

**Filip Maciąg**

**Rola białek STIM i ORAI w wybranych aspektach fizjologii  
neuronów**

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

Promotor: prof. dr hab. Jacek Kuźnicki

Promotor pomocniczy: dr inż. Łukasz Majewski

Studium Medycyny Molekularnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Laboratorium Neurodegeneracji

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie



**Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego**

Warszawa 2020

podpis Promotora: *Jacek Kuźnicki*  
podpis Promotora pomocniczego: *Łukasz Majewski*  
podpis Kandydata: *Filip Maciąg*



## Streszczenie

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zbadanie, jak białka biorące udział w tzw. pojemnościowym napływie jonów wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ , ang. *store-operated calcium entry*, SOCE) wpływają na funkcje neuronów, w szczególności na przekaźnictwo synaptyczne i homeostazę  $\text{Ca}^{2+}$ . W komórkach niebudliwych, a więc niezdolnych do wytworzenia potencjału czynnościowego, SOCE jest jednym z głównych mechanizmów umożliwiających napływ  $\text{Ca}^{2+}$  ze środowiska zewnątrzkomórkowego. Jednakże, w ostatnich latach stwierdzono jego aktywność również w neuronach. Pomimo stale prowadzonych badań na temat fizjologicznej roli neuronalnego SOCE, proces ten pozostaje słabo poznany w tym typie komórek. Kluczowym organelum w mechanizmie SOCE jest siateczka śródplazmatyczna (ang. *endoplasmic reticulum*, ER), będąca głównym magazynem  $\text{Ca}^{2+}$  w komórce. W przypadku wypływu  $\text{Ca}^{2+}$  z ER do cytoplazmy, na skutek otwarcia odpowiednich kanałów, lokalny spadek stężenia tych jonów powoduje aktywację białek STIM (ang. *stromal interaction molecule*). W konsekwencji, białka te przemieszczają się do błony komórkowej i poprzez oddziaływanie z wysoce selektywnymi na jony  $\text{Ca}^{2+}$  kanałami ORAI, powodują ich otwarcie. Napływające przez kanały ORAI jony wapnia stwarzają pulę do ich ponownego napływu do ER oraz inicjują kaskady sygnałowe prowadzące m.in. do aktywacji ekspresji określonych genów.

Jako model badawczy zastosowano transgeniczne linie myszy z pojedynczą nadprodukcją białek STIM1, STIM2 lub ORAI1 w neuronach mózgu, a także transgeniczną linię STIM2/ORAI1 z nadprodukcją obu tych białek. W doświadczeniach wykorzystywałem metody elektrofizjologiczne oraz przyżyciowe obrazowanie  $\text{Ca}^{2+}$ . Obie techniki wykonywane były *ex vivo*, przy użyciu skrawków tkanki nerwowej izolowanych z hipokampa. Analizowane parametry homeostazy  $\text{Ca}^{2+}$  nie wykazały istotnych zmian w neuronach z nadprodukcją białek STIM1 ani STIM2. Wraz z otrzymanymi wspólnie ze współautorami jednej z publikacji wynikami, wskazującymi na zaburzenia w długoterminowej plastyczności synaptycznej w neuronach hipokampalnych linii Tg(STIM1)lbd, rezultaty przeprowadzonych przeze mnie doświadczeń

sugerują złożoną rolę białka STIM1 w neuronach, potencjalnie niezależną od jego funkcji jako aktywatora kanałów ORAI.

Na podstawie uzyskanych w naszym Laboratorium wyników oraz zgodnie z tzw. wapniową hipotezą starzenia (ang. *calcium hypothesis of ageing*) oczekiwano, że jednoczesna nadprodukcja białek STIM2 oraz ORAI1 w neuronach mózgu spowoduje zwiększone spoczynkowe stężenie  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie i w konsekwencji przyspieszy procesy neurodegeneracyjne. Okazało się jednak, że podstawowe właściwości elektrofizjologiczne neuronów hipokampalnych w linii STIM2/ORAI1 były tylko nieznacznie zmienione w porównaniu do tych parametrów u myszy typu dzikiego. Przeprowadzone badania nie wykazały zwiększonego spoczynkowego stężenia  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie. Zaobserwowano jednak niewielkie zaburzenia ich homeostazy w odpowiedzi na fizjologiczny bodziec w postaci stymulacji roztworem neuroprzekaźnika, kwasu glutaminowego. Podobny efekt zidentyfikowano w przypadku pojedynczej linii transgenicznej ORAI1. Co ciekawe, w toku badań nad transgeniczną linią ORAI1 odnotowano spontaniczne pojawianie się napadów drgawkowych u starzejących się samic tej linii. Obserwacje te zweryfikowano w badaniach elektrofizjologicznych, wykazując zmiany w reakcji komórek piramidowych rejonu CA3 ze skrawków hipokampalnych na chemiczną indukcję wyładowań epileptycznych. Efekt ten nie wystąpił u transgenicznych samców w podobnym wieku. Ponadto, wykazano obecność niewielkich zaburzeń synaptycznych w neuronach hipokampalnych linii Tg(ORAI1)*I*bd, które występowały u dorosłych samic transgenicznych, nie były natomiast obecne u samców ani młodych samic.

Podsumowując, przeprowadzone przeze mnie doświadczenia potwierdzają zaangażowanie białek SOCE w utrzymywanie neuronalnej homeostazy wapniowej oraz w bazowe przekąźnictwo synaptyczne. Uzyskane wyniki wskazują także na udział białek ORAI w mechanizmach prowadzących do występowania napadów padaczkowych. Ponadto, opublikowane przez nas prace stanowią pierwsze doniesienie sugerujące rolę płci w procesach zależnych od funkcjonowania neuronalnego białka ORAI.