

## **Rola izoform białka STIM2 w regulacji neuronalnych kanałów wapniowych w danio pręgowanym**

Jony wapnia pełnią ważną rolę w sygnalizacji w komórce. W wyniku aktywacji komórki w cytoplazmie wzrasta poziom tych jonów, co uruchamia wewnątrzkomórkowe procesy, prowadzące do wykonania przez komórkę jej funkcji. Jony wapnia napływają do cytoplazmy albo z magazynów o nazwie ER (retikulum endoplazmatyczne), albo ze środowiska otaczającego komórkę przez kanały wapniowe znajdujące się w jej błonie. Uzupełnienie jonów wapnia w ER odbywa się w procesie tzw. pojemnościowego napływu wapnia. Proces ten polega na tym, że białka sensoryczne w ER o nazwie STIM, czują kiedy w ER jest tych jonów zbyt mało i powodują otwarcie kanałów wapniowych znajdujących się w błonie komórki. Takimi kanałami są ORAI oraz TRP. Regulacja poziomu wapnia jest szczególnie istotna dla funkcjonowania układu nerwowego, ponieważ aktywność komórek nerwowych, tj. uwalnianie przez nie neuroprzekazników, ekspresja genów oraz zmiany morfologiczne kolców dendrytycznych są od niego zależne. STIM2 jest dominującą formą w mózgu, ale jego funkcje w przeciwieństwie do STIM1 są mało poznane. W literaturze sugeruje się, że STIM1 może reagować nie tylko na zmiany poziomu wapnia wewnątrz ER, ale także aktywować napływ wapnia do komórki w odpowiedzi na czynniki, takie jak stres oksydacyjny lub zmiany temperatury. Do tej pory nie prowadzono badań, które pozwoliłyby stwierdzić, czy STIM2 posiada takie właściwości i jeśli tak, to który kanał otwiera się pod jego wpływem. Celem projektu jest zidentyfikowanie kanałów wchodzących w interakcje ze STIM2, które poza regulacją pojemnościowego napływu wapnia uczestniczą w reakcji komórki na zmiany temperatury lub stres oksydacyjny.

Badania planujemy przeprowadzić na rybie z gatunku danio pręgowany, która ma dwie postacie sensora o nazwie Stim2 (a i b). Stosując technikę CRISPR/Cas9, uzyskaliśmy linie ryb, które są pozbawione albo Stim2a albo Stim2b. W pierwszym etapie projektu, przy pomocy hybrydyzacji *in situ* oraz barwień immunohistochemicznych zlokalizujemy występowanie białek Stim2a i Stim2b oraz kanałów Orai i wybranych kanałów Trp w larwach danio oraz w skrawkach mózgu dorosłych ryb. Zbadamy, jak brak poszczególnych form Stim2 wpływa na podstawowe parametry homeostazy wapniowej - spontaniczną aktywność, a także reakcję na czynniki stresowe, takie jak podwyższenie temperatury czy stres oksydacyjny. Korzystając z przezroczystości danio na wczesnych etapach rozwoju, zamierzamy przyżyciowo obrazować zmiany poziomu wapnia w neuronach ryb wykazujących ekspresję sondy wapniowej GCaMP5G w komórkach neuronalnych. Pomiar wapnia będziemy także prowadzić w hodowlach pierwotnych neuronów z danio, co pozwoli na uzupełnienie informacji, których nie mogą dostarczyć eksperymenty *in vivo*.

W celu identyfikacji kanału oddziałującego ze Stim2 planujemy przeprowadzić immunoprecypitację, a następnie zidentyfikować związane białka za pomocą spektrometrii mas. Wyniki tej analizy będą potwierdzane m.in. metodą Western blot, a kolokalizacja białek Stim2 z potencjalnymi docelowymi kanałami, metodą ligacji zblizeniowej. Interakcja między kanałami wapniowymi a Stim2a lub Stim2b będzie wywoływana przez poddanie larw danio lub hodowli neuronów bodźcom stresowym, takim jak podwyższenie temperatury czy stres oksydacyjny lub indukcję pojemnościowego napływu wapnia. W celu określenia fenotypu spowodowanego brakiem Stim2 zanalizujemy ruchliwość i reakcję larw na światło oraz zachowanie osobników dorosłych w nowym środowisku i w testach pozwalających na ocenę ich zdolności poznawczych. Metodą RNA-Seq przeprowadzimy analizę poziomu różnych mRNA, aby zidentyfikować geny, których ekspresja ulega zmianie w liniach pozbawionych Stim2. W końcowej fazie projektu spróbujemy przywrócić prawidłowy fenotyp w hodowanych neuronach pochodzących z tych linii przez ekspresję brakujących białek Stim2.

Homeostaza Ca<sup>2+</sup> jest zaburzona w wielu schorzeniach neurodegeneracyjnych, w tym w badanych przez nas modelach chorób Alzheimera, Parkinsona i Huntingtona. Badania nasze i innych zespołów wskazują na znaczącą rolę STIM2 w patologii choroby Alzheimera. Zrozumienie zatem funkcji białek Stim i ich udziału w regulacji homeostazy wapniowej u ryby danio pręgowanego pozwoli stworzyć w przyszłości modele różnych chorób neurodegeneracyjnych, w których występują zaburzenia homeostazy wapniowej.