet homozygotyczne myszy nie wykazały fenotypu odmiennego do typu dzikiego. Wydawały się zdrowe, rozmnażały się normalnie i nie wykazywały anomalii histologicznych. Okrojona wersja białka prawidłowo wpasowywała się w szkielet błonowy. Wyniki badań sugerowały, że proteoliza kalpainą czy kaspazami nie jest niezbędna dla najważniejszych funkcji komórki. Nie zbadano jednak wpływu tej modyfikacji na zdolności poznawcze i pamięć[47]. Stworzono też linię myszy, w której knock-out jest ograniczony do kardiomiocytów. Wykazywały one znaczące zmiany strukturalne komórkowe skutkujące przyspieszonym remodelingiem, fibrozą i arytmia. Na poziomie molekularnym występowała podwyższona ekspresja α I-spektryny i obniżona β -spektryn ze zmienioną lokalizacją. Modyfikacja miała też wpływ na zmianę ekspresji i transportu kanałów jonowych[128]. Większość powyższych modeli prezentuje mechanizm patologii oparty na niedoborze odpowiedniego transkryptu. W literaturze opisano też przypadki gdzie dochodziło do mutacji w obrębie domen odpowiedzialnych za dimeryzację, co skutkowało u chorych agregacją białek[118]. Zatem jak już wcześniej wspomniano przy pojawieniu się mutacji prowadzących do neurodegeneracji najczęściej albo brakuje odpowiedniej ilości białka, albo też białko tworzy złogi w komórce. Mutacja w mysim modelu Spna2mutR1098Q jest pod tym względem odmienna, gdyż ekspresjonowanie białka nie jest ograniczone, a zarazem nie dochodzi też do agregacji i tworzenia złogów białek wywołujących patologie w obrębie komórki.

Mechanizm patologii prawdopodobnie opiera się w tym przypadku nie na utracie podstawowej funkcji zmutowanego białka, ale na zaburzeniu odpowiedzi α II spektryny w szlakach sygnałowych sterowanych poziomem jonów wapniowych i kalmoduliną angażujących kalpainę, w punkcie krzyżującym się jednocześnie ze szlakami kinaz tyrozynowych.

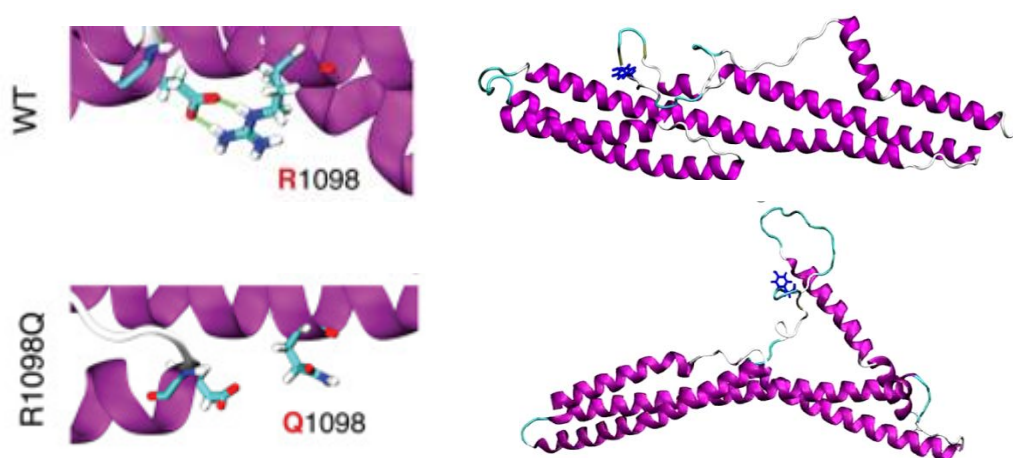
3.3.2 Myszy szczepu R1098Q

Badana w naszym laboratorium mutacja R1098Q, wystąpiła spontanicznie u myszy szczepu C57BL/6J znajduje się w obrębie domeny CCC w 10 powtórzeniu spektrynowym. Reszta aminokwasowa dotknięta występowaniem tej mutacji R1098Q jest ewolucyjnie silnie konserwowana, co sugeruje jej wysokie znaczenie funkcjonalne. Reszta ta tworzy mostki solne spinające alfa helisy powtórzenia spektrynowego. Mutacja jest dziedziczona zgodnie z prawami Mendla, w sposób autosomalny, dominujący. Myszy dotknięte tą mutacją charakteryzują się zmniejszoną masą ciała, zaburzeniami równowagi i koordynacji ruchowej. Pojawia się u nich atrofia mózdzku, zmniejszenie liczby komórek Purkiniego i astroglioza. Dendryty są poszerzone a zagęszczenia postsynaptyczne rzadkie. Występują różnice w kolokalizacji spektryn w neuronach, a poziom β III spektryny ulega obniżeniu. U homozygot często obserwowane są deformacje czaszki i krwotoki podczaszkowe, umierają już na etapie embrionalnym. Poprzez analizę WB tkanek myszy z wykorzystaniem przeciwciała anti- α II-spektryna już na etapie embrionalnym u homozygot zaobserwowano znaczną ilość produktów świadczących o degradacji α II-spektryny przez kalpainę, nie obserwując jednocześnie produktów świadczących o zaawansowanej proteolizie apoptotycznej z udziałem kaspaz. Z wykorzystaniem immunohistochemii w mózdkach dojrzałych myszy w typie heterozygoty zobrazowano specyficzne dla kalpainsy produkty degradacji w komórkach Purkiniego: w perikarionie oraz w przebiegu dendrytu wierzchołkowego, oraz w komórkach warstwy ziarnistej[129]. Obraz ten przedstawia, że wskazana pojedyncza mutacja R1098Q w łańcuchu α II-spektryny prowadzi do podwyższonej proteolizy α II-spektryny przez kalpainę doprowadzając następnie do rozległych patologii podobnych do tych obserwowanych w omówionych wcześniej ciężkich schorzeniach neurologicznych o zróżnicowanym podłożu.

3.3.3 Modelowanie strukturalne fragmentu z mutacją R1098Q

Modelowanie wykonane przez zespół z uniwersytetu w Yale na podstawie sekwencji dwóch powtórzeń 9 i 10 wykazało zmianę położenia pętli CCC względem trzonu struktury. W tym modelu na skutek utraty oddziaływań zapewnianych przez resztę argininy znajdującej

się pomiędzy dwoma powtórzeniami spektrynowymi, nie jest możliwe utworzenie stabilizującego mostka solnego z pętlą dziewiątego powtórzenia. Zmienia się kąt pomiędzy sąsiadującymi powtórzeniami spektrynowymi a domena CCC zostaje wyeksponowana na zewnątrz. Struktura staje się bardziej wypukła i giętka. Zaprezentowano to na rycinie 9. Podjęto się też modelowania oddziaływania z kalmoduliną i wykonano symulację wolnej energii która ujawniła zmiany termodynamiczne wpływające na oddziaływanie kalmoduliny ze zmutowaną wersją spektryny skutkujące obniżeniem powinowactwa o 15 % [129].



Rycina 9. Modelowanie strukturalne powtórzeń spektrynowych 9 i 10 w typie dzikim i zawierające mutację R1098Q. (Modyfikowano na podstawie: Miazek, Arkadiusz et al. "Age-dependent ataxia and neurodegeneration caused by an all-spectrin mutation with impaired regulation of its calpain sensitivity." Scientific reports vol. 11,1 7312. 31 Mar. 2021, doi:10.1038/s41598-021-86470-1)

3.3.4 Myszy transgeniczne Prp-hCAST

Myszy transgeniczne Prp-hCAST posiadają około 40 kopii ludzkiego genu kalpastatyny (*hCAST*) pod kontrolą promotora prionowego (PrP). Konstrukcja transgeny opierała się na modyfikacji wektora kodującego promotor genu *PrP* (MoPrP.Xho) poniżej którego (3'-końcu) wklonowano cDNA kodujące ludzką kalpastatynę *hCAST*. Następnie kasetę ekspresyjną wycięto z wektora, oczyszczono i użyto do mikroiniekcji przedjądrzy zapłodnionych oocytów FVB/N. Modyfikacja ta zapewnia szeroką dystrybucję kalpastatyny w różnych typach komórek mózgowych i w niektórych tkankach obwodowych. W obrębie kory i hipokampu obserwuje się u heterozygot tych myszy ok. 80-krotny wzrost poziomu kalpastatyny w porównaniu do myszy typu dzikiego bez różnic między płciami. Zwierzęta te były pierwotnie wykorzystywane m. in. do sprawdzenia skuteczności kalpastatyny jako czynnika obniżającego poziom uszkodzeń po urazach mózgu do oceny poziomów

produktów kalpainowej proteolizy dla α II-spektryny, kanału bramkowanego napięciem $\text{Na}_v1.2$ i białka CRMP-2, co okazało się skuteczne w obniżeniu poziomu produktu degradacji α II-spektryny SPBD 145. Wzmoczona inhibicja była aktywna już krótko po urazie i jeszcze długi czas później – może to być istotne dla stanów w których wysoka aktywność kalpainsy utrzymuje się przez dłuższy czas. Co istotne w modelu tym nie zachodzi obniżenie podstawowych poziomów kalpainsy 1 i 2. Nie wykazano też kompensacyjnych zmian w poziomie ekspresji substratów kalpainsy[111]. W kolejnych badaniach ustalono, że po uszkodzeniu tkanek mózgowych modyfikacja ta obniża śmierć neuronów i powoduje ograniczenie objętości zmian chorobowych, wpływa na zachowanie właściwej istoty białej i szarej oraz na poprawę funkcji lokomotorycznych w porównaniu do myszy typu dzikiego. Obniżenie poziomu proteolizy α II-spektryny osiąga ok. 50%. Badania te wskazują że utrzymująca się proteoliza kalpainowa przyczynia się znacznie do zmian patologicznych po uszkodzeniach tkanek mózgu[130]. Model ten był też wykorzystywany w ostatnich latach również do badań związanych z uszkodzeniami serca[131][132] i wątroby[133], otyłością[134] i dotyczących stwardnienia zanikowego bocznego[135]. Powszechność ekspresji kalpastatyny i jej poziom w tych myszach transgeniczych czyni je dogodnym modelem badawczym dla śledzenia wpływu kalpastatyny na aktywność kalpainsy w różnych czynnikach patologicznych. Ze względu na omówione wyżej czynniki myszy te zostały wybrane do kojarzenia z myszami noszącymi mutację R1098Q celem oceny w potomstwie PrP-hCAST x R1098Q skuteczności kalpastatyny w obniżeniu neurodegeneracji i potencjalnej poprawy parametrów ruchowych oraz siły mięśniowej myszy C57BL/6Spna2mutR1098Q. Biorąc pod uwagę, że mutacja R1098Q wpływa dodatnio na podatność α II-spektryny na proteolizę przez kalpainę poprzez ekspozycję pętli CCC, można w pewnych ramach ekstrapolować fenotyp występujący u tych myszy na zmiany wynikające z uogólnionego podwyższonego poziomu aktywności kalpainsy w innych schorzeniach neurodegeneracyjnych. Czyni to eksperyment bardziej intrygującym zarówno w kontekście ustalenia czy proteoliza kalpainowa spektryn jest tylko skutkiem innych patologicznych procesów wewnątrzkomórkowych, czy też kluczowym aspektem dla neurodegeneracji i w kontekście możliwego szerszego zastosowania inhibitorów kalpainsy jako czynnika terapeutycznego.

4. Cel pracy

Celem pracy było wytworzenie nowych modeli badawczych *in silico*, *in vitro* i *in vivo* pomocnych w ustaleniu wpływu mutacji punktowej c.3293G>A w genie *Spna2*, kodującym łańcuch α II-spektryny (ortolog ludzkiego genu *SPTAN1*), zidentyfikowanej w szczepie myszy C57BL/6Spna2mutR1098Q, na struktury II i III-rzędowe zmutowanego białka, kinetyki jego oddziaływań z kalmoduliną, a także jego podatności na trawienie kalpainą i kaspazą 3. Dodatkowo, w oparciu o uzyskane dane z badań instrumentalnych oraz *in vitro*, wytworzono transgeniczny myszy model badawczy w celu oceny wpływu obniżenia aktywności kalpainy w neuronach myszy szczepu C57BL/6Spna2mutR1098Q x hCAST na parametry motoryczne i siłę mięśniową.

5. Materiały i metody

5.1. Materiały

5.1.1 Odczynniki

Tabela 2. Odczynniki do manipulacji DNA.

Odczynniki i roztwory	Producent
NG dART RT kit (zestaw) (odwrotna transkryptaza)	EUR _x [®]
2 x Platinum SuperFi PCR Master Mix (polimeraza)	Invitrogen
DreamTaq DNA Polymerase (polimeraza)	Thermo Scientific
DreamTaq DNA Polymerase Buffer (buford dla polimerazy)	Thermo Scientific
10 Mm Ultrapure dNTPs Mix (dNTP)	EUR _x [®]
Fast Digest Bam HI (enzym restrykcyjny)	Thermo Scientific
Fast Digest Not I (enzym restrykcyjny)	Thermo Scientific
Fast Digest Pst I (enzym restrykcyjny)	Thermo Scientific
Fast Digest Msp I (enzym restrykcyjny)	Thermo Scientific
10 x Fast Digest Green Buffer (bufor dla enzymów restrykcyjnych)	Thermo Scientific
FastAPThermosensitiveAlkalinePhosphatase (fosfataza alkaliczna)	Thermo Scientific
T4 DNA Ligase (ligaza - zestaw)	TaKaRa
Trizol (ekstrakcja RNA)	Sigma
Izopropanol (ekstrakcja RNA)	POCH
Etanol (ekstrakcja RNA)	Stanlab
Gene MATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit (oczyszczanie DNA z żelu)	EUR _x [®]
Gene MATRIX PCR/DNA Clean-up Purification Kit (oczyszczanie DNA z roztworu)	EUR _x [®]
RNAza A (minipreparacja DNA)	EUR _x [®]
Octan potasu (minipreparacja DNA)	BioShop
GeneJET PlasmidMidiprep Kit (midipreparacja DNA)	Thermo Scientific
Direct Tissue PCR Kit (genotypowanie)	EUR _x [®]
Oligonukleotydy	Sigma

Tabela 3. Odczynniki do ekspresji i oczyszczania białek

Odczynnik	Producent
IPTG	Sigma
Glutation sepharose 4B	GE Healthcare
Precision [™] Protease	GE Healthcare
Zredukowany glutation	Sigma
Pierce [™] BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Protease Inhibitor Cocktail P8340	Sigma
Leupeptyna	Sigma
Apoproteina	Sigma

Tabela 4. Odczynniki do rozdziału i wizualizacji cząsteczek.

Odczynnik	Producent
DNA	
Agaroza	EUR _X
Bromek etydyny	Sigma
Simply Safe	EUR _X
Sacharoza	Fluka
6x DNA Loading Dye(Bufor obciążający)	Fermentas
Perfect™ Plus 1 kb DNA Ladder(Marker)	EUR _X
Perfect™100 bp DNA Ladder(Marker)	EUR _X
Perfect Plus™ Molecular Weight Quantitative DNA Ladder (Marker)	EUR _X
DAPI	
BIAŁKA	
Akrylamid 29:1	Sigma
APS	Serva
Perfect™ Tricolor Protein Ladder	EUR _X
Perfect™ Color Protein Ladder	EUR _X
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	Thermo Scientific
TEMED	Sigma
Coomassie Brilliant blue	Fluka
Na ₂ S ₂ O ₃	Sigma
AgNO ₃	POCH
Formaldehyd 38%	POCH
Na ₂ CO ₃	POCH
Przeciwciało anty-SNTF(#ABN2264)	Sigma
Przeciwciało anty-królik-FITC (#BD_395212)	Becton Dickinson
Przeciwciało anty-myc-tag (#ab9106)	Abcam
Przeciwciało anty-mysz-HRP (#A5906)	Sigma
Przeciwciało anty-PY (#05-1050)	Sigma
Przeciwciało anty-królik-HRP(#12-348)	Sigma

Tabela 5. Odczynniki do hodowli bakteryjnej.

Odczynnik	Producent
Agar bakteriologiczny	BTL
Podłoże LB Mix	BTL
Ampicylina	Sigma
Chloramfenikol	POCH

Tabela 6. Media i odczynniki do hodowli komórkowej.

Odczynnik	Producent
Neurobasal™ Medium	Gibco
B-27™ Supplement (50X)	Gibco
Antibiotic-Antimycotic	Gibco
Penicillin-Streptomycin	Gibco
L-Glutamine	Gibco

Tabela 7. Odczynniki do metod instrumentalnych.

Odczynnik	Producent
Superdex® 200 10/300 GL	GE Healthcare
Przeciwciało anty-GST (#27457701)	GE Healthcare
Bufor HBS-NHS	GE Healthcare
EDC	GE Healthcare
Etanoloamina	GE Healthcare
Mounting medium na bazie alkoholu poliwinylowego z DABCO	Sigma

Tabela 8. Odczynniki do buforów.

Odczynnik	Producent
Tris (Trizma base)	Fluka
SDS	POCH
Kwas octowy	Chempur
EDTA	Sigma
Glicerol	POCH
NaCl	Stanlab
NaOH	POCH
KCl	POCH
CaCl ₂	Sigma
Błękit bromofenolowy	Sigma
β-merkaptoetanol	IITD
PMSF	Sigma
Triton X 100	Serva
DTT	Invitrogen
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	POCH
KH ₂ PO ₄	POCH

5.1.2 Składy buforów, żeli rozdzielających i pożywek:

Tabela 9. Składy używanych roztworów.

Bufor/Roztwór	Odczynnik	Ilość / Stężenie
Elektroforeza DNA		
Bufor TAE pH 8.5 (50x stężony)	Tris-base	242 g
	Kwas octowy	57,1 ml
	0,5 mM EDTA pH 8.0	100 ml
	H ₂ O dest.do 1000ml	
Bufor obciążający do elektroforezy DNA	Sacharoza	40%
	Błękit bromofenolowy	0,5%
	H ₂ O MQ	
Żel agarozowy (1%)	Agaroz	0,6 g
	Bromek etydyny/Simply	4 µl
	Bufor 1xTAE	60 ml
Minipreparacja DNA		
Bufor do zawieszania P1	Tris-HCl pH 8.0	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNAza A	100 µg/ml
	H ₂ O MQ	
Bufor do lizy P2	NaOH	200 mM
	SDS	1%
	H ₂ O MQ	
Bufor neutralizujący P3	Octan potasu pH 5.5	3,0 M
	H ₂ O MQ	
Hodowla bakteryjna		
Pożywka bakteryjna	Proszkowy koncentrat LB	25 g
	Agar* (pożywka zestalona)	15 g
	Ampicylina	100µg/ml
	Chloramfenikol	30µg/ml
	H ₂ O MQ do 1000 ml	
Elektroforeza Białek		
Bufor Laemmliego (5x)	SDS	5%
	Błękit bromofenolowy	0,5%
	β-merkaptioetanol	5%
	Glicerol	50%
	Tris-HCl pH 6,8	125mM
	H ₂ O MQ	
Bufor do elektroforezy SDS-PAGE (5x)	Tris	15,1g
	10% SDS	50ml
	Glicyna	94g
	H ₂ O dest do 1000ml	
Żel poliakrylamidowy dolny (12,5%)	H ₂ O MQ	2,15 ml
	Akrylamid 29:1 40%	1,5 ml
	1,5 M Tris-HClpH 8.8	1,25 ml
	SDS 10 %	50 µl
	APS 20 %	25 µl
	TEMED	5 µl

Bufor/Roztwór	Odczynnik	Ilość / Stężenie
Żel poliakrylamidowy górny (5,0%)	H ₂ O MQ	1,83 ml
	Akrylamid 29:1 40%	325 µl
	0,5 M Tris-HCl pH 6.8	325 µl
	SDS 10 %	50 µl
	APS 20 %	12,5 µl
	TEMED	5 µl
Western Blot		
Bufor do transferu	TRIS	6 g
	glicyna	3 g
	10% r-r SDS	3,75 ml
	metanol	10-15 %
	H ₂ O destylowana do 1000 ml	
Bufor płuczący WB	2 M NaCl	100 ml
	0.5 M Tris-HCl, pH 7.6	40 ml
	Tween-20	1 ml
	H ₂ O MQ do 1000 ml	
Roztwór do blokowania WB	odtłuszczone mleko w proszku	5%
	Bufor płuczący WB	
Substrat dla HRP	1 M Tris-HCl, pH 8.8	1 ml
	250 µM luminol (DMSO)	50 µl
	09 mM kwas kumarowy (DMSO)	22 µl
	30 % r-r H ₂ O ₂	10 µl
	H ₂ O MQ do 10 ml	
ELISA		
Substrat (roztwór TMB)	1 mg/ml TMB (DMSO)	1 ml
	Bufor fosfocetrynianowy, pH 5	9 ml
	30 % r-r H ₂ O ₂	2 µl
Bufor fosfocetrynianowy, pH 5	0.2 M Na ₂ HPO ₄	25,7 ml
	0.1 M kwas cytrynowy	24, 3 ml
	H ₂ O MQ	50 ml
Roztwór do blokowania ELISA	odtłuszczone mleko w proszku	5%
	Tween-20	0,1%
	PBS	
Bufor płuczący ELISA	odtłuszczone mleko w proszku	0,5%
	Tween-20	0,1%
	PBS	
Wizualizacja Białek		
Barwienie Coomassie		
Coomassie Brilliant Blue	Brilliant Blue G	0,05 g
	Metanol	12,5 g
	Kwas octowy	2,5 ml
	H ₂ O MQ do 50 ml	
Roztwór do odbarwiania Coomassie Brilliant Blue	Metanol	75,0 ml
	Kwas octowy	15,0 ml
	H ₂ O MQ	210 ml

Bufor/Roztwór	Odczynnik	Ilość / Stężenie
Barewienie azotanem srebra		
Roztwór utrwalający	Metanol	50 %
	Kwas octowy	12 %
	H ₂ O MQ	
Roztwór uwrażliwiający	Na ₂ S ₂ O ₃	0,02 %
	H ₂ O MQ	
Roztwór soli srebra	AgNO ₃	0,2 %
	H ₂ O MQ	
Roztwór wywołujący	Na ₂ S ₂ O ₃ 2%	20 µl
	Formaldehyd 38%	12 µl
	Na ₂ CO ₃	1,5 g
	H ₂ O MQ do 20 ml	
Roztwór zatrzymujący reakcje	Kwas octowy	5,0 %
	H ₂ O MQ	
Izolacja Białek		
Bufor PBS pH 7.4	NaCl	0,8%
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0,2%
	KH ₂ PO ₄	0,02%
	KCl	0,02%
Bufor do lizy bakterii	PMSF	1 ml
	Triton X 100	1 ml
	Leupeptyna	100 µl
	Apoproteina	100 µl
	PBS do 100 ml	
Bufor glutationowy do elucji, pH 8.0	Zredukowany glutation	10Mm
	Tris-HCl pH 8.0	50Mm
Bufor Cleavage (dla Prescission Protease)	Tris-HCl pH7.0	50mM
	NaCl	150mM
	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
	Proteoliza białek	
Bufor reakcyjny - Kalpaina	NaCl	135 mM
	KCl	5 mM
	MgCl ₂	1 mM
	Glukoza	10 mM
	Hepes pH 7.25	10 mM
	β-merkaptioetanol	10 mM
	CaCl ₂	3 mM
	H ₂ O MQ	
Bufor reakcyjny – Kaspaza 3	NaCl	100 mM
	DTT	10 mM
	EDTA	1 mM
	Sacharoza	10 %
	PIPES pH 7.2	20 mM
	CHAPS	0,1 %
	H ₂ O MQ	

5.1.3 DNA

Wektor pGEX-6P-1

Wysokokopijny plazmid używany do produkcji białek fuzyjnych w systemie bakteryjnym pod kontrolą promotora tac. Białka rekombinowane wytwarzane w tym systemie ekspresji zawierają na N końcu białko GST oraz miejsce cięcia dla proteazy *PreScission*. Zawiera gen oporności na ampicylinę.

Sekwencje oligonukleotydów

Tabela 10. Sekwencje oligonukleotydów wykorzystane do klonowania oraz do genotypowania.

Nazwa	Sekwencja 5' → 3'
KLONOWANIE	
sptan gst1012F	CCAGGATCCCAGGCCAGCAGTACTTTG
sptan gst1012R	GAAGCGGCCGCACCTTCAGACTCCAGGTCTTC
SPTAN13R	GAAGCGGCCGCCTGCCCAAGAGCTGGCT
MycF	CAAGCGGCCGCATGAACAGAACTGATCTCTGAAGAAGACCTGAT
MycR	GTAGCGGCCGCATCAGGTCTTCTTCAGAGATCAGTTTCTGTTCAT
GENOTYPOWANIE	
R1098Q_F	CTGCCTTCCTTGTCATTGT
R1098Q_R	AGACAGCCCATACTTCTGG
hCAST_F	GAACTGAACCATTTCAACCGAG
hCAST_R	AGAGCTACAGGTGGATAACC

Sekwencja cDNA

Sekwencja cDNA została odnaleziona w bazie danych NCBI [Mus musculus spectrin alpha, non-erythrocytic 1 (Sptan1), transcript variant 4, mRNA][136]. Pochodzi z mysiej α II-spektryny. Skorzystano z fragmentu genu spektryny od początku powtórzenia spektrynowego 9 do końca powtórzenia10 (2900-3861pz). Sekwencja ta została użyta przy projektowaniu starterów.

5.1.4 Bakterie

E. coli HST08Stellar™ Competent Cells[137]

Szczep gatunku *Escherichia coli* wykorzystywany do klonowania. Komórki te nie posiadają genów (*mrr-hsdRMS-mcrBC* i *mcrA*), odpowiedzialnych za trawienie metylovanego DNA. Charakteryzuje je genotyp: F^- , *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *phoA*, $\Phi 80d lacZ \Delta M15$, Δ (*lacZYA - argF*) *U169*, Δ (*mrr - hsdRMS - mcrBC*), $\Delta mcrA$, λ^-

E. coli BL21 CodonPlus®-RIL[138]

Szczep gatunku *Escherichia coli*, przeznaczony do ekspresji białek fuzyjnych. Zawiera gen oporności na chloramfenikol oraz dodatkowe kopie genów tRNA:*argU*, *ileY* i *leuW*. O genotypie: *E. coli B F⁻ omp ThsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal endAHte [argU ileY leuW Cam^r]*

5.1.5 Myszy

Myszy "R1098Q" wyróżniają się mutacją punktową c.3293G>A:p.R1098Q w genie *Spna2* (*syn.Sptan1*) w obrębie odpowiadającym 10 powtórzeniu łańcucha α II-spektryny, skutkującą zamianą argininy na glutaminę w sekwencji aminokwasowej. Wywodzą się one z linii C57Bl/6J. Mutacja nastąpiła spontanicznie. Myszy były wyodrębnione z hodowli w zwierzętarni IITD i tamże charakteryzowane. Do kojarzeń na następne pokolenia wykorzystywano myszy C57Bl/6J, pochodzące z Centrum Onkologii w Warszawie. [129]

Myszy hCAST to linia myszy, w których osiągnięto podwyższoną ekspresję ludzkiej kalpastatyny - endogennego inhibitora specyficznego dla kalpainy zależnego od stężenia jonów wapniowych. Ekspresja transgenu pod kontrolą mysiego promotora białka prionowego Prp prowadzi do zwiększenia ilości kalpastatyny w aksonach neuronów. [139]

Myszy „R1098Q” hodowane są w zwierzętarni w pomieszczeniach o temp. 22 +/-2°C i wilgotności 55% ± 10% z klimatyzacją i zachowaniem cyklu dobowego. Bytują w warunkach SPF w wentylowanych klatkach z filtrami HEPA chroniącymi przed patogenami (2-5 myszy/klatkę) z dostępem do standardowej wyjałowionej paszy dla gryzoni i filtrowanej, sterylizowanej wody *ad libitum*. Myszy "R1098Q+hCAST" wykorzystywane do testów rota-rod były hodowane w pomieszczeniach CV z klimatyzacją i zachowaniem cyklu dobowego bez systemu wentylacji ze standardową paszą i sterylizowaną wodą. W celu utrzymania należytego stanu kolonii, wdrożono badania na myszach strażniczych.

5.1.6 Pierwotne hodowle komórkowe

Pierwotne hodowle komórkowe zostały utworzone z mózgów pobranych z embrionów myszy „R1098Q”, pozyskanych od samicy w 14 dniu ciąży bytującej w warunkach SPF.

5.1.7 Białka

Kalmodulina[140][141]

Do doświadczeń wykorzystano komercyjne białko rekombinowane - kalmodulinę (CaM) (#C4874 Sigma) o sekwencji odpowiadającej kalmodulinie wołowej z C-końcową metką histydynową (His-tag). Nie różni się ona istotnie od kalmoduliny mysiej.

Kalpaina[136]

Komercyjna Kalpaina1 (#C6108 Sigma), zastosowana do proteolizy fragmentów spektrynowych, jest otrzymywana z ludzkiego osocza. Została zakupiona w postaci aktywnej w roztworze stabilizującym (zawierającym glicerol, imidazol, β -merkaptoetanol, EDTA i EGTA).

Kaspaza 3[142]

Kaspaza 3 (#CC119 Sigma), użyta przy proteolizie fragmentów spektrynowych, jest dystrybuowana w formie rekombinowanej o sekwencji odpowiadającej ludzkiej kaspazie 3, wzbogaconej o metkę histydynową (His-tag).

Kinaza c-Src[143]

Kinaza c-Src (#14-746 Sigma) wykorzystana w eksperymentach to białko rekombinowane odpowiadające sekwencji aminokwasowej 1-530 ludzkiej kinazy c-Src z dodaną metką histydynową na N-końcu. Do reakcji fosforylacji wykorzystano dedykowany bufor (#20-121 Sigma).

5.1.8 Zestaw do pomiaru aktywności kalpainowej

Test aktywności kalpainowej przeprowadzono przy pomocy komercyjnego zestawu - Calpain Activity Assay Kit (#ab65308 Abcam).

5.2. Metody

5.2.1 Modelowanie strukturalne

Do modelowania wykorzystano serwis „SWISSMODEL” dostępny online: <https://swissmodel.expasy.org/>. Wykorzystano fragment 891-1231 aa sekwencji aminokwasowej α II-spektryny ze strony NCBI: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_001309460.1 (Mus musculus spectrin alpha, non-erythrocytic 1 (Sptan1), transcript variant 4, mRNA) w czterech wariantach w pozycji 1098 -R,Q,K,C. Fragment ten zawiera 9 i 10 powtórzenie spektrynowe wraz z domenami SH3 i CCC. Jako matrycę do tworzenia modelu wybrano strukturę krystalograficzną o oznaczeniu: 1u4q.2.A, pochodzącą z serwisu PDB: <https://www.rcsb.org/>.

5.2.2 Otrzymywanie białek rekombinowanych

Klonowanie

Wykorzystywane cDNA otrzymano poprzez izolację RNA z mózgu myszy roztworem Trizol z ekstrakcją w układzie chloroform/izopropanol i reakcją odwrotnej transkrypcji. Klonowanie do ramki odczytu wykonano z użyciem PCR i enzymów restrykcyjnych NotI i BamHI do wektora pGEX-6P-1. Sekwencja myc-tag została połączona z dwóch jednoniciowych oligonukleotydów zawierających miejsce cięcia NotI i wklonowana do wcześniej otrzymanego plazmidu. Do reakcji PCR zastosowano startery oligonukleotydowe (sekwencje oligonukleotydowe przedstawiono w tabeli 10). Do określenia poprawności amplikonów użyto sekwencjonowania Sangera.

Transformacja bakterii

Do transformacji wykorzystano bakterie elektrokompetentne *E. coli* HST08Stellar™ Competent Cells, by namnożyć materiał i wstępnie skontrolować otrzymane konstrukty na żelu agarozowym. Następnie transformowano komórki *E. coli* BL21 CodonPlus®-RIL do docelowej ekspresji peptydów.

Hodowla i indukcja ekspresji białek rekombinowanych

Bakteriami *E. coli* RIL, zawierającymi plazmid ekspresyjny, zaszczepiano medium LB z ampicyliną (100 μ g/ml) i chloramfenikolem (30 μ g/ml) w objętości 1/20 docelowej hodowli i inkubowano przez noc (37°C, 180 rpm). Hodowlę, po wprowadzeniu zawiesiny bakteryjnej, prowadzono w objętości 100-150 ml do otrzymania gęstości optycznej 0,6. Następnie schładzano przez 5 min i przeprowadzano indukcję na lodzie, również

przez 5 min. Hodowla była prowadzona jeszcze przez 1,5 godziny, aby otrzymać optymalną ilość białka.

Oczyszczanie białek fuzyjnych

Oczyszczanie białka z hodowli przeprowadzono, korzystając z zaleceń producenta Glutathione Sepharose, poprzez odwirowanie medium pohodowlanego (8000 rpm 5 min), sonikację bakterii zawieszonych w PBS z dodatkiem PMSF, leupeptyny i apoproteiny, odwirowanie resztek bakteryjnych (10 000 rpm, 7 min), inkubację złoża z lizatem 1,5 godziny oraz 4-krotne płukanie w PBS z dodatkiem PMSF, leupeptyny i apoproteiny w objętości min. 20-krotnej względem objętości złoża.

Trawienie enzymatyczne białek fuzyjnych w celu odcięcia transferazy glutationowej (GST)

Oczyszczone białko rekombinowane na kolumnie przepłukiwano buforem cleavage w 20-krotnej objętości względem objętości złoża, a następnie nakładano roztwór Precision™ Protease (#270843 GE Healthcare) w buforze cleavage (48 u enzymu/ ~1 mg trawionego białka). Reakcje prowadzono zgodnie z instrukcjami producenta przez 4 godziny w temperaturze 5 °C. Odtrawione białko odpłukano tym samym buforem. Przeprowadzono dializę do PBS. Stężenia białka badano testem BCA (#71285-3 Millipore). Ocena czystości preparatu była określana poprzez elektroforezę SDS-PAGE wraz z barwieniem Coomassie brilliant blue.

5.2.3 Chromatografia size-exclusion (SEC)

Przed eksperymentami instrumentalnymi CD i DLS białka były oczyszczane przez wysokociśnieniową chromatografię cieczową (HPLC) na kolumnie ze złożem size-exclusion Superdex® 200, 10/300 mm. z użyciem systemu Ultimate 3000 HPLC - Dionex wyposażonego w detektor DAD i podłączonego do kolumny. Jako fazę mobilną wybrano PBS o przepływie 0.5 ml/min przy nastrzyku 150 ul. Detektor UV nastawiono na długość fali 280 nm. Metodę tę wykorzystano jednocześnie do wymiany buforu przed eksperymentami strukturalnymi, oceny czystości wyjściowych preparatów i określenie stopnia renaturacji po zmianach temperatur roztworów białek[144].

5.2.4 Dichroizm kołowy (CD)

Dichroizm kołowy został wprowadzony do badań celem określenia właściwości strukturalnych badanych fragmentów spektrynowych. Spektra były nagrywane na spektropolarymetrze J-1500 (Jasco) wyposażonym w termostatowany uchwyt na kuwety kwarcowe i detektor PM-539. Wyniki zostały wyrażone jako średnia eliptyczność molowa na resztę aminokwasową ($[\theta]$) $\text{deg} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}$, zakładając 114,5 jako średnią masę na resztę aminokwasową. Widma były zbierane sześć razy. Wszystkie wartości zostały skorygowane o rozpuszczalnik (PBS). Warunki pomiaru to: 0,2 mm – skok danych, 1 mm – przepustowość, 2 s – D.I.T, przy 50 nm/min. Dla termalnych skanów podgrzewano białka od 25 do 71°C a następnie schłodzono do 25°C z szybkością grzania/chłodzenia 1°C/min kontrolowaną przez programowalny moduł Peltiera. Spektra CD były nagrywane przy 25, 45 i 65°C, a aktywność dichroiczna przy 222 nm była stale monitorowana co każde 2°C. Stężenia białek w eksperymencie to 0.152 mg/ml dla WT i 0.175 mg/ml dla R1098Q. Stężenia zostały określone przez pomiar absorbancji przy 280 nm, $\epsilon = 45000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ($\epsilon_{0.1\%} = 1.08$)[144].

5.2.5 Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)

Dynamiczne rozpraszanie światła wykorzystano, aby ocenić podatność fragmentów spektrynowych na tworzenie agregatów białkowych podczas podgrzewania ich roztworów. Pomiarzy zostały przeprowadzone na urządzeniu Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Anglia) z laserem 633 nm w 12 ul kuwecie pod stałym kątem rozpraszania 173° w PBS. Wpływ wzrostu temperatury na parametry hydrodynamiczne białek spektrynowych WT i R1098Q był szacowany przez DLS z co 5°C od 25 do 75°C i z 2 min czasem na osiągnięcie równowagi dla każdego punktu pomiarowego. Stężenia białek w eksperymencie to 0.152 mg/ml dla WT i 0.175 mg/ml dla R1098Q. Zastosowano następujące parametry: 1.450 – współczynnik załamania światła dla roztworów białek i PBS, $0.9060 \cdot 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ - lepkość rozpuszczalnika (PBS). Wykonano trzy następujące po sobie pomiary dla każdej próbki z czasem pozyskiwania 30 s na funkcję korelacji. Dane były analizowane przy użyciu oprogramowania dts 7.11 (Malvern Instruments, Worcestershire, Anglia)[144].

5.2.6 Rezonans Plazmonów Powierzchniowych (SPR)

Metoda rezonansu plazmonów powierzchniowych (SPR) została wykorzystana do oceny jakościowej i ilościowej oddziaływań kalmoduliny (CaM) i oczyszczonych rekombinowanych z GST fragmentów spektrynowych odpowiadających 9 i 10 powtórzeniu

spektrynowemu i w obecności jonów wapnia. Do eksperymentu wykorzystano białka zawierające miejsca oddziaływań z kalmoduliną i kalpainą, odpowiedniki kodonów 891-1231. Pracowano na urządzeniu BIAcore T200 instrument (GE Healthcare) z wykorzystaniem płytki z chipami CM5 z grupą karboksylową. Powierzchnia została aktywowana, aby przeprowadzić bezpośrednie sprzężanie z grupami aminowymi na kozim przeciwciele anty-GST. Nastrzyknięto na powierzchnię chipu 40 μ l odgazowanego roztworu sprzęgającego HBS-NHS/EDC (0.01 M HEPES, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05 M NHS (N-hydroksysukcynoimid), 0.2 M EDC (N-etylo-N'-dimetyloaminopropylu karbodiimid)). Po przepuszczeniu roztworu zawierającego przeciwciała anty-GST, nastrzyknięto etanoloaminę, aby dezaktywować pozostałe estry na powierzchni chipu. Następnie oczyszczone białko spektrynowe w typie dzikim lub zawierające mutację było wiązane do powierzchni przeciwciał do końcowego poziomu odpowiedzi – 1000 (RU). Nad płytką z ligandem przepuszczano roztwory o wzrastających stężeniach kalmoduliny (2-2000 nM) w buforze HBS-NHS przy stałym stężeniu 2 mM CaCl₂ o prędkości przepływu 20 μ l/min. Po fazie asocjacji nad płytką przepuszczano sam bufor (faza dysocjacji). Jako kontrolę zastosowano ten sam układ bez obecności białek spektrynowych, a jedynie z immobilizowanym przeciwciałem anty-GST. Eksperymenty wiązania prowadzono w temperaturze 25 °C. Sensogramy zostały otrzymane poprzez odjęcie wyników otrzymanych przy przepuszczaniu samego buforu od zapisanych krzywych oddziaływań, odjęto również wartości odpowiadające oddziaływaniu kalmoduliny z powierzchnią sensora. Stałe równowagi (KD), definiowane jako stosunek kd/ka, zostały określone przy użyciu oprogramowania BIAevaluation 3.1 dostępnego na stronie https://www.biocore.com/lifesciences/service/downloads/software_licenses/biaevaluation/. Dla dopasowania globalnego zastosowano model wiązania 1:1 Langmuira z uwzględnieniem transportu mas zgodnie z instrukcjami podręcznika BIAevaluation handbook <https://www.biocore.com/lifesciences/service/downloadsHandbooks>. Składniki resztowe oceniano pod kątem systematycznych rozbieżności z algorytmami dopasowania jako miarę stosowności modelu wiązania[129]

5.2.7. Pomiary stabilności białek - Prometheus

Pomiary stabilności białek wykonano przy pomocy urządzenia Prometheus PR.48 (Nanotemper). Dokonywano pomiarów fluorescencji reszt tryptofanowych dla długości fali 330 i 350 nm przy zmianach temperatury w zakresie 20-90°C co ok. 0,1°C na 3-4 s. Wykonano trzy powtórzenia techniczne w kapilarach o objętości 10 μ l dla białek w typie dzikim i z mutacją.

5.2.8 Rozdział i wizualizacja białek

Elektroforeza SDS-PAGE:

Do próbek dodawano buforu Laemmliego i inkubowano w 95°C przez 5 min w celu denaturacji białek. Próbki nakładano w odpowiedniej ilości na spolimeryzowany żel poliakrylamidowy uwzględniając marker wagowy. Elektroforezę prowadzono w układzie nieciągłym, w odpowiednim buforze, pod stałym napięciem 180 V przez 30-60 min.

Barwienie Coomassie Brilliant Blue:

Do wizualizacji białek na żelu używano roztworu Coomassie Brilliant Blue G 250. Żel wybarwiano przez godzinę, a następnie odbarwiano, zmieniając roztwór odbarwiający na czysty co 10 min, aż do uzyskania czytelnego obrazu.

Barwienie azotanem srebra:

Do barwienia białek w żelu poliakrylamidowym stosowano metodę wykorzystującą srebro. Żel zawierający rozdzielone białka utrwalano w roztworze z kwasem octowym i metanolem przez 50 min. Opłukiwano wodą z dodatkiem metanolu trzykrotnie przez 15 min. Żel inkubowano 2 min. w roztworze uwrażliwiającym. Dwukrotne odmyto żel poprzez płukanie wodą przez 1,5 min. Następnie inkubowano żel z roztworem azotanu srebra pod przykryciem chroniącym przed światłem, przez 30 min. W kolejnym etapie opłukiwano żel dwukrotnie przez minutę w MQ. Barwienie uzyskano wykorzystując roztwór wywołujący, sprawdzając stopień wybarwienia białek. Po uzyskaniu właściwego efektu wywoływanie zatrzymano, odrzucając roztwór barwiący i płucząc żel w roztworze kwasu octowego.

5.2.9 Fosforylacja kinazą c-Src – western blot anty-PY

Złoże ze związanym białkiem zawieszono w buforze PBS. Z próbowki pobrano zawieszony w buforze żółce odpowiadające ok. 20 µg białka rekombinowanego. Odwirowano i odciągnięto PBS, a żółce zalano 25 ul buforu reakcyjnego (#20-121 Sigma) zawierającego kinazę c-Src (#14-746 Sigma) (7,6 ng/ reakcję) i ATP (0,1 mM). Przygotowano również próbki kontrolne nie zawierające ATP lub kinazy. Reakcję fosforylacji prowadzono na żółcu w 30 °C w termocyklerze przez 10 min. Po reakcji dodano do próbek 20 ul buforu Laemmliego i 20 ul MQ, zagotowano. Do studzienek nałożono próbki zawierające fosforylowane białka rekombinowane w objętościach odpowiadających 4, 2.6, 1.3 µg w dwóch powtórzeniach oraz próbki kontrolne 4 µg. Po rozdziale elektroforetycznym przeprowadzono

transfer na membranę nitrocelulozową (15 V, 18 min.). Membranę zablokowano roztworem odtłuszczonego mleka w proszku. Następnie membranę poddano inkubacji z przeciwciałami pierwszej warstwy - anti-PY (#05-1050 Sigma) w rozcieńczeniu 1:5000 przez 1,5 godziny. Odmyto trzykrotnie po 10 min i nałożono drugą warstwę przeciwciał anti-mysz-HRP (#A5906 Sigma) w rozcieńczeniu 1:10000 i inkubowano godzinę. Po ponownym odpłukaniu niezwiązanych przeciwciał, zalano roztworem substratu i odsączoną z nadmiaru cieczy membranę, umieszczono w ciemni w kasecie wraz z kliszą fotograficzną. Naświetlanie prowadzono przez 10 min. Po tym czasie kliszę wywołało.

5.2.10 Trawienie kalpainą – western blot anty myc-tag

Reakcja krzyżowa z wykorzystaniem białek bez myc-tag i kalmoduliny

Trawienie kalpainą rekombinowanych fragmentów spektrynowych na złożu przeprowadzono z wykorzystaniem dwóch różnych wariantów białka na każdy typ WT i R1098Q. Jeden z wariantów posiadał na C-końcu myc-tag a drugi nie. Zmieszano lizaty z dwóch hodowli bakteryjnych przeciwnych typów WT i R1098Q w proporcji 1:4 z nadmiarem białka bez znacznika. Tak przygotowane lizaty wykorzystano przy oczyszczaniu białek na złożu, metodologia zostało opisana w punkcie 5.2.2. Złoże ze związanymi białkami po oczyszczeniu zawieszono w PBS i podzielono na próbki. PBS, odwirowano i dodano do każdej próbki 40 μ l buforu reakcyjnego zawierającego 1 u kalpainy i 100 nM kalmoduliny. Przygotowano po cztery powtórzenia (dla 4 punktów czasowych 5, 20, 15, 25 min) i próbkę bez kalpainy - nie trawioną. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej. Próbki następnie zagotowano z buforem Laemmliego i nałożono na studzienki elektroforetyczne w objętości 30 μ l odpowiadającej ok. 5 μ g białka. Po rozdziale elektroforetycznym przeprowadzono transfer na membranę (15 V, 27 min). Kolejno blokowano membranę w 5 % roztworze mleka przez noc. Po odpłukaniu z mleka przeprowadzono inkubację z przeciwciałami anty myc-tag przez 1,5 godziny. Odpłukano niezwiązane przeciwciała trzykrotnie po 10 min i inkubowano z przeciwciałami anti-mysz-HRP przez godzinę, po ponownym odpłukaniu niezwiązanych przeciwciał użyto substratu dla HRP i naświetlano kliszę w ciemni przez godzinę i ponownie drugą kliszę przez 40 min (dla obrazu górnych prążków).

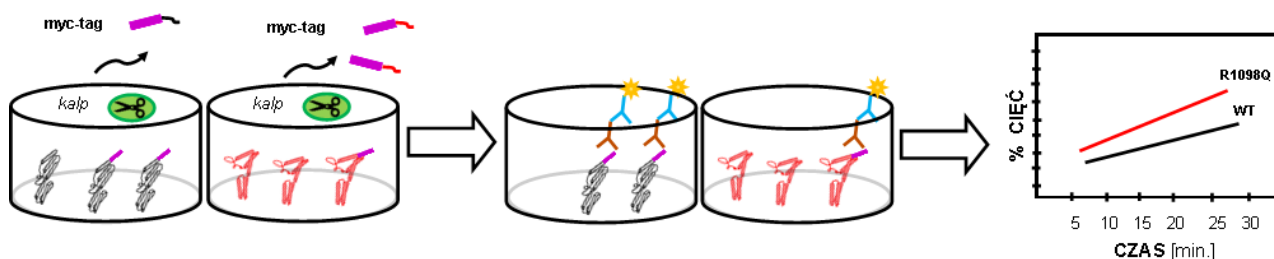
Reakcja z wykorzystaniem kolumniek wirówkowych bez kalmoduliny.

Trawienie kalpainą rekombinowanych fragmentów spektrynowych na złożu z wykorzystaniem kolumniek przeprowadzono na białkach WT i R1098Q zawierających metkę myc (ang. myc tag). Złożę ze związanymi białkami po oczyszczeniu zawieszono w PBS i podzielono na równe próbki w kolumnkach wirówkowych tak że na każdej kolumnie z trzech znalazło się ok. 4 µg białka. PBS odwirowano. Nałożono 100 µl buforu do reakcji kalpainowej i ponownie zwirowano, aby jak najskuteczniej wymenić bufor. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez 20 min w 45 µl buforu z 1 u kalpainy. Następnie próbki zwirowano, do przesączu dodano buforu Laemmliego i zagotowano. Połowę tak przygotowanych próbek nałożono na żel elektroforezowy. Dodatkowo przygotowano próbki zawierające białko nietrawione i nałożono na żel po ok. 0,1 µg białka. Po elektroforezie wykonano transfer na membranę nitrocelulozową (27 min) i zablokowano membranę inkubując ją przez noc w 5% roztworze odtłuczonego mleka. Po odpłukaniu z mleka przeprowadzono inkubację z przeciwciałami anty myc-tag przez 1,5 godziny. Odpłukano niezwiązane przeciwciała trzykrotnie po 15 min i inkubowano z przeciwciałami anty-mysz-HRP przez 2 godziny, po ponownym odpłukaniu niezwiązanych przeciwciał użyto substratu dla HRP i naświetlano kliszę w ciemni przez 30 min.

5.2.11 Trawienie kaspazą 3

Reakcję trawienia kaspazą 3 (#CC119 Sigma) prowadzono w buforze dla kaspaz w próbkach w objętości 50 µl. W każdej próbce umieszczono 1 µg białka spektrynowego pozbawionego GST. Przygotowano próbki dla wariantów WT i R1098Q z 0,5 U kaspazy 3 oraz próbki kontrolne z białkami, ale bez enzymu. Reakcję prowadzono przez 2 godziny w 37°C. Następnie do próbek dodano 20 µl buforu Laemmliego i zagotowano. Do elektroforezy wykorzystano po 20 µl tak przygotowanych próbek. Po przeprowadzeniu elektroforezy żel wybarwiono srebrem.

5.2.12 Trawienie kalpainą w protokole ELISA



Rycina 10. Schemat obrazujący przebieg eksperymentu trawienia enzymatycznego w protokole ELISA.

Białka pozbawione GST ze znacznikiem myc-tag w ilości 80 ng/ dołek zawieszono w PBS nałożono w objętości 50 μ l na płytce 96 dołkowej Nunc MaxiSorp™ flat-bottom (#44-2404-21 Thermo Fisher) celem opłaszczenia. Adsorbcję prowadzono przez godzinę w temperaturze 37 °C. Po tym czasie dołki odpłukano jednokrotnie 150 μ l buforu płuczającego. Blokowano 200 μ l roztworu mleka przez godzinę. Płukano dwukrotnie 200 μ l buforu płuczającego. Prowadzono reakcję w kalpainowym buforze reakcyjnym w objętości 50 μ l z wykorzystaniem kalpainsy (#C6108 Sigma) - 90 ng/studzienkę (~25 nM), w obecności lub bez kalmoduliny (#C4874 Sigma) - 45 ng/studzienkę (~50 nM) w temperaturze pokojowej. Aby zatrzymać reakcję zalewano dołki 200 μ l buforu płuczającego i odbierano roztwór z dołka. Następnie odpłukano dołki jeszcze 4 razy 200 μ l buforu płuczającego. Reakcję zatrzymywano w kilku punktach czasowych od 0 do 30 min. Po przerwaniu reakcji wykonywano następane kroki testu ELISA. Nałożono pierwszą warstwę przeciwciała anti-myc tag (#ab9106 Abcam) w rozcieńczeniu 1:30 000, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 70 min. Odpłukano czterokrotnie 200 μ l. Nałożono drugą warstwę przeciwciała anti-mysz HRP (#A5906 Sigma) w rozcieńczeniu 1:20 000, inkubowano w RT przez godzinę. Odpłukano 4-krotnie 200 μ l. Nałożono 100 μ l substratu na bazie TMB, po upływie 15 min zastopowano reakcję barwną poprzez dodanie 100 μ l 1 M H₂SO₄. Odczytano wynik na instrumencie Perkin Elmer przy długości fali $\lambda=450$ nm[144].

5.2.13 Trawienie kaspazą 3 w protokole ELISA

Białka pozbawione GST ze znacznikiem myc-tag w ilości 80 ng/ dołek zawieszono w PBS nałożono w objętości 30 μ l na płytce 96 dołkowej Nunc MaxiSorp™ flat-bottom (#44-2404-21 Thermo Fisher) celem opłaszczenia. Adsorbcję prowadzono przez godzinę w temperaturze 37 °C. Po tym czasie dołki odpłukano jednokrotnie 150 μ l buforu płuczającego. Blokowano 200 μ l roztworu mleka przez godzinę. Płukano dwukrotnie 200 μ l buforu płuczającego. Prowadzono reakcję w buforze reakcyjnym dla kaspazy w objętości 30 μ l

z wykorzystaniem 0,5 u lub 1,5 u kaspazy 3 (#CC119 Sigma) w temperaturze 37°C przez dwie godziny. Aby zatrzymać reakcję zalewano dołki 200 µl buforu płuczącego i odbierano roztwór z dołka. Następnie odpłukano dołki jeszcze 4 razy 200 µl buforu płuczącego. Reakcję prowadzono w trzech powtórzeniach technicznych dla białka typu WT i R1098Q. Po przerwaniu reakcji wykonywano następne kroki testu ELISA analogicznie do protokołu reakcji z kalpainą.

5.2.14 Pierwotna hodowla komórek neuronalnych

Cieżarną samicę myszy „R1098Q” uśmiercono poprzez dyslokację kręgow szyjnych. Na drodze sekcji pobrano embriony. Całość mózgu pochodzącą z każdego embrionu rozdrobniono z użyciem skalpela i PBS. Tak potraktowaną zawiesinę przeniesiono do medium hodowlanego dedykowanego do wzrostu komórek nerwowych z dodatkiem suplementu B27 i pasażowano odrzucając komórki nieadherentne.

5.2.15 Barwienie komórek neuronalnych

Do wykonania barwienia komórek mózgowych wykorzystano okrągłe szkiełka. Po osadzeniu ich na 12 dołkowej płytce hodowlanej komórki zostały wysiane na każdy dołek – 3 typy komórek (WT, HET R1098Q, HOMO R1098Q), dla każdego typu po 3 dołki. Po okresie wzrostu odrzucono medium przepłukano komórki trzykrotnie schłodzonym PBS i utrwalono w 4% formaldehydzie w PBS (15 min na lodzie), ponownie przepłukano. Kolejne komórki permeabilizowano przy użyciu 0.5% roztworu Triton X-100 w PBS (10 min w temperaturze pokojowej), przepłukano. Szkiełka były blokowane przez godzinę w 2% BSA w PBS w 4°C, przepłukano. Następnie inkubowano komórki z roztworem przeciwciała pierwszorzędowego anty-SNTF 1:1200 w 2% BSA w PBS przez godzinę, przemywano PBS i barwiono DAPI 5µg/ml oraz przeciwciałem drugorzędowym anty-królik-FITC 1:100 przez 45 min, ponownie odpłukano. Szkiełka z utrwalonymi i wybarwionymi komórkami umieszczono przy pomocy mounting medium (na bazie alkoholu poliwinylowego) na szkle podstawkowym i po zabezpieczeniu styku brzegów szkiełek lakierem, celem konserwacji preparatu, przekazano do analizy mikroskopowej. Do wizualizacji próbek użyto skanującego laserowego mikroskopu konfokalnego Stellaris (Leica) z obiektywem 63x NA1.4 HC PL APO CS2 63x/1.40 OIL.

5.2.16 Genotypowanie myszy R1098Q+hCAST

Do genotypowania myszy wykorzystano biopłaty pobrane z płatków uszu przy znakowaniu osobników. Zastosowano zestaw do bezpośredniej izolacji DNA z tkanek - Direct Tissue PCR Kit (#E0940 Eurx). Po ekstrakcji DNA dla każdej pary starterów przeprowadzono osobne reakcje. Ekstrakcję DNA oraz reakcję PCR w formie z trzema krokami (denaturacja, stapianie, wydłużanie) wykonano zgodnie z zaleceniami producenta.[145] Modyfikacji uległy temperatura stapiania (58°C - R1098Q, 60°C-hCAST) i czas wydłużania w powtórzeniach cyklu (30 s - R1098Q, 60 s - hCAST). Realizowano 35 cykli. Objętość próbek wynosiła 20 µl. Wykorzystano startery przedstawiono w tabeli w sekcji materiałów. W przypadku genotypowania myszy pod kątem występowania mutacji R1098Q po reakcji PCR a przed elektroforezą na całości próbek przeprowadzono trawienie kontrolne przy wykorzystaniu enzymu restrykcyjnego MspI i dedykowanego buforu. Miejsce restrykcyjne dla tego enzymu (5'...CCGG...3') występuje w sekwencji typu dzikiego, a na skutek mutacji zostało utracone.

5.2.17 Test aktywności kalpajny w lizatach z mózdków myszy R1098Q+hCAST

Do pomiaru aktywności kalpajny w lizatach z mózdków myszy wykorzystano zestaw fluorymetryczny – Calpain Activity Assay Kit (#ab65308 Abcam). Mózdzki pobrano od grupy myszy w wieku 10-11 miesięcy. Tkankę mózdku homogenizowano na lodzie w buforze ekstrakcyjnym w proporcji 50 µl buforu na 10 mg tkanki. Próbkę odwirowano (4°C, 5 min, 16 600 g) supernatant wykorzystano w teście fluorymetrycznym. Do dołków na czarnej płytce NUNC 96 (#237105 Thermo Fisher) nałożono 20 µl lizatu z mózdku, 10 µl buforu reakcyjnego, 5 µl substratu i 65 µl buforu ekstrakcyjnego. Płytkę inkubowano przez 60 min w 37°C. Następnie dokonano pomiarów fluorescencji przy EX/EM=400/505 nm na aparacie CLARIOstar (BMG Labtech). Stężenie białek w lizatach określono przy pomocy urządzenia nanodrop. Wyniki fluorescencji skorygowano o otrzymane wartości stężeń lizatów.

5.2.18 Test dot blot anty-SNTF na lizatach z mózdków myszy R1098Q+hCAST

Na membranę nitrocelulozową nałożono rzędami po 4 próbki lizatów z mózdków myszy w objętości 1 μ l dla grup WT, WT+ hCAST, R1098Q, R1098Q+hCAST. Wykorzystano te same lizaty co do testu kalpainowego. Pozostawiono do obeschnięcia. Następnie membranę blokowano w roztworze odtłuszczonego mleka w PBS przez godzinę. Po krótkim odpłukaniu w buforze płuczającym inkubowano membranę w roztworze 1:10 000 przeciwciała anty-SNTF (# ABN2264 Sigma) przez 1,5 godziny. Przepłukano trzykrotnie po 10 min. Prowadzono inkubację z przeciwciałem drugiej warstwy anty-królik-HRP (#12-348 Sigma) 1: 10 000 przez godzinę. Przepłukano jak poprzednio i zanurzano membranę w substracie dla HRP. Po odsączeniu membranę umieszczono w aparacie G-Box gel doc (Syngene, Frederic, MD, USA) i zarejestrowano intensywność sygnału świetlnego dla poszczególnych próbek. Uzyskany obraz analizowano przy pomocy oprogramowania ImageJ wersja 1.53e (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

5.2.19 Test rotarod myszy R1098Q+hCAST

Testy rotarod wykonano na urządzeniu skonstruowanym przez mgr inż. Tomasza Budzińskiego. Aparat ten posiada elektroniczny sekundomierz sprzężony z czujnikiem upadku. Przed rozpoczęciem testów przeprowadzono sesje osvajania myszy z urządzeniem 48 i 24 godziny przed testami, aby osiągnąć jak najbardziej miarodajne wyniki nie zaburzone stresem związanym z nowymi doznaniem. Myszy przebywały na nieruchomym drążku, na drążku kręcącym się ze znikomą prędkością $< 0,5$ rpm, jak również w przestrzeni pod drążkiem oraz osłuchiwały się z pracą silnika urządzenia (min. 3 minuty na każdą czynność). Pomiarów dokonywano przy użyciu prędkości 14 rpm. Przy każdej sesji wykonywano 4 niezależne pomiary, między którymi mysz odpoczywała min. 3 min. Kończono pomiar, gdy mysz spadła z drążka. Za maksymalny czas przebywania na drążku przyjęto 120 s – po tym czasie kończono pomiar prawidłowo poruszającej się myszy. Przeprowadzono 5 sesji w następujących po sobie dniach. Do analizy uśredniono wyniki pomiarów z każdej sesji. Myszy wykorzystane w trakcie badania miały 6-8 miesięcy.

5.2.20 Test siły mięśniowej myszy R1098Q+hCAST

Testy siły chwytu wykonano przy użyciu dynamometru ze stale przyłączonym fragmentem kratownicy wykorzystywanej w karmidlach. Dzień przed testami przeprowadzono sesję próbną. Pomiaru dokonywano przez oznaczenie siły potrzebnej do zerwania uchwytu kratownicy przednimi łapami myszy. Pomiary, w których mysz użyła również tylnych kończyn

bądź siekaczy, odrzucano. Testy prowadzono przez 3 dni. Każda sesja zawierała 4 następujące po sobie pomiary dla każdej z myszy. Do analizy uśredniono wyniki pomiarów dla każdej sesji. Myszy wykorzystane w trakcie badania były w wieku 7-9 miesięcy.

5.2.21 Test footprint analizy chodu myszy R1098Q+hCAST

Pomiarów chodu myszy dokonano przy pomocy areny/toru wyłożonego bibułą Whatmann, połączonego z zamkniętym, zaciemnionym pudełkiem o wymiarach 15 x 15 x 15 cm. Przed dokonaniem testów, myszy oswajano z areną pomiarową poprzez pięciokrotne wpuszczanie ich na tor tak aby mysz po wypuszczeniu kierowała się wzdłuż ścieżki pomiarowej do zaciemnionej części. Łapy przednie i tylne znakowano tuszem kreślarskim w dwóch różnych kolorach. Zmierzono zastępujące parametry: rozstaw łap (ang. base of support), długość kroku (ang. step length), odległość między śladami łapy (ang. straight length) zarówno dla kończyn tylnych i przednich, oraz odległość między łapami przednią i tylną przy dostawieniu (ang. interlimb distance). Myszy wykorzystane w trakcie badania miały 8-10 miesięcy.

5.2.22 Metody statystyczne

Na zaprezentowanych wykresach wszystkie różnice istotne statystycznie oznaczono gwiazdką (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Dla wykresów dotyczących pomiarów stabilności białek na urządzeniu Prometheus wyrażono niepewność pomiaru jako przedział ufności (95%). Dla pomiarów w eksperymentach ELISA, DLS, dot blot i dla testu aktywności kalpajny słupki niepewności wyrażone są w postaci odchylenia standardowego, zaś w przypadku testów dotyczących koordynacji ruchowej i siły mięśniowej myszy R1098Q+hCAST zastosowano standardowy błąd pomiaru.

Do analizy statystycznej wyników użyto programu GraphPad Prism 5. Wyniki ELISA testowano na podstawie dwóch powtórzeń biologicznych, każde po dwa techniczne powtórzenia. Do oszacowania zależności pomiędzy utratą gęstości optycznej a czasem proteolizy zastosowano regresję liniową na podstawie zbadanych punktów pomiarowych. Aby określić istotność statystyczną wyników badania analizowano wartości gęstości optycznej, po 30 min. reakcji dla każdego badanego układu, poprzez test wieloczynnikowej analizy wariancji two-way ANOVA z poprawką Bonferroniego.

Do analizy wyników testu rotarod wykorzystano średnie z 4 niezależnych pomiarów dla wszystkich 5 dni testów. Wykorzystano dane dotyczące grupy myszy o następujących licznosciach: samice R1098Q(8), R1098Q+hCAST(5), samce R1098Q(4),

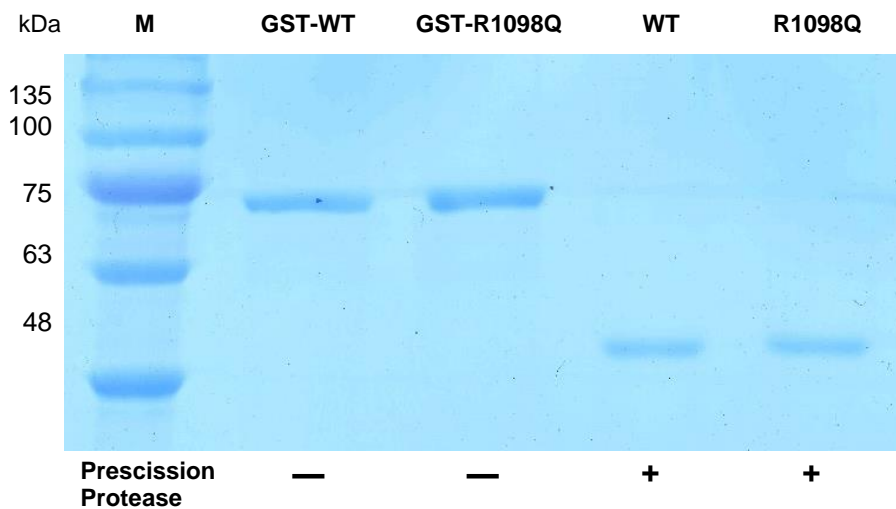
R1098Q+hCAST(6). Zastosowano test two-way ANOVA dla powtarzanych pomiarów z poprawką Bonferroniego. Do analizy wyników testu siły chwytu wykorzystano średnie z 4 niezależnych pomiarów z 2 dni testów. Wykorzystano dane dotyczące grupy myszy o następujących licznosciach: samice R1098Q (8), R1098Q+hCAST (5), WT+hCAST (7) samce R1098Q (4), samce R1098Q+hCAST (6), WT+hCAST(6). Użyto testu one-way ANOVA z poprawką Bonferroniego.

Do analizy wyników testu footprint użyto danych dotyczących myszy w grupach mieszanych płciowo: R1098Q (8), R1098Q+hCAST (7), WT+hCAST (7). Wykorzystano karty ze śladami co najmniej pięciu nieprzerwanych kroków. Przed analizą statystyczną uśredniono pomiary każdego z parametrów dla danej myszy. Dla parametrów odległości między łapami przy dostawieniu oraz odległości między śladami łapy uśredniono pomiary dotyczące prawych i lewych kończyn. Zastosowano test one-way ANOVA z poprawką Bonferroniego.

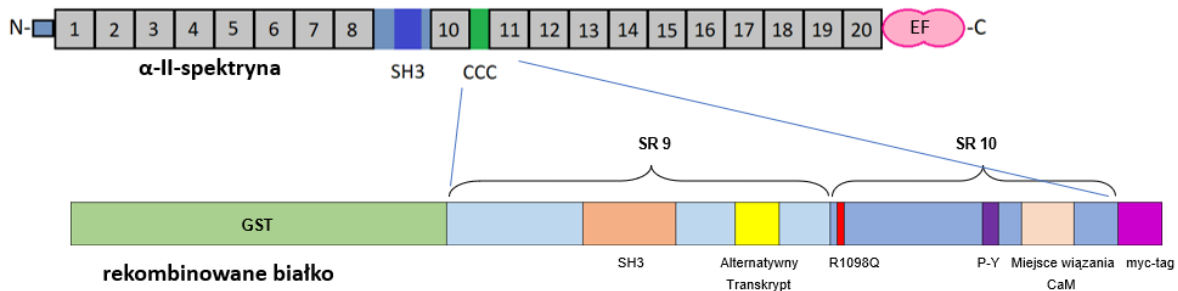
6. Wyniki

6.1 Białka SPTAN1.2/myc

Wyizolowano z hodowli bakteryjnej i oczyszczono białka rekombinowane w formie dzikiej jak i zawierającej mutację o sekwencji zbieżnej z 9 i 10 powtórzeniami spektrynowymi. Po oczyszczeniu białka były dodatkowo traktowane Precision Protease w celu eliminacji GST dla eksperymentów wymagających wykorzystania jedynie fragmentu powtórzeń spektrynowych. Na rycinie 11 zaprezentowane są prążki reprezentujące białka rekombinowane po rozdiale elektroforetycznym zarówno w formie fuzyjnej jak i po odcięciu GST. Rycina 12 obrazuje wzajemne umiejscowienie poszczególnych składników białka rekombinowanego i odpowiadający fragment a II spektryny. Peptydy te zawierają domenę SH3 oraz domenę CCC - miejsce fosforylacji przez kinazę Src, miejsce wiązania kalmoduliny oraz proteolizy przez kalpainę i kaspazy. Na C-końcu niedaleko miejsca proteolizy umieszczono znacznik myc-tag. Na czerwono zaznaczone jest położenie mutacji.



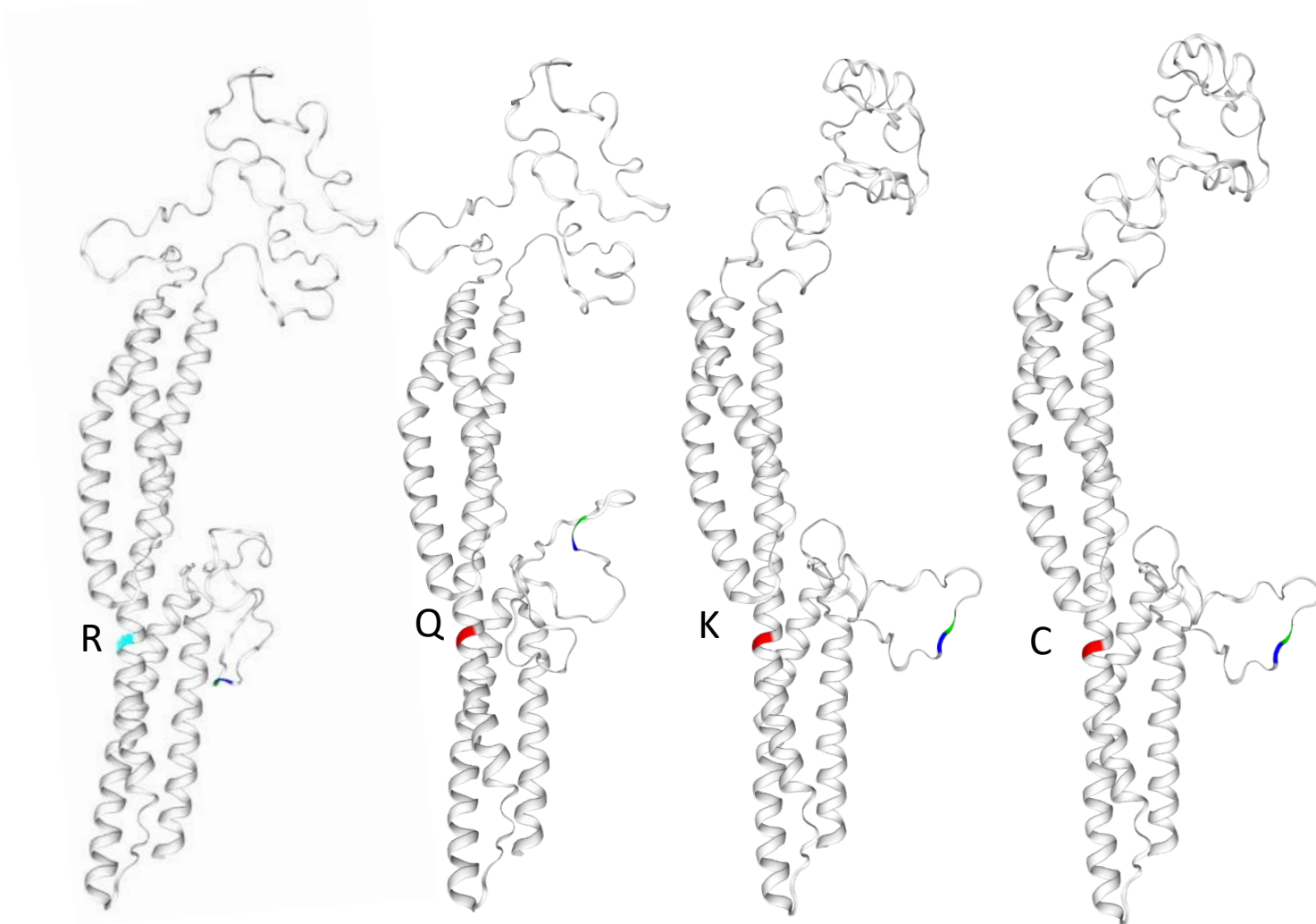
Rycina 11. Elektroforegram przedstawiający białka WT i R1098Q po oczyszczeniu i po odtrawieniu GST.



Rycina 12. Schemat przedstawiający rekombinowane fragmenty a II spektryny i odpowiadające im położenie w pełnym białku.

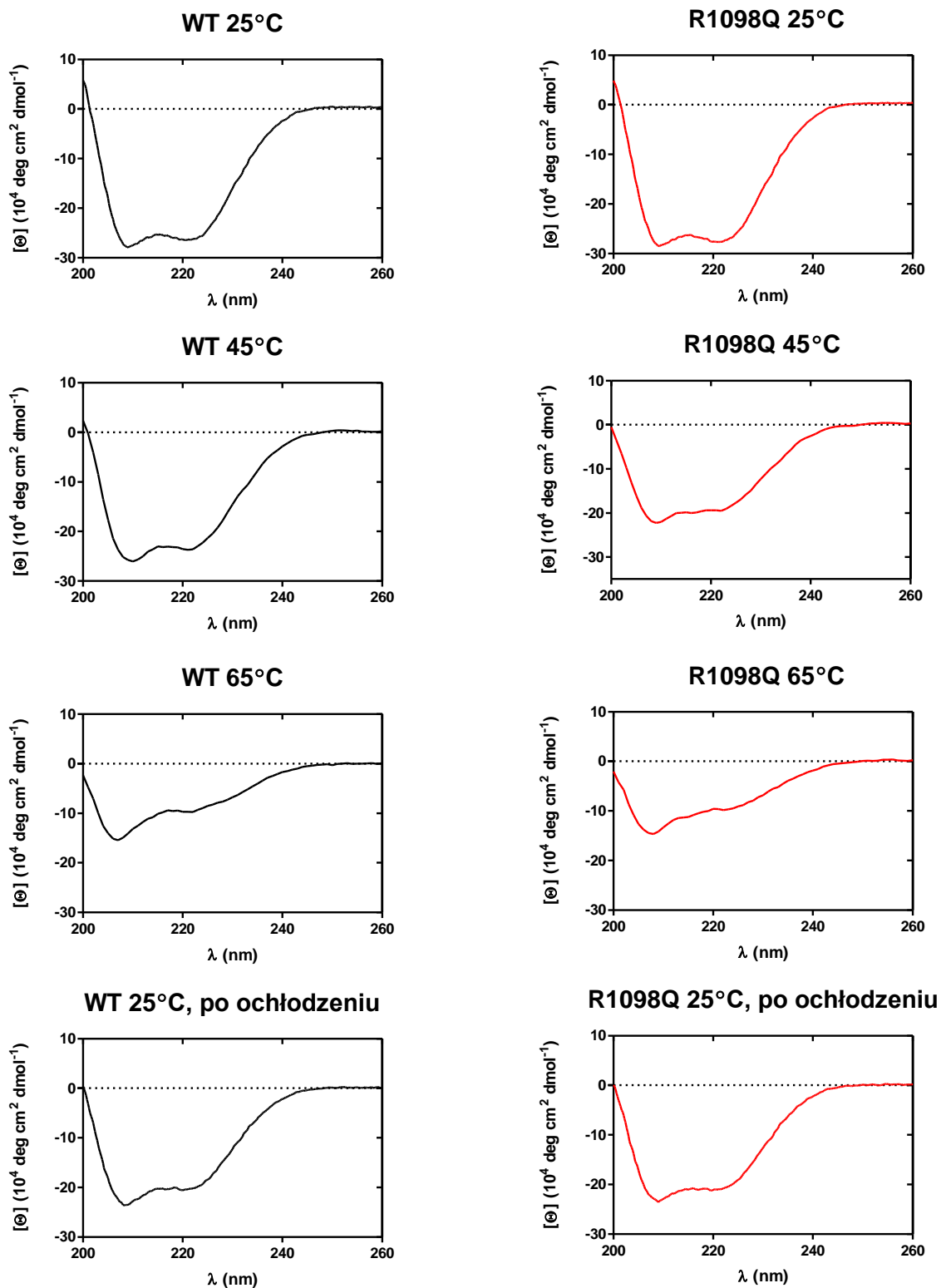
6.2 Modelowanie strukturalne

W modelowaniu strukturalnym wykorzystano 4 wersje sekwencji: w typie dzikim R1098 i ze zmianami: odpowiadające badanej mutacji R1098Q, i dodatkowo analizowane R1098K, R1098C. W przypadku wersji z mutacją R1098Q modelowanie strukturalne wykazało znaczną zmianę położenia pętli CCC w obrębie której znajduje się miejsce proteolizy dla kalpainy, względem położenia alfa helis powtórzeń spektrynowych. Zmiana ta wywołuje rozluźnienie tej struktury, odsunięcie i większą ekspozycję wiązania między tyrozyną 1176 i glicyną 1177 które może dzięki temu być łatwiej dostępne dla kalpainy. Do rozwinięcia struktury, odsunięcia i wyeksponowania wiązania Y1776/G1177 dochodzi też przy wygenerowaniu bardzo podobnych do siebie modeli w wersjach R1098K i R1098C. We wszystkich przypadkach modyfikacji miejsce proteolizy zostaje odsunięte od osi środkowej modelu zawierającego dwa powtórzenia spektrynowe.



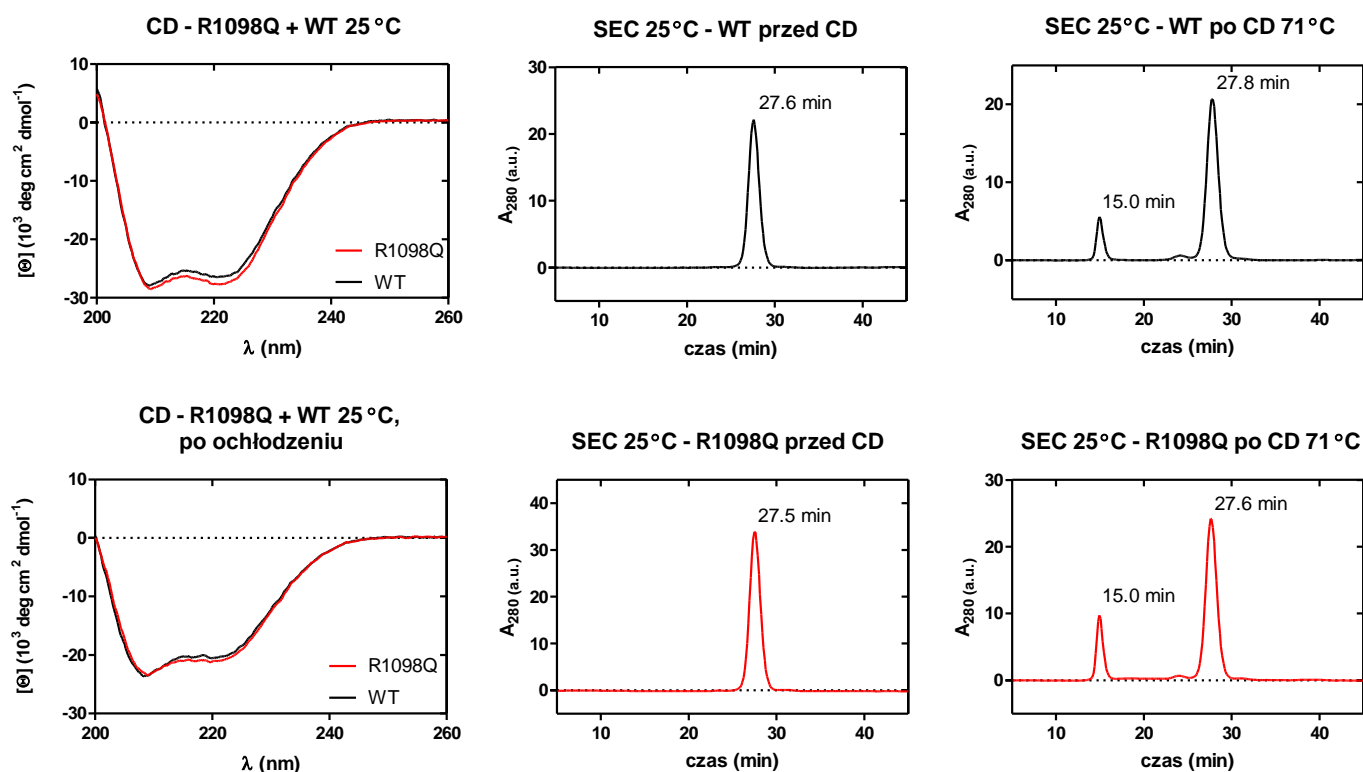
Rycina 13. Rzuty modelowania strukturalnego fragmentów all-spektryny w różnych wariantach 1098 reszty aminokwasowej.

6.3 Dichroizm kołowy, DLS i chromatografia size-exclusion



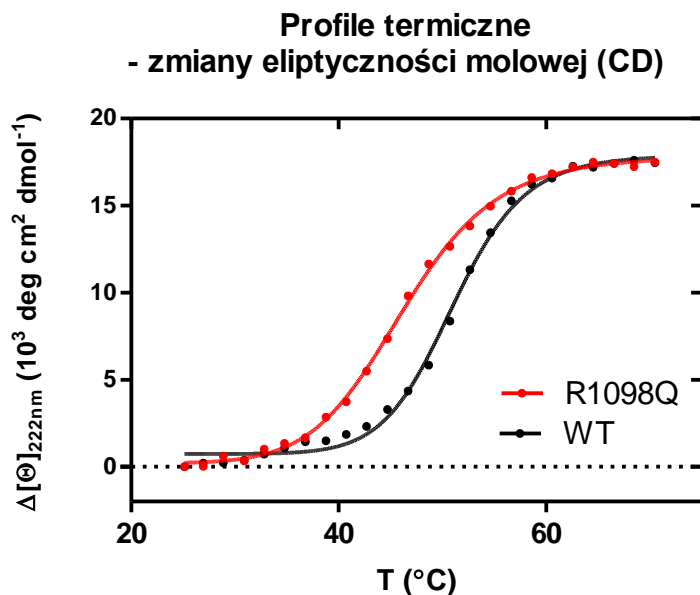
Rycina 14. Obraz dichroizmu kołowego dla białek spektrynowych w różnych temperaturach.

Eksperyment dichroizmu kołowego wykonano w ośmiu wariantach temperaturowych, po cztery dla każdego rodzaju białka. Porównując wykresy CD na rycinie 14 można zaobserwować, że dla temperatury 45 °C przebieg krzywej jest wyższy dla białka w wariacie R1098Q, co świadczy o jego szybszej denaturacji. Różnice nie są tak widoczne dla wykresów w pozostałych temperaturach. Na rycinie 15 widoczne są zestawione wykresy CD dla roztworów białek w typie dzikim i R1098Q w formie natywnej (25°C) oraz po denaturacji i schłodzeniu do 25°C. Wgłębienia w dolnej części wykresów świadczą o wysokiej zawartości α -helisy w strukturze białek i są zbliżone dla obu peptydów. Wykresy CD po denaturacji mają podwyższone przebiegi w porównaniu do tych przed denaturacją. Są za to odpowiedzialne agregaty o nieuporządkowanej strukturze. Po prawej stronie wykresów CD zaprezentowane są chromatogramy peptydów. W części centralnej po oczyszczeniu przed eksperymentami CD i denaturacją, a po prawej po oddziaływaniu termicznym. Na chromatogramach po denaturacji widoczne są dodatkowe szczyty odpowiadające one cząsteczkom o nieuporządkowanej strukturze i większej objętości, tym które nie uległy renaturacji po obniżeniu temperatury. Na podstawie przedstawionych wykresów można stwierdzić, że badane peptydy mają zbliżoną strukturę drugorzędową i podobną skłonność do renaturacji.



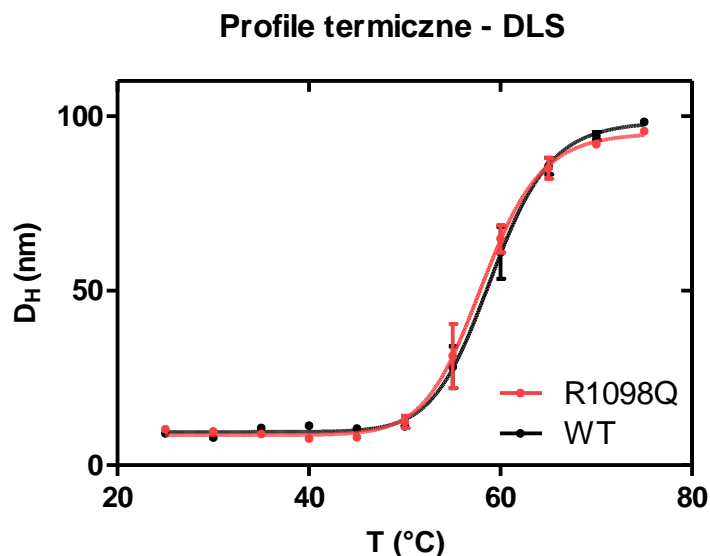
Rycina 15. Wyniki dichroizmu kołowego w zestawieniu z wynikami chromatografii żelowej (SEC).

Na poniższej rycinie 16 przedstawiono zmiany eliptyczności molowej wraz z temperaturą dla białek typu dzikiego i z mutacją R1098Q. Środkowy punkt dla obu krzywych to temperatura, przy której połowa łańcucha jest zdenaturowana. W typie dzikiem wynosiła ona $51.25^{\circ}\text{C}\pm 0.09$, natomiast w typie R1098Q $45.67^{\circ}\text{C}\pm 0.25$. Dla białka noszącego mutację jest ona o ok. 5.5°C niższa, co oznacza większą labilność struktury.



Rycina 16. Zmiany eliptyczności molowej w zależności od temperatury.

Przeciwnie do wyników uzyskanych w dichroizmie kołowym przebiegi krzywych DLS dla obu peptydów są do siebie zbliżone świadczy to o podobnym przebiegu agregacji białek podczas procesu denaturacji. Temperatury określone jako środkowy punkt agregacji na podstawie wzrostu średnicy cząsteczek wynosiły w tym przypadku 59.09°C dla WT i 58.14°C dla R1098Q. Wykresy przedstawiono na poniższej rycinie 17.



Rycina 17. Zmiany rozmiaru cząsteczek w zależności od temperatury.

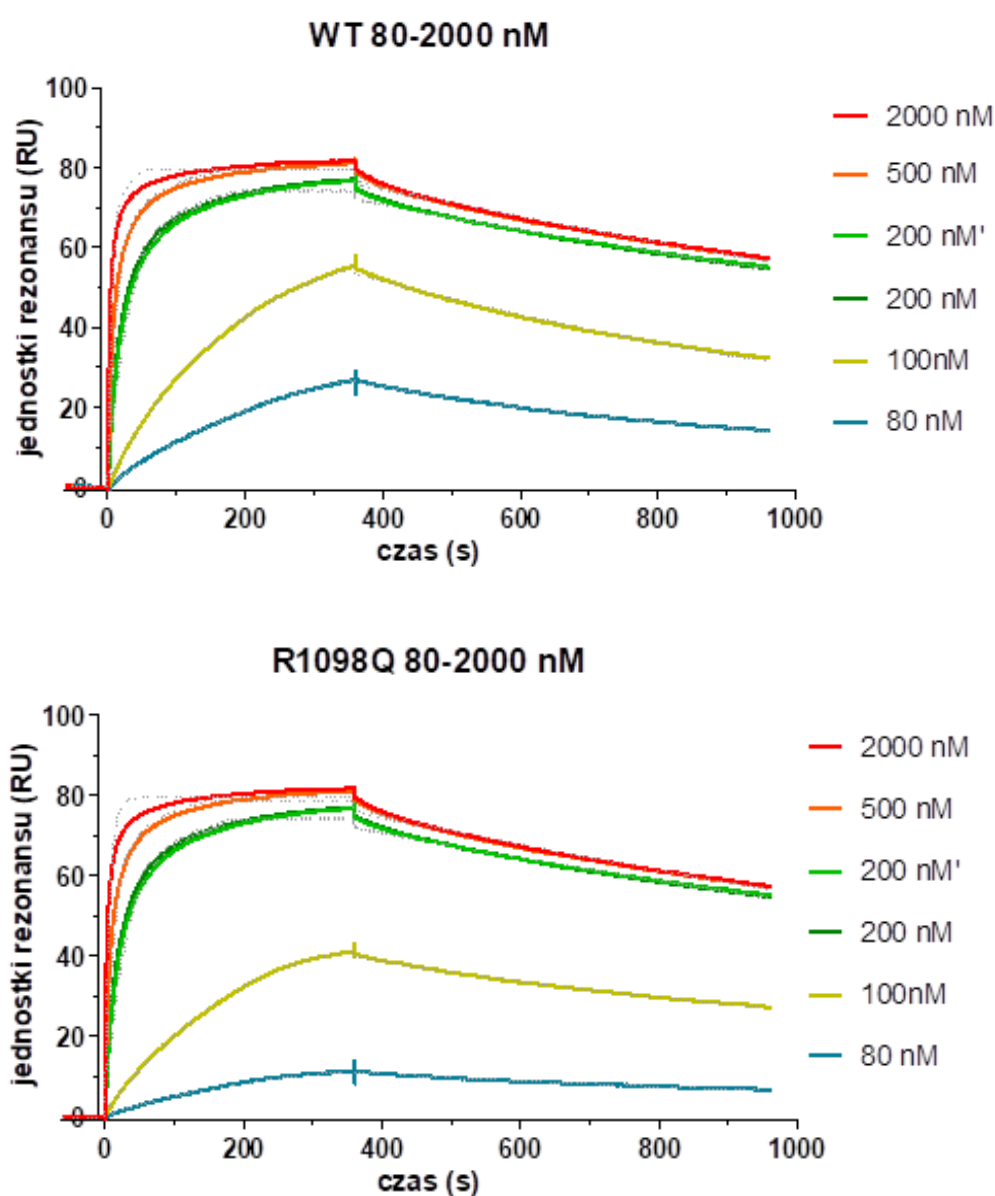
Uzyskane przy użyciu dichroizmu kołowego dane wprowadzono do programu dostępnego za pośrednictwem witryny internetowej Dichroweb: <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml> i przeprowadzono analizę metodą K2D przybliżającą zawartość poszczególnych struktur drugorzędowych białka w badanych próbkach. Wyniki analizy przedstawiono w poniższej tabeli.

Tabela 11. Przybliżona zawartość procentowa struktur drugorzędowych we fragmentach spektrynowych WT i R1098Q.

struktura/próbka	WT 25°C	R1098Q 25°C	WT 25°C po ochłodzeniu	R1098Q 25°C po ochłodzeniu
α helisa	85%	70%	87%	73%
β kartka	0	3%	0	2%
nieuporządkowana	15%	26%	13%	25%

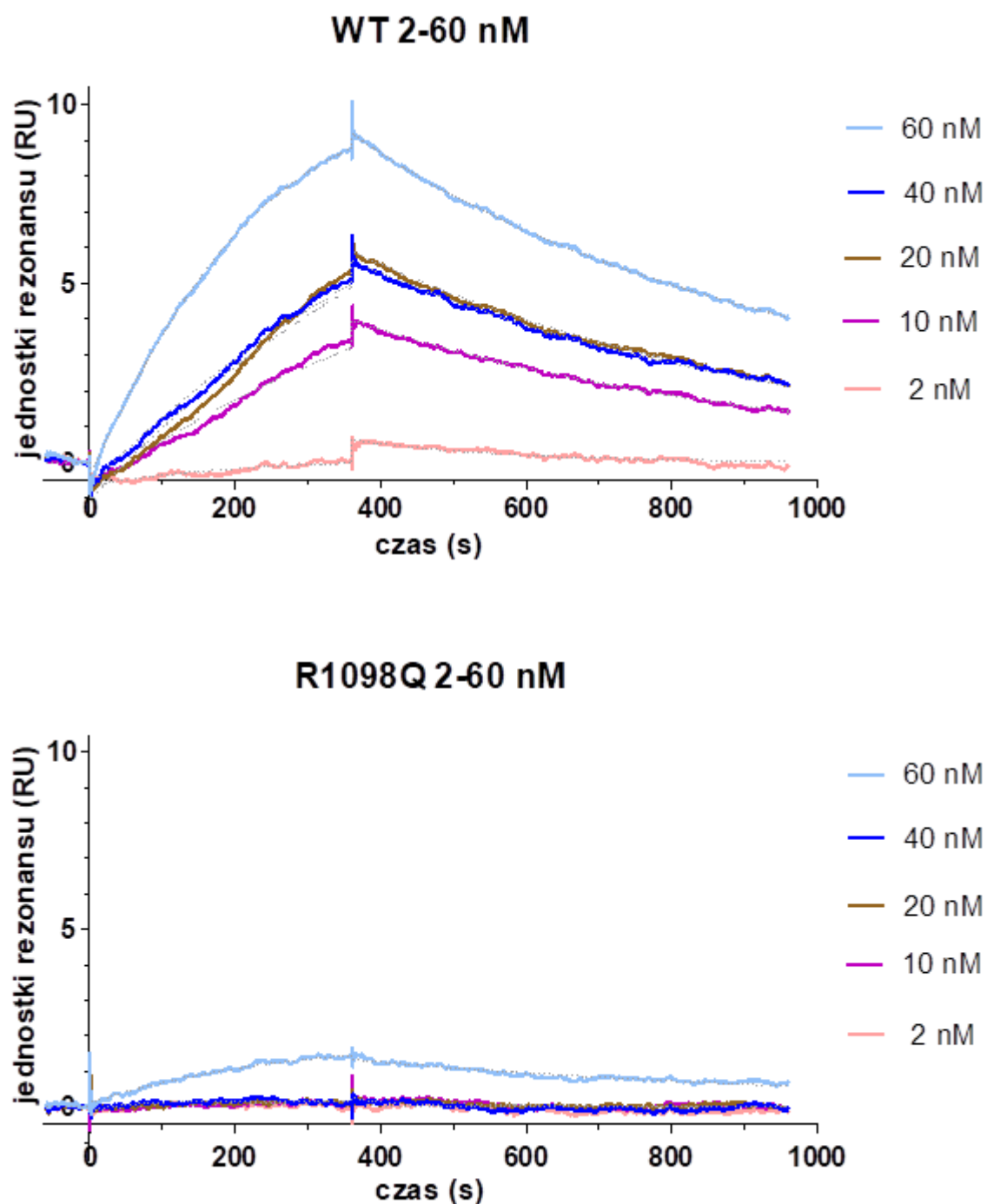
6.3 SPR – Rezonans plazmonów powierzchniowych

Technika rezonansu plazmonów powierzchniowych posłużyła do oceny oddziaływania peptydów spektrynowych z kalmoduliną w obecności jonów wapniowych. Jak można zaobserwować na rycinie 18, dla bardzo wysokich stężeń kalmoduliny w zakresie 200-2000 nM nie zaobserwowano znaczących różnic w powinowactwie kalmoduliny do obu typów ligandów. Widoczne jest jedynie nieco wolniejsze wiązanie i zwalnianie kalmoduliny przez fragmenty zawierające mutację.



Rycina 18. Wyniki SPR dla peptydów WT i R1098Q przy stężeniach kalmoduliny 80-2000 nM.

Na rycinie 19 zaprezentowano wyniki oddziaływania dla stężeń kalmoduliny poniżej 80 nM. Jak można zauważyć różnice są znaczące dopiero przy niższych stężeniach kalmoduliny gdzie białko z mutacją bardzo słabo wiąże kalmodulinę, zatem typ R1098Q słabo oddziałuje z kalmoduliną, gdy jej stężenia są bliższe fizjologicznym.



Rycina 19. Wyniki SPR dla peptydów WT i R1098Q przy stężeniach kalmoduliny 2-60 nM.

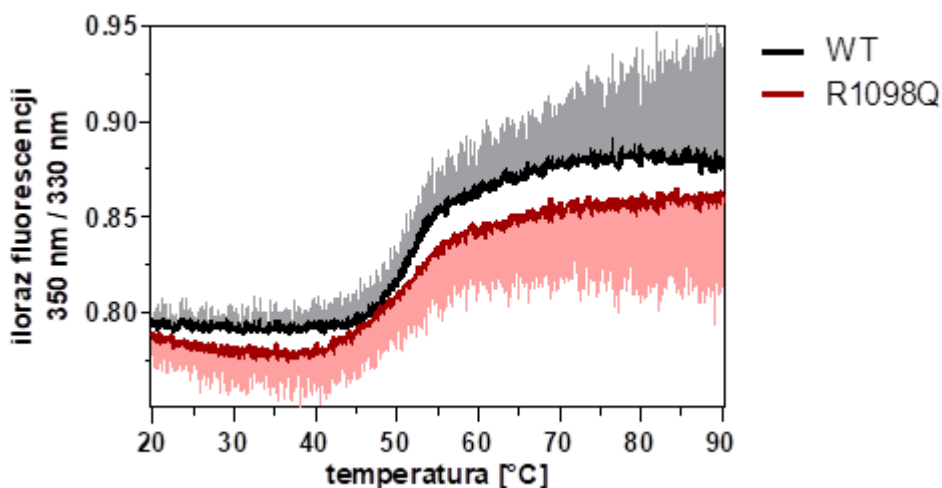
W poniższej tabeli 12 przedstawiono wartości stałych asocjacji, dysocjacji i stałą równowagi, które zostały obliczone na podstawie otrzymanych danych eksperymentalnych.

Tabela 12. Wartości stałych kinetycznych oddziaływania fragmentów spektrynowych WT i R1098Q z kalmoduliną.

forma białka	k_a [$(M \cdot s)^{-1}$]	k_d [s^{-1}]	KD [M]
WT	$2.7 \pm 0.1 \cdot 10^{-5}$	$8.6 \pm 0.3 \cdot 10^{-4}$	$3.2 \pm 0.1 \cdot 10^{-9}$
R1098Q	$1.3 \pm 0.1 \cdot 10^{-5}$	$4.8 \pm 0.1 \cdot 10^{-4}$	$3.8 \pm 0.3 \cdot 10^{-9}$

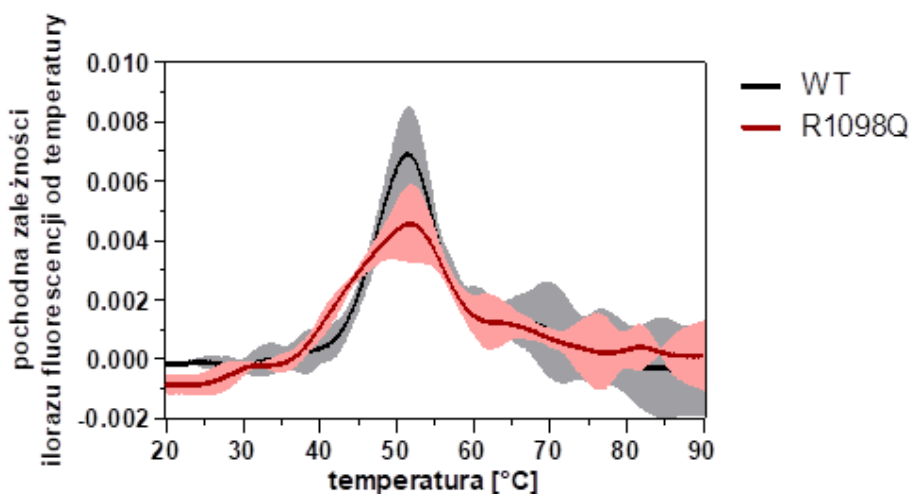
6.4 Pomiary stabilności białek - Prometheus

Pomiary na urządzeniu Prometheus pozwoliły na oszacowanie jakości białka i zbadanie jego podatności na rozfałdowanie pod wpływem wzrastającej temperatury podobnie jak pomiary CD i DLS. Na rycinie 20 zaprezentowano wykres zależności ilorazu fluorescencji 350 nm/ 330 nm od temperatury. Kształt zbliżony do sigmoidalnego świadczy o dobrej jakości białka wykorzystanego do pomiarów.



Rycina 20. Zmiany zależności ilorazu fluorescencji 350nm/330 nm od temperatury- system Prometheus.

Na kolejnej rycinie 21 zaprezentowano pierwszą pochodną tej zależności. Z obrazu tego można odczytać punkt przegięcia odpowiadający połowicznemu rozfałdowaniu oraz temperaturę przy której rozpoczęła się denaturacja. Wartości te wskazano w tabeli 13. Z eksperymentu można wnioskować o zbliżonej dla obu typów białek temperaturze odpowiadającej punktowi przegięcia. Natomiast znacznie różnią się temperatury początkowe przy których inicjowane jest rozfałdowanie struktury dla typu dzikiego jest to ok 43°C, natomiast dla wersji R1098Q ok. 34°C.



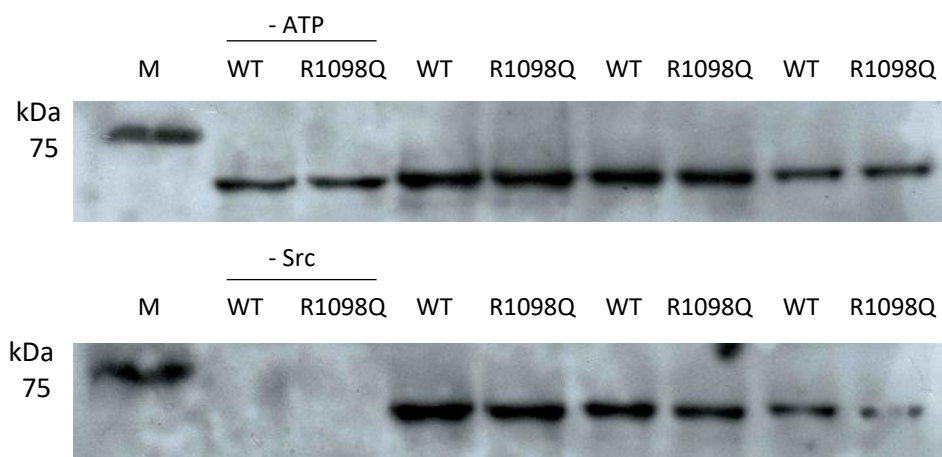
Rycina 21. Zmiany pochodnej zależności ilorazu fluorescencji od temperatury - system Prometheus.

Tabela 13. Wartości termiczne otrzymane dla białek WT i R1098Q w eksperymencie na aparacie Prometheus.

	WT	R1098Q
Początek denaturacji	43,37 °C	34,80 °C
Punkt przegięcia	51,53 °C	51,70 °C

6.5 Fosforylacja kinazą c-Src – western blot

Aby sprawdzić, czy obydwa białka ulegają jednakowo skutecznej fosforylacji, postanowiono zbadać stopień ufosforylowania białek w typie WT i R1098Q po reakcji katalizowanej przez kinazę c-Src. Na rycinie 17 widoczne są w dwóch powtórzeniach (górze i dole) różne ilości ufosforylowanego białka. We wszystkich rozcieńczeniach próbek stopień ufosforylowania jest zbliżony dla białek typu WT i R1098Q. Dodatkowo na żelu umieszczono próbkę bez kinazy, dla której nie stwierdzono obecności fosfotyrozyny, białko nie było ufosforylowane przed reakcją kinazy. Druga kontrola uwzględniała próbki bez ATP, w tym przypadku uwidoczniono fosfotyrozinę na wysokości odpowiadającej masie fragmentów spektrynowych. Możliwe, że mimo procesu oczyszczania na złożu zostały niewielkie ilości ATP umożliwiające kinazie c-Src przeprowadzenie reakcji fosforylacji jednak z mniejszą wydajnością niż miało to miejsce w próbkach do których dodano określoną ilość ATP – ilość nałożonego na elektroforezę białka w próbce bez dodanego ATP była taka sama jak w najmniej rozcieńczonych próbkach reakcyjnych.

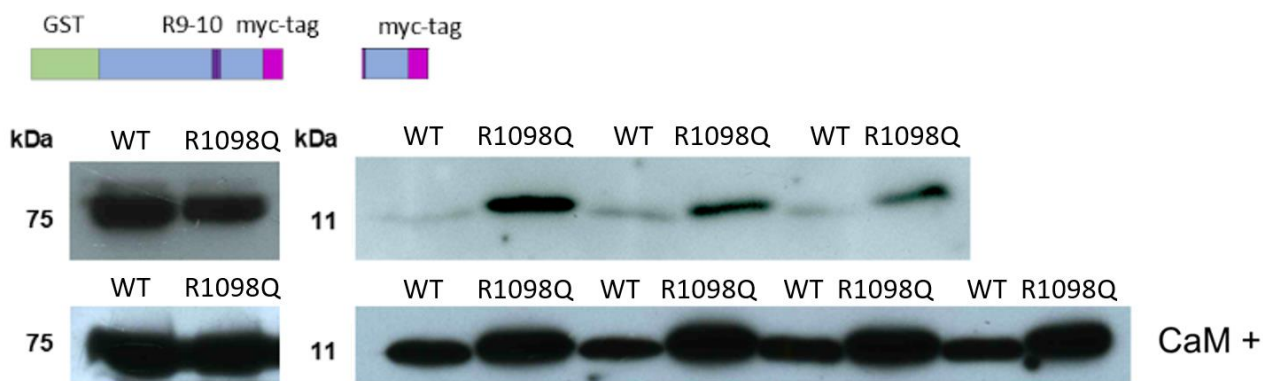


Rycina 22. Wynik western blot anty-fosfotyrozyna – fosforylacja fragmentów spektrynowych przez kinazę c-src.

6.6 Trawienie kalpainą – western blot

Podatność na proteolizę fragmentów spektrynowych badano przy użyciu techniki Western blot. Do eksperymentu wykorzystano kolumnienki wirówkowe i białka na złożu. Elektroforezie poddano próbki będące przesączem z wirowania po reakcji na kolumnienkach zawierających jedynie produkty reakcji proteolizy oraz porównawczo nietrawione próbki białek. Wynik Western blot anty-myc-tag wskazuje większy stopień proteolizy dla typu niosącego mutację R1098Q.

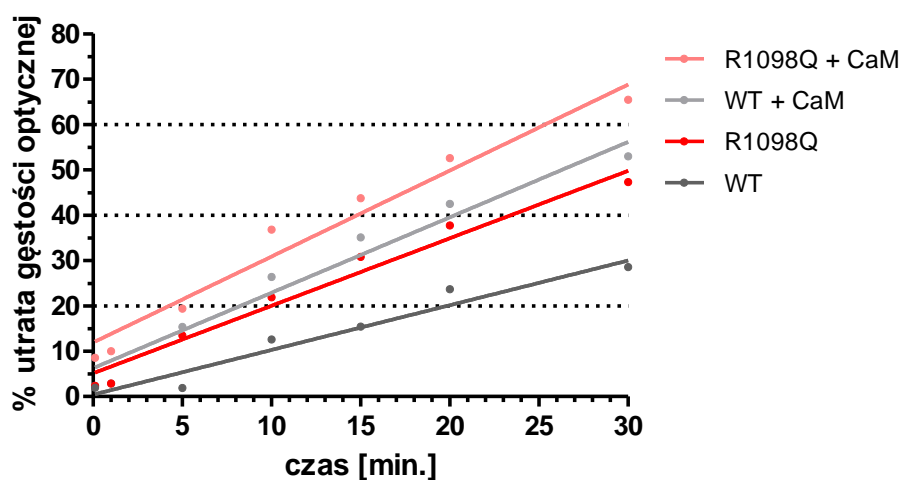
Celem sprawdzenia podatności fragmentów spektrynowych w typie WT i R1098Q na proteolizę kalpainą przy obecności kalmoduliny przeprowadzono reakcję w układzie w którym białku z myc-tagiem w typie R1098Q towarzyszyło w nadmiarze białko WT które nie posiadało znacznika, oraz układ przeciwny z białkiem WT z myc tagiem i białkiem R1098Q bez znacznika. Eksperyment wykazał znacznie większy przyrost produktu degradacji we wszystkich badanych próbkach w przypadku białka z mutacją R1098Q co jest widoczne w dolnym zestawieniu obrazów WB na rycinie 18. Reakcję przerywano w różnych punktach czasowych jednak różnice między poszczególnymi czasami przerywania reakcji nie są widoczne prawdopodobnie substrat z myc-tagiem przereagował już w czasie pierwszych 5 min.



Rycina 23. Wynik Western-blot anty-myc-tag dla proteolizy peptydów spektrynowych przez kalpainę.

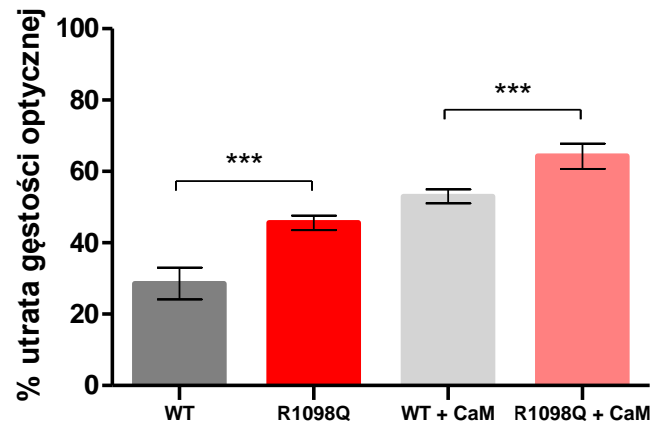
6.7 Trawienie kalpainą - ELISA

Trawienie fragmentów spektrynowych zbadano przy wykorzystaniu zmodyfikowanego autorskiego testu ELISA. Reakcja została przerwana w kilku punktach czasowych, rycina 24 zawiera obliczone na podstawie wyników z punktów pomiarowych procentowe ubytki gęstości optycznej względem próbek nie poddanych działaniu kalpiny. Na ich podstawie wyznaczone zostało liniowe dopasowanie, a stopień nachylenia krzywej świadczy o tempie proteolizy. Obliczone wartości nachylenia krzywych wynosiły: WT=0,986±0099, R1098Q=1,489±0,099, WT+CaM=1,664±0,116, R1098Q +CaM=1,897±0,134



Rycina 24. Procentowa utrata gęstości optycznej w zależności od czasu reakcji.

Na rycinie 25 został ujęty średni procentowy ubytek gęstości optycznej dla finalnego punktu pomiarowego – po 30 min reakcji. Na pokazanych wykresach zauważalna jest podwyższona podatność na trawienie kalpainą dla białka R1098Q. Dodatek kalmoduliny zgodnie z literaturą [88] ułatwia trawienie w przypadku typu dzikiego spektryny ale w mniejszym stopniu dzieje się tak również w przypadku typu R1098Q.



Rycina 25. Całkowita procentowa utrata gęstości optycznej odpowiadająca ilości strawionego białka - kalpaina.

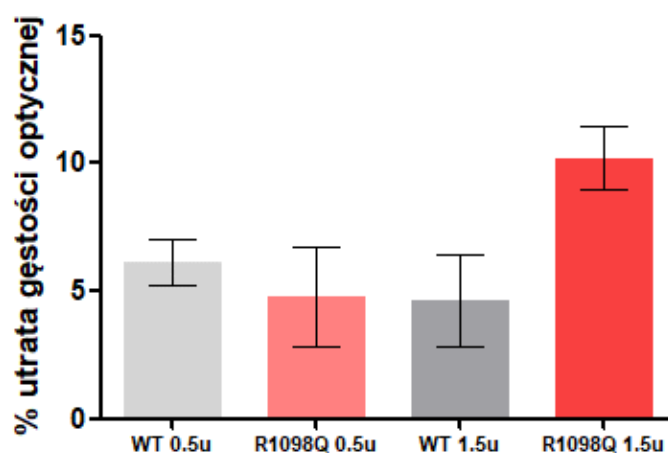
Oprócz regresji liniowej na podstawie punktów pomiarowych obliczono także średnią szybkość reakcji wyrażoną jako ubytek substratu w jednostce czasu, co przedstawiono w tabeli 14:

Tabela 14. Wydajność proteolizy substratów spektrynowych przez kalpainę w reakcji łączonej z ELISA.

	WT	R1098Q	WT + CaM	R1098Q + CaM
Średni ubytek substratu [ng/min]	0,74	1,68	1,94	2,50
Średni czas proteolizy 1 ng substratu [s]	81,32	35,64	30,90	23,98

6.8 Trawienie kaspazą 3 - ELISA

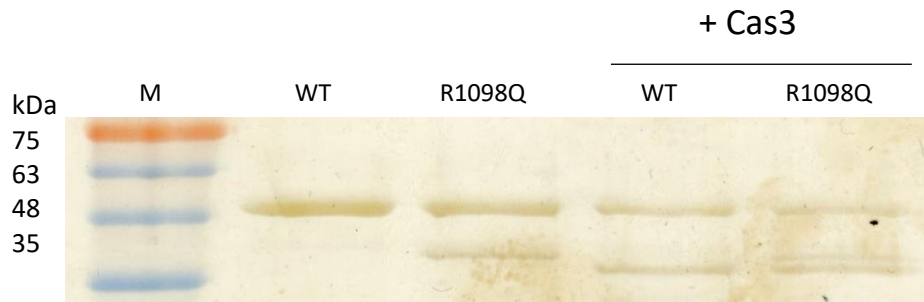
Przeprowadzono testy proteolizy białek spektrynowych WT i R1098Q przez kaspazę 3 z zastosowaniem 0,5 i 1,5 u enzymu. Wyniki przedstawiono na rycinie 21 jako procentową utratę gęstości optycznej dla poszczególnych typów próbek, jej wartość jest proporcjonalna do ilości białka poddanego proteolizie. Słupki reprezentują średnią ze wszystkich dokonanych pomiarów. Wykonano po dwa niezależne eksperymenty dla obu stężeń kaspazy 3, dla 0,5 u trzy powtórzenia, a dla 1,5 u dwa powtórzenia techniczne. Eksperymenty wykazały niewielki stopień proteolizy obu typów białek w stosunku do początkowej ilości białka w próbce. Było to średnio 5,4% dla 1 u i 7,4 % dla 1,5 u kaspazy 3. Najwyższy wynik uzyskano dla próbki zawierającej białko R1098Q z 1,5 u kaspazy 3, jednak nie przekroczył on 13,5% strawionego białka. Poszczególne eksperymenty miały niską powtarzalność. Nie uzyskano istotności statystycznej dla otrzymanych wyników.



Rycina 26. Całkowita procentowa utrata gęstości optycznej odpowiadająca ilości strawionego białka - kaspaza 3.

6.9 Trawienie kaspazą 3 – barwienie azotanem srebra

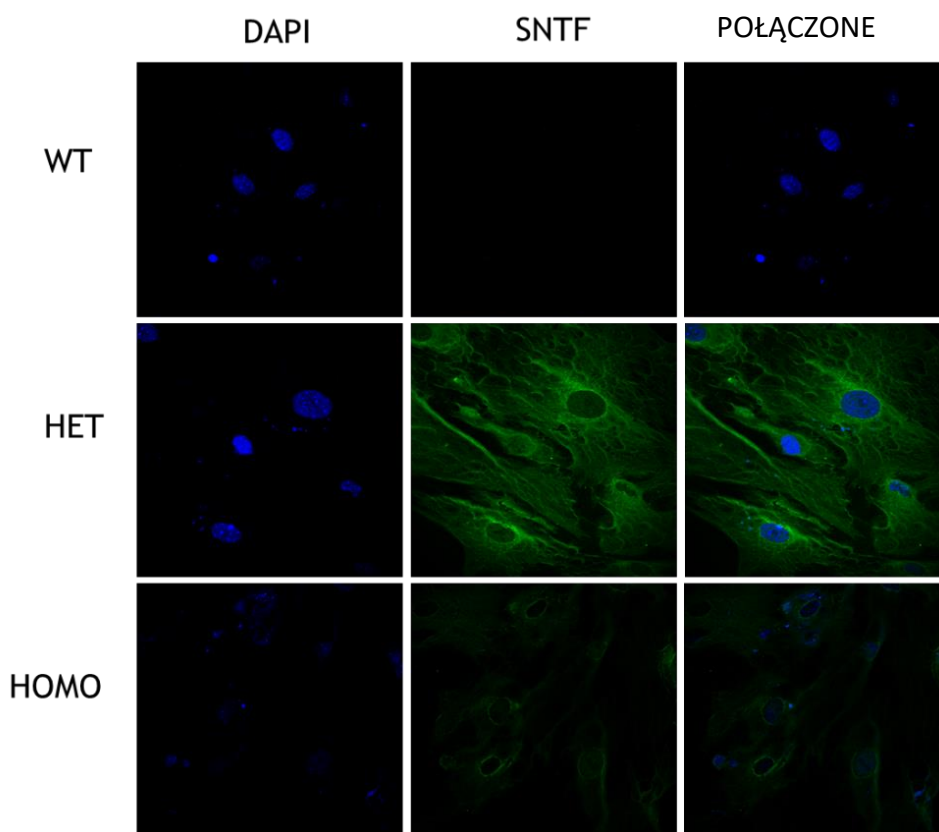
Drugą techniką wykorzystaną do porównania stopnia proteolizy białek spektrynowych WT i R1098Q przez kaspazę 3 było barwienie azotanem srebra. Barwienie próbek po proteolizie białek spektrynowych przez kaspazę 3 podobnie jak eksperyment ELISA nie wykazało dużych różnic pomiędzy próbkami WT i R1098Q. Analiza densytometryczna nie dała miarodajnych wyników ze względu na ciemne niejednorodne tło.



Rycina 27. Trawienie kaspazą 3 – obraz barwienia azotanem srebra.

6.10 Barwienie komórek mózgowych na obecność produktów degradacji alfa spektryny

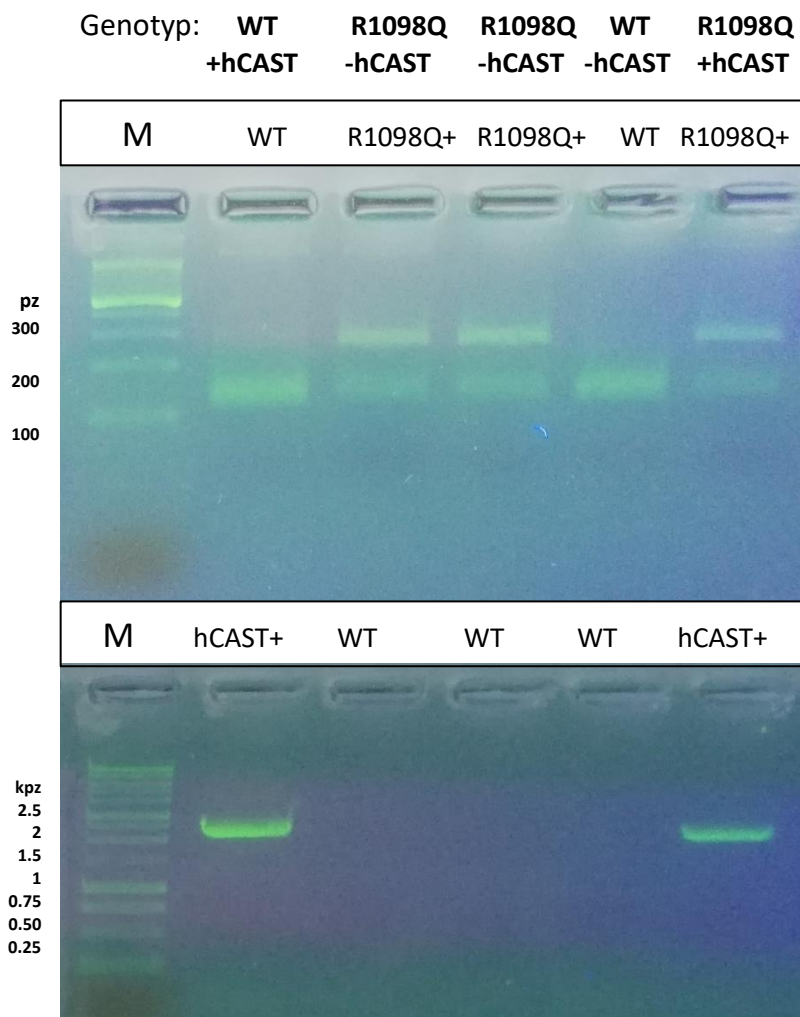
Sprawdzono jaka jest podatność na trawienie kalpainą białek spektrynowych w komórkach otrzymanych z mózgow embrionów myszy poprzez barwienie immunofluorescencyjne specyficzne wobec antygenu SNTF charakterystycznego dla łańcucha spektryny który uległ trawieniu kalpainą. Na poniższej rycinie 28 widoczne są barwienia komórek typu dzikiego oraz z pojedynczym i podwójnym allelem zawierającym mutację. Na zielono ukazana została lokalizacja trawionych białek spektrynowych, zaś na niebiesko położenie DAPI odpowiadające jądom komórkowym. Na zdjęciach marker widoczny jest w komórkach hetero i homozygot, natomiast nie jest zauważalny w przypadku komórek typu dzikiego.



Rycina 28. Obraz z mikroskopu przedstawiający barwienie komórek mózgowych myszy.

6.11 Genotypowanie myszy R1098Q+hCAST

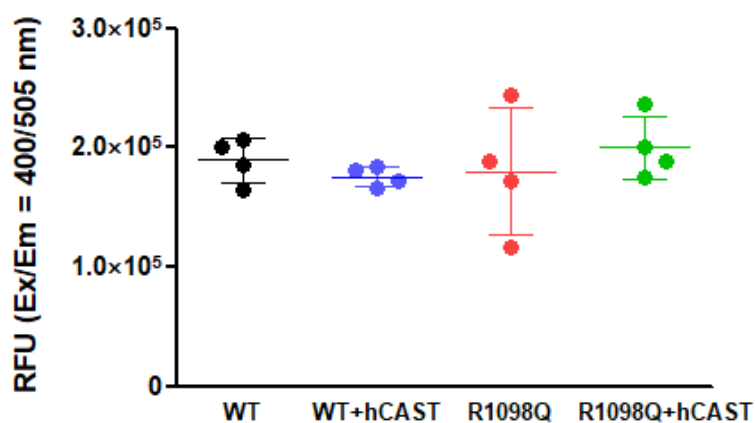
Myszy z otrzymanej grupy R1098Q+hCAST genotypowano pod względem obecności dwóch cech – mutacji R1098Q w genie SPTAN1 i transgenu hCAST. Na poniższych rycinach zobrazowano elektroforegramy przykładowych genotypowań myszy z populacji R1098Q+hCAST. Oba elektroforegramy dotyczą tych samych osobników. Ścieżki z górnego elektroforegramu odnoszą się do obecności mutacji, z dolnego do DNA kodującego kalpastatynę. Mutacja jest widoczna jako dwa ślady na ścieżce elektroforetycznej górny odpowiadający allelowi z mutacją, dolny allelowi bez mutacji. Allel bez mutacji ulega trawieniu na dwie części o zbliżonej masie ok. 150 par zasad, gdyż produkt reakcji PCR został zaprojektowany w ten sposób, że zawiera miejsce restrykcyjne w środkowej części. Pojawienie się mutacji skutkowało modyfikacją sekwencji tego miejsca i brakiem reakcji enzymu MspI. Przy mutacji trawienie MspI nie następuje a na ścieżce widoczny jest jeden prążek odpowiadający produktowi reakcji PCR ok. 300 pz. Transgen hCAST uwidoczniiony jest w postaci produktu PCR o masie ok. 2000 pz. Można zaobserwować 4 warianty genotypowe u osobników z tej grupy: WT+hCAST, WT-hCAST, R1098Q+hCAST, oraz R1098Q-hCAST.



Rycina 29. Elektroforegramy - genotypowanie myszy R1098Q+hCAST.

6.12 Test aktywności kalpainowej

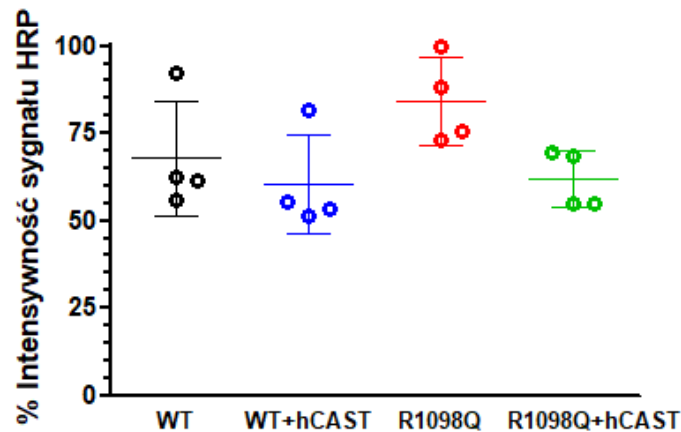
Test kalpainowy miał na celu określenie i porównanie aktywności kalpainowej w lizatach z mózdków myszy o czterech genotypach: WT, WT+hCAST, R1098Q, R1098Q+hCAST. Wyniki przedstawiono na rycinie 30 w postaci jednostek fluorescencji w przeliczeniu na 1mg lizatu z mózdku dla poszczególnych genotypów. Średni poziom aktywności, obliczony na podstawie wyników czterech osobników na genotyp, okazał się zbliżony dla wszystkich genotypów – nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. Największe rozbieżności między próbkami w obrębie genotypu wystąpiły dla myszy R1098Q.



Rycina 30. Aktywność kalpainy w przeliczeniu na 1 mg lizatu mózdku.

6.13 Test dot blot anty-SNTF na lizatach z mózdków myszy R1098Q+hCAST

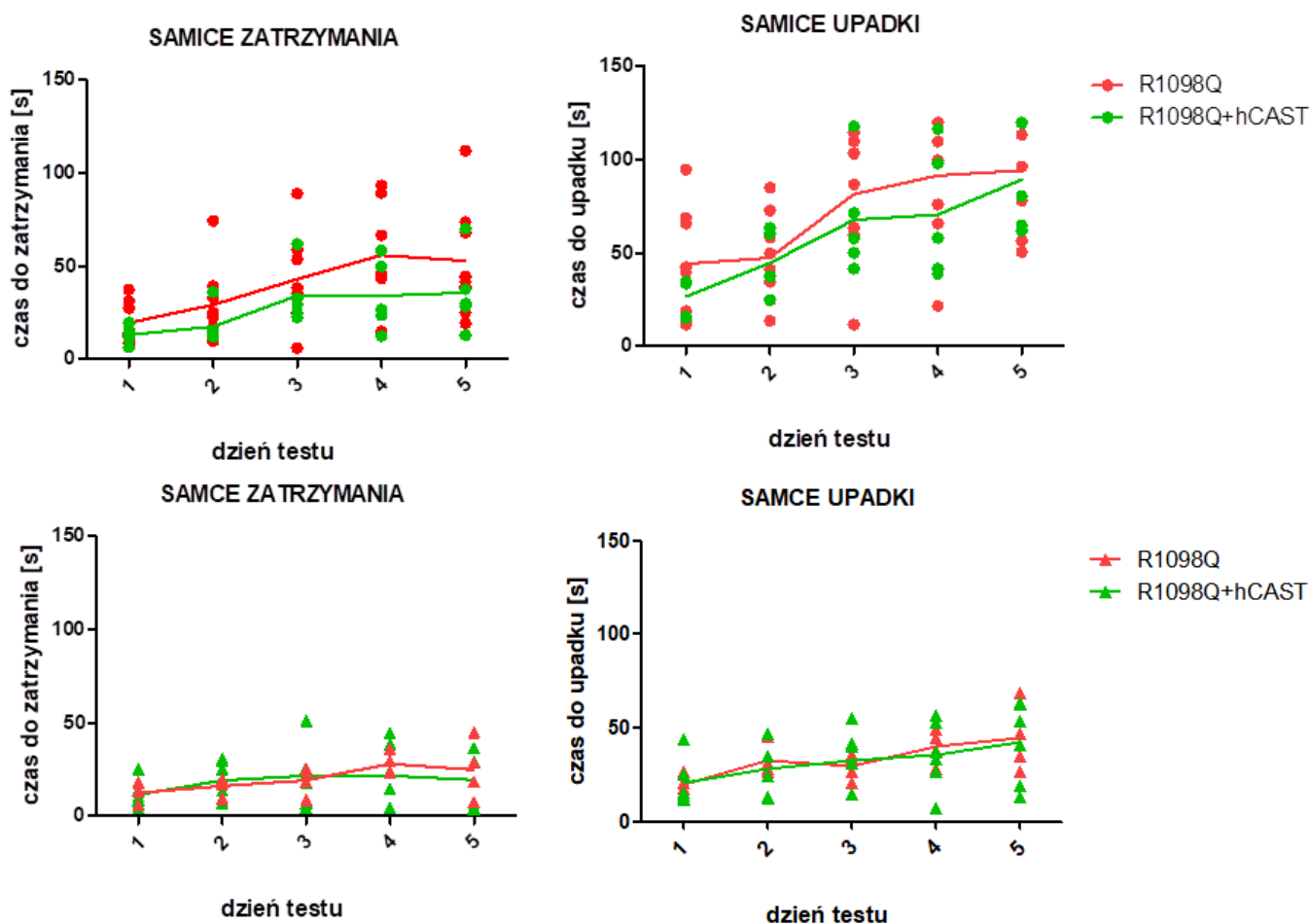
Test dot blot anty-SNTF służył zbadaniu ilości specyficznych produktów proteolizy α II-spektryny w lizatach z mózdków myszy grup WT, WT+hCAST, R1098Q, R1098Q+hCAST, dla każdej grupy zbadano materiał od 4 osobników. Wyniki przedstawiono na rycinie 31 jako intensywność zarejestrowanego sygnału świetlnego pochodzącego od przeciwciała drugiej warstwy. Najwyższe wyniki uzyskały myszy z grupy R1098Q. Grupy WT i WT+hCAST wykazały podobny poziom. Uśredniony poziom intensywności sygnału dla R1098Q+hCAST był niższy niż dla R1098Q, bardziej zbliżony do poziomu reprezentowanego przez myszy bez mutacji, jednak nie uzyskano istotności statystycznej dla zobrazowanych różnic.



Rycina 31. Specyficzne produkty proteolizy α II-spektryny w lizatach z mózdków (Dot blot anty-SNTF).

6.14 Rotarod myszy R1098Q+hCAST

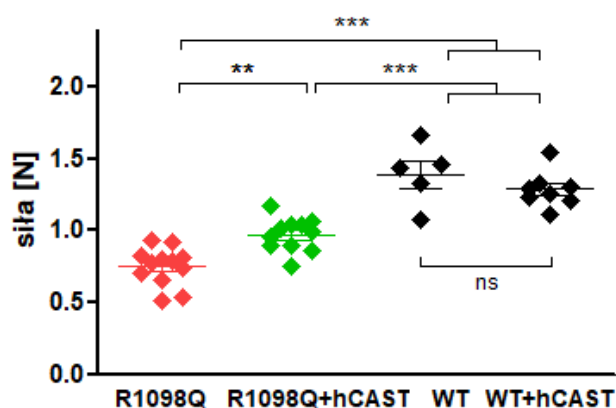
Jednym z testów sprawdzającym kondycję myszy był test rotarod. Pomiary prowadzono przez 5 dni. Wyniki zaprezentowano na wykresach przedstawionych poniżej – rycina 32. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic między grupą R1098Q a grupą R1098Q+hCAST zarówno w przypadku samic jak i samców we wszystkich dniach testu. W obu grupach samice wykazywały lepszą koordynację ruchową niż samce. Znaczenie miał też czynnik czasu ($p < 0.001$), w kolejnych dniach pomiarów obserwowano poprawę w wydajności. W przypadku danych dotyczących zatrzymania na drążku różnice wystąpiły tylko w przypadku dwóch grup samic R1098Q i samców R1098Q+hCAST ($p < 0.01$) dla dwóch ostatnich dni pomiarów. Dane dotyczące upadku z drążka pozwoliły odnotować największe różnice w trzech ostatnich dniach pomiarów pomiędzy samicami R1098Q, a samcami R1098Q ($p < 0.01$) i samcami R1098Q+hCAST ($p < 0.001$). W ostatnim dniu pomiarów różnica pojawiła się również między samicami R1098Q+hCAST, a samcami R1098Q ($p < 0.05$) i samcami R1098Q+hCAST ($p < 0.01$).



Rycina 32. Wyniki testu rotarod dla zatrzymań i upadków z drążka.

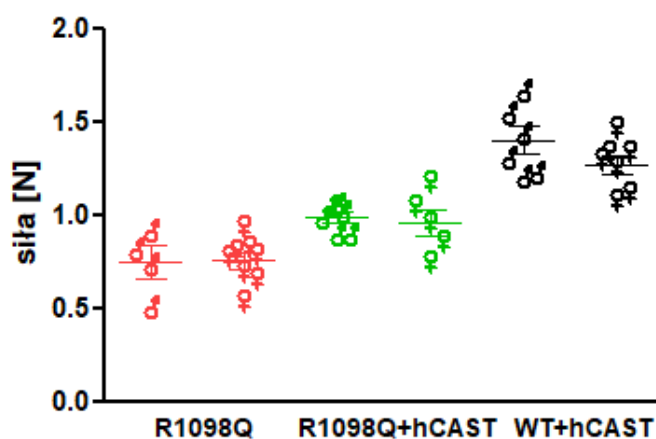
6.15 Siła chwytu

Drugim z testów zastosowanych do oceny stanu myszy R1098Q+hCAST był test siły chwytu (ang. *grip strenght test*). Wykazał on istotne różnice pomiędzy wszystkimi badanymi grupami. Na poniższych wykresach – rycina 33 zaprezentowano uśrednione wyniki z dwóch dni pomiarowych dla grup mieszanych pod względem płci. Myszy z grupy kontrolnej WT+hCAST wykazywały największą siłę chwytu, myszy R1098Q najmniejszą. Myszy R1098Q+hCAST plasowały się pomiędzy tymi grupami.



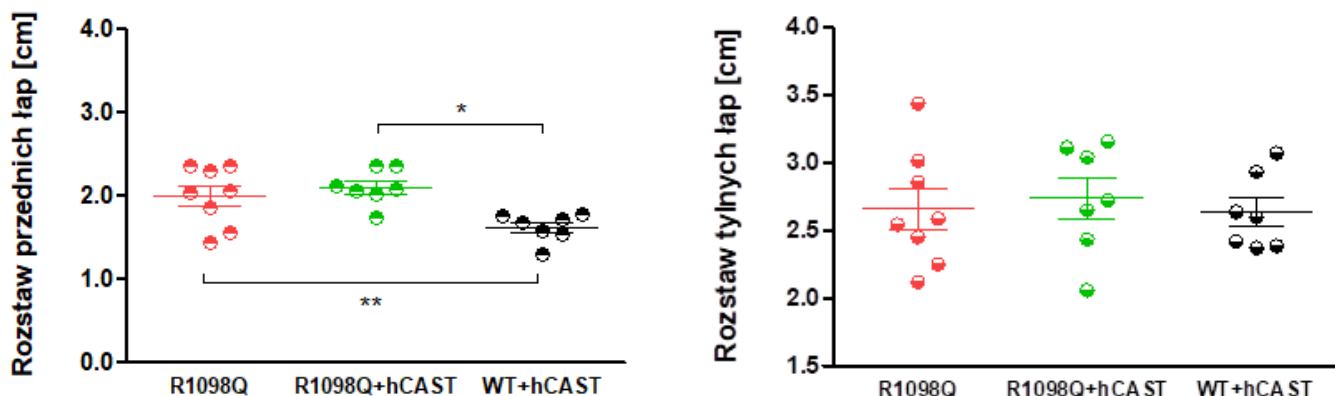
Rycina 33. Siła chwytu. Wyniki testu dla grup mieszanych płciowo.

Wyniki z podziałem na płeć zaprezentowano na poniższej rycinie 34. Nie odnotowano różnic istotnych statystycznie między płciami w poszczególnych grupach.

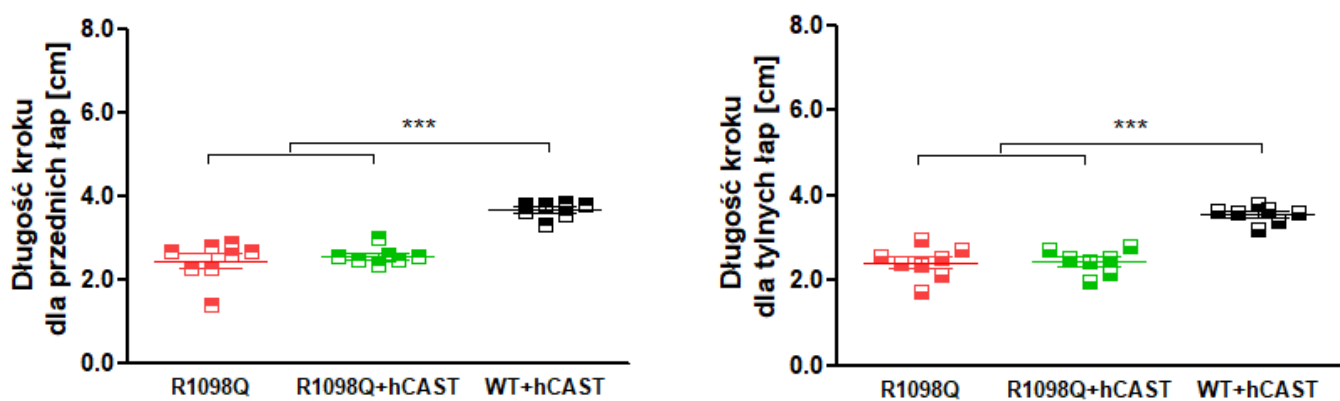


Rycina 34. Siła chwytu. Wyniki testu według fenotypu i płci.

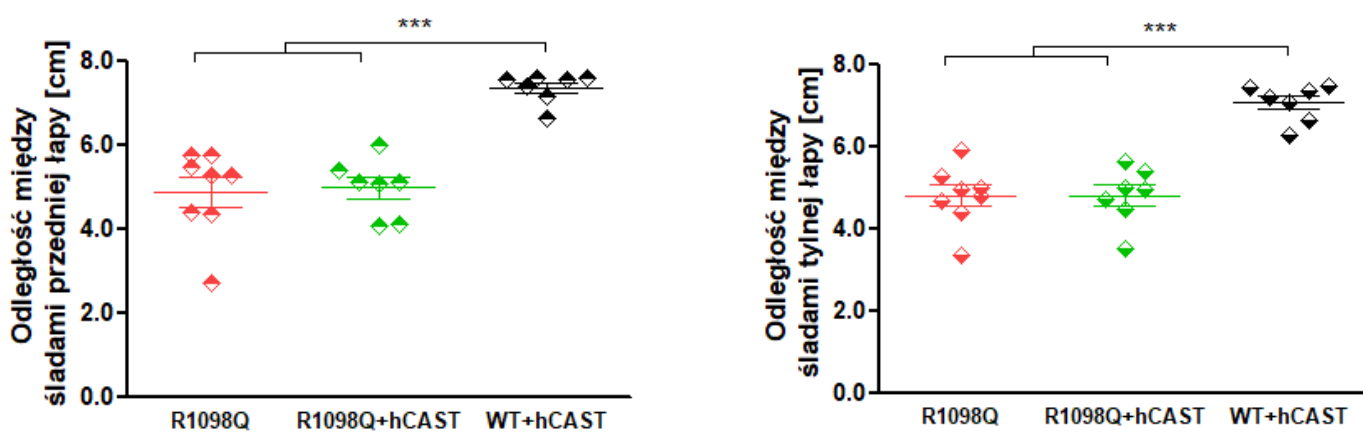
6.16 Test footprint - analiza chodu



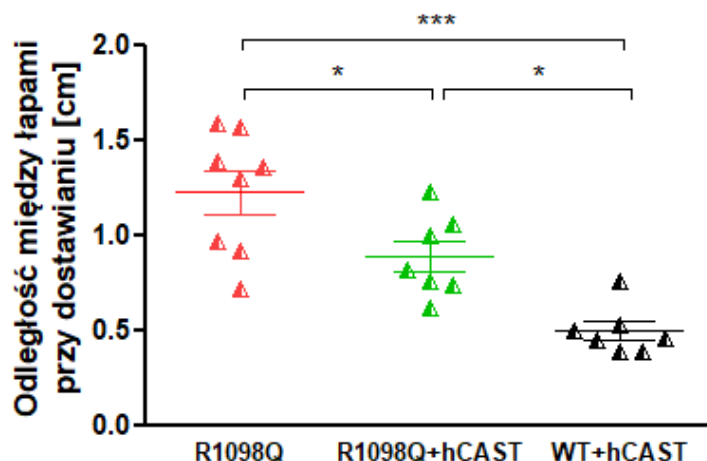
Rycina 35. Test footprint - Rozstaw łap.



Rycina 36. Test footprint - Długość kroku.



Rycina 37. Test footprint - Odległość między śladami łapy.



Rycina 38. Test footprint - Odległość między łapami przy dostawieniu.

Przy użyciu testu footprint określono podstawowe parametry chodu myszy. Do określonych parametrów zaliczyły się średnie: rozstaw łap, długość kroku i odległość między poszczególnymi śladami łapy, wszystkie dla przednich i tylnych łap, oraz odległość między łapami przy dostawieniu. Jak można zaobserwować na zestawieniu wykresów na rycinach 35, 36 i 37 trzy pierwsze parametry okazały się być bardzo zbliżone dla myszy R1098Q i R1098Q+hCAST. Różniły się one istotnie od wartości stwierdzonych dla myszy WT+hCAST, z wyjątkiem wyników uzyskanych dla rozstawu tylnych łap. Istotnie statystycznie różnice między myszami R1098Q i R1098Q+hCAST stwierdzono jedynie w przypadku średniej odległości między łapami przy dostawieniu – rycina 38. Dla tego parametru najwyższe wartości wykazały myszy R1098Q, najniższe myszy WT+hCAST, myszy R1098Q+hCAST uzyskały wartości pomiędzy myszami zdrowymi, a myszami z mutacją bez nadekspresji kalpastatyny.

7. Dyskusja i wnioski

7.1 Stabilność struktury

Spektryny, mimo stanowienia rozległej platformy dla oddziaływań międzybiałkowych, przede wszystkim pełnią podstawowe funkcje strukturalne cytoszkieletu komórek. Szeroko omówione we wstępie specyficzne elastyczne zdolności spektryn pozwalają na przenoszenie sił w obrębie ich struktury aby kompensować obciążenia działające na błonę komórkową wynikające z oddziaływań zewnętrznych jak i z ruchu generowanego przez ciało[28]. Doświadczenie wykorzystujące CD i analizę wyników przy pomocy witryny internetowej Dichroweb wykazało różnice w strukturze drugorzędowej pomiędzy peptydami WT i R1098Q odpowiadającymi 9 i 10 powtórzeniu spektrynowemu[tab.11]. Łańcuch zawierający mutację wykazywał znacząco mniejszy udział procentowy α -helisy na rzecz struktury nieuporządkowanej w porównaniu do WT. Jest to interesujący wynik ze względu na szczególną istotność struktury α -helisy w powtórzeniach spektrynowych i ich funkcjonowaniu. Przeprowadzone eksperymenty w zakresie technik CD i DLS wykazały ponadto podwyższoną podatność formy zmutowanej R1098Q fragmentów α II-spektryny na rozfałdowanie wywołane czynnikiem w postaci energii termicznej. Temperatura połowicznego rozfałdowania była znacznie niższa dla tej formy białka. Wynik ten koresponduje z założeniami postawionymi na podstawie komputerowego modelowania strukturalnego, gdzie pętla CCC formy R1098Q jest znacznie odsunięta od trzonu struktury który stanowią trójhelisy powtórzeń spektrynowych i z modelowaniem opublikowanym w Scientific Reports, gdzie również wskazano różnice w strukturze trzeciorzędowej wariantów WT i R1098Q m. in. zmianę położenia pętli CCC [129]. Struktura trzeciorzędowa powtórzeń spektrynowych bazuje na oddziaływaniach hydrofobowych trzymających blisko trzy α -helisy, ale również na formowaniu mostków solnych. Reszta R1098 znajduje się blisko styku powtórzeń spektrynowych 9 i 10 i tworzy mostek solny z resztą D922 obecną w pętli łączącej helisy A i B 9 powtórzenia spektrynowego, pojawienie się reszty Q w miejsce R1098 całkowicie uniemożliwia takie oddziaływanie stabilizujące, co więcej w modelowaniu tym wykazano zmianę kąta między powtórzeniami spektrynowymi. Dodatkowo modelowano również podstawienie reszty K które częściowo zachowywało oddziaływanie, jednak również miało wpływ na zmianę położenia pętli CCC. Zmienne położenie tej domeny jest widoczne również w wariantach modelowania R, Q, K, C zawartych w tej pracy[ryc. 13].

Podobnie, wyniki otrzymane na podstawie eksperymentu wykonanego przy użyciu urządzenia Prometheus wskazują na wcześniejszą inicjację rozfałdowywania białka R1098Q pod wpływem wzrastającej temperatury. Obserwacje te skłaniają do wniosku, że struktura białka R1098Q jest zauważalnie bardziej labilna niż jej prawidłowego odpowiednika, co może wpływać na sumaryczną stabilność tetramerów spektrynowych w obrębie komórek. Jako przyczynę postulujemy utratę oddziaływań zapewnianych przez resztę argininy 1098, która jest odpowiedzialna za tworzenie stabilizujących mostków siarczkowych[129]. Jednocześnie DLS nie wykazał podwyższonej skłonności peptydów typu R1098Q do agregacji co jest spójne z brakiem agregatów spektrynowych w neuronach myszy noszących mutację. Zatem w przypadku tej mutacji to nie agregacja białek spektrynowych jest przyczyną neurodegeneracji, jak zdarza się przy innych opisanych spektrynopathiach. Analiza próbek po denaturacji wykazała zbliżoną skłonność obu typów WT i R1098Q do renaturacji.

7.2 Oddziaływania regulacyjne

Eksperyment wykorzystujący technikę rezonansu plazmonów powierzchniowych ujawnił, że przy stałym stężeniu jonów wapniowych i stężeniach kalpajny zbliżonych do fizjologicznych peptydy spektrynowe R1098Q wykazują niższe powinowactwo do kalmoduliny. Oddziaływanie wzrasta i słabnie wolniej niż w przypadku białek typu dzikiego. Znowu jest to zgodne z modelowaniem publikowanym w Scientific Reports, które przewidywało 15% niższe powinowactwo wariantu R1098Q wobec kalmoduliny w porównaniu do WT[129]. Kalmodulina jest znana jako główny przekaźnik sygnałów wapniowych w komórkach eukariotycznych, w tym jako białko wiążące α II-spektrynę promujące allosterycznie jej proteolizę przez kalpainę [146][88]. W aktywowanej wapniem komórce, w obecności kalmoduliny łańcuch α II-spektryny jest naturalnie bardziej wrażliwy na proteolizę. Jej działanie koncentruje się na wyeksponowaniu wiązania Y1176G tak by proteoliza spektryny przez kalpainę zachodziła efektywniej. Stan ten został odzwierciedlony w eksperymentach przeprowadzonych na fragmentach białkowych, gdzie zarówno typ dziki, jak i R1098Q były lepiej trawione z udziałem CaM. Różnice te nie były jednak takie same. Kalmodulina miała niższy wpływ na promowanie proteolizy formy R1098Q. Zatem zapewne w stanie spoczynkowym w komórkach różnice między proteolizą R1098Q i WT są większe na korzyść proteolizy R1098Q, zaś w komórkach pobudzonych napływem wapnia różnice zmniejszają się. Kalmodulina w komórkach pobudliwych będących w stanie spoczynku jest w stanie łączyć się z różnymi białkami przy niepełnym obsadzeniu wapniem ze względu na zróżnicowane powinowactwo jej domen

wiązających wapń i specyfikę poszczególnych oddziaływań, jednak wiązanie spektryny potrzebne są wszystkie cztery jony wapnia, zatem interakcja ta wymaga znacznego podwyższenia stężenia jonów wapniowych[147][63]. Do stanów podwyższonego stężenia jonów wapniowych w komórce dochodzi w procesach neuroprzebieżności[148], skurczu serca[149], czy mięśni szkieletowych[150] jak również w biegu cyklu komórkowego[151], czy apoptozy[152] oraz w patologicznych procesach chorobowych[153] lub podczas urazów[154].

Modelowanie strukturalne jak i badania instrumentalne wskazują na podwyższoną labilność struktury i wyeksponowanie pętli CCC α II-spektryny w obrębie której znajdują się zarówno miejsce wiązania kalmoduliny jak i miejsce proteolizy dla kalpajny[ryc.13, 16]. Zmiany te mogą powodować zaburzenia w szlakach sygnałowania opartych na kalmodulinie.

Kinaza c-Src wewnątrz komórek odpowiedzialna jest m. in. za fosforylację reszty Y1176, która to jest szeroko opisywana jako czynnik regulujący podatność spektryny na proteolizę kalpajną, działanie to chroni wiązanie Y1176G przed proteolizą hamując działanie kalpajny. Eksperyment dotyczący fosforylacji reszty Y1176 przez kinazę c-Src nie wykazał różnic w poziomie fosforylacji dla białek spektrynowych typu R1098Q i WT[ryc.22], zatem nie wydaje się by obniżony poziom fosforylacji był przyczyną zmiany podatności spektryny R1098Q na proteolizę przez kalpajnę.

7.3 Proteoliza

Podwyższoną podatność na proteolizę fragmentów spektrynowych R1098Q przez kalpajnę wobec WT wykazano przy pomocy technik WB i ELISA zarówno dla eksperymentów w obecności jak i bez kalpajny[ryc 23, 25]. Wyniki testu ELISA pozwalają stwierdzić, że różnice w proteolizie pomiędzy WT i R1098Q były większe w przypadku reakcji bez udziału kalmoduliny. Wynik dla białka R1098Q bez dodatku kalmoduliny jest zbliżony do wyniku otrzymanego dla typu WT z udziałem kalmoduliny. Obserwacje te sugerują, że w warunkach wewnątrzkomórkowych białko R1098Q bez udziału kalmoduliny jest podobnie podatne na proteolizę przez kalpajnę jak białko w typie dzikim przy jej działaniu. Rozluźniona pętla CCC wraz z wiązaniem Y1176G nie wymaga oddziaływania z kalmoduliną, aby być bardziej dostępną dla proteolizy, co jest zgodne z modelowaniem i wynikami CD[ryc.13, 16]. Efekt działania kalmoduliny jest jednak słabszy dla białka R1098Q, to zaś koresponduje z danymi otrzymanymi poprzez testy SPR odnośnie słabszego powinowactwa wariantu R1098Q do kalmoduliny[ryc. 18, 19]. Jednocześnie eksperymenty dotyczące kaspazy 3 nie wykazały różnic w podatności na proteolizę białek

w typie WT i R1098Q jest to spójne z wcześniejszymi obserwacjami gdzie nie odnotowywano zwiększonej ilości produktów degradacji α II-spektryny charakterystycznych dla działania kaspaz u homozygotycznych embrionów myszy objętych mutacją[129].

7.4 Produkty proteolizy

Doświadczenie obrazujące produkty proteolizy α II-spektryny przy pomocy przeciwciała anti-SNTF w komórkach mózgowych z hodowli ukazało obecność dużej ilości specyficznych produktów proteolizy zarówno u homozygot jak i heterozygot. Niestety ze względów technicznych niemożliwe było zastosowanie markerów specyficznych wobec konkretnych grup komórek mózgowych, a szczególnie przydatne w tej analizie byłoby zastosowanie przeciwciał anti-NrCAM dla markera neuronów. Jednak mimo to eksperyment dostarczył porcję cennych informacji. U homozygot szkielet spektrynowy obrazowany jedynie przez produkty proteolizy wydaje się być znacznie węższy i o mniejszym stopniu uporządkowania. W przypadku heterozygot, gdzie w szkielecie spektrynowym znajdują się zarówno spektryny w formie dzikiej R1098 jak i te obciążone mutacją Q1098 produkty proteolizy są lepiej widoczne, ale też sieć połączeń wygląda na lepiej zorganizowaną. Jednocześnie specyficznych produktów nie udało się zaobserwować dla komórek pochodzących od embrionów WT. Co do produktów proteolizy spektryn stan taki odnotowywano jednak już wcześniej przy innych eksperymentach w grupach kontrolnych[33]. Duża ilość SNTF świadczy o wzmożonej proteolizie spektryny w obrębie komórek noszących mutację. Wcześniej opisywane doświadczenie WB ujawniło wzmożoną ilość produktów proteolizy spektryn o masie 150 kDa dla embrionów homozygot, przy jednoczesnym braku produktów proteolizy 120 kDa generowanych przez kaspazy[129]. Z drugiej strony, duża ilość produktów proteolizy wbudowanych w sieć szkieletu spektrynowego na przedstawionym obrazowaniu może też świadczyć o występowaniu problemów w efektywnej degradacji i skutecznym zastępowaniu nieciągłych α II-spektryn, co również może upośledzać funkcje komórek. We wstępie wspomniano o udziale kalmoduliny w kalpainowej proteolizie heterodimerów spektryn, gdzie kalmoduliną oddysocjuje od kompleksu dopiero po przecięciu łańcucha β -spektryny. Być może w tym przypadku mutacji R1098Q rzadziej dochodzi do proteolizy β -spektryny i występuje nadreprezentacja nieciągłych spektryn w sieci. Z pewnością cenne byłyby dalsze eksperymenty przy użyciu mikroskopu konfokalnego z wykorzystaniem grupy przeciwciał aktywnych wobec różnych rodzajów spektryn, aktywny oraz znaczników specyficznych dla różnych typów komórek mózgowych.

7.5 Aktywność kalpajny i proteoliza α II-spektryny a stany neurodegeneracyjne

Wyniki opisanych eksperymentów sugerują iż zaburzenia w regulacji cytoszkieletu spektrynowego opierające się na zmienionym powinowactwie do kalmoduliny i wzmożonej proteolizie przez kalpainę prowadzą do konsekwencji molekularnych skutkujących postępującą ataksją i neurodegeneracją co omawialiśmy w publikowanych pracach [129][144][155]. Spostrzeżenia te są ciekawe przez wzgląd na wzmożoną aktywność kalpajny i towarzyszącą jej degradację spektryny odnotowywaną wielokrotnie w różnych okolicznościach prowadzących do neuropatologii. Patologicznie podwyższoną aktywność kalpajny stwierdzono w różnych stanach związanych z uszkodzeniami mózgu, a produkty degradacji spektryn SPDB zidentyfikowano dla wielu modeli m.in. niedotlenienia/niedokrwienia, epilepsji, narażenia na toksyny, uszkodzenia mózgu. W przypadku ciężkich urazów aktywacja kalpajny jest wczesnym wynikającym z uszkodzenia wydarzeniem. Utrzymująca się proteoliza może z pewnością prowadzić do śmierci zwłaszcza wrażliwych rodzajów komórek. Produkty degradacji spektryn narastają w skutek starzenia i w przebiegu choroby Alzheimera. Istnieje wiele przesłanek świadczących o udziale kalpajny w komórkowych szlakach apoptotycznych z wzajemnym wpływem na kaspazy. Kalpajna może przyczyniać się do eskalacji fazy degradacji apoptozy na skutek proteolizy kalpastatyny za którą odpowiedzialne są kaspazy a która czyni ten peptyd bezużytecznym w hamowaniu aktywności kalpajny[156][157]. Co ciekawe kalpajna jest zdolna do unieczynnijającej proteolizy niektórych kaspaz blokując aktywację proapoptotycznej kaspazy-3, z drugiej strony udowodniono że kalpajna 2 jest w stanie sama proteolizować kaspazę-3 powodując jej aktywację. Prawdopodobnie w różnych warunkach kalpajny mogą być białkami pro bądź antyapoptotycznymi, jednak nie pozostają bez wpływu na te procesy [158][159].

Poważne uszkodzenie mózgu może incydentalnie dotknąć każdego w skutek uprawiania sportu, poruszania się pojazdami, czy upadku i prowadzić do trwałych zmian neurologicznych, a nawet do śmierci[160]. Przy TBI (*ang. traumatic brain injury*) w początkowym etapie proteoliza α II-spektryny przez kalpainę utrzymuje się na wyższym poziomie niż proteoliza przez kaspazę 3 i może przyczyniać się do postępującego uszkodzenia strukturalnego aksonów, natomiast pojawiająca się później przedłużona aktywacja kalpajny kilka do kilkunastu dni po urazie koreluje z późniejszą śmiercią komórek i pojawiającymi się zmianami zwyrodnieniowymi [161][162][163]. Przy uszkodzeniu opuszki węchowej myszy na skutek uderzenia płynem (*ang. mFPI - mild fluid percussion injury*) szczyt 150kDa SBDP przypada na 3 dobę po urazie i jest ok. 7 krotnie wyższy niż w pierwszej dobie,

jednocześnie nie odnotowano w tym czasie podwyższenia 145 kDa SBDP oraz charakterystycznych dla kaspaz 120kD SBDP. W traumatycznych urazach innych części mózgu (kora mózgowa, hipokamp, ciało modzelowate) wzrost był nawet 10 krotny zarówno w przypadku 150 kDa i 145 kDa SBDP, ale jednocześnie towarzyszył mu niewielki wzrost stężenia produktów pochodzących od kaspaz[164]. Być może w zależności od struktury mózgu, typu i intensywności uszkodzenia proteoliza kalpainowa przyjmuje zróżnicowany przebieg. Doniesienia te jednak sugerują że w określonych ramach czasowych to właśnie podwyższona aktywność kalpainowa i towarzysząca jej zmasowana degradacja spektryn stanowiących ok. 3 % mózgowych białek błonowych jest właściwym celem terapeutycznym dla ochrony struktury komórek przed neurodegeneracją[98]. Urazowe uszkodzenia mózgu zakłócają również mechanizmy przeciwzapalne bazujące na tlenku azotu, który z udziałem nieprawidłowej aktywności neuronalnej syntazy tlenku azotu (nNOS), wywołanej podwyższonym poziomem wapnia, przekształcany jest w nadtlenoazotyn. To zmniejsza biodostępność NO dla syntezy S-nitrozoglutationu (GSNO) z udziałem GSH i dla regulacji neuroprotekcji. Zwiększony poziom nadtlenoazotynu koreluje ze zwiększoną aktywnością kalpains i wzrostem 145 kDa SBDP oraz uszkodzeniem aksonów i komórek neuronalnych przez mechanizmy 3-nitrotyrozynacji łańcucha kalpains. GSNO natomiast reguluje aktywność kalpains poprzez wtórną modyfikację na drodze S-nitrozytacji reszty cysteiny w jej miejscu aktywnym hamując jej działanie i obniżając poziom proteolizy spektryn[165][166].

W powszechnie znanej chorobie Alzheimerera, jak stwierdzono na podstawie analizy pośmiertnej mózgow pacjentów, podwyższona aktywność kalpains 1 jest obecna już we wczesnych etapach i ulega zwiększeniu w III i IV stadium w skali Braaka aż do ok. 400% kontroli w stadium VI, natomiast aktywność kalpastatyny wzrasta w stadiach IV i V (ok. 1700% kontroli), ale nie utrzymuje się w końcowym etapie choroby. Co istotne mimo że w chorobie Alzheimerera wykazano zarówno apoptotyczną jak i nieapoptotyczną aktywację kaspazy 3 jej aktywność utrzymuje się na tym samym zbliżonym do kontroli poziomie podczas rozwoju choroby. W rozwoju choroby na etapach II-VI dochodzi do wzrostu 145kDa i 150 kDa SBDP, natomiast nie wykazano wzrostu produktów specyficznych dla kaspaz co sugeruje, że za rozpad α II-spektryny w eskalacji choroby odpowiedzialna jest właśnie kalpain[167][168][169]. Ciekawe pod kątem analizy przyczyn schorzenia i potencjalnych terapii jest naturalne podwyższenie aktywności kalpastatyny będące działaniem neuroprotekcijnym wykazywanym przez objęte chorobą komórki. Kalpain w świetle przytoczonych faktów z pewnością ma istotne znaczenie dla rozwoju chorób i stanowi uzasadniony cel terapeutyczny.

7.6 Znaczenie udziału proteolizy α II-spektryny wobec neurodegeneracji

Jak już wspomniano w wielu chorobach neurodegeneracyjnych na skutek patologii dochodzi do wzrostu poziomu jonów wapniowych wewnątrz komórki i aktywacji szlaku $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{kaspaina}$. W rezultacie dochodzi do proteolizy białek szkieletu komórkowego w szczególności spektryn. Nie jest wiadome czy proteoliza spektryn jest priorytetowym wydarzeniem postępującej neurodegeneracji, czy raczej następuje w skutek nagromadzenia innych niekorzystnych zmian w komórce i czy może być skutecznym celem dla terapii. W przypadku myszy R1098Q nie dochodzi do wzmocnionej sygnalizacji Ca^{2+} czy idącej za nią wzmożonej aktywności kaspainy co zostało zobrazowane przez test aktywności kaspainy na lizatach z mysich mózdków – rycina 30. Jednak występuje zwiększona podatność na proteolizę spektryny przez kaspainę. Kluczowe wydaje się wyjaśnienie czy zwiększona podatność substratowa spektryny na proteolizę kaspainową może wyzwolić neurodegenerację, czy tylko jest jej wtórnym przejawem? Spektryna jest zaangażowana w wiele zróżnicowanych procesów komórkowych i wydaje się mało prawdopodobne, aby jej rozpad u myszy R1098Q był jedynie wynikiem ogólnego krańcowego stadium uszkodzenia neuronów. W modelu tym identyfikujemy rozległe zmiany neurodegeneracyjne i w szczególności śmierć komórek wyrażoną poprzez zmniejszenie liczby komórek Purkiniego i atrofię mózdku. W kontraście do sporadycznego ujawniania się mutacji SPTAN1 wywołujących neurodegenerację w populacji, schorzenia w których występuje patologicznie podwyższona aktywność kaspainy są częste, a nowe strategie terapeutyczne są pożądane w obu tych przypadkach. Na podstawie wcześniejszych wyników dotyczących myszy R1098Q spekulowano, że zwiększona aktywność kaspainy wobec α II-spektryny typu dzikiego może powodować fenotyp zbliżony z tym obecnym u myszy z wariantem R1098Q α II-spektryny o podwyższonej podatności na proteolizę kaspainę, a zmniejszenie aktywności kaspainy prawdopodobnie może odwrócić fenotyp znacząco upodabiając go do myszy typu dzikiego [18]. Ostatnie badania zamieszczone w niniejszej pracy w dużym stopniu weryfikują te podejrzenia.

7.7 Inhibicja kaspainy przez kalpastatynę a fenotyp R1098Q

Aby zweryfikować odpowiedzialność wzmożonej proteolizy α II-spektryny za fenotyp myszy R1098Q, otrzymaliśmy linię charakteryzującą się zarówno mutacją R1098Q w α II-spektrynie jak i nadekspresją inhibitora kaspainy – kalpastatyny wykorzystując do krzyżowania myszy hCAST. Obserwacje i dane eksperymentalne uzyskane na grupach

myszy o genotypie R1098Q+hCAST i R1098Q pozwalają ocenić ogólną kondycję myszy z nadekspresją kalpastatyny obarczonych mutacją. W przypadku eksperymentu rotarod nie wykazano bezpośrednich różnic w wydajności w grupach mieszanych płciowo między myszami R1098Q+hCAST i R1098Q. Myszy z obu grup wykazywały zdolność uczenia się poprawiając sprawność w poruszaniu się na drążku w kolejnych dniach. Obecność dodatkowych kopii genu kalpastatyny nie spowodowała jednak wyraźnych pozytywnych zmian w złożonej koordynacji ruchowej niezbędnej do właściwego przechodzenia tego testu charakterystycznej dla myszy typu dzikiego. Sposób poruszania się myszy o genotypie R1098Q+hCAST w oczach obserwatora jest dość podobny do myszy R1098Q, natomiast różnice w sposobie przemieszczania się między myszami R1098Q i WT są łatwo zauważalne. Inaczej w kontekście testu siły chwytu uzyskano istotne statystycznie znaczne różnice między wszystkimi badanymi grupami mieszanych płciowo, gdzie grupa R1098Q+hCAST sytuowała się w sile chwytu pomiędzy grupą R1098Q a grupą kontrolną co świadczy o tym, że znacznej poprawie uległa wydajność włókien mięśniowych u tych myszy. Osłabienie siły mięśniowej u myszy R1098Q jest spójne z objawami neuropatii ruchowej odnotowywanymi przez Beiyera i in. [125], a poprawa tego parametru u myszy R1098Q+hCAST musi być związana z ograniczoną aktywnością kalpainy wobec α II-spektryny. Kolejnym eksperymentem był test footprint skupiający się na ocenie parametrów chodu. W doświadczeniu tym nie wykazano różnic między grupami R1098Q+hCAST i R1098Q dla parametrów takich jak rozstaw łap, długość kroku, czy odległości między śladami jednej łapy, gdzie cechy te różniły się od wartości uzyskanych dla myszy WT. Rozstaw przednich łap był większy dla myszy noszących mutację, natomiast długość kroku i odległość między śladami łapy były znacznie mniejsze. Jedynym parametrem, dla którego wykazano różnice między R1098Q+hCAST i R1098Q była odległość między łapami przy dostawieniu. Dla myszy R1098Q+hCAST wartość ta była mniejsza, bardziej zbliżona do tej reprezentowanej przez grupę WT. Prawdopodobnie spadek tego parametru może mieć związek ze zwiększoną siłą mięśniową wykazaną we wcześniej omówionym eksperymencie.

Oceniono również średnią aktywność kalpainową w lizatach z mózdków dla wszystkich grup genotypowych (R1098Q, R1098Q+hCAST, WT, WT+hCAST) i nie wykazano różnic istotnych statystycznie, jednak najmniej spójna w wynikach była grupa myszy R1098Q. Jeszcze niepublikowane doświadczenia otrzymane przy współpracy naszego zespołu z badaczami z Yale University w których barwieniu poddano mózgi i mózdzki myszy R1098Q+hCAST na produkty degradacji spektryny wskazują że produkty degradacji spektryny

występują choć w mniejszej ilości niż w przypadku R1098Q w mózdzku, jednak w strukturach hipokampa ilość SNTF jest porównywalna z poziomem otrzymanym dla myszy WT. Może to wskazywać na poprawę funkcji kognitywnych, co zostało przez nas odnotowane jako zwiększenie precyzji dostawiania łap. Podobną obserwację co do ilości produktów degradacji spektryny SNTF poczyniliśmy w teście dot blot[ryc. 31], gdzie myszy R1098Q+hCAST miały tendencję do mniejszej ilości SNTF, w porównaniu do myszy R1098Q. Nadekspresja kalpastatyny u myszy hCAST w obrębie kory i hipokampu jest ok. 80 krotnie większa niż ekspresja endogennej mysiej kalpastatyny w tych rejonach. Jednak stosunek ten jest już mniejszy w przypadku mózdzku, dodatkowo nadekspresja hCAST może częściowo ograniczać naturalną ekspresję mCAST w tym rejonie[111]. Można postawić pytanie czy nadekspresja kalpastatyny w tym obszarze jest wystarczająco wydajna, aby znacząco zmienić fenotyp? Istnieje też możliwość że kalpastatyna jako naturalny inhibitor kompetycyjny wobec formy spektryny o zwiększonej podatności na proteolizę jest nieco mniej wydajna niż wobec formy dzikiej. Z pewnością uzyskany obecnie obniżony poziom proteolizy nie wpływa jednak znacznie na szeroko pojęte funkcje układu nerwowego w tym na występowanie dotkliwej ataksji.

7.8 Ataksja u myszy R1098Q

Powyżej opisane obserwacje te skłaniają z drugiej strony do przypuszczeń, że główny problem w przypadku mutacji R1098Q w α II-spektrynie może stanowić sama upośledzona forma białka o zmienionych właściwościach nie pozwalających na sprawne funkcjonowanie przewodnictwa nerwowego już we wczesnych etapach życia, zaś fakt wzmożonej podatności na proteolizę tej formy białka nie pozostaje bez wpływu, jednak ma drugorzędne znaczenie dla występującego fenotypu. Ciężko również znaleźć piśmiennictwo łączące bezpośrednio występowanie ataksji z proteolizą spektryn przez kalpainsy. Już wcześniej w świetle wyników CD zakładaliśmy możliwość, że niestabilność α II-spektryny w formie R1098Q może wpływać na jej właściwości mechaniczne i interakcje z innymi białkami. Spekulowaliśmy, że czynniki fizyczne wywierające wpływ na neurony mogą skutkować wczesnym rozluźnianiem heterodimerów spektryn i doprowadzać do patologii w funkcjonowaniu układu nerwowego[155]. Ataksja jest jednym z szerzej opisywanych objawów występujących u pacjentów z mutacjami w obrębie genu *SPTAN1* i jednym z najpoważniejszych dotyczących heterozygotycznych myszy R1098Q. Może ona mieć wiele przyczyn jednak zazwyczaj pojawia się na skutek degeneracji struktur mózdzku. W spektrynopathiach ataksja idzie w parze z astrogliozą i ubytkiem komórek Purkiniego[170]. W przypadku α II-spektryny wystąpienie

ataksji u pacjentów często, ale nie zawsze towarzyszy mutacjom zastępującym lub usuwającym argininę np. p.Arg19Trp, p.Arg627*, p.Arg1098Cys, p.Arg1464Trp, p.Arg1624Cys, p.Arg2124Cys nawet w regionach odległych od miejsc proteolizy α II-spektryny przez kalpainę (Y1176/G1177,G1230/S1231), ale też innym mutacjom w obrębie tego białka. Większość z wymienionych arginin ma przypisywane funkcje stabilizujące dla struktury α II-spektryny poprzez oddziaływania na dystans z innymi częściami łańcucha takie jak tworzenie mostków solnych[2][171]. Bardzo istotny jest również fakt zróżnicowania objawów występujących wewnątrz rodzin np. w obrębie jednej rodziny, w której pojawia się mutacja p.Arg19Trp ataksja występuje tylko w przypadku części obciążonych nią pacjentów[2]. Zmienne nasilenie fenotypowe jest obserwowane u myszy R1098Q o niemal jednorodnym tle genetycznym, jednak nigdy przez wszystkie wyprowadzone pokolenia nie odnotowano przypadku myszy z mutacją p.Arg1098Gln, u której nie występowałyby ataksja.

7.9 Utrata komórek Purkiniego

Śmierć komórek Purkiniego jest wydarzeniem często łączonym z ataksją a jednocześnie powszechnym u myszy R1098Q. Aktywność receptorów AMPA jak i kalpainy w różnych kontekstach była łączona zarówno z apoptotyczną jak i nekrotyczną śmiercią komórek. Pod kątem analizy mutacji R1098Q niezwykle istotne wydaje się ustalenie jaki mechanizm odpowiada za śmierć nerwowych komórek Purkiniego w mózdzku i jakie znaczenie ma w nim kalpaina. Receptory AMPA pośredniczą we wprowadzeniu komórek w stan prowadzący do śmierci poprzez początkowy i wydłużony wpływ jonów wapniowych w obrębie cytozolu i jądrze i szybką aktywację kalpainy. Aktywność kalpainy odnotowana na podstawie obecności jej produktów proteolizy 150 kDa i 145 kDa ma miejsce głównie w przypadku zaprogramowanej śmierci komórki. Komórki Purkiniego przed śmiercią wykazują cechy morfologiczne takie jak kurczenie się czy kondensacja chromatyny[172][173]. Użycie antagonistów kalpainy w tym przypadku ograniczyło o 50% liczbę ciemnych komórek zmierzających do śmierci, co wskazuje na zaangażowanie w proces również kaspaz oraz miało wpływ na obniżenie produktów degradacji α II-spektryny, co nie miało miejsca w przypadku komórek nekrotycznych. Dodatkowo komórki nekrotyczne wykazały umiarkowany wzrost produktów degradacji α II-spektryny. Wydaje się to zaskakujące ze względu na szczególnie łączony z nekrozą gwałtowny wpływ jonów Ca^{2+} . Jednak w tym przypadku właściwy czas i lokalizacja wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} może mieć sprzyjający wpływ na aktywację kalpainy tak jak sugerowano w temacie aktywacji kalpainy przy udziale NMDA[172][174]. Podobnie już dawno wykazano, że procesy prowadzące do śmierci indukowane ekscytotoksycznością

związaną np. z niedokrwieniem komórek można łagodzić poprzez zastosowanie antagonistów kalpainy[175]. Biorąc pod uwagę powyższe należałoby docenić rolę kalpainy i degradacji α II-spektryny w apoptotycznym mechanizmie śmierci komórek Purkiniego.

7.10 Znaczenie proteolizy domeny CCC

We wstępie wspomniano model myszy w którym usunięto domenę CCC i nie zidentyfikowano znaczących rozwojowych zmian fenotypowych w zachowaniu czy histologii. Autorzy sugerowali na tej podstawie, że domena ta nie jest szczególnie ważna dla zachowania podstawowych funkcji komórki. Niestety dotychczas nie zbadano wpływu tej modyfikacji na pamięć i funkcje poznawcze[47]. Wcześniej podejrzewano, że kalpainowa proteoliza spektryny może mieć związek z procesami długotrwałego wzmocnienia[176]. Analiza taka byłaby dla nas interesująca ze względu na przeprowadzone przez nasz zespół testy rozpoznawania obiektów na młodych i starszych osobnikach R1098Q, oceniające pamięć wzrokowo-przestrzenną, które nie ujawniły zwiększonego zainteresowania nowym obiektem u myszy R1098Q i wykazały znaczne różnice między wynikami myszy WT i R1098Q w grupie 8-tygodniowej[155], co jednocześnie odpowiadało utracie neuronów w korze nosowej i części hipokampa[129]. Wyniki te rzeczywiście sugerują znaczenie miejsca proteolitycznego kalpainy w domenie CCC w kontekście procesów neuronalnych związanych z pamięcią. Spektryna ulega proteolizie przez kalpainę na skutek aktywacji receptorów NMDA, może uczestniczyć w modulacji transmisji synaptycznej i wpływać na ilość receptorów w błonach synaptycznych[177]. Inną ciekawą obserwacją poczynioną przez ten zespół było występowanie normalnych pęcherzyków apoptotycznych u myszy bez domeny CCC, co wskazywało na to że proteoliza tego regionu nie jest wstępnie wymaganym wydarzeniem dla apoptozy, jak było to postulowane[47]. Dodatkowo zmiana ta nie uniemożliwiła proteolizy β II-spektryny, ponownie wskazując na złożoność zależności proteolizy z udziałem α II- β II-spektryny i kalmoduliny. W innej publikacji na podstawie obserwacji po indukowanej 1,2-DAB aksonopatii sugerowane jest, że domena wrażliwa na kalpainy i kaspazy nie jest istotna dla integralności cytoszkieletu w nerwach obwodowych, a proteoliza α II-spektryny jest zdarzeniem późniejszym w patogenezie zapoczątkowanej addukcją białek i sieciowaniem[180]. Jednak w doświadczeniu tym jako zaczątek stanu patologicznego wykorzystano właśnie czynnik sieciujący. W świetle tych cytowanych badań i przedstawionych w tej pracy wyników dotyczących fenotypu myszy R1098Q+hCAST kalpainowa proteoliza domeny CCC zdaje się nie mieć szerokich skutków czynnościowych dla podstawowego funkcjonowania komórek w układzie nerwowym. Myszy R1098Q+hCAST wykazały w dotychczas przeprowadzonych

badaniach jedynie wzrost siły mięśniowej i zwiększoną precyzję dokroku w porównaniu do myszy R1098Q. Jeśli chodzi o neuroplastyczność związaną z procesami poznawczymi to możliwe, że zarówno brak naturalnej plastyczności cytoszkieletu regulowanej za pośrednictwem domeny CCC przez kalpainę, czy też odkryty przez nas patologicznie podwyższony poziom proteolizy α II-spektryny u myszy R1098Q może mieć zgubny wpływ na procesy zapamiętywania. Z pewnością cenne byłoby przeprowadzenie porównawczych testów rozpoznawania nowego obiektu u myszy R1098Q+hCAST i R1098Q. Ciekawy pozostaje również aspekt zmienionej siły mięśniowej. Czy możliwe, że myszy pozbawione domeny CCC wykazywałyby zmienioną siłę mięśniową w porównaniu do kontroli?

7.11 Znaczenie proteolizy α II-spektryny dla wariantu R1098Q

Jak się okazuje przypuszczalnie proteoliza α II-spektryny w wariantcie R1098Q jest zdarzeniem pierwotnym, niewymagającym podwyższonej aktywności kalpajny, wynikającym z immanentnej cechy tej formy białka a spowodowanym większą ekspozycją pętli CCC na działanie enzymu. W niniejszej pracy udało się określić wpływ tej proteolizy na siłę mięśniową i precyzję dokroku myszy. Jak wskazują obserwacje fenotyp R1098Q jest związany z innymi ciężkimi objawami, które na razie zdaje się nie wynikają bezpośrednio ze swobodniejszej proteolizy tej formy spektryny. Prawdopodobnie równolegle pojawiają się inne nieprawidłowości związane z zaburzoną stabilizacją w obrębie 9-10 powtórzenia spektrynowego wpływające na podstawowe funkcje spektryny. Niewykluczone, że w tym przypadku dochodzi do zmiany natury oddziaływań z innymi zidentyfikowanymi bądź niepoznanymi dotychczas partnerami α II-spektryny, które również mają wpływ na obserwowany fenotyp, co z pewnością będzie przedmiotem dalszych badań. Nadmierna aktywność kalpajny i proteoliza α II-spektryny w świetle literatury jest wiązana z obumieraniem komórek Purkinjego i atrofią mózdzku, jednak praca ta nie potwierdza związku przyczynowo skutkowego między tymi procesami. Nadmierne działanie kalpajny jest w tym przypadku wyizolowane do wzmożonej proteolizy wybranego białka, choć najprawdopodobniej ma miejsce nawet w stanie podstawowym komórki bez zwiększonego poziomu Ca^{2+} .

Z pewnością konieczna będzie dalsza charakterystyka linii R1098Q+hCAST w celu wyłuszczenia komponenty kalpajnowej w występujących u myszy R1098Q objawach, a pełniejszy obraz będzie można skuteczniej odnieść do neuropatologii będącej udziałem proteolizy spektryn w innych schorzeniach neurodegeneracyjnych, szczególnie przy uwzględnieniu analizy stanu myszy na różnych etapach rozwoju.

8. Podsumowanie

Szereg eksperymentów instrumentalnych, zawartych w tej pracy, motywowanych wynikami modelowania *in silico* pozwolił na wykazanie, że mutacja punktowa c.3293G>A w obrębie genu α II-spektryny wpływa na stabilność struktury szczególnie w obrębie pętli CCC gdzie znajdują się miejsca oddziaływania z kalmoduliną jak i specyficzne miejsce proteolizy przez kalpainę. Jednocześnie wykazano, że stan ten wpływa na znacznie podwyższoną podatność mutanta na proteolizę wiązania Y1176G przez kalpainę bliską do podatności dzikiej formy białka oddziałującego z kalmoduliną. Wykazano również zmniejszone powinowactwo zmutowanej formy wobec kalmoduliny. Jednocześnie oddalono możliwość mniejszej podatności na fosforylację reszty Y1176 przez kinazę c-Src jako przyczynę zwiększonej podatności na proteolizę. Przy zwiększonej podatności na proteolizę przez kalpainę nie wykryto różnic w podatności na proteolizę przez kaspazę 3. Specyficzną wrażliwość na proteolizę zmutowanej formy α II-spektryny skonfrontowano z nadekspresją kalpastatyny, inhibitora kalpainsy, tworząc linię myszy R1098Q+hCAST, aby ocenić potencjalne zmiany fenotypu w kontekście udziału owej proteolizy w całościowym obrazie zmian neurodegeneracyjnych. Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, iż obniżenie proteolizy przez kalpastatynę wpływa pozytywnie na siłę mięśniową oraz precyzję dostawiania łap, nie przynosząc jednocześnie znacznej poprawy w szerszej pojętych zdolnościach motorycznych, w tym wielu parametrów chodu i wydajności na urządzeniu rotarod. Utworzenie linii pozwoliło również na analizę ilości SNTF (specyficznego dla kalpainsy produktu degradacji α II-spektryny) w mózgach myszy R1098Q+hCAST, a wyniki pomimo braku istotności statystycznej wskazywały trend spadku poziomu SNTF w mózgu myszy R1098Q+hCAST, co zostało niezależnie potwierdzone badaniem immunohistochemicznym w obrębie hipokampu myszy przy jednoczesnym niecałkowitym obniżeniu barwienia SNTF w obrębie mózdzku [dane niepublikowane komunikowane przez Dra Michael'a Stankewich'a]. Otrzymane wyniki wskazują na użyteczność modelu myszy R1098Q+hCAST w kontekście eksperymentalnych terapii neuropatii spektrynozależnych.

9. Spis rycin i tabel

Spis rycin

Rycina 1. Schematyczne przedstawienie tetrameru złożonego z α i β spektryn.	18
Rycina 2. Powtórzenia spektrynowe z różnych perspektyw - 15,16,17 all spektryny z mózgu kurczaka. ..	19
Rycina 3. Schemat budowy MPS.	20
Rycina 4. Model chińskiej pułapki na palce.	22
Rycina 5. Schemat dystrybucji typów spektryn w neuronie.	23
Rycina 6. Schematyczne przedstawienie degradacji α II-spektryny przez kalpainę.	31
Rycina 7. Schematyczne przedstawienie proteolizy α II-spektryny przez kaspazę 3.	38
Rycina 8. Mutacje zidentyfikowane w sekwencji α II-spektryny.	39
Rycina 9. Modelowanie strukturalne powtórzeń spektrynowych 9 i 10 w typie dzikim i zawierające mutację R1098Q.	43
Rycina 10. Schemat obrazujący przebieg eksperymentu trawienia enzymatycznego w protokole ELISA.	62
Rycina 11. Elektroforegram przedstawiający białka WT i R1098Q po oczyszczeniu i po odtrawieniu GST. .	68
Rycina 12. Schemat przedstawiający rekombinowane fragmenty α II spektryny i odpowiadające im położenie w pełnym białku.	68
Rycina 13. Rzuty modelowania strukturalnego fragmentów α II-spektryny w różnych wariantach 1098 reszty aminokwasowej.	69
Rycina 14. Obraz dichroizmu kołowego dla białek spektrynowych w różnych temperaturach.	70
Rycina 15. Wyniki dichroizmu kołowego w zestawieniu z wynikami chromatografii żelowej (SEC).	71
Rycina 16. Zmiany eliptyczności molowej w zależności od temperatury.	72
Rycina 17. Zmiany rozmiaru cząsteczek w zależności od temperatury.	73
Rycina 18. Wyniki SPR dla peptydów WT i R1098Q przy stężeniach kalmoduliny 80-2000 nM.	74
Rycina 19. Wyniki SPR dla peptydów WT i R1098Q przy stężeniach kalmoduliny 2-60 nM.	75
Rycina 20. Zmiany zależności ilorazu fluorescencji 350nm/330 nm od temperatury- system Prometheus.77	
Rycina 21. Zmiany pochodnej zależności ilorazu fluorescencji od temperatury - system Prometheus.	77
Rycina 22. Wynik western blot anty-fosfotyrozyna – fosforylacja fragmentów spektrynowych przez kinazę c-src.	79
Rycina 23. Wynik Western-blot anty-myc-tag dla proteolizy peptydów spektrynowych przez kalpainę.	80
Rycina 24. Procentowa utrata gęstości optycznej w zależności od czasu reakcji.	81
Rycina 25. Całkowita procentowa utrata gęstości optycznej odpowiadająca ilości strawionego białka - kalpaina.	82
Rycina 26. Całkowita procentowa utrata gęstości optycznej odpowiadająca ilości strawionego białka - kaspaza 3.	83
Rycina 27. Trawienie kaspazą 3 – obraz barwienia azotanem srebra.	84
Rycina 28. Obraz z mikroskopu przedstawiający barwienie komórek mózgowych myszy.	85
Rycina 29. Elektroforegramy - genotypowanie myszy R1098Q+hCAST.	86
Rycina 30. Aktywność kalpainy w przeliczeniu na 1 mg lizatu mózdku.	87
Rycina 31. Specyficzne produkty proteolizy α II-spektryny w lizatach z mózdków (Dot blot anty-SNTF).	88
Rycina 32. Wyniki testu rotarod dla zatrzymań i upadków z drążka.	89
Rycina 33. Siła chwytu. Wyniki testu dla grup mieszanych płciowo.	90
Rycina 34. Siła chwytu. Wyniki testu według fenotypu i płci.	90
Rycina 35. Test footprint - Rozstaw łap.	91
Rycina 36. Test footprint - Długość kroku.	91
Rycina 37. Test footprint - Odległość między śladami łapy.	91
Rycina 38. Test footprint - Odległość między łapami przy dostawieniu.	92

Spis tabel

Tabela 1. Wybrane grupy białek oddziałujące z a II spektryną.	30
Tabela 2. Odczynniki do manipulacji DNA.	46
Tabela 3. Odczynniki do ekspresji i oczyszczania białek	46
Tabela 4. Odczynniki do rozdziału i wizualizacji cząsteczek.....	47
Tabela 5. Odczynniki do hodowli bakteryjnej.	47
Tabela 6. Media i odczynniki do hodowli komórkowej.....	48
Tabela 7. Odczynniki do metod instrumentalnych.	48
Tabela 8. Odczynniki do buforów.	48
Tabela 9. Składy używanych roztworów.	49
Tabela 10. Sekwencje oligonukleotydów wykorzystane do klonowania oraz do genotypowania.	52
Tabela 11. Przybliżona zawartość procentowa struktur drugorzędowych we fragmentach spektrynowych WT i R1098Q.....	73
Tabela 12. Wartości stałych kinetycznych oddziaływania fragmentów spektrynowych WT i R1098Q z kalmoduliną.	76
Tabela 13. Wartości termiczne otrzymane dla białek WT i R1098Q w eksperymencie na aparacie Prometheus.	78
Tabela 14. Wydajność proteolizy substratów spektrynowych przez kalpainę w reakcji łączonej z ELISA.	82

10. Piśmiennictwo

- [1] N. Morrison-Levy, F. Borlot, P. Jain, and R. Whitney, “Early-Onset Developmental and Epileptic Encephalopathies of Infancy: An Overview of the Genetic Basis and Clinical Features,” *Pediatr. Neurol.*, vol. 116, pp. 85–94, 2021, doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2020.12.001.
- [2] L. Van de Vondel *et al.*, “De Novo and Dominantly Inherited SPTAN1 Mutations Cause Spastic Paraplegia and Cerebellar Ataxia,” *Mov. Disord.*, vol. 37, no. 6, pp. 1175–1186, 2022, doi: 10.1002/mds.28959.
- [3] E. Leveille *et al.*, “SPTAN1 variants as a potential cause for autosomal recessive hereditary spastic paraplegia,” *J. Hum. Genet.*, vol. 64, no. 11, pp. 1145–1151, 2019, doi: 10.1038/s10038-019-0669-2.
- [4] J. Pascual, J. Castresana, and M. Saraste, “Evolution of the spectrin repeat,” *BioEssays*, vol. 19, no. 9, pp. 811–817, 1997, doi: 10.1002/bies.950190911.
- [5] R. R. Dubreuil and T. Grushko, “Genetic studies of spectrin: New life for a ghost protein,” *BioEssays*, vol. 20, no. 11, pp. 875–878, 1998, doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199811)20:11<875::AID-BIES1>3.0.CO;2-P.
- [6] V. Bennett, “Spectrin: a structural mediator between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 2, no. 1, pp. 51–56, 1990, doi: 10.1016/S0955-0674(05)80030-4.
- [7] L. H. Teliska and M. N. Rasband, “Spectrins,” *Curr. Biol.*, vol. 31, no. 10, pp. R504–R506, 2021, doi: 10.1016/j.cub.2021.01.040.
- [8] B. Machnicka, R. Grochowalska, D. M. Bogusławska, A. F. Sikorski, and M. C. Lecomte, “Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 69, no. 2, pp. 191–201, 2012, doi: 10.1007/s00018-011-0804-5.
- [9] J. W. Brown, J. W. Brown, E. Bullitt, S. Sriswasdi, and S. Harper, “The Physiological Molecular Shape of Spectrin: A Compact Supercoil Resembling a Chinese Finger Trap The Physiological Molecular Shape of Spectrin : A Compact Supercoil Resembling a Chinese Finger Trap,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 11, no. 11(6), p. e1004302, 2015, doi: 10.1371/journal.pcbi.1004302.
- [10] M. H. Derbala, A. S. Guo, P. J. Mohler, and S. A. Smith, “The role of β II spectrin in cardiac health and disease,” *Life Sci.*, vol. 192, pp. 278–285, 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2017.11.009.
- [11] J. S. Sreeja, R. John, D. Dharmapal, R. K. Nellikka, and S. Sengupta, “A Fresh Look at the Structure, Regulation, and Functions of Fodrin,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 40, no. 17, pp. e00133-20, 2020, doi: 10.1128/mcb.00133-20.
- [12] D. M. Bogusławska, B. Machnicka, A. Hryniewicz-Jankowska, and A. Czogalla, “Spectrin and phospholipids - the current picture of their fascinating interplay,” *Cell. Mol. Biol. Lett.*, vol. 19, no. 1, pp. 158–179, 2014, doi: 10.2478/s11658-014-0185-5.
- [13] G. Shaw, “The pleckstrin homology domain: An intriguing multifunctional protein module,” *BioEssays*, vol. 18, no. 1, pp. 35–46, 1996, doi: 10.1002/bies.950180109.

- [14] D. Li, "Role of Spectrin in Endocytosis," *Cells*, vol. 11, no. 15:2459, 2022, doi: 10.3390/cells11152459.
- [15] P. R. Stabach and J. S. Morrow, "Identification and characterization of β V spectrin, a mammalian ortholog of *Drosophila* β (H) spectrin," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 28, pp. 21385–21395, 2000, doi: 10.1074/jbc.C000159200.
- [16] K. Djinovic-Carugo, M. Gautel, J. Yläanne, and P. Young, "The spectrin repeat: A structural platform for cytoskeletal protein assemblies," *FEBS Lett.*, vol. 513, no. 1, pp. 119–123, 2002, doi: 10.1016/S0014-5793(01)03304-X.
- [17] D. Li, H. Y. Tang, and D. W. Speicher, "A structural model of the erythrocyte spectrin heterodimer initiation site determined using homology modeling and chemical cross-linking," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 3, pp. 1553–1562, 2008, doi: 10.1074/jbc.M706981200.
- [18] J. S. Morrow and M. C. Stankewich, "The Spread of Spectrin in Ataxia and Neurodegenerative Disease," *J. Exp. Neurol.*, vol. 2, no. 3, pp. 131–139, 2021, doi: 10.33696/neurol.2.045.
- [19] A. Hard, Anna-Lena; Smith, Lois; Hellstrom, "Membrane-associated periodic skeleton is a signaling platform for RTK transactivation in neurons," *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 1, pp. 139–148, 2018, doi: 10.1126/science.aaw5937.Membrane-associated.
- [20] N. Unsain, F. D. Stefani, and A. Cáceres, "The actin/spectrin membrane-associated periodic skeleton in neurons," *Front. Synaptic Neurosci.*, vol. 10, no. MAY, pp. 1–8, 2018, doi: 10.3389/fnsyn.2018.00010.
- [21] S. C. Leite and M. M. Sousa, "The neuronal and actin commitment: Why do neurons need rings?," *Cytoskeleton*, vol. 73, no. 9, pp. 424–434, 2016, doi: 10.1002/cm.21273.
- [22] J. Wasilewski, T. Kiljański, and K. Miszalski-Jamka, "Rola naprężeń ścinających i mechanotransdukcji w procesie miażdżycowym," *Kardiol. Pol.*, vol. 69, no. 7, pp. 717–720, 2011.
- [23] C. Leterrier and P. A. Pullarkat, "Mechanical role of the submembrane spectrin scaffold in red blood cells and neurons," *J. Cell Sci.*, vol. 135, no. 16, pp. 1–9, 2022, doi: 10.1242/jcs.259356.
- [24] "https://allegro.pl/oferta/chinska-pulapka-na-palce-zabawka-prezent-13149110725 (17.03.2023-19:25)." .
- [25] Johnson CP, Tang HY, Carag C, Speicher DW, Discher DE, "Forced Unfolding of Proteins Within Cells," *Science (80-.)*, vol. 317, no. 5838, pp. 663–666, 2007, doi: 10.1126/science.1139857.
- [26] C. Storm, J. J. Pastore, F. C. MacKintosh, T. C. Lubensky, and P. A. Janmey, "Nonlinear elasticity in biological gels," *Nature*, vol. 435, no. 7039, pp. 191–194, 2005, doi: 10.1038/nature03521.
- [27] M. S. Z. Kellermayer, S. B. Smith, H. L. Granzier, and C. Bustamante, "Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers," *Science (80-.)*, vol. 276, no. 5315, pp. 1112–1116, 1997, doi: 10.1126/science.276.5315.1112.

- [28] C. Y. M. Huang, C. Zhang, D. R. Zollinger, C. Leterrier, and M. N. Rasband, “An α II spectrin-based cytoskeleton protects large-diameter myelinated axons from degeneration,” *J. Neurosci.*, vol. 37, no. 47, pp. 11323–11334, 2017, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2113-17.2017.
- [29] A. A. Sabet, E. Christoforou, B. Zatlin, G. M. Genin, and P. V. Bayly, “Deformation of the human brain induced by mild angular acceleration,” *J. Neurotrauma*, vol. 22, no. 8, pp. 845–856, 2005, doi: 10.1089/neu.2005.22.845.
- [30] M. Hammarlund, E. M. Jorgensen, and M. J. Bastiani, “Axons break in animals lacking β -spectrin,” *J. Cell Biol.*, vol. 176, no. 3, pp. 269–275, 2007, doi: 10.1083/jcb.200611117.
- [31] B. Machnicka *et al.*, “Spectrins: A structural platform for stabilization and activation of membrane channels, receptors and transporters,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1838, no. 2, pp. 620–634, 2014, doi: 10.1016/j.bbamem.2013.05.002.
- [32] M. R. Galiano *et al.*, “A distal axonal cytoskeleton forms an intra-axonal boundary that controls axon initial segment assembly,” *Cell*, vol. 149, no. 5, pp. 1125–1139, 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.03.039.
- [33] M. C. Stankewich *et al.*, “Targeted deletion of β III spectrin impairs synaptogenesis and generates ataxic and seizure phenotypes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 13, pp. 6022–6027, 2010, doi: 10.1073/pnas.1001522107.
- [34] B. Machnicka, R. Grochowalska, D. M. Bogusławska, and A. F. Sikorski, “The role of spectrin in cell adhesion and cell–cell contact,” *Exp. Biol. Med.*, vol. 244, no. 15, pp. 1303–1312, 2019, doi: 10.1177/1535370219859003.
- [35] C. Y. Huang *et al.*, “ α II Spectrin Forms a Periodic Cytoskeleton at the Axon Initial Segment and Is Required for Nervous System Function,” *J. Neurosci.*, vol. 37, no. 47, pp. 11311–11322, 2017, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2112-17.2017.
- [36] J. H. Kim, S. J. Kwon, M. C. Stankewich, G. Huh, S. B. Glantz, and J. S. Morrow, “Reactive protoplasmic and fibrous astrocytes contain high levels of calpain-cleaved alpha 2 spectrin,” *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 100, no. 1, pp. 1–7, 2016, doi: 10.1016/j.yexmp.2015.11.005.
- [37] M. C. Stankewich *et al.*, “Outer hair cell function is normal in β V spectrin knockout mice R,” *Hear. Res.*, vol. 423, p. 108564, 2022, doi: 10.1016/j.heares.2022.108564.
- [38] M. J. F. Broderick and S. J. Winder, “Spectrin, α -actinin, and dystrophin,” *Advances*, vol. 70, no. 04, pp. 203–246, 2005, doi: 10.1016/S0065-3233(04)70007-8.
- [39] M. J. F. Broderick and S. J. Winder, “Towards a complete atomic structure of spectrin family proteins,” *J. Struct. Biol.*, vol. 137, no. 1–2, pp. 184–193, 2002, doi: 10.1006/jsbi.2002.4465.
- [40] M. Gimona and S. J. Winder, “Single calponin homology domains are not actin-binding domains,” *Curr. Biol.*, vol. 8, no. 19, pp. R674–675, 1998, doi: 10.1016/S0960-9822(98)70431-2.
- [41] A. Levineb, G. Moir, and V. Perry, “Binding sites involved in the interaction of actin with the N-terminal 1’ region of dystrophin,” *FEBS Lett.*, vol. 298, no. 1, pp. 44–8, 1992, doi: 10.1016/0014-5793(92)80019-d.

- [42] A. R. Bresnick, P. A. Janmey, and J. Condeelis, "Evidence that a 27-residue sequence is the actin-binding site of ABP-120," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 20, pp. 12989–12993, 1991.
- [43] A. V. Buevich, S. Lundberg, I. Sethson, U. Edlund, and L. Backman, "NMR studies of calcium-binding to mutant α -spectrin EF-hands," *Cell. Mol. Biol. Lett.*, vol. 9, no. 1, pp. 167–186, 2004.
- [44] R. A. Atkinson *et al.*, "Ca²⁺-independent binding of an EF-hand domain to a novel motif in the α -actinin-titin complex," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 8, no. 10, pp. 853–857, 2001, doi: 10.1038/nsb1001-853.
- [45] H. S. Yoon, P. J. Hajduk, A. M. Petros, E. T. Olejniczak, R. P. Meadows, and S. W. Fesik, "Solution structure of a pleckstrin-homology domain," *Nature*, vol. 369, no. 6482, pp. 672–675, 1994, doi: 10.1038/369672a0.
- [46] M. J. Macias, A. Musacchio, H. Ponstingl, M. Nilges, M. Saraste, and H. Oschkinat, "Structure of the pleckstrin homology domain from β -spectrin," *Nature*, vol. 369, no. 6482, pp. 675–677, 1994, doi: 10.1038/369675a0.
- [47] F. Meary *et al.*, "A mutant α II-spectrin designed to resist calpain and caspase cleavage questions the functional importance of this process in vivo," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 19, pp. 14226–14237, 2007, doi: 10.1074/jbc.M700028200.
- [48] B. Rotter, Y. Kroviarski, G. Nicolas, D. Dhermy, and M. C. Lecomte, " α II-Spectrin is an in vitro target for caspase-2, and its cleavage is regulated by calmodulin binding," *Biochem. J.*, vol. 378, no. 1, pp. 161–168, 2004, doi: 10.1042/BJ20030955.
- [49] X. Li *et al.*, "Mechanistic insights into the role of calcium in the allosteric regulation of the calmodulin-regulated death-associated protein kinase," *Front. Mol. Biosci.*, vol. 9, no. 9, p. 1104942, 2022, doi: 10.3389/fmolb.2022.1104942.
- [50] M. Zhang and T. Yuan, "Molecular mechanisms of calmodulin's functional versatility," *Biochem. Cell Biol.*, vol. 76, no. 2–3, pp. 313–323, 1998, doi: 10.1139/o98-027.
- [51] S. Yumura *et al.*, "Dynamics of Actin Cytoskeleton and Their Signaling Pathways during Cellular Wound Repair," *Cells*, vol. 11, no. 19, 2022, doi: 10.3390/cells11193166.
- [52] D. Chin and A. R. Means, "Calmodulin: a prototypical calcium sensor," *Trends Cell Biol.*, vol. 10, no. 8, pp. 322–328, 2000, doi: 10.1016/s0962-8924(00)01800-6.
- [53] F. A. Vigil and K. P. Giese, "Calcium/calmodulin-dependent kinase II and memory destabilization: a new role in memory maintenance," *J. Neurochem.*, vol. 147, no. 1, pp. 12–23, 2018, doi: 10.1111/jnc.14454.
- [54] J. Hu *et al.*, "Calmodulin-dependent signalling pathways are activated and mediate the acute inflammatory response of injured skeletal muscle," *J. Physiol.*, vol. 597, no. 21, pp. 5161–5177, 2019, doi: 10.1113/JP278478.
- [55] L. Racioppi and A. R. Means, "Calcium/calmodulin-dependent kinase IV in immune and inflammatory responses: novel routes for an ancient traveller," *Trends Immunol.*, vol. 29, no. 12, pp. 600–607, 2008, doi: 10.1016/j.it.2008.08.005.

- [56] J. P. Williams, K. Micoli, and J. M. McDonald, “Calmodulin - An often-ignored signal in osteoclasts,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1192, no. 1, pp. 358–364, 2010, doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05242.x.
- [57] S. Takemoto-Kimura *et al.*, “Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease,” *J. Neurochem.*, vol. 141, no. 6, pp. 808–818, 2017, doi: 10.1111/jnc.14020.
- [58] C. A. Hudson and A. L. Bernal, “The regulation of myosin phosphatase in pregnant human myometrium,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 40, no. 1, pp. 262–267, 2012, doi: 10.1042/BST20110614.
- [59] R. K. Sharma and S. Parameswaran, “Calmodulin-binding proteins: A journey of 40 years,” *Cell Calcium*, vol. 75, pp. 89–100, 2018, doi: 10.1016/j.ceca.2018.09.002.
- [60] Y. Ohya and Y. Anraku, “A galactose-dependent cmdl mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of Calmodulin in Nuclear Division,” *Curr Genet.*, vol. 15, no. 2, pp. 113–120, 1989, doi: 10.1007/BF00435457.
- [61] M. Ben-Johny and D. T. Yue, “Calmodulin regulation (calmodulation) of voltage-gated calcium channels,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 143, no. 6, pp. 679–692, 2014, doi: 10.1085/jgp.201311153.
- [62] X. D. Zhang, P. N. Thai, D. K. Lieu, and N. Chiamvimonvat, “Cardiac small-conductance calcium-activated potassium channels in health and disease,” *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 473, no. 3, pp. 477–489, 2021, doi: 10.1007/s00424-021-02535-0.
- [63] M. Simonovic, Z. Zhang, C. D. Cianci, T. A. Steitz, and J. S. Morrow, “Structure of the calmodulin α II-Spectrin complex provides insight into the regulation of cell plasticity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 45, pp. 34333–34340, 2006, doi: 10.1074/jbc.M604613200.
- [64] J. P. Steiner, H. T. Walke, and V. Bennett, “Calcium/calmodulin inhibits direct binding of spectrin to synaptosomal membranes,” *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 5, pp. 2783–2791, 1989, doi: 10.1016/s0021-9258(19)81682-4.
- [65] M. B. F. Gali Maor, Ronald R. Dubreuil, “ α -Synuclein Promotes Neuronal Dysfunction and Death by Disrupting the Binding of Ankyrin to β -Spectrin,” *J. Neurosci.*, vol. 43, no. 9, pp. 1614–1626, 2023, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1922-22.2022.
- [66] V. Bennett and A. J. Baines, “Spectrin and ankyrin-based pathways: Metazoan inventions for integrating cells into tissues,” *Physiol. Rev.*, vol. 81, no. 3, pp. 1353–1392, 2001, doi: 10.1152/physrev.2001.81.3.1353.
- [67] A. J. Baines, “Evolution of spectrin function in cytoskeletal and membrane networks,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 37, no. 4, pp. 796–803, 2009, doi: 10.1042/BST0370796.
- [68] A. Konietzny, J. Bär, and M. Mikhaylova, “Dendritic actin cytoskeleton: Structure, functions, and regulations,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 11, no. 147, pp. 1–10, 2017, doi: 10.3389/fncel.2017.00147.
- [69] R. Dominguez and K. C. Holmes, “Actin structure and function,” *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 40, no. 1, pp. 169–186, 2011, doi: 10.1146/annurev-biophys-042910-155359.

- [70] A. J. Baines, P. M. Bennett, E. W. Carter, and C. Terracciano, "Protein 4.1 and the control of ion channels," *Blood Cells, Mol. Dis.*, vol. 42, no. 3, pp. 211–215, 2009, doi: 10.1016/j.bcmd.2009.01.016.
- [71] E. Bok, A. Hryniewicz-Jankowska, and A. F. Sikorski, "Białka aktywnego szkieletu komórki i błony partnerami lipidów," *Postepy Biochem.*, vol. 55, no. 2, pp. 207–222, 2009.
- [72] A. J. Baines, H. C. Lu, and P. M. Bennett, "The Protein 4.1 family: Hub proteins in animals for organizing membrane proteins," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1838, no. 2, pp. 605–619, 2014, doi: 10.1016/j.bbamem.2013.05.030.
- [73] Y. Matsuoka, X. Li, and V. Bennett, "Adducin: Structure, function and regulation," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 57, no. 6, pp. 884–895, 2000, doi: 10.1007/PL00000731.
- [74] K. M. Y. Kiang and G. K. K. Leung, "A Review on Adducin from Functional to Pathological Mechanisms: Future Direction in Cancer," *Biomed Res. Int.*, vol. 2018, no. 3465929, pp. 1–14, 2018, doi: 10.1155/2018/3465929.
- [75] S. R. Goodman, D. Johnson, S. L. Youngentob, and D. Kakhniashvili, "The Spectrinome: The Interactome of a Scaffold Protein Creating Nuclear and Cytoplasmic Connectivity and Function," *Exp. Biol. Med.*, vol. 244, no. 15, pp. 1273–1302, 2019, doi: 10.1177/1535370219867269.
- [76] R. Zhang, C. Zhang, Q. Zhao, and D. Li, "Spectrin: Structure, function and disease," *Sci. China Life Sci.*, vol. 56, no. 12, pp. 1076–1085, 2013, doi: 10.1007/s11427-013-4575-0.
- [77] D. E. Croall and K. Ersfeld, "The calpains: Modular designs and functional diversity," *Genome Biol.*, vol. 8, no. 6, pp. 1–11, 2007, doi: 10.1186/gb-2007-8-6-218.
- [78] R. Rolius *et al.*, "Inhibition of calpain but not caspase activity by spectrin fragments," *Cell. Mol. Biol. Lett.*, vol. 15, no. 3, pp. 395–405, 2010, doi: 10.2478/s11658-010-0015-3.
- [79] I. M. Kotova, N. S. Pestereva, D. S. Traktirov, M. T. Absalyamova, and M. N. Karpenko, "Functions and distribution of calpain-calpastatin system components in brain during mammal ontogeny," *BBA - Gen. Subj.*, vol. 1867, no. 5, p. 130345, 2023, doi: 10.1016/j.bbagen.2023.130345.
- [80] A. Kamal, Y. S. Ying, and R. G. W. Anderson, "Annexin VI-mediated loss of spectrin during coated pit budding is coupled to delivery of LDL to lysosomes," *J. Cell Biol.*, vol. 142, no. 4, pp. 937–947, 1998, doi: 10.1083/jcb.142.4.937.
- [81] S. M. Harwood, M. M. Yaqoob, and D. A. Allen, "Caspase and calpain function in cell death: Bridging the gap between apoptosis and necrosis," *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 42, no. 6, pp. 415–431, 2005, doi: 10.1258/000456305774538238.
- [82] A. Czogalla and A. F. Sikorski, "Spectrin and calpain: A 'target' and a 'sniper' in the pathology of neuronal cells," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 62, no. 17, pp. 1913–1924, 2005, doi: 10.1007/s00018-005-5097-0.
- [83] S. B. Glantz, C. D. Cianci, R. Iyer, D. Pradhan, K. K. W. Wang, and J. S. Morrow, "Sequential Degradation of α II and β II Spectrin by Calpain in Glutamate or Maitotoxin-Stimulated Cells," *Biochemistry*, vol. 46, no. 2, pp. 502–513, 2007, doi: 10.1021/bi061504y.Sequential.

- [84] L. Löfvenberg and L. Backman, “Calpain-induced proteolysis of β -spectrins,” *FEBS Lett.*, vol. 443, no. 2, pp. 89–92, 1999, doi: 10.1016/S0014-5793(98)01697-4.
- [85] D. P. Schafer, S. Jha, F. Liu, T. Akella, L. D. McCullough, and M. N. Rasband, “Disruption of the axon initial segment cytoskeleton is a new mechanism for neuronal injury,” *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 42, pp. 13242–13254, 2009, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3376-09.2009.
- [86] P. Tompa *et al.*, “On the sequential determinants of calpain cleavage,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 20, pp. 20775–20785, 2004, doi: 10.1074/jbc.M313873200.
- [87] J. H. Nedrelow, C. D. Cianci, and J. S. Morrow, “c-Src binds α II spectrin’s Src homology 3 (SH3) domain and blocks calpain susceptibility by phosphorylating Tyr1176,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 9, pp. 7735–7741, 2003, doi: 10.1074/jbc.M210988200.
- [88] A. S. Harris, D. E. Croall, and J. S. Morrow, “Calmodulin regulates fodrin susceptibility to cleavage by calcium-dependent protease I,” *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 29, pp. 17401–17408, 1989, doi: 10.1016/s0021-9258(18)71508-1.
- [89] K. K. W. Wang *et al.*, “Simultaneous degradation of α II- and β II-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 35, pp. 22490–22497, 1998, doi: 10.1074/jbc.273.35.22490.
- [90] G. Nicolas *et al.*, “Tyrosine Phosphorylation Regulates Alpha II Spectrin Cleavage by Calpain,” vol. 22, no. 10, pp. 3527–3536, 2002, doi: 10.1128/MCB.22.10.3527.
- [91] J. Liu, M. C. Liu, and K. K. W. Wang, “Calpain in the CNS : From Synaptic Function to Neurotoxicity,” *Sci Signal.*, vol. 1, no. 14, pp. 1–8, 2008, doi: 10.1126/stke.114re1.
- [92] D. E. Goll, V. F. Thompson, H. Li, W. E. I. Wei, and J. Cong, “The Calpain System,” *Physiol Rev*, vol. 83, no. 3, pp. 731–801, 2003, doi: 10.1152/physrev.00029.2002.
- [93] M. Baudry and X. Bi, “Calpain-1 and calpain-2: the yin and yang of synaptic plasticity and neurodegeneration,” *Trends Neurosci.*, vol. 39, no. 4, pp. 235–245, 2017, doi: 10.1016/j.tins.2016.01.007.
- [94] M. Azam, S. S. Andrabi, K. E. Sahr, L. Kamath, A. Kuliopulos, and A. H. Chishti, “Disruption of the Mouse μ -Calpain Gene Reveals an Essential Role in Platelet Function,” *Mol. Cell. Bioll.*, vol. 21, no. 6, pp. 2213–2220, 2001, doi: 10.1128/MCB.21.6.2213.
- [95] R. J. Hu and V. Bennett, “In vitro proteolysis of brain spectrin by calpain I inhibits association of spectrin with ankyrin-independent membrane binding site(s),” *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 27, pp. 18200–18205, 1991, doi: 10.1016/s0021-9258(18)55255-8.
- [96] A. L. Andres *et al.*, “NMDA receptor activation and calpain contribute to disruption of dendritic spines by the stress neuropeptide CRH,” *J. Neurosci.*, vol. 33, no. 43, pp. 16945–16960, 2013, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1445-13.2013.
- [97] R. Shams, N. L. Banik, and A. Haque, “Calpain in the Cleavage of Alpha-Synuclein and the Pathogenesis of Parkinson’s Disease,” *Prog Mol Biol Transl Sci.*, vol. 167, pp. 107–124, 2019, doi: 10.1016/bs.pmbts.2019.06.007.

- [98] X.-X. Yan and A. Jeromin, "Spectrin Breakdown Products (SBDPs) as Potential Biomarkers for Neurodegenerative Diseases," *Curr. Transl. Geriatr. Exp. Gerontol. Rep.*, vol. 1, no. 2, pp. 85–93, 2012, doi: 10.1007/s13670-012-0009-2.
- [99] D. C. Shields and N. L. Banik, "Pathophysiological Role of Calpain in Experimental Demyelination," *J. Neurosci. Res.*, vol. 55, no. 5, pp. 533–541, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19990301)55:5<533::AID-JNR1>3.0.CO;2-8.
- [100] J. G. Tidball and M. J. Spencer, "Calpains and muscular dystrophies," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 32, no. 1, pp. 1–5, 2000, doi: 10.1016/s1357-2725(99)00095-3.
- [101] R. A. Nixon, "The calpains in aging and aging-related diseases," *Ageing Res. Rev.*, vol. 2, no. 4, pp. 407–418, 2003, doi: 10.1016/S1568-1637(03)00029-1.
- [102] J. Gafni and L. M. Ellerby, "Calpain Activation in Huntington's Disease," *J. Neurosci.*, vol. 22, no. 12, pp. 4842–4849, 2002, doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-12-04842.2002.
- [103] B. G. Mundo E, Soldati L, Bellodi L, "The calpain-calpastatin system in obsessive-compulsive disorder," *Biol Psychiatry.*, vol. 42, no. 3, pp. 228–9, 1997, doi: 10.1016/S0006-3223(97)00251-5.
- [104] K. L. Hedstrom, Y. Ogawa, and M. N. Rasband, "AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity," *J. Cell Biol.*, vol. 183, no. 4, pp. 635–640, 2008, doi: 10.1083/jcb.200806112.
- [105] J. T. Povlishock, "All roads lead to disconnection ? – Traumatic axonal injury revisited," *Acta Neurochir.*, vol. 148, no. 2, pp. 181–194, 2006, doi: 10.1007/s00701-005-0674-4.
- [106] A. Eto, Y. Akita, T. C. Saido, K. Suzuki, and S. Kawashima, "The role of the calpain-calpastatin system in thyrotropin-releasing hormone-induced selective down-regulation of a protein kinase C isozyme, nPKC ϵ , in rat pituitary GH4C1 cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 42, pp. 25115–25120, 1995, doi: 10.1074/jbc.270.42.25115.
- [107] B. Sparatore *et al.*, "A new human calpastatin skipped of the inhibitory region protects calpain-1 from inactivation and degradation," *BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1866, no. 8, pp. 1260–1271, 2019, doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.04.005.
- [108] H. Khan, N. Garg, T. G. Singh, A. Kaur, and K. Thapa, "Calpain Inhibitors as Potential Therapeutic Modulators in Neurodegenerative Diseases," *Neurochem. Res.*, vol. 47, no. 5, pp. 1125–1149, 2022, doi: 10.1007/s11064-021-03521-9.
- [109] I. O. Donkor, "An update on the therapeutic potential of calpain inhibitors: a patent review," *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 30, no. 9, pp. 659–675, 2020, doi: 10.1080/13543776.2020.1797678.
- [110] D. Aluja, S. Delgado-tom, M. Ruiz-meana, and A. Barrab, "Calpains as Potential Therapeutic Targets for Myocardial Hypertrophy," *Int. J. Mol. Sci. Rev.*, vol. 23, no. 8, p. 4103, 2022, doi: 10.3390/ijms23084103.
- [111] K. E. S. Kathleen M Schoch , Catherine R von Reyn, Jifeng Bian, Glenn C Telling, David F Meaney, "Brain injury-induced proteolysis is reduced in a novel calpastatin-overexpressing transgenic mouse," *J. Neurochem.*, vol. 125, no. 6, pp. 909–920, 2013, doi: 10.1111/jnc.12144.

- [112] M. Gauster, M. Siwetz, K. Orendi, G. Moser, G. Desoye, and B. Huppertz, “Caspases rather than calpains mediate remodelling of the fodrin skeleton during human placental trophoblast fusion,” *Cell Death Differ.*, vol. 17, no. 2, pp. 336–345, 2010, doi: 10.1038/cdd.2009.133.
- [113] B. Rotter, O. Bournier, G. Nicolas, D. Dhermy, and M.-C. Lecomte, “AlphaII-spectrin interacts with Tes and EVL, two actin-binding proteins located at cell contacts,” *Biochem. J.*, vol. 388, no. Pt 2, pp. 631–8, 2005, doi: 10.1042/BJ20041502.
- [114] A. Lee, J. S. Morrow, and V. M. Fowler, “Caspase Remodeling of the Spectrin Membrane Skeleton during Lens Development and Aging,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 23, pp. 20735–20742, 2001, doi: 10.1074/jbc.M009723200.
- [115] T. Klockgether, C. Mariotti, and H. L. Paulson, “Spinocerebellar ataxia,” *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 5, no. 1, p. 24, 2019, doi: 10.1038/s41572-019-0074-3.
- [116] Y. Zhang *et al.*, “Gene Mutation Analysis in 253 Chinese Children with Unexplained Epilepsy and Intellectual / Developmental Disabilities,” *PLoS One*, vol. 10, no. 11, p. e0141782, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0141782.
- [117] Y. Ikeda *et al.*, “Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5,” *Nat. Genet.*, vol. 38, no. 2, pp. 184–190, 2006, doi: 10.1038/ng1728.
- [118] S. Syrbe *et al.*, “Delineating SPTAN1 associated phenotypes : from isolated epilepsy to encephalopathy with progressive brain atrophy,” *Brain*, vol. 140, no. 9, pp. 2322–2336, 2017, doi: 10.1093/brain/awx195.
- [119] J. Tohyama *et al.*, “SPTAN1 encephalopathy: Distinct phenotypes and genotypes,” *J. Hum. Genet.*, vol. 60, no. 4, pp. 167–173, 2015, doi: 10.1038/jhg.2015.5.
- [120] H. Saitsu *et al.*, “Dominant-Negative Mutations in α -II Spectrin Cause West Syndrome with Severe Cerebral Hypomyelination, Spastic Quadriplegia, and Developmental Delay,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 86, no. 6, pp. 881–891, 2010, doi: 10.1016/j.ajhg.2010.04.013.
- [121] G. Terrone *et al.*, “Intrafamilial variability in SPTAN1-related disorder: From benign convulsions with mild gastroenteritis to developmental encephalopathy,” *Eur. J. Paediatr. Neurol.*, vol. 28, pp. 237–239, 2020, doi: 10.1016/j.ejpn.2020.07.008.
- [122] Y. Gao *et al.*, “ β -III spectrin is critical for development of Purkinje cell dendritic tree and spine morphogenesis,” *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 46, pp. 16581–16590, 2011, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3332-11.2011.
- [123] T. Hirano, “Purkinje Neurons: Development, Morphology, and Function,” *The Cerebellum*, vol. 17, no. 6, pp. 699–700, 2018, doi: 10.1007/s12311-018-0985-7.
- [124] L. Van De Vondel, J. Baets, and D. Beijer, “Reply: De novo SPTAN1 mutation in axonal sensorimotor neuropathy and developmental disorder,” *Brain*, vol. 143, no. 12, pp. 1–2, 2020, doi: 10.1093/brain/awaa345.
- [125] D. Beijer *et al.*, “Nonsense mutations in alpha-II spectrin in three families with juvenile onset hereditary motor neuropathy,” *Brain*, vol. 142, no. 9, pp. 2605–2616, 2019, doi: 10.1093/brain/awz216.

- [126] M. G. Voas, D. A. Lyons, S. G. G. Naylor, N. Arana, M. N. N. Rasband, and W. S. Talbot, “ α II-Spectrin Is Essential for Assembly of the Nodes of Ranvier in Myelinated Axons,” *Curr. Biol.*, vol. 17, no. 6, pp. 562–568, 2007, doi: 10.1016/j.cub.2007.01.071.
- [127] M. C. Stankewich, C. D. Cianci, P. R. Stabach, L. Ji, A. Nath, and J. S. Morrow, “Cell organization, growth, and neural and cardiac development require a II-spectrin,” *J Cell Sci.*, vol. 124, no. Pt 23, pp. 3956–3966, 2011, doi: 10.1242/jcs.080374.
- [128] E. R. Lubbers *et al.*, “Defining new mechanistic roles for α I spectrin in cardiac function,” *J. Biol. Chem.*, vol. 294, no. 24, pp. 9576–9591, 2019, doi: 10.1074/jbc.RA119.007714.
- [129] A. Miazek *et al.*, “Age-dependent ataxia and neurodegeneration caused by an α II spectrin mutation with impaired regulation of its calpain sensitivity,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–18, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-86470-1.
- [130] H. Injury *et al.*, “Calpastatin Overexpression Protects against Excitotoxic Hippocampal Injury and Traumatic Spinal Cord Injury,” *J. Neurotrauma*, vol. 37, no. 21, pp. 2268–2276, 2020, doi: 10.1089/neu.2020.7122.
- [131] S. P. Chelko *et al.*, “Exercise triggers CAPN1-mediated AIF truncation, inducing myocyte cell death in arrhythmogenic cardiomyopathy,” *Sci Transl Med.*, vol. 13, no. 581, pp. 1–46, 2021, doi: 10.1126/scitranslmed.abf0891.
- [132] S. Li, J. Ma, J. Li, J. C. Lacefield, D. L. Jones, and T. Peng, “Over-expression of calpastatin attenuates myocardial injury following myocardial infarction by inhibiting endoplasmic reticulum stress,” vol. 10, no. 9, pp. 5283–5297, 2018, doi: 10.21037/jtd.2018.08.133.
- [133] J. Flores-toro *et al.*, “Critical Roles of Calpastatin in Ischemia/Reperfusion Injury in Aged Livers,” *Cells*, vol. 10, no. 8, p. 1863, 2021, doi: 10.3390/cells10081863.
- [134] L. Muniappan *et al.*, “Calpain Inhibition Attenuates Adipose Tissue Inflammation and Fibrosis in Diet-induced Obese Mice,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 14398, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-14719-9.
- [135] N. Disorders, N. S. Wales, N. S. Wales, and N. S. Wales, “CAST your vote: is calpain inhibition the answer to ALS?,” *J. Neurochem.*, vol. 137, no. 2, pp. 140–141, 2016, doi: 10.1111/jnc.13296.
- [136] “<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c6108?lang=pl®ion=PL> (16.05.2018-12:41).” .
- [137] “http://www.clontech.com/GD/Products/Cloning_and_Compentent_Cells/Competent_Cells/ibcGetAttachment.jsp?cItemId=29980&fileId=5899667&sitex=10020:22372:US (16.05.2018-11:43).” .
- [138] “<https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/230240.pdf> (16.05.2018-11:48).” .
- [139] R. McGonigal *et al.*, “The endogenous calpain inhibitor calpastatin attenuates axon degeneration in murine Guillain-Barré syndrome,” *J. Peripher. Nerv. Syst.*, vol. 28, no. 1, pp. 4–16, 2022, doi: 10.1111/jns.12520.
- [140] “<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c4874?lang=pl®ion=PL> (16.05.2018-12:41).” .

- [141] “<https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/sigma/p1431> (16.03.2023-11:10).” .
- [142] “<https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/mm/cc119> (07.09.2023-14:06).” .
- [143] “<https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/product/mm/14746m> (12.09.2023-11:38).” .
- [144] J. Skrzymowska, M. Zalas, T. M. Goszczyński, and A. Miazek, “An alpha II spectrin mutant peptide with unstable scaffold structure and increased sensitivity to calpain cleavage,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 581, pp. 68–73, 2021, doi: 10.1016/j.bbrc.2021.10.021.
- [145] “<https://eurx.com.pl/docs/specs/en/e0940.pdf> (28.04.2023-13:52).” .
- [146] J. Urrutia *et al.*, “The crossroad of ion channels and Calmodulin in disease,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 2, p. 400, 2019, doi: 10.3390/ijms20020400.
- [147] N. V. Valeyev, D. G. Bates, P. Heslop-Harrison, I. Postlethwaite, and N. V. Kotov, “Elucidating the mechanisms of cooperative calcium-calmodulin interactions: A structural systems biology approach,” *BMC Syst. Biol.*, vol. 2, p. 48, 2008, doi: 10.1186/1752-0509-2-48.
- [148] T. Griffith, K. Tsaneva-Atanasova, and J. R. Mellor, “Control of Ca²⁺ Influx and Calmodulin Activation by SK-Channels in Dendritic Spines,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 12, no. 5, p. e1004949, 2016, doi: 10.1371/journal.pcbi.1004949.
- [149] S. C. Salvage, Z. F. Habib, H. R. Matthews, A. P. Jackson, and C. L. H. Huang, “Ca²⁺-dependent modulation of voltage-gated myocyte sodium channels,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 49, no. 5, pp. 1941–1961, 2021, doi: 10.1042/BST20200604.
- [150] A. Tripathy, L. Xu, G. Mann, and G. Meissner, “Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor),” *Biophys. J.*, vol. 69, no. 1, pp. 106–119, 1995, doi: 10.1016/S0006-3495(95)79880-0.
- [151] M. Wahl and E. Gruenstein, “Intracellular free Ca²⁺ in the cell cycle in human fibroblasts: Transitions between G1 and G0 and progression into S phase,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 4, no. 3, pp. 293–302, 1993, doi: 10.1091/mbc.4.3.293.
- [152] C. Liu *et al.*, “Crosstalk between Ca²⁺ signaling and mitochondrial H₂O₂ is required for rotenone inhibition of mTOR signaling pathway leading to neuronal apoptosis,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 7, pp. 7534–7549, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.7183.
- [153] T. Yan and Y. Zhao, “Acetaldehyde induces phosphorylation of dynamin-related protein 1 and mitochondrial dysfunction via elevating intracellular ROS and Ca²⁺ levels,” *Redox Biol.*, vol. 28, p. 101381, 2020, doi: 10.1016/j.redox.2019.101381.
- [154] A. D. Poon *et al.*, “Ca²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II and Dimethyl Sulfoxide affect the sealing frequencies of transected hippocampal neurons,” *J Neurosci Res.*, vol. 96, no. 7, pp. 1208–1222, 2018, doi: 10.1002/jnr.24232.
- [155] M. Zalas, J. Skrzymowska, A. Miązek, and A. Miazek, “Progressive Ataxia, Memory Impairments, and Seizure Episodes in Spna2 R1098Q Mouse Variant Affecting Alpha II Spectrin’s Scaffold Stability,” *Brain sci.*, vol. 13, no. 2, p. 261, 2023, doi: 10.3390/brainsci13020261.
- [156] D. E. Wood and E. W. Newcomb, “Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 12, pp. 8309–8315, 1999, doi: 10.1074/jbc.274.12.8309.

- [157] M. Kato, T. Nonaka, M. Maki, H. Kikuchi, and S. Imajoh-Ohmi, "Caspases cleave the amino-terminal calpain inhibitory unit of calpastatin during apoptosis in human Jurkat T cells," *J. Biochem.*, vol. 127, no. 2, pp. 297–305, 2000, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022607.
- [158] B. T. Chua, K. Guo, and P. Li, "Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 7, pp. 5131–5135, 2000, doi: 10.1074/jbc.275.7.5131.
- [159] P. W. Vanderklish and B. A. Bahr, "The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states," *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 81, no. 5, pp. 323–339, 2004, doi: 10.1111/j.1365-2613.2000.00169.x.
- [160] N. B. Chauhan, "Chronic neurodegenerative consequences of traumatic brain injury," *Restor Neurol Neurosci.*, vol. 32, no. 2, pp. 337–65, 2014, doi: 10.3233/RNN-130354.
- [161] Z. Zhang, S. F. Larner, M. C. Liu, W. Zheng, R. L. Hayes, and K. K. W. Wang, "Multiple alphaII-spectrin breakdown products distinguish calpain and caspase dominated necrotic and apoptotic cell death pathways," *Apoptosis*, vol. 14, no. 11, pp. 1289–1298, 2009, doi: 10.1007/s10495-009-0405-z.
- [162] R. B. Carteri *et al.*, "Testosterone administration after traumatic brain injury reduces mitochondrial dysfunction and neurodegeneration," *J. Neurotrauma*, vol. 36, no. 14, pp. 2246–2259, 2019, doi: 10.1089/neu.2018.6266.
- [163] K. E. Saatman, B. Abai, A. Grosvenor, C. K. Vorwerk, D. H. Smith, and D. F. Meaney, "Traumatic axonal injury results in biphasic calpain activation and retrograde transport impairment in mice," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 23, no. 1, pp. 34–42, 2003, doi: 10.1097/01.WCB.0000035040.10031.B0.
- [164] M. A. Powell, R. T. Black, T. L. Smith, T. M. Reeves, and L. L. Phillips, "Mild fluid percussion injury induces diffuse axonal damage and reactive synaptic plasticity in the mouse olfactory bulb Melissa," *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 5, pp. 139–148, 2018, doi: 10.4049/jimmunol.1801473.The.
- [165] K. M *et al.*, "Targeting the nNOS/peroxynitrite/calpain system to confer neuroprotection and aid functional recovery in a mouse model of TBI," *Brain Res.*, vol. 1, no. 1630, pp. 159–70, 2016, doi: 10.1016/j.brainres.2015.11.015.
- [166] Y. Deng, B. M. Thompson, X. Gao, and E. D. Hall, "Temporal relationship of peroxynitrite-induced oxidative damage, calpain-mediated cytoskeletal degradation and neurodegeneration after traumatic brain injury," *Exp. Neurol.*, vol. 205, no. 1, pp. 154–165, 2007, doi: 10.1016/j.expneurol.2007.01.023.
- [167] K. Kurbatskaya *et al.*, "Upregulation of calpain activity precedes tau phosphorylation and loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease brain," *Acta Neuropathol. Commun.*, vol. 4, p. 34, 2016, doi: 10.1186/s40478-016-0299-2.
- [168] A. De Calignon *et al.*, "Caspase activation precedes and leads to tangles," *Nature*, vol. 464, no. 7292, pp. 1201–1204, 2010, doi: 10.1038/nature08890.
- [169] A. G. Porter and R. U. Jänicke, "Emerging roles of caspase-3 in apoptosis," *Cell Death Differ.*, vol. 6, no. 2, pp. 99–104, 1999, doi: 10.1038/sj.cdd.4400476.

- [170] E. M. Perkins *et al.*, “Loss of β -III spectrin leads to Purkinje cell dysfunction recapitulating the behavior and neuropathology of spinocerebellar ataxia type 5 in humans,” *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 14, pp. 4857–4867, 2010, doi: 10.1523/JNEUROSCI.6065-09.2010.
- [171] H. Morsy *et al.*, “Expanding SPTAN1 monoallelic variant associated disorders: From epileptic encephalopathy to pure spastic paraplegia and ataxia,” *Genet. Med.*, vol. 25, no. 1, pp. 76–89, 2023, doi: 10.1016/j.gim.2022.09.013.
- [172] B. Mansouri *et al.*, “Involvement of calpain in AMPA-induced toxicity to rat cerebellar Purkinje neurons,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 557, no. 2–3, pp. 106–114, 2007, doi: 10.1016/j.ejphar.2006.11.032.
- [173] J. C. Strahlendorf, K. McMahon, B. Border, P. Barenberg, R. Miles, and H. K. Strahlendorf, “AMPA-elicited dark cell degeneration of cerebellar Purkinje neurons has characteristics of apoptosis,” *Neurosci. Res. Commun*, vol. 25, no. 3, pp. 149–161, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1520-6769(199911/12)25:3<149::AID-NRC4>3.0.CO;2-S.
- [174] E. Adamec, M. L. Beermann, and R. A. Nixon, “Calpain I activation in rat hippocampal neurons in culture is NMDA receptor selective and not essential for excitotoxic cell death,” *Mol. Brain Res.*, vol. 54, no. 1, pp. 35–48, 1998, doi: 10.1016/S0169-328X(97)00304-5.
- [175] C. G. Markgraf *et al.*, “Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats,” *Stroke*, vol. 29, no. 1, pp. 152–158, 1998, doi: 10.1161/01.STR.29.1.152.
- [176] G. Lynch and M. Baudry, “Brain spectrin, calpain and long-term changes in synaptic efficacy,” *Brain Res. Bull.*, vol. 18, no. 6, pp. 809–815, 1987, doi: 10.1016/0361-9230(87)90220-6.
- [177] C. M. G. Gary Lynch, Christopher S. Rex, “LTP consolidation: Substrates, explanatory power, and functional significance,” *Neuropharmacology*, vol. 52, no. 1, pp. 12–23, 2007, doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.07.027.
- [178] R. Kassa *et al.*, “Proximal giant neurofilamentous axonopathy in mice genetically engineered to resist calpain and caspase cleavage of α -2 spectrin,” *J Mol Neurosci.*, vol. 47, no. 3, pp. 631–638, 2012, doi: 10.1007/s12031-011-9699-8.