

mgr Iga Wasilewska

Rola białka Stim2 w procesie neurodegeneracji u *Danio rerio*

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu

w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. Jacek Kuźnicki

Laboratorium Neurodegeneracji

Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2020

Wasilewska
[Signature]

Białka STIM są zlokalizowane w błonie siateczki śródplazmatycznej, gdzie działają jako czujniki poziomu jonów wapnia (Ca^{2+}). Podstawową funkcją tych białek jest regulacja procesu pojemnościowego napływu wapnia (SOCE), który pozwala na napływ Ca^{2+} do komórki, gdy ich poziom w ER obniża się. Napływ Ca^{2+} odbywa się za pośrednictwem obecnych w błonie plazmatycznej kanałów Orai lub kanałów z rodziny receptorów przejściowego potencjału, które by przejść w stan otwarty wymagają interakcji z białkami STIM. Wysoki poziom STIM2 zaobserwowano w centralnym układzie nerwowym gryzoni, a jego obecność jest konieczna dla funkcjonowania SOCE w neuronach. Zmiany w poziomie tego białka obserwuje się w różnych chorobach neurodegeneracyjnych, jak choroba Alzheimera i padaczka. Jednak, mimo rosnącej liczby badań dotyczących STIM2, funkcje jakie to białko pełni w neuronach, np. w jaki sposób wpływa na behavior czy procesy neurodegeneracyjne, wciąż nie są poznane. Większość badań prowadzona jest bowiem z użyciem hodowli komórkowych, co nie oddaje w pełni procesów zachodzących w żywych organizmach. Celem niniejszej pracy było określenie roli białka Stim2b w neuronach danio pręgowanego (łac. *Danio rerio*). Zbadano zachowanie larw *stim2b*^{-/-}, zmiany w ekspresji genów, aktywność neuronów oraz wpływ czynników, które mogą prowadzić do zmian neurodegeneracyjnych.

Aby zbadać wpływ braku Stim2b na zachowanie wykorzystano testy behawioralne, podczas których rejestrowano aktywność larw *stim2b*^{-/-} oraz typu dzikiego (WT). Podczas niektórych eksperymentów ryby umieszczano w szalkach zawierających pentetrazol (PTZ) lub glutaminian. Ekspresję genów oznaczano przy użyciu ilościowej reakcji PCR oraz sekwencjonowania RNA. Aktywność neuronów mierzono *in vivo* na podstawie zmian w poziomie Ca^{2+} w poszczególnych komórkach w części pokrywy wzrokowej. Do tej analizy wykorzystywano mikroskop Lightsheet Z1 oraz larwy *stim2b*^{-/-} i *stim2b*^{+/+} wykazujące neuronalną ekspresję sondy Ca^{2+} , GCaMP5G, w cytozolu.

Analiza bioinformatyczna połączona z analizą ekspresji genów w larwach i osobnikach dorosłych wykazała obecność transkryptów 444 genów kodujących białka wpływające na homeostazę wapniową i przekazywanie sygnałów Ca^{2+} w mózgu danio pręgowanego, w tym genów kodujących białka biorące udział w SOCE. Ryby *stim2b*^{-/-} nie wykazywały zwiększonej śmiertelności w żadnym z etapów rozwoju, nie zaobserwowaliśmy też

poważnych zmian morfologicznych. Widoczne są natomiast duże różnice m.in. w aktywności motorycznej mutantów. Larwy *stim2b^{-/-}* wykazały o wiele wyższy poziom aktywności, niż larwy WT. Zwiększona była także częstotliwość sygnałów wapniowych w neuronach w mózgu tych ryb. Może to wskazywać na podniesioną pobudliwość neuronów ryb *stim2b^{-/-}*, co sugeruje większą podatność na drgawki. Co więcej, analizując zachowanie larw, wykryłam różnice w reakcji tych ryb na zarówno PTZ, jak i glutaminian. Mutanty *stim2b^{-/-}* reagowały silniej na traktowanie glutaminianem lub 1.5 mM PTZ, niż ryby dzikie. Jednak w przypadku dziesięciokrotnie wyższej dawki PTZ (15 mM), zaobserwowaliśmy słabszą reakcję mutantów. Analiza ekspresji genów wykazała zmiany w poziomie transkryptów dla kilku białek zaangażowanych w rozwój i funkcjonowanie układu nerwowego takich, jak m.in. *smc1a*, *anxa3a*, *rrm2* i *homer2*. Podsumowując, brak Stim2b zaburza funkcjonowanie neuronów w mózgu danio, co ujawnia się m.in. w testach behawioralnych. Zaobserwowane zmiany mogą wskazywać na związek tego białka z procesami prowadzącymi do zmian chorobowych, w tym np. padaczki.