

Rishikesh Kumar Gupta

Rola białka Stim2a w neuroprotekcji u danio pręgowanego

Abstrakt

Jony wapnia (Ca^{2+}) odgrywają istotną rolę w sygnalizacji każdej komórki eukariotycznej. Napływ Ca^{2+} do cytoplazmy pochodzi albo z retikulum endoplazmatycznego (ER), głównego magazynu tych jonów, albo ze środowiska zewnętrznego. Ponowne napełnianie tych magazynów jest możliwe dzięki napływowi wapnia w procesie (SOCE, ang. *Store operated calcium entry*, dawniej zwanym CCE, pojemnościowym napływem wapnia; ang. *Capacitative calcium entry*); (Putney 1986). SOCE polega na wykrywaniu obniżonego poziomu Ca^{2+} w ER przez białka sensoryczne STIM i aktywacji przez nie kanałów Orai/TRP zlokalizowanych w błonie komórkowej (Hartmann i wsp. 2014, Shin i wsp. 2016), przez co te jony dostają się do cytoplazmy, a następnie są przenoszone do ER przez pompę wapniową zależną od ATP (SERCA). Białka STIM zostały zidentyfikowane w naszym laboratorium w hodowlach pierwotnych komórek nerwowych ssaków i pokazaliśmy ich udział w sygnalizacji Ca^{2+} (przegląd w (Majewski i wsp. 2015, Wegierski i wsp. 2018)). Ze względu na wczesną śmiertelność nokautu Stim2 u myszy (Berna-Erro i wsp. 2009, Garcia-Alvarez i wsp. 2015) obserwacje potwierdzające udział SOCE w homeostazie neuronalnego Ca^{2+} i jego wpływ na behavior nie mogły być potwierdzone *in vivo* (Berna-Erro i wsp. 2009, Garcia-Alvarez i wsp. 2015).

Danio pręgowany posiada dwie izoformy STIM2 – Stim2a i Stim2b kodowane przez *stim2a* i *stim2b*. Stosując technikę CRISPR/Cas9, stworzono zmutowaną linię danio pręgowanego *stim2a*, która była żywotna. W niniejszym badaniu wykazano, że delecja *stim2a* powodowała wyraźne zmiany behawioralne u larw *stim2a*^{-/-} danio pręgowanego, np. zaobserwowano nadpobudliwość, wzrost tigmotaksji (tj. preferencję do pozostawania blisko krawędzi naczynia) w porównaniu z WT. Ponadto, w larwach *stim2a*^{-/-} stwierdzono zmniejszenie fototaksji w porównaniu z WT. Jednocześnie, larwy *stim2a*^{-/-} danio pręgowanego reagowały na zmiany światła i wykazywały wyższą aktywność w fazie niskiej aktywności w teście odpowiedzi wzrokowo-ruchowej (VMR). Aby ustalić związek między zachowaniem a zmianami w komórce mierzono *in vivo* poziom fluorescencji sondy wapniowej - GCaMP5G. Zaobserwowano wzrost częstotliwości

oscylacji Ca^{2+} w neuronach w osłonie wzrokowej larw danio pręgowanego *stim2a*^{-/-} w porównaniu z WT. Po potraktowaniu larw glutaminianem aktywność Ca^{2+} w neuronach mierzona *in vivo* wykazywała wzrost częstotliwości oscylacji Ca^{2+} . Przeprowadzono sekwencjonowanie RNA nowej generacji i analizę różnicowej ekspresji genów. Znalezione łącznie 392 geny, które wykazywały ≥ 2 -krotną zmianę w *stim2a*^{-/-} danio pręgowanego. Spośród tych 392 genów 86% genów było regulowanych w górę, a 14% w dół. Wśród genów o zróżnicowanej ekspresji, były też geny kodujące białka zaangażowane w CaTK: *anxa3a*, *grinab*, *hp*, *hpca*, *mast2*, *pkn3*, *pvalb7* i *slc25a25b*. Wskazuje to, że ekspresja genów kodujących białka zaangażowane w homeostazę Ca^{2+} jest zaburzona w neuronach *stim2a*^{-/-} danio pręgowanego. Następnie przeprowadzono analizę ekspresji genów w populacji pojedynczych komórek pochodzenia neuronalnego izolowanych z mózgu larw (scRNASeq). W komórkach z larw WT zidentyfikowano w oparciu o geny markerów komórkowych 13 klastrow, reprezentujących różne typy komórek. Jedenaście z nich zidentyfikowano jako określony typ neuronów, a dwa jako nieznane. Dalsza analiza wykazała 88 unikalnych genów CaTK ze wszystkich skupisk komórek neuronalnych; mogą one być zaangażowane w sygnalizację neuronalną Ca^{2+} . W każdym skupisku komórek neuronalnych liczba i rodzaj tych genów były różne. W podwójnym mutancie (*stim2a;stim2b*)^{-/-} w oparciu o komórkowe geny markerowe zidentyfikowano 15 klastrow reprezentujące różne typy komórek pochodzenia neuronalnego. We wszystkich skupiskach komórek zidentyfikowano łącznie 102 unikalne CaTK geny. Sześć typów komórek zidentyfikowano zarówno w WT, jak i podwójnym mutancie (*stim2a;stim2b*)^{-/-}. Pomimo tego samego typu geny CaTK w tych sześciu klastrach wykazywały niejednorodność. Cztery z ośmiu genów CaTK (*grinab*, *hpca*, *mast2* i *pvalb7*), których ekspresja oznaczona przy pomocy sekwencjonowania RNA była znacząco podwyższona w próbach mózgow mutantu *stim2a*^{-/-}, zidentyfikowano metodą scRNA w kilku klastrach komórek neuronalnych. Pozostałe cztery geny (*anxa3a*, *hp*, *pkn3* i *slc25a25b*) z podwyższoną ekspresją w mózgu larw *stim2a*^{-/-}, nie zostały zidentyfikowane w komórkach ekspresjonujących GCaMP5G. To sugeruje, że geny te wykazują ekspresję przede wszystkim w komórkach innych, niż komórki pochodzenia neuronalnego. Ta interpretacja wydaje się uzasadniona, ponieważ niedawno w naszym laboratorium odkryto, że gen *anxa3a* był podwyższony w populacji komórek nieekspresjonujących GCaMP5G, oddzielonych przez FACS z podwójnego mutantu (*stim2a;stim2b*)^{-/-}.