

Mgr Magdalena Kędra

**Charakterystyka zmian molekularnych, neuroanatomicznych oraz
behawioralnych w modelu stwardnienia guzowego
w danio pręgowanym *tsc2*^{vu242/vu242}**

Praca doktorska wykonana w Pracowni Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej
Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

Promotor: Prof. dr hab. Jacek Jaworski

Promotor pomocniczy: dr Justyna Zmorzyńska



Warszawa, 2021

Oświadczenie autora

Ja, niżej podpisana(-y) Magdalena Kędra wyrażam zgodę na przechowywanie i udostępnianie mojej pracy doktorskiej pt. „Charakterystyka zmian molekularnych, neuroanatomicznych oraz behawioralnych w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym *tsc2^{vu242/vu242}*” przez Bibliotekę Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w formie drukowanej, w czytelni oraz w ramach wypożyczeń międzybibliotecznych, na zasadach dozwolonego użytku.

Jednocześnie udzielam Bibliotece Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN nieodpłatnej licencji niewyłącznej na korzystanie z w. w. pracy bez ograniczeń czasowych i terytorialnych na następujących polach eksploatacji:

- 1) umieszczenie treści pracy w formie pliku pdf wraz z metadanymi, w repozytorium cyfrowym RCIN (*Repozytorium Cyfrowe Instytutów Naukowych*, kolekcja: *Instytut Biologii Doświadczalnej PAN/ Prace dyplomowe*) znajdującym się pod adresem: <https://rcin.org.pl/dlibra/collectiondescription/121>
- 2) zwielokrotnienie utworu techniką cyfrową (digitalizacja pracy w przypadku konieczności zeskanowania wersji drukowanej)

Warszawa, dnia

Podpis.....

Wykonanie niniejszej pracy było możliwe dzięki wsparciu finansowemu udzielonemu przez:

Narodowe Centrum Nauki

Grant ETIUDA (2020/36/T/NZ3/00132)

Grant SONATA (2015/17/D/NZ3/03735)

PODZIĘKOWANIA

Chciałabym podziękować wszystkim tym, bez których pomocy oraz wsparcia realizacja niniejszej pracy doktorskiej nie byłaby możliwa.

Dziękuję:

Prof. dr hab. Jackowi Jaworskiemu, za umożliwienie mi pracy w swoim zespole badawczym oraz za całokształt opieki promotorskiej. Dziękuję za cenne rady oraz wsparcie przez cały okres mojego doktoratu, a także za cierpliwość oraz wszystkie uwagi i sugestie, które przyczyniły się do powstania niniejszej pracy doktorskiej w obecnym kształcie.

Dr Justynie Zmorzyńskiej, za wprowadzenie mnie do świata danio pręgowanego i podzielenie się całą wiedzą i doświadczeniem, dzięki którym mogłam zrealizować mój projekt doktorski. Dziękuję za wspólną pracę w atmosferze przyjaźni, za nieustające wsparcie oraz motywację do działania, a także za wszystkie cenne wskazówki podczas pisania niniejszej pracy doktorskiej.

Koleżankom i Kolegom z Laboratorium Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej, za wspólnie spędzony czas zarówno podczas pracy, jak i poza nią, za bezinteresowną pomoc oraz tworzenie wspaniałej, serdecznej atmosfery. Dziękuję szczególnie Oli Tempes, Agnieszce Brzozowskiej oraz Karolinie Bogusz za codzienne rozmowy o życiu oraz wzajemne podtrzymywanie się na duchu podczas niepowodzeń eksperymentalnych. Dziękuję również Matyldzie M., Ewie L., Gosi U. za dzielenie się ekspertyzą i wszystkie porady naukowe oraz nienaukowe.

Panie Profesorze, Justyno, Koleżanki i Koledzy praca z Wami była zaszczytem i przyjemnością.

Pracownikom Pracowni Danio Pręgowanego, za wsparcie merytoryczne i techniczne w pracy z danio pręgowanym oraz pomoc w utrzymywaniu w dobrostanie wszystkich używanych przeze mnie rybek.

Kamilowi, Rodzicom i Siostrze, za nieustające wsparcie, wszelką pomoc i wiarę w moje możliwości.

STRESZCZENIE

Stwardnienie guzowate to rzadka, wielonarządowa choroba genetyczna charakteryzująca się wysoce zmiennym obrazem klinicznym. W schorzeniu tym obserwuje się liczne dysplazje komórkowe i tkankowe obejmujące m.in. skórę, różne narządy wewnętrzne oraz ośrodkowy układ nerwowy. Co więcej, charakterystyczne zmiany neuropatologiczne rozwijają się już w życiu płodowym. Pacjenci ze stwardnieniem guzowatym wykazują również objawy neurologiczne, takie jak epilepsja. Równie ważnym, choć często pomijanym w diagnozie i leczeniu, aspektem stwardnienia guzowatego są zaburzenia o podłożu neuropsychiatrycznym (ang. *TSC associated neuropsychiatric disorders*; TANDs). Patogeneza tego schorzenia opiera się na nadmiernej aktywności szlaku kinazy mTOR, spowodowanej mutacją w genach *TSC1* lub *TSC2*. Celem przeprowadzonych w niniejszej rozprawie badań była charakterystyka zmian neuroanatomicznych, behawioralnych i molekularnych w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym (*tsc2^{vu242/vu242}*), a także zbadanie działania wybranych związków farmakologicznych na zaobserwowane fenotypy. W pierwszej części pracy udowodniono, że homozygotyczne mutanty *tsc2^{vu242/vu242}* wykazują zmiany w aktywności lokomotorycznej, co jest związane z nadmierną aktywnością szlaku mTORC1 oraz napadami padaczkowymi. Ponadto, na podstawie pogłębionej analizy behawioralnej, stwierdzono, że larwy *tsc2^{vu242/vu242}* wykazują fenotypy podobne do niektórych zaburzeń z grupy TANDs, takie jak nasilony lęk oraz zaburzenia funkcji poznawczych. Analiza ilościowa poziomu kortyzolu pozwoliła dodatkowo potwierdzić hipotezę o podwyższonym lęku w badanym przeze mnie modelu doświadczalnym. W drugiej części pracy zbadano patologie związane z wybranymi obwodami neuronalnymi w mózgu mutantów *tsc2^{vu242/vu242}* i wykazano zaburzenia morfologii spoidła przedniego oraz problemy z ukierunkowanym wzrostem aksonów. Zaburzenia te współistniały ze zmienionym poziomem mRNA genów szlaku Dock-Elmo-Rac1, zaangażowanego m.in. w proces wydłużania aksonów, wskazując molekularne podłoże obserwowanych zmian neuroanatomicznych. Wskazano również na prawdopodobne zaburzenia równowagi neurotransmisji hamującej, która jest wymieniana, jako jedna z przyczyn inicjacji napadów padaczkowych oraz rozwoju niepełnosprawności intelektualnej u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym. Co więcej, zbadano wpływ powszechnie stosowanych w klinice leków, rapamycyny i wigabatryny, na wybrane zmiany neurologiczne oraz behawioralne. Rapamycyna była skuteczna zarówno przy fenotypach behawioralnych, jak i nieprawidłowościach neuroanatomicznych w spoidle przednim mózgu. Wigabatryna odwracała fenotypy odzwierciedlające napady padaczkowe, ale nie polepszyła parametrów związanych z nasilonym lękiem u mutantów *tsc2^{vu242/vu242}*. Oprócz tego zidentyfikowano nowy związek, ANA-12, jako potencjalny lek w stwardnieniu guzowatym. Wpływał on pozytywnie na niektóre aspekty zachowania związanego z lękiem, a także był skuteczny w poprawie morfologii spoidła przedniego.

SUMMARY

Tuberous sclerosis complex (TSC) is a rare genetic disease characterized by a highly variable clinical picture. Numerous cellular and tissue dysplasias are observed in this disease in multiple organs, including the central nervous system. Some of these characteristic neuropathological changes can already be detected during fetal development. Patients with TSC also exhibit neurological symptoms such as epilepsy which often develop during the first two years of life. Equally important but often overlooked manifestations of this disease are TSC-associated neuropsychiatric disorders (TANDs). The TSC pathogenesis results mainly from hyperactivity of the mTORC1 pathway caused by loss-of-function mutations in *TSC1* or *TSC2* genes. This work aims to characterize neuroanatomical, behavioral, and molecular changes in the zebrafish model of TSC *tsc2^{vu242/vu242}*, and investigate the effects of selected drugs on the observed phenotypes. In the first part of this thesis, I showed that homozygous mutants exhibit alterations in locomotor activity, associated with hyperactivity of the mTORC1 pathway and seizures. Furthermore, based on in-depth behavioral analysis, it was found that *tsc2^{vu242/vu242}* larvae exhibit phenotypes similar to TANDs, such as increased anxiety and cognitive impairment. The quantitative analysis of cortisol levels further supported the hypothesis of increased anxiety in this model. The second part of the study examined pathologies of the selected neuronal circuits in the brain of *tsc2^{vu242/vu242}* mutants identifying disturbances in the morphology of the anterior commissure and the directed axonal growth leading to impaired axon fasciculation. These abnormalities coexisted with altered mRNA levels of genes of the Dock-Elmo-Rac1 pathway, which is involved e.g., in axon elongation, indicating a molecular basis for the observed neuroanatomical changes. Molecular analysis also revealed the probable disturbance of inhibitory neurotransmission, which is one of the reasons for the initiation of epileptic seizures and the development of intellectual disability in the TSC patients. Furthermore, the effects of the TSC clinical drugs, rapamycin and vigabatrin, on selected neurological and behavioral changes were examined. Rapamycin was effective in rescuing both behavioral phenotypes and neuroanatomical abnormalities in the anterior commissure of the brain in the *tsc2^{vu242/vu242}* mutants. Vigabatrin reversed phenotypes reflecting seizures but did not improve the parameters associated with increased anxiety in the *tsc2^{vu242/vu242}* mutants. In addition, a novel compound, ANA-12, was identified as a potential treatment for TSC-related symptoms, as it had a positive effect on some aspects of anxiety-related behavior and improved anterior commissure morphology.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	11
1. WSTĘP	15
1.1 Patofizjologia stwardnienia guzowatego	15
1.1.1 Objawy stwardnienia guzowatego w ośrodkowym układzie nerwowym ...	16
1.1.2 Objawy neuropsychiatryczne w stwardnieniu guzowatym (TANDs).....	17
1.1.3 Kliniczne leczenie farmakologiczne stwardnienia guzowatego.....	18
1.2 Modele zwierzęce w stwardnieniu guzowatym	20
1.3 Molekularne podstawy stwardnienia guzowatego.....	22
1.3.1 Budowa kompleksu białkowego TSC1-TSC2.....	22
1.3.2 Ścieżka kanoniczna TSC1-TSC2-mTORC1.....	23
1.4 Rozwój neuronów w stwardnieniu guzowatym.....	25
1.4.1 Kompleks TSC1-TSC2 w różnicowaniu i migracji neuronów	26
1.4.2 Kompleks TSC1-TSC2 w rozwoju aksonów.....	28
1.4.3 Kompleks TSC1-TSC2 w dendryto- i synaptogenezie oraz funkcjonowaniu synaps.....	30
1.5 Wybrane szlaki sygnałowe ważne dla rozwoju neuronów	34
1.5.1 Szlak DOCK-ELMO-RAC	34
1.5.2 Szlak BDNF-TrkB.....	36
1.6 Danio pręgowany w badaniach zaburzeń układu nerwowego	37
1.6.1 Danio pręgowany, jako organizm modelowy	37
1.6.2 Rozwój i organizacja układu nerwowego w danio pręgowanym	40
1.6.3 Przydatność danio pręgowanego w badaniach chorób ośrodkowego układu nerwowego	45
1.7 Modele stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym.....	48
2. CELE PRACY	52
3. MATERIAŁY I METODY	53
3.1 Najczęściej stosowane materiały i odczynniki.....	53
3.2 Związki farmakologiczne	55
3.3 Linie danio pręgowanego.....	56
3.4 Hodowla Danio pręgowanego.....	57
3.4.1 Warunki hodowli dorosłych ryb.....	57
3.4.2 Warunki hodowli larw	57

3.4.3	Traktowanie larw roztworami związków farmakologicznych	58
3.5	Genotypowanie larw linii <i>tsc2^{vu242}</i>	58
3.5.1	Reakcja PCR	59
3.5.2	Analiza profilu topnienia matrycy w wysokiej rozdzielczości HRM	61
3.6	Metody pracy z kwasami nukleinowymi	62
3.6.1	Izolacja genomowego DNA.....	62
3.6.2	Izolacja mRNA i synteza cDNA	62
3.6.3	Reakcja ddPCR (ang. <i>Digital Droplet PCR</i>)	63
3.6.4	Jednoetapowa ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym (ang. <i>one-step real-time quantitative PCR</i>).....	64
3.6.5	Analiza ilościowa oraz jakościowa DNA i RNA.....	66
3.7	Metody pracy z białkami	66
3.7.1	Izolacja białek z tkanek larw linii <i>tsc2^{vu242}</i>	66
3.7.2	Elektroforeza białek w warunkach denaturujących SDS-PAGE	67
3.7.3	Technika Western Blot	67
3.7.4	Izolacja kortyzolu z larw <i>tsc2^{vu242}</i> oraz ELISA	68
3.8	Testy behawioralne.....	68
3.8.1	Warunki wspólne dla wszystkich testów behawioralnych.....	68
3.8.2	Podstawowy test aktywności lokomotorycznej.....	69
3.8.3	Test jasnego-ciemnego pola (ang. <i>light-dark box test</i>)	69
3.8.4	Test w otwartym polu (ang. <i>open-field test</i>)	69
3.8.5	Test badający reakcję na nagłe zmiany oświetlenia	69
3.8.6	Test badający reakcję ucieczki oraz habituację larw w odpowiedzi na nagły, powtarzający się bodziec świetlny	70
3.9	Barwienia immunofluorescencyjne pełnego przekroju (ang. <i>whole-mount antibody staining</i>)	70
3.9.1	Przygotowanie materiału do barwień oraz protokół barwienia.....	70
3.9.2	Izolacja mózgów oraz przygotowanie preparatów do obrazowania.....	71
3.10	Techniki mikroskopowe.....	71
3.10.1	Akwizycja obrazów mikroskopowych	71
3.10.2	Analiza obrazu mikroskopowego.....	72
3.10.3	Analiza szerokości spoidła przedniego	72
3.10.4	Analiza morfologii neuronów w 3D	72
3.10.5	Analiza poziomu dekarboksylazy glutaminianowej (GAD).....	73

3.11 Analiza statystyczna	74
4. WYNIKI	75
4.1 Analiza podstawowych zdolności lokomotorycznych modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym oraz zbadanie wpływu wybranych substancji farmakologicznych na obserwowane fenotypy	75
4.1.1 Analiza podstawowych zdolności lokomotorycznych larw linii <i>tsc2^{vu242}</i> ..	76
4.1.2 Analiza wpływu hamowania aktywności szlaku mTORC1 za pomocą rapamycyny na zdolności lokomotoryczne larw linii <i>tsc2^{vu242}</i> oraz analiza biochemiczna działania rapamycyny na aktywację mTORC1	78
4.1.3 Analiza zachowania larw <i>tsc2^{vu242}</i> pod kątem napadów drgawkowych	82
4.2 Analiza poziomu lęku w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym	85
4.2.1 Analiza zachowania larw linii <i>tsc2^{vu242}</i> w teście w otwartym polu	86
4.2.2 Analiza zachowania larw linii <i>tsc2^{vu242}</i> w teście jasnego-ciemnego pola ..	88
4.2.3 Analiza zachowania larw linii <i>tsc2^{vu242}</i> w teście badającym reakcję na nagłe zmiany oświetlenia	90
4.2.4 Analiza zachowania larw linii <i>tsc2^{vu242}</i> w teście badającym reakcję ucieczki oraz habituację w odpowiedzi na bodziec świetlny	94
4.2.5 Analiza ilościowa poziomu kortyzolu u larw linii <i>tsc2^{vu242}</i> w wieku 5 dpf	97
4.2.6 Określenie wpływu ANA-12 na poziom aktywności szlaku mTORC1 u larw linii <i>tsc2^{vu242}</i>	98
4.3 Charakterystyka morfologii wybranych obwodów neuronalnych w mózgu w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym oraz poszukiwanie mechanizmów komórkowych i molekularnych odpowiedzialnych za patogenezę tej choroby	99
4.3.1 Analiza zmian anatomicznych oraz molekularnych w łączności wybranych obwodów neuronalnych u larw <i>tsc2^{vu242}</i>	99
4.3.2 Analiza modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym pod kątem zaburzeń w ścieżkach sygnałowych związanych z neurotransmisją hamującą	106
5. DYSKUSJA	111
5.1 Danio pręgowany jako model stwardnienia guzowatego (<i>tsc2^{vu242/vu242}</i>)	111
5.1.1 Odzwierciedlenie mechanizmów powstawania choroby w modelu stwardnienia guzowatego <i>tsc2^{-/-}</i> w danio pręgowanym	112
5.1.2 Podobieństwo objawów choroby w modelu stwardnienia guzowatego <i>tsc2^{-/-}</i> w danio pręgowanym	114

5.1.3 Przewidywalność strategii terapeutycznych w modelu stwardnienia guzowego <i>tsc2^{-/-}</i> w danio pręgowanym	126
5.2 Podsumowanie	129
6. WNIOSKI	130
7. BIBLIOGRAFIA	131
8. PUBLIKACJE DOKTORANTKI	163

WYKAZ SKRÓTÓW

ADHD	(ang. <i>attention-deficit hyperactivity disorder</i>) – zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi
AML	(ang. <i>angiomyolipoma</i>) – naczyniomięśniakotłuszczaki nerek
AMPA	(ang. <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>) – kwas α-amino-3-hydroksy-5-metylo-4-isoksazolopropinowy
AMPK	(ang. <i>5'AMP-activated protein kinase</i>) – kinaza białkowa regulowana przez AMP
ASD	(ang. <i>autism spectrum disorder</i>) – spektrum autyzmu
BDNF	(ang. <i>brain derived neurotrophic factor</i>) – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego
CBD	(ang. <i>cannabidiol</i>) – kannabidiol, związek chemiczny zawarty w konopiach
CDC42	(ang. <i>cell division cycle 42</i>) – białko cyklu podziałów komórkowych 42
cDNA	(ang. <i>complementary DNA</i>) – komplementarny DNA
CRISPR - Cas9	(ang. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPR associated protein 9</i>) - zgrupowane, regularnie rozmieszczone, krótkie, powtarzające się sekwencje palindromowe – białko 9 związane z CRISPR
DAG	(ang. <i>diacylglycerole</i>) – diacyloglicerol
DCC	(ang. <i>deleted in colorectal carcinoma</i>) – receptor dla netryn
dLGN	(ang. <i>dorsal lateral geniculate nucleus</i>) – grzbietowe ciało kolankowate boczne
DMSO	(ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>) – dimetylosulfotlenek
DOCK	(ang. <i>dedicator of cytokinesis</i>) - czynnik wymiany nukleotydu guaninowego
dpf	(ang. <i>days post fertilization</i>) – dni po zapłodnieniu
eNSC	(ang. <i>embryonic neural stem cells</i>) – embrionalne
ENU	(ang. <i>N-ethyl-N-nitrosourea</i>) – N-etylo-N-nitrozomocznik

EphA	(ang. <i>ephrins A</i>) – efryny A
ERK	(ang. <i>extracellular signal-regulated kinases</i>) – kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym
FRB	(ang. <i>FKBP12-rapamycin-binding domain</i>) – domena wiążąca FKBP12 i rapamycynę
GABA	(ang. <i>γ-aminobutyric acid</i>) – kwas γ -aminomasłowy
GAP	(ang. <i>GTPase-activating protein</i>) – białko aktywujące GTPazę
GDP	(ang. <i>guanosine-5'-diphosphate</i>) - guanozyno-5'-difosforan
GEF	(ang. <i>guanine nucleotide exchange factor</i>) - aktywatory wymiany nukleotydów
GTP	(ang. <i>guanosine-5'-triphosphate</i>) - guanozyno-5'-trifosforan
Hb	(ang. <i>habenula</i>) - uzdeczka
hpf	(ang. <i>hours post fertilization</i>) – godziny po zapłodnieniu
ID	(ang. <i>intellectual disability</i>) – niepełnosprawność intelektualna
IP3	(ang. <i>inositol trisphosphate</i>) – trifosforan inozytolu
iPSC	(ang. <i>induced pluripotent stem cells</i>) – indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste
LFP	(ang. <i>local-field potential</i>) – lokalny potencjał pola
L-LTP	(ang. <i>late long-term potentiation</i>) – późna faza długotrwałego wzmocnienia synaptycznego
LOH	(ang. <i>loss of heterozygosity</i>) – utrata heterozygotyczności
LTD	(ang. <i>long-term depression</i>) – długotrwałe osłabienie synaptyczne
LTP	(ang. <i>long-term potentiation</i>) – długotrwałe wzmocnienie synaptyczne
MAPK	(ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i>) – kinaza aktywowana mitogenami
mEPSPs	(ang. <i>miniature excitatory postsynaptic potentials</i>) – miniaturowe potencjały postsynaptyczne pobudzające

mGluR	(ang. <i>metabotropic glutamate receptor</i>) – metabotropowe receptory glutaminianowe
mIPSPs	(ang. <i>miniature inhibitory postsynaptic potentials</i>) – miniaturowe potencjały postsynaptyczne hamujące
mTOR	(ang. <i>mechanistic/mammalian target of rapamycin</i>) – ssaczy cel rapamycyny
mTORC1	(ang. <i>mTOR complex 1</i>) – kompleks pierwszy kinazy mTOR
mTORC2	(ang. <i>mTOR complex 2</i>) – kompleks drugi kinazy mTOR
NMDA	(ang. <i>N-methyl-D-aspartic acid</i>) – kwas N-metylo-D-asparaginowy
NPC	(ang. <i>neural progenitor cells</i>) – komórki neuroprogenitorowe
NSC	(ang. <i>neural stem cells</i>) – neuralne komórki macierzyste
PKC	(ang. <i>protein kinase C</i>) – kinaza białkowa C
PLC-γ	(ang. <i>phospholipase C gamma</i>) – fosfolipaza C
PSD	(ang. <i>post-synaptic site density</i>) – zagęszczenia postsynaptyczne
RAC1	(ang. <i>RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>) – podobny do Ras substrat 1 składnika C3 toksyny botulinowej
RGCs	(ang. <i>retinal ganglion cells</i>) – komórki zwojowe siatkówki
Rheb	(ang. <i>Ras homolog enriched in brain</i>) – homolog białka Ras wzbogacony w mózgu
RHO	(ang. <i>Ras homologous protein</i>) – białko homologiczne z Ras
RPS6	(ang. <i>ribosomal protein s6</i>) – rybosomalne białko S6
S6K	(ang. <i>ribosomal protein s6 kinase</i>) – kinaza rybosomalnego białka S6
SEGA	(ang. <i>supependymal giant cell astrocytomas</i>) – gwiazdziaki podwyściółkowe olbrzymiokomórkowe
SENs	(ang. <i>supependymal nodules</i>) – okołokomorowe guzki podwyściółkowe
SGK1	(ang. <i>serum/glucocorticoid regulated kinase 1</i>) – kinaza regulowana surowicą i glukokortykoidami

TALENs	(ang. <i>transcription activator-like effector nucleases</i>) – nukleazy efektorowe przypominające aktywator transkrypcji
TANDs	(ang. <i>TSC associated neuropsychiatric disorders</i>) – zaburzenia neuropsychiatryczne związane ze stwardnieniem guzowatym
TBC1D7	(ang. <i>TBC1 domain family member 7</i>) – białko 7 należące do rodziny domeny TBC1
TEMED	(ang. <i>tetramethylethylenediamine</i>) – N'-tetrametyloetylenodiamina
TrkB	(ang. <i>tropomyosin receptor kinase B</i>) – kinaza receptora tropomiozyny B
TSC	(ang. <i>tuberous sclerosis complex</i>) – stwardnienie guzowate
TSC1	(ang. <i>tuberous sclerosis 1 protein</i>) – białko hamartyna
TSC2	(ang. <i>tuberous sclerosis 2 protein</i>) – białko tuberyna
ZFN	(ang. <i>zinc finger nuclease</i>) – nukleaza z motywem palca cynkowego

1. WSTĘP

1.1 Patofizjologia stwardnienia guzowatego

Stwardnienie guzowate (ang. *tuberous sclerosis complex*; TSC) to wielonarządowa choroba rozwojowa, której występowanie szacuje się na 1:6000 żywych urodzeń (Osborne, Fryer, i Webb 1991). Objawy TSC obejmują zmiany skórne, zmiany rozwojowe w obrębie narządów wewnętrznych i narządzie wzroku oraz w ośrodkowym układzie nerwowym, wraz z charakterystycznymi łagodnymi guzami typu hamartoma (Curatolo 2007; Switon i wsp. 2016). Pierwsze symptomy choroby pojawiają się już w życiu płodowym i postępują we wczesnym dzieciństwie. Na stan zdrowia pacjentów, szczególnie we wczesnych etapach choroby, duży wpływ mają zmiany neuropatologiczne i objawy neurologiczne, od których zależy po części długość oraz jakość życia ludzi ze stwardnieniem guzowatym.

Stwardnienie guzowate jest uwarunkowane genetycznie. Choroba rozwija się na skutek mutacji w genie *TSC1* lub *TSC2*, która powoduje utratę funkcji tych genów. Schorzenie to jest dziedziczone autosomalnie dominująco (postać rodzinna) lub powstaje w wyniku mutacji *de novo* (postać sporadyczna). U 70% pacjentów ze stwardnieniem guzowatym mutacja dotyczy inaktywacji genu *TSC2*, a w 20% genu *TSC1* w całym organizmie. Do pozostałych 10% zalicza się osoby, u których nie zidentyfikowano mutacji bądź też wykazano mozaicyzm somatyczny, czyli obecność mutacji w genach *TSC1* lub *TSC2* tylko w niektórych tkankach, czy komórkach (Sancak i wsp. 2005; Dabora i wsp. 2001). Poszczególni pacjenci mają bardzo zróżnicowane objawy choroby, nawet w przypadku występowania mutacji w tym samym genie (Dabora i wsp. 2001). Ocenia się, że cięższy obraz kliniczny występuje w przypadku utraty funkcji genu *TSC2* (Lewis i wsp. 2004; Sancak i wsp. 2005). Geny *TSC1* i *TSC2* pełnią rolę “antyonkogenu” czyli genów supresorowych transformacji nowotworowej. Oznacza to, że do rozwinięcia guzów konieczna jest utrata obu kopii genów tzw. utrata heterozygotyczności (ang. *loss of heterozygosity*; LOH). U pacjentów ze stwardnieniem guzowatym mechanizm ten początkowo obserwowano w wielu narządach wewnętrznych poza układem nerwowym, natomiast dopiero późniejsze badania potwierdziły występowanie LOH również w guzach mózgu, takich jak gwiaździaki podwyściółkowe olbrzymiokomórkowe (ang. *supependymal giant cell astrocytomas*; SEGA) czy guzki korowe (ang. *cortical tubers*) (Bongaarts i wsp. 2017; Feliciano 2020; Martin i wsp. 2017). W warunkach prawidłowych produkty białkowe wspomnianych genów, hamartyna (*TSC1*) i tuberyna (*TSC2*), tworzą kompleks mający za zadanie hamować aktywność kinazy mTOR (ang. *mechanistic/mammalian target of rapamycin*). W wyniku braku funkcjonalnego kompleksu *TSC1-TSC2* w stwardnieniu

guzowatym szlak kinazy mTOR ulega niekontrolowanej i nadmiernej aktywacji. W układzie nerwowym prowadzi to do zaburzenia procesów niezbędnych dla prawidłowego rozwoju mózgu, takich jak różnicowanie i migracja komórek neuroprekursorowych, formowanie aksonów i dendrytów (aksono- i dendrytogenezy), synaptogeneza oraz aktywność neuronalna (Lipton i Sahin 2014; Takei i Nawa 2014; Switon i wsp. 2016; 2017).

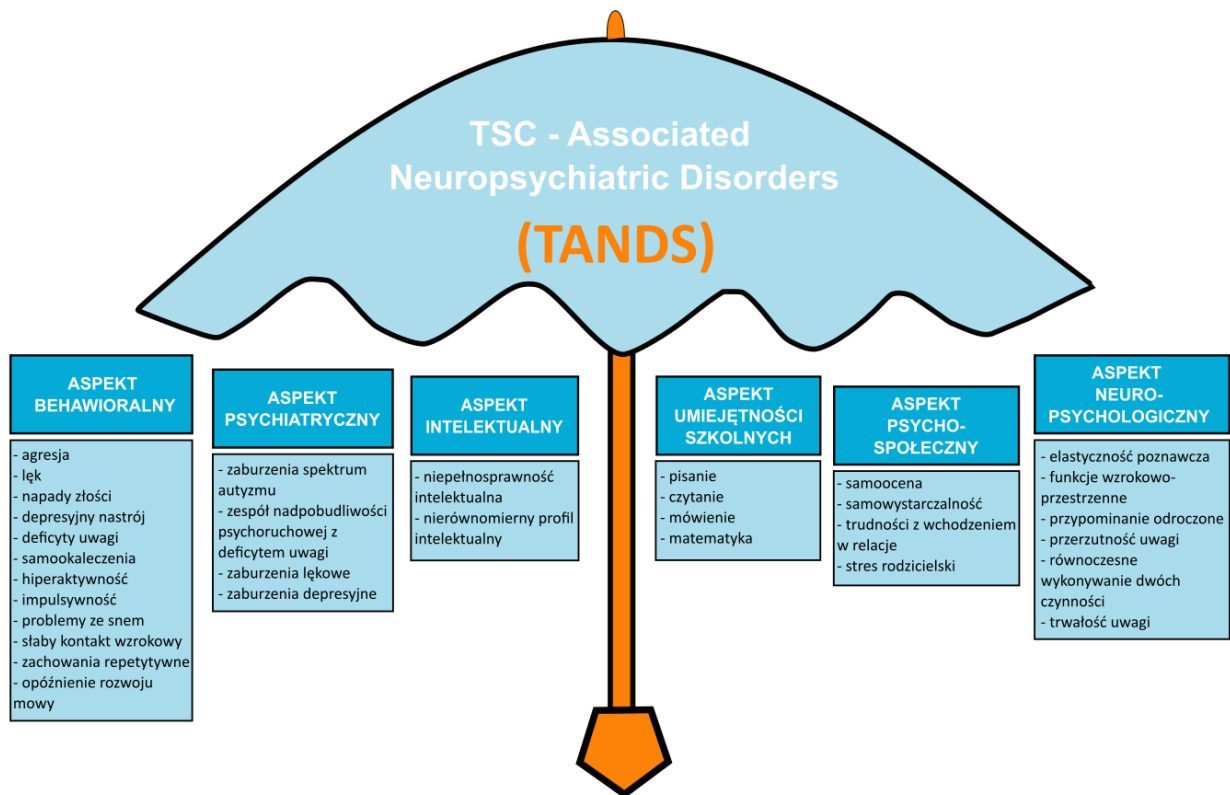
1.1.1 Objawy stwardnienia guzowatego w ośrodkowym układzie nerwowym

Najczęściej spotykane patologiczne zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym to: guzki korowe dzielące liczne cechy patologiczne z dysplazjami korowymi, zaburzenia struktury istoty białej mózgu, pierwotne guzy mózgu gwiaździaki podwyściółkowe olbrzymiokomórkowe (SEGA) oraz okołokomorowe guzki podwyściółkowe (ang. *subependymal nodules*; SENs) uważane za zmiany prekursorowe dla SEGA (Curatolo, Moavero, i de Vries 2015; DiMario 2004). Guzki korowe tworzone są na etapie formowania kory mózgowej podczas życia płodowego (Barkovich i wsp. 2005). Pod względem budowy histologicznej charakteryzują się niepoprawnym uwarstwieniem względem kory mózgu, przerostem gleju gwiaździstego (astrocytów) i obecnością wielojądrowych komórek olbrzymich oraz dysmorficznych neuronów o nieprawidłowym położeniu (Feliciano i wsp. 2013; Mizuguchi 2007). Innym równie poważnym zaburzeniem neurologicznym jest padaczka (epilepsja), która występuje u 80-90% zdiagnozowanych pacjentów ze stwardnieniem guzowatym i w znaczącym stopniu przyczynia się do śmiertelności (Holmes i wsp. 2007). Napady padaczkowe rozpoczynają się zwykle w okresie niemowlęcym, często prowadząc do rozwoju zespołu Westa, charakteryzującego się specyficznym typem napadów tzw. „spazmami niemowlęcymi” (ang. *infantile spasms*; napady zgięciowe) (Kotulska i wsp. 2014). Przy zespole Westa rokowania nie są pomyślne, często obserwuje się rozwój dodatkowych rodzajów padaczek, w tym lekoopornych i może się wiązać z przedwczesną śmiercią pacjenta (Lagae i wsp. 2010). Pomimo prowadzonych na światową skalę badań, przyczyny napadów epileptycznych w stwardnieniu guzowatym wciąż nie są jasne. Uważa się, że kluczową rolę w aktywności epileptycznej mają powstające w mózgu guzy, jednakże istnienie modeli zwierzęcych tej choroby, wykazujących spontaniczne napady padaczkowe pomimo braku hamartom w ośrodkowym układzie nerwowym, wskazują na dodatkową, niezależną przyczynę lub inny mechanizm powstawania epilepsji (Goorden i wsp. 2007; Lozovaya i wsp. 2014). Proponowane patomechanizmy potencjalnie wyjaśniające epileptogenezę w stwardnieniu guzowatym to zaburzenia w równowadze pobudzającego i hamującego przewodnictwa

synaptycznego oraz zmiany w warstwowości kory mózgowej spowodowane nieprawidłową migracją neuronów (Curatolo, Moavero, i de Vries 2015; Ruffolo i wsp. 2016).

1.1.2 Objawy neuropsychiatryczne w stwardnieniu guzowatym (TANDs)

Na zróżnicowany obraz kliniczny stwardnienia guzowatego składają się nie tylko zaburzenia neurologiczne, ale również neuropsychiatryczne objęte terminem TANDs (ang. *TSC associated neuropsychiatric disorders*). Występują one u ok. 90 % osób zdiagnozowanych ze stwardnieniem guzowatym (Curatolo, Moavero, i de Vries 2015; De Vries i wsp. 2015). Zaburzenia te zależne są często od wieku pacjentów, tak więc niemowlęta, dzieci, młodzież i dorośli mogą wykazywać zupełnie różne spektrum objawów choroby. Na poziomie behawioralnym odnotowano m.in. agresję (37-66%), hiperaktywność (22-73%), stany depresyjne (19-43%), trudności społeczne czy problemy z koncentracją i snem (Eden i wsp. 2014; Pulsifer, Winterkorn, i Thiele 2007; Lewis i wsp. 2004; De Vries, Hunt, i Bolton 2007). Na poziomie psychiatrycznym i intelektualnym stwierdzono m.in. występowanie spektrum autyzmu (ang. *autism spectrum disorder*; ASD) (40-50%), zaburzeń lękowych (41-56%), zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ang. *attention-deficit hyperactivity disorder*; ADHD) (30-50%) oraz niepełnosprawności intelektualnej (ang. *intellectual disability*; ID) o różnym stopniu nasilenia (50-64%) (D'Agati i wsp. 2009; Curatolo, Napolioni, i Moavero 2010; de Vries i wsp. 2018). Za pośrednie przyczyny powstawania TANDs u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym uważa się guzki korowe i inne strukturalne nieprawidłowości w mózgu oraz napady padaczkowe. Pod uwagę brane są również hipotezy wskazujące, że może istnieć bezpośrednia droga od nadmiernej aktywacji szlaku mTOR do rozwoju TANDs (de Vries i wsp. 2018; de Vries i Howe 2007; Ehninger, de Vries, i Silva 2009). Szczegółowy podział TANDs przedstawiono na Ryc. 1.1.



Ryc. 1.1 Schemat zaburzeń neuropsychiatrycznych współwystępujących w stwardnieniu guzowatym tzw. TANDs (ang. *TSC associated neuropsychiatric disorders*). Termin TANDs obejmuje neuropsychiatryczne objawy choroby dotyczące różnych aspektów życia pacjentów ze stwardnieniem guzowatym. Grafikę wykonano na podstawie pracy Curatolo i wsp. 2015 (Curatolo, Moavero, i de Vries 2015).

1.1.3 Kliniczne leczenie farmakologiczne stwardnienia guzowatego

Biorąc pod uwagę, że stwardnienie guzowate spowodowane jest niekontrolowaną aktywnością szlaku mTOR, zidentyfikowanie inhibitorów kinazy mTOR, a dokładnie rapamycyny i jej analogów, dało nadzieję terapeutyczną w leczeniu następstw tej choroby. Rapamycyna to antybiotyk makrolidowy pozyskany z bakterii glebowych *Streptomyces hygroscopicus*, charakteryzujący się działaniem immunosupresyjnym oraz antyproliferacyjnym. Analogi rapamycyny (rapalogi), takie jak ewerolimus, zostały stworzone w celu ulepszenia stabilności, rozpuszczalności oraz farmakokinetyki rapamycyny, a więc polepszenia skuteczności oraz bezpieczeństwa leku. Molekularny mechanizm działania rapalogów jest wspólny. Rapamycyna wraz z wewnątrzkomórkowym białkiem FKBP12 tworzy kompleks, który przyłącza się do kinazy mTORC1 poprzez obecną w niej specyficzną domenę FRB (ang. *FKBP12-rapamycin-binding domain*), co prowadzi do allosterycznego hamowania tej kinazy (Choi i wsp. 1996; Dumont i Su 1995). W 2009 roku rozpoczęto pierwsze międzynarodowe

badania kliniczne nad zastosowaniem analogów rapamycyny w leczeniu stwardnienia guzowatego. W kolejnych latach wykazano między innymi, że ewerolimus nie tylko zmniejsza wielkość i rozwój guzów SEGA, ale również pozytywnie wpływa na patologiczne zmiany powstałe w nerkach (naczyniomięśniakotłuszczaki nerek; ang. *angiomyolipoma*; AML) oraz na skórze (naczyniakowłókniaki i włókniaki), a także redukuje częstotliwość napadów epileptycznych (Franz i wsp. 2016; Qin i wsp. 2010; Krueger i wsp. 2016). W 2017 roku Europejska Agencja Medyczna zatwierdziła zastosowanie ewerolimusu w leczeniu pomocniczym przy lekoopornych napadach ogniskowych (ang. *partial seizures*) u pacjentów powyżej drugiego roku życia. Niemniej jednak długotrwałe stosowanie rapalogów powoduje ogólnoustrojowe działania niepożądane, w tym zapalenie błon śluzowych, zwiększone ryzyko zakażeń, hiperglikemię i hiperlipidemię, a nawet śmiertelne zapalenie płuc (Zuber i wsp. 2008; Kim i Lee 2019). Ponadto, istnieją dowody z badań u ludzi oraz na modelach zwierzęcych stwardnienia guzowatego wskazujące, że odstawienie inhibitorów mTOR może prowadzić do nawrotu objawów klinicznych (Samueli i wsp. 2016; Krueger i wsp. 2016; 2013).

Lekiem pierwszego wyboru dla dzieci z napadami zgięciowymi lub napadami ogniskowymi jest wigabatryna – inhibitor transaminazy kwasu γ -aminomasłowego (ang. *γ -aminobutyric acid*; GABA) (Hancock i Osborne 1999; Curatolo, Jóźwiak, i Nabbout 2012). Rozpoczęcie terapii wigabatryną w okresie niemowlęcym ma korzystny, długoterminowy wpływ w leczeniu padaczek, a także w rozwoju układu nerwowego u dzieci ze stwardnieniem guzowatym. Mechanizm hamowania przez wigabatrynę napadów zgięciowych w tej chorobie nie jest dobrze poznany. Co ciekawe, działanie wigabatryny może nie ograniczać się do zapobiegania rozpadowi kwasu γ -aminomasłowego i wzmacniania w ten sposób hamującej transmisji synaptycznej. W mysim modelu stwardnienia guzowatego wykazano, że zastosowanie wigabatryny przyczynia się również do zmniejszenia aktywności kinazy mTOR (Zhang i wsp. 2013), jednak dane te nie zostały dotychczas potwierdzone w innych modelach i u pacjentów. Niemniej jednak stosowanie tego leku może wiązać się z działaniami niepożądanymi – u niektórych pacjentów długotrwałe stosowanie wysokich dawek wigabatryny powodowało rozwój wad pola widzenia (Golec i wsp. 2021; Singh i Carson 2021). W przypadku, gdy pierwsza linia leczenia zawiedzie, w kolejnym kroku stosuje się kortykotropinę, która jest skuteczna przy napadach zgięciowych oraz terapię skojarzoną lekami o działaniu antyepileptycznym (Curatolo i wsp. 2018).

Chociaż poczyniono duże postępy w identyfikacji i terapii wielu problemów obecnych w stwardnieniu guzowatym, w tym SEGA i epilepsji, objawy neuropsychiatryczne pozostają

niedostatecznie rozpoznawane i leczone. Pojawia się coraz więcej dowodów na to, że określone elementy zaburzeń neuropsychiatrycznych w tej chorobie można bezpośrednio przypisać rozregulowaniu ścieżki sygnałowej mTOR. Między innymi udowodniono, że zastosowanie inhibitorów mTORC1 w mysich oraz szczurzych modelach stwardnienia guzowego poprawiało funkcje poznawcze oraz zachowania społeczne zwierząt (Petrasek i wsp. 2021; Ehninger i wsp. 2008; Sato i wsp. 2012). W przypadku ludzi istnieją bardzo ograniczone dane. Dotychczas przeprowadzono jedynie dwa badania kliniczne wczesnej fazy dotyczące stosowania ewerolimusu u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym w kierunku terapii TANDs. W przypadku pierwszego z badań przeprowadzonych u osób dorosłych, stwierdzono poprawę w procesach zapamiętywania oraz umiejętności wykonawczych (Davies i wsp. 2011; de Vries i wsp. 2018). W kolejnym badaniu z udziałem dzieci i młodzieży nie odnotowano znaczącej poprawy w zakresie objawów typu TANDs, w tym zdolności intelektualnych czy problemów behawioralnych. Uzyskane wyniki były zróżnicowane w zależności od pacjenta, przez co trudne i niejednoznaczne w interpretacji. Jedynie u części badanych stwierdzono poprawę w funkcjach poznawczych oraz w zachowaniach społecznych (Krueger i wsp. 2017). Tak więc, zastosowanie rapalogów ma szansę zostać ukierunkowaną molekularnie terapią przynajmniej niektórych aspektów TANDs. Warto jednak poszukiwać nowych, bardziej efektywnych terapii. Badania przesiewowe leków oraz nowych związków chemicznych wymagają zastosowania modeli umożliwiających wysokoprzepustowe analizy skuteczności substancji oraz ich toksyczności w przypadku tych drugich.

1.2 Modele zwierzęce w stwardnieniu guzowatym

Istnieje kilkanaście zwierzęcych modeli stwardnienia guzowego i chociaż żaden z nich nie odzwierciedla w pełni ludzkiego fenotypu choroby – każdy dostarczył cennych informacji na jej temat. W większości badań dotyczących tej choroby stosowane były modele ssacze, takie jak mysz, czy szczur, natomiast w 2009 roku po raz pierwszy wykorzystano model ryby danio pręgowany, który omówiono w Rozdziale 1.7.

Wśród modeli ssaczych powszechnie używane są modele mysie uzyskane poprzez zastosowanie różnego rodzaju modyfikacji genetycznych oraz rzadziej stosowany, naturalny model szczurzy tzw. szczur Ekeria niosący spontaniczną mutację linii zarodkowej inaktywującą gen *Tsc2*. Szczury te rozwijają liczne guzy, w szczególności naczyniomięśniakotłuszczaki nerek, a także guzy macicy i przysadki mózgowej, jednak nie wykryto u nich poważnych patologii anatomicznych w ośrodkowym układzie nerwowym ani spontanicznych drgawek. Pomimo tego Waltereit i wsp. (2006) zaobserwowali u szczurów Ekeria zaburzenia

w plastyczności synaptycznej, zmiany w funkcjach poznawczych, w tym pamięci epizodycznej oraz nasiloną podatność na napady drgawkowe wywoływane farmakologicznie. W modelach mysich opierających się na nokaucie genowym, a więc inaktywacji genów *Tsc1* lub *Tsc2*, mutanty homozygotyczne wykazywały wysoką śmiertelność na wczesnych etapach rozwoju. Z uwagi na to badania prowadzono na mutantach heterozygotycznych (w niniejszej pracy nazywane *Tsc1^{+/-}* i *Tsc2^{+/-}*) lub tworzono odrębne mutanty z warunkowym wyłączeniem genów w ściśle określonych tkankach i komórkach (tzw. nokauty warunkowe). Mysie mutanty *Tsc1^{+/-}* i *Tsc2^{+/-}* wykazywały patologiczne zmiany w strukturze nerek i wątroby oraz podwyższoną śmiertelność (Switon i wsp. 2017). U żadnego z nich nie rozwinęły się guzy w ośrodkowym układzie nerwowym, a spontaniczne drgawki zaobserwowano jedynie w modelu *Tsc1^{+/-}* opisanym w pracy Lozovaya i wsp. (Switon i wsp. 2017; Lozovaya i wsp. 2014). Mimo tego, stwierdzono szereg deficytów behawioralnych w tym zaburzenia zachowań społecznych oraz upośledzenie procesów uczenia się i zapamiętywania (Ehninger i wsp. 2008; Goorden i wsp. 2007). Pojawienie się fenotypów podobnych do objawów neuropsychiatrycznych w stwardnieniu guzowatym, bez widocznych zmian neuropatologicznych sugerowało, iż obserwowane fenotypy mogą wynikać z bardziej subtelnych nieprawidłowości w mechanizmach molekularnych bądź łączności obwodów neuronalnych. Niemniej jednak brak charakterystycznych zmian anatomicznych w ośrodkowym układzie nerwowym wymógł zastosowanie bardziej skomplikowanych metod genetycznych w celu stworzenia adekwatnego modelu stwardnienia guzowatego. Nokauty warunkowe w wybranych populacjach neuronów uzyskiwano m.in. za pomocą techniki rekombinacji Cre/Lox. Metoda ta polega na usuwaniu wybranych genów poprzez krzyżowanie myszy, u których badany gen oflankowany jest przez sekwencje LoxP rozpoznawane przez enzym rekombinazę Cre z myszami posiadającymi gen rekombinazy Cre pod tkankowo- lub komórkowo-specyficznym promotorem (Kim i wsp. 2018). W wyniku takiej krzyżówki powstaje linia transgeniczna z delecją wybranych genów w danej populacji komórek. Mutanty z delecją *Tsc1* w komórkach gleju radialnego (komórki progenitorowe neuronów, astrocytów i oligodendrocytów) wykazywały spontaniczne napady drgawkowe, zwiększoną proliferację astrocytów w korze mózgowej oraz hipokampie, zaburzenia homeostazy receptorów glutaminianu oraz przedwczesną śmiertelność (Uhlmann i wsp. 2002). W innym modelu, z warunkową delecją *Tsc1* w embrionalnych, neuronalnych komórkach progenitorowych, zaobserwowano powiększenie rozmiaru mózgu oraz występowanie cytomegalicznych neuronów, wykazujących znaczny wzrost aktywności szlaku mTORC1. Oprócz tego stwierdzono poważne wady w uwarstwieniu kory mózgowej, obecność powiększonych dysmorficznych astrocytów i zaburzenia mielinizacji neuronów (Carson i wsp.

2012). Analogiczne defekty zaobserwowano u mutantu z warunkowym nokautem *Tsc2* w komórkach gleju radialnego w rozwijającej się korze mózgowej i hipokampie. Potwierdzono także zaburzenia migracji skutkujące nieprawidłowościami w strukturze kory mózgowej, obecność cytomegalicznych neuronów, liczne skupiska nieprawidłowo położonych komórek nerwowych i wady mielinizacji (Way i wsp. 2009). Zmiany neuropatologiczne przypominające guzki korowe udało się odwzorować jedynie w mysim modelu z utratą heterozygotyczności (LOH) w genie *Tsc1* (Feliciano i wsp. 2011). Jednakże stworzenie takiego modelu wiązało się z zastosowaniem skomplikowanych metod genetycznych. Feliciano i wsp. (2011) wykorzystali transgeniczne myszy *Tsc1^{+/-}*, w których jedyny allel *Tsc1* był oflankowany sekwencjami LoxP. Następnie za pomocą elektroporacji *in utero* rekombinazy Cre, usunięto *Tsc1* w wybranych embrionalnych komórkach neuroprogenitorowych.

Podsumowując, badanie przyczyn oraz mechanizmów choroby, której etiologia wymaga skupienia się na wczesnych etapach rozwoju (*in utero*) jest utrudnione w modelach ssaczych i wymaga skomplikowanych metod badawczych, jednocześnie ograniczając wykorzystanie metod przyżyciowych. Wszystko to razem narzuca konieczność tworzenia różnych modeli ssaczych dla kolejnych etapów rozwoju (np. z użyciem różnych promotorów lub systemów indukowalnych). W związku z powyższym badanie związków przyczynowo-skutkowych jest utrudnione, a prowadzenie badań przesiewowych w tych modelach, pod kątem potencjalnych terapii w stwardnieniu guzowatym, wiąże się z wysokimi kosztami oraz długim czasem badań.

1.3 Molekularne podstawy stwardnienia guzowatego

1.3.1 Budowa kompleksu białkowego TSC1-TSC2

Kompleks TSC1-TSC2 złożony jest z białek hamartyny (TSC1, 140 kDa) i tuberyny (TSC2, 200 kDa) kodowanych odpowiednio przez geny supresorowe nowotworów *TSC1* i *TSC2*. W skład tego kompleksu wchodzi także białko TBC1D7 (ang. *TBC1 domain family member 7*; 34 kDa) (Dibble i wsp. 2012; Van Slegtenhorst i wsp. 1998). Białka TSC1 i TSC2 nie wykazują homologii ze sobą ani też z żadnymi innymi białkami i są ewolucyjnie konserwowane. Wśród organizmów wielokomórkowych występują ich liczne ortologi (odpowiednio 284 dla TSC1 i 203 dla TSC2) (Huang i Manning 2008; Ensembl Genomes b.d.; b.d.). Białka TSC1, TSC2 i TBC1D7 ściśle współdziałają ze sobą na poziomie molekularnym. TSC1 stabilizuje białko TSC2 zapobiegając jego degradacji. TBC1D7 stabilizuje heterodimerski kompleks TSC1-TSC2 poprzez bezpośrednią interakcję z domeną coiled-

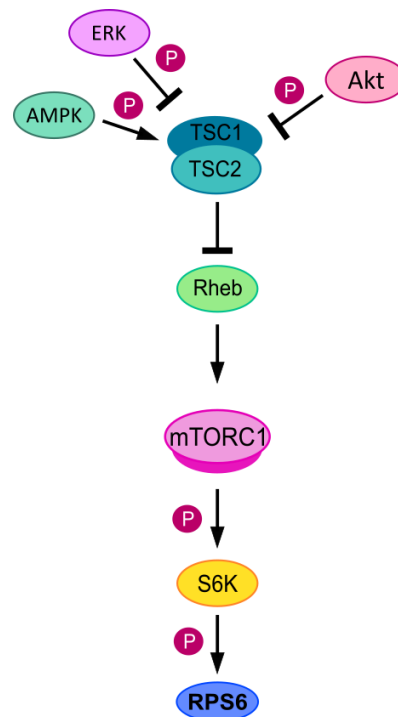
coil (ang. *coiled-coil domain*; CCD) białka TSC1 (Yang i wsp. 2021; Hodges i wsp. 2001; Benvenuto i wsp. 2000). Białko TSC2 zawiera domenę aktywującą GTPazę (ang. *GTPase-activating protein*; GAP). Domena GAP umożliwia inaktywację małych białek G z rodziny Ras poprzez hydrolizę guanozyno-5'-trifosforanu (ang. *guanosine-5'-triphosphate*; GTP) do guanozyno-5'-difosforanu (ang. *guanosine-5'-diphosphate*; GDP) (Switon i wsp. 2017; Tee i wsp. 2016). Dzięki temu TSC2 może inaktywować białko Rheb, będące homologiem białka Ras wzbogaconym w mózgu (ang. *Ras homologue enriched in brain*; Rheb) (Switon i wsp. 2016; Tee i wsp. 2003; Inoki i wsp. 2003). Poprzez aktywność GTPazową TSC2, kompleks TSC1-TSC2 negatywnie reguluje położony poniżej Rheb szlak kinazy mTOR (bardziej szczegółowo omówione w Rozdziale 1.3.2, schemat szlaku na Ryc. 1.2).

1.3.2 Ścieżka kanoniczna TSC1-TSC2-mTORC1

Kompleks białkowy TSC1-TSC2 pełni funkcję supresora nowotworów regulując ścieżkę sygnałową kinazy mTOR. Ścisłe konserwowana wśród eukariontów kinaza serynowo-treoninowa mTOR odpowiada w organizmie za szereg ważnych procesów fizjologicznych m.in. wzrost, proliferację i metabolizm komórek, syntezę białek, autofagię oraz regulację cytoszkieletu (Switon i wsp. 2017). Kinaza mTOR wchodzi w skład dwóch odrębnych, multimerycznych kompleksów, które kontrolują odmienne procesy komórkowe. Kompleks pierwszy kinazy mTOR (mTORC1) kontroluje syntezę białek, transkrypcję, syntezę nukleotydów, dynamikę mikrotubul i autofagię. Kompleks drugi kinazy mTOR (mTORC2) jest mniej zbadany niż mTORC1 i odpowiada m.in. za reorganizację cytoszkieletu aktywnego oraz przeżywalność komórki poprzez wywieranie efektu plejotropowego, jako aktywator kinazy Akt, kinazy białkowej C (PKC) oraz kinazy regulowanej surowicą i glukokortykoidami (SGK1) (Switon i wsp. 2017; Luo i wsp. 2018). Kompleks TSC1-TSC2 reguluje mTORC1 za pośrednictwem białka Rheb (Ryc. 1.2). Białko to ma aktywność GTPazy i w połączeniu z GTP stymuluje mTORC1. W wyniku aktywności GTPazowej TSC2, która polega na hydrolizie GTP w białku Rheb do GDP, następuje hamowanie Rheb, a co za tym idzie także kompleksu mTORC1 (Tee i wsp. 2003; Inoki i wsp. 2003). Co istotne, zarówno TSC2, jak i TSC1 są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania kompleksu TSC1-TSC2, dlatego też mutacja nawet w jednym z genów kodujących te białka powoduje rozregulowanie ścieżki sygnałowej TSC1-TSC2-mTORC1. W szlakach poniżej mTOR, kompleks pierwszy kinazy promuje syntezę i translację białek poprzez bezpośrednią fosforylację m.in. kinazy rybosomalnego białka S6 (S6K) (Ryc. 1.2). W wyniku aktywacji S6K następuje fosforylacja jej substratów m.in. rybosomalnego białka S6 (RPS6) (Ruvinsky i wsp. 2005). Poziom fosforylacji białka

RPS6 jest więc bezpośrednio związany z poziomem aktywacji kompleksu mTORC1 i z tego powodu bardzo często wykorzystywany, również w niniejszej rozprawie, jako jego marker.

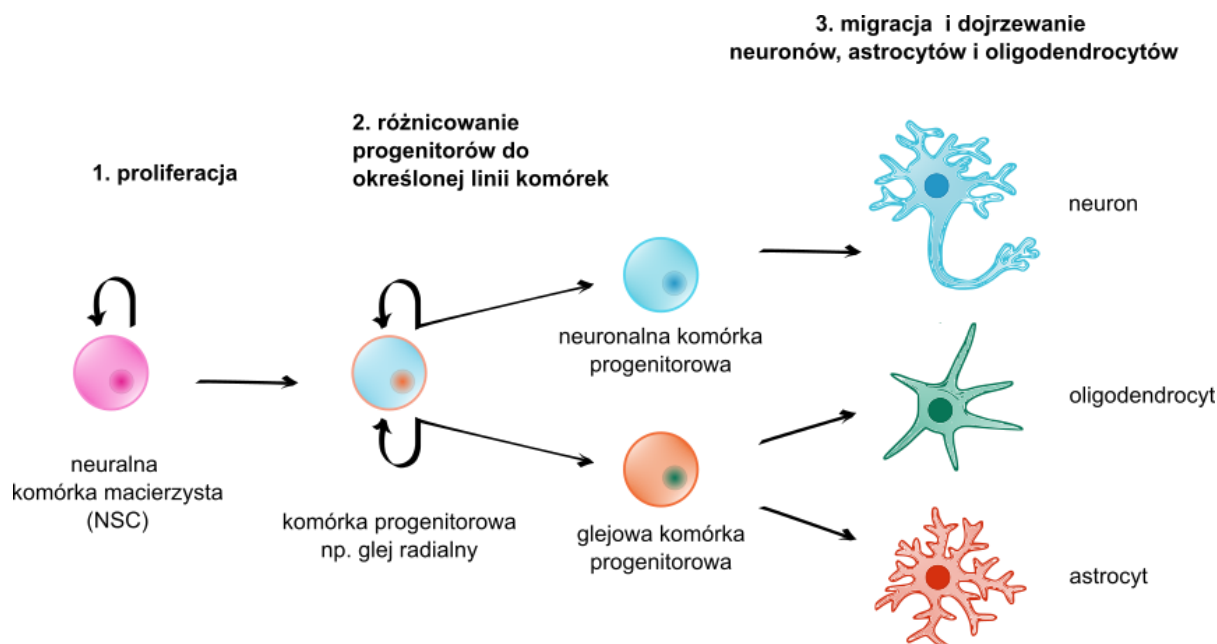
Kompleks TSC1-TSC2 jest regulowany potranslacyjnie przez kilka głównych szlaków sygnałowych w komórkach: szlak kinazy 3-fosfatydoinozytolu i Akt (PI3K-Akt), szlak kinazy regulowanej sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK) oraz szlak kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK). Szlaki PI3K-Akt oraz ERK są stymulowane pod wpływem m.in. czynników wzrostu i negatywnie regulują aktywność kompleksu TSC1-TSC2 przez fosforylację białka TSC2 (Ryc. 1.2) (Inoki i wsp. 2002; Ma i wsp. 2005). Natomiast szlak AMPK aktywuje TSC2 podczas niekorzystnego stanu energetycznego komórek, tym samym hamując działanie mTORC1 (Ryc. 1.2) (Inoki, Zhu, i Guan 2003).



Ryc. 1.2 Schemat ścieżki sygnałowej TSC1-TSC2-mTORC1. ERK – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym; AMPK – kinaza białkowa regulowana przez AMP; Akt – kinaza białkowa Akt; TSC1-TSC2 – kompleks białkowy hamartyny i tuberyny; Rheb – homolog białka Ras wzbogacony w mózgu; mTORC1 – kompleks pierwszy kinazy mTOR; S6K – kinaza rybosomalnego białka S6; RPS6 – rybosomalne białko S6. Szczegółowy opis w tekście.

1.4 Rozwój neuronów w stwardnieniu guzowatym

Strukturalny i funkcjonalny rozwój ośrodkowego układu nerwowego zależy od procesu neurogenezy, czyli procesu powstawania nowych komórek nerwowych. Na proces ten składa się powstawanie z neuroepitelium multipotencjalnych, neuralnych komórek macierzystych (ang. *neural stem cells*; NSC), ich proliferacja i powstawanie komórek neuroprogenitorowych (ang. *neural progenitor cells*; NPC), które mają ograniczone zdolności do samopowielania (Ryc. 1.3). NPC różnicują do określonej linii komórek układu nerwowego, która da początek neuronom, astrocytom lub oligodendrocytom (Ryc. 1.3). Młode neurony rozpoczynają proces dojrzewania składający się z szeregu kolejnych, często nakładających się na siebie etapów: migracji do miejsc docelowych, wydłużania aksonów, tworzenia dendrytów i wytwarzania specyficznych połączeń nerwowych w procesie synaptogenezy (Ryc. 1.3). W regulację tego złożonego ciągu zdarzeń zaangażowane są różne szlaki molekularne wraz z czynnikami genetycznymi i środowiskowymi. Zaburzenia w którymkolwiek z wyżej wymienionych etapów neurogenezy mogą prowadzić do poważnych wad rozwojowych i upośledzenia pracy mózgu. Tak też dzieje się w stwardnieniu guzowatym, gdzie obserwuje się patologiczne zmiany w morfologii mózgu zarówno na poziomie makroskopowym (guzki korowe, SENs, SEGA, zaburzenia w łączności istoty białej), jak i komórkowym (obecność cytomegalicznych, dysmorficznych neuronów, wadliwa polaryzacja neuronów, nieprawidłowości w rozgałęzianiu dendrytów i zaburzona migracja neuronów) (Salussolia i wsp. 2019; Feliciano 2020). Uważa się, że deregulacja szlaku mTORC1 jest punktem zapalnym w powstawaniu nieprawidłowości w procesie neurogenezy w stwardnieniu guzowatym, podkreślając kluczową rolę kompleksu TSC1-TSC2 w rozwoju układu nerwowego (Salussolia i wsp. 2019; Huang i Manning 2008; Piedimonte, Wailes, i Weiner 2006). Konsekwencją są zaburzenia neurologiczne, takie jak epilepsja oraz neuropsychiatryczne z grupy TANDs, powszechnie diagnozowane u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym.



Ryc. 1.3 Uproszczony schemat rozwoju komórek układu nerwowego. Opis w tekście.

1.4.1 Kompleks TSC1-TSC2 w różnicowaniu i migracji neuronów

Jak wcześniej wspomniano u podstaw charakterystycznych zmian w tkance nerwowej w stwardnieniu guzowatym leży zaburzona sygnalizacja mTORC1 wynikająca z mutacji w genach *TSC1* lub *TSC2*. Analiza histopatologiczna guzów mózgu pochodzących od pacjentów doprowadziła do wysunięcia hipotezy, że problemy w różnicowaniu komórek nerwowych przyczyniają się do neuropatologii w stwardnieniu guzowatym (Yamanouchi i wsp. 1997; Mizuguchi i Takashima 2001; Lee i wsp. 2003).

Badania przeprowadzone na modelu mysim z warunkowym nokautem *Tsc1* w neuralnych komórkach macierzystych (ang. *embryonic neural stem cells*; eNSC) kory mózgowej, wykazały, że zwiększona aktywność mTORC1 spowodowana utratą TSC1 skutkuje przedwczesnym różnicowaniem oraz nieprawidłowym dojrzewaniem neuronów powodując rozwój SENs oraz defektów laminacji kory (Magri i wsp. 2011). Do podobnych wniosków doszli Costa i wsp. (2016) oraz Zucco i wsp. (2018) używając linii genetycznie modyfikowanych ludzkich komórek macierzystych *TSC2^{+/-}* i *TSC2^{-/-}* oraz pochodzących od pacjentów komórek macierzystych *TSC2^{+/-}*, które różnicowano do neuronów *in vitro*. O opóźnieniu w procesie różnicowania świadczyło powstanie w badanym czasie mniejszej liczby neuronów w porównaniu do komórek kontrolnych.

Zaburzenia w migracji, podobnie jak nieprawidłowości w różnicowaniu komórek są charakterystyczne dla patologicznych zmian w ośrodkowym układzie nerwowym u pacjentów

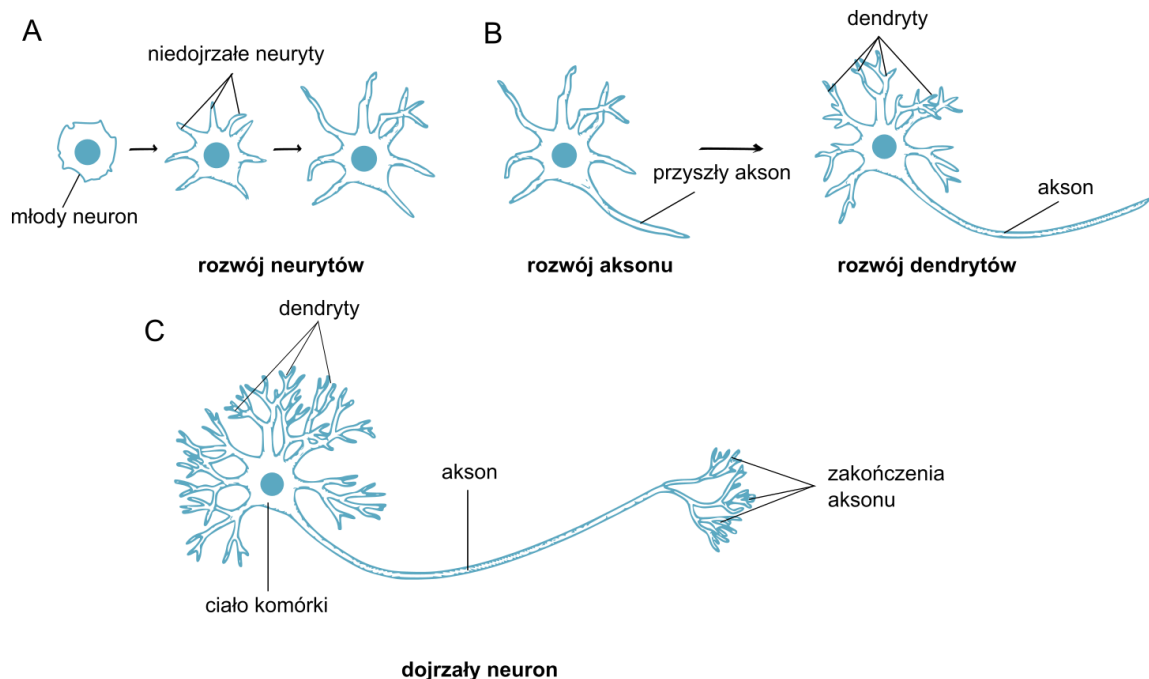
ze stwardnieniem guzowatym (Feliciano 2020). Migracja neuronów to proces, podczas którego komórki powstałe w różnym czasie i o różnych właściwościach wchodzą w odpowiednie kontakty przestrzenne, co jest niezbędne dla prawidłowego rozwoju układu nerwowego. Nowonarodzone neurony korowe przemieszczają się z głębokiej strefy proliferacyjnej (strefa okołokomorowa), poprzez strefę pośrednią (z której powstanie następnie istota biała), rozchodząc się po ośrodkowym układzie nerwowym w kierunku warstw powierzchniowych, aby ostatecznie dotrzeć do miejsca docelowego i stać się częścią odpowiedniej warstwy korowej oraz obwodu neuronalnego (Cooper 2013).

W mysim modelu z utratą heterozygotyczności *Tsc1* w embrionalnych komórkach neuroprogenitorowych zaobserwowano dysplazje korowe przypominające guzki korowe oraz mikroguzki okołokomorowe, charakteryzujących się nieprawidłowym uwarstwieniem, podobnie jak u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym (Feliciano i wsp. 2011; 2012). Również w pracy Zhou i wsp. (2011) w modelu mysim z indukowanym tamoksifenem nokautem *Tsc1* w neuralnych komórkach macierzystych, stwierdzono obecność zmian podobnych do guzków okołokomorowych oraz SEGA. Struktury guzo-podobne powstały na skutek nieprawidłowej migracji komórek NPC traktowanych tamoksifenem. Uważa się, że właśnie wadliwa migracja neuronów jest podłożem patologicznych zmian w korze mózgowej w stwardnieniu guzowatym (Uysal i Şahin 2020). W większości przeprowadzonych badań zmiany wynikające z niepoprawnej migracji zachodziły w sposób autonomiczny komórkowo, to znaczy, że do nieprawidłowej migracji dochodziło tylko w przypadku neuronów niosących inaktywującą mutację w genie *TSC1* lub *TSC2* (Goto i wsp. 2011; Meikle i wsp. 2007). Przykładowo utrata *Tsc1* w rozwijającym się oku myszy powodowała przedwczesne różnicowanie i nieprawidłową migrację radialną komórek zwojowych siatkówki (Jones i wsp. 2015). Podobnie warunkowy nokaut *Tsc1* w komórkach progenitorowych interneuronów GABAergicznym powodował m.in. powstawanie nieprawidłowo położonych skupisk tych komórek, również sugerując zaburzenia w procesie migracji (Fu i wsp. 2012). Z kolei w modelu mysim badanym przez Tsai i wsp. (2014) wyciszenie genu *Tsc2* w komórkach neuroprogenitorowych *in utero* powodowało nieprawidłowości w migracji tych komórek do odpowiednich warstw korowych, ale również zakłócało migrację otaczających je neuronów, które nie miały wyciszenia drugiego allelu genu *Tsc2*. Badacze zasugerowali, że nadaktywność mTORC1 w neuronach z wyciszonym genem *Tsc2* inicjuje uwalnianie przez nie cząsteczek sygnałowych, które zaburzają migrację sąsiadujących komórek neuroprogenitorowych. Krytyczne funkcje białka TSC2 w procesie laminacji kory mózgowej u myszy wykazali

również Moon i wsp. (2015), gdzie warunkowy nokaut *Tsc2* w komórkach neuroprogenitorowych powodował opóźnienie migracji neuronów oraz ich niewłaściwe rozmieszczenie we wszystkich warstwach kory mózgowej. Podsumowując kompleks TSC1-TSC2 reguluje migrację oraz różnicowanie neuronów, a wszelkie nieprawidłowości w tych procesach mogą prowadzić do wadliwego rozwoju kory mózgowej.

1.4.2 Kompleks TSC1-TSC2 w rozwoju aksonów

Jednym z najbardziej krytycznych etapów rozwoju układu nerwowego jest tworzenie sieci neuronalnych. Zasadnicze znaczenie dla formowania funkcjonalnych obwodów neuronalnych ma specyfikacja aksonów i dendrytów, czyli wyodrębnienie się w nowopowstałym, multipolarnym neuronie aksonów i dendrytów. Akson to długa, pojedyncza wypustka, która przekazuje informację do innych neuronów poprzez uwalnianie neuroprzekazników. Dendryty natomiast, to zwykle krótsze i bogato rozgałęzione wypustki, zawierające na swojej powierzchni receptory dla neuroprzekazników, dzięki którym odbierają informację od innych neuronów. Podczas rozwoju neurony zazwyczaj tworzą pojedynczy akson i wiele dendrytów, aby ułatwić przekazywanie i integrację informacji elektrochemicznej w mózgu. Nowo zróżnicowane neurony zaczynają ulegać polaryzacji akson-dendryt, gdy zakończą cykl komórkowy i zaczynają migrować do docelowych struktur mózgu (Barnes i Polleux 2009).



Ryc. 1.4 Etapy rozwoju neuronów. A) Nowo zróżnicowany neuron wykształca wypustki zwane neurytami. Następuje wzrost i dojrzewanie neurytów, w tym stadium neuron jest

multipolarny. B) Zachodzi specyfikacja aksonu, pozostałe neuryty stają się dendrytami. Następuje wzrost aksonu i dynamiczny wzrost i rozgałęzianie się dendrytów. C) W wyniku procesów aksonogenezy, dendrytogenezy i synaptogenezy powstaje dojrzały neuron. Na podstawie Barnes i wsp. (2009) oraz Urbanska i wsp. (2008).

U pacjentów ze stwardnieniem guzowatym rozpoznaje się strukturalne defekty w połączeniach nerwowych mózgu, które mogą przyczyniać się do rozwoju epilepsji czy symptomów ze spektrum TANDs (Widjaja i wsp. 2010; Baumer i wsp. 2018; Im i wsp. 2016). Badanie wpływu kompleksu TSC1-TSC2 na tworzenie funkcjonalnych sieci neuronalnych jest więc ważnym aspektem w poznawaniu mechanizmów choroby.

W pracy Choi i wsp. (2008) udowodniono, że kompleks białkowy TSC1-TSC2 jest niezbędny dla ustalenia biegunowości neuronów i formowania aksonów w mysich neuronach hipokampalnych *in vitro* oraz neuronach korowych *in vivo*. Nadprodukcja TSC1-TSC2 ogranicza specyfikację i wzrost aksonu, natomiast utrata funkcjonalnego kompleksu TSC1-TSC2 prowadzi do tworzenia wielu ektopicznych aksonów (Choi i wsp. 2008). Stwierdzono, że podczas procesu polaryzacji aktywność szlaku TSC1-TSC2-mTOR w mysich neuronach hipokampalnych jest miejscowo specyficzna. W neurycie, który ma stać się aksonem zachodzi inaktywacja kompleksu TSC1-TSC2, co umożliwia zainicjowanie i utrzymanie wzrostu poprzez aktywację kinazy mTORC1. Natomiast w pozostałych wypustkach aktywny kompleks TSC1-TSC2 hamuje ich dalszy wzrost (Choi i wsp. 2008). Wydaje się, że ta krytyczna funkcja kompleksu TSC1-TSC2 jest związana z jego zdolnością do regulowania poziomu m.in. białka SAD-A, kinazy wymaganej do tworzenia aksonów w mózgu myszy (Choi i wsp. 2008; Kishi i wsp. 2005; Wildonger, Jan, i Jan 2008). Zwiększona ekspresja białka SAD-A korelowała ze wzrostem aktywności mTORC1 i była hamowana przez rapamycynę (Choi i wsp. 2008).

Podczas embriogenezy dochodzi do formowania wiązek uporządkowanych włókien nerwowych, co wymaga precyzyjnej kontroli i wzrostu aksonów. Znajdujące się z przodu aksonu stożki wzrostu są nakierowywane do miejsc docelowych przez różnego rodzaju cząsteczki sygnałowe pochodzące ze środowiska zewnętrznego. Te cząsteczki sygnałowe (ang. *guidance cues*) mogą występować w wielu formach, od błonowych białek i lipidów, po białka macierzy lub węglowodany zlokalizowane w środowisku komórkowym. Jedne z pierwszych doniesień dotyczących nieprawidłowego wzrostu aksonów w neuronach pozbawionych funkcjonalnego kompleksu TSC1-TSC2 pochodzą z badań nad układem wzrokowym w *Drosophila*. Knox i wsp. (2007) wskazali, że fotoreceptory mutantu *Tsc1*

formują nieregularną i defektywną blaszkę neuronalną (ang. *lamina plexus*) w płacie optycznym muszki owocowej oraz dalsze nieprawidłowe wiązki aksonów prowadzące do jego rdzenia. Badania molekularne przeprowadzone przy użyciu modelu heterozygotycznej myszy *Tsc2^{+/-}* wykazały, że haploinsuficjencja w stwardnieniu guzowatym jest wystarczająca do wytworzenia nieprawidłowych wypustek neuronalnych. Nie i wsp. (2010) stwierdzili, że podczas rozwoju embrionalnego ścieżka TSC1-TSC2-mTOR jest preferencyjnie aktywowana w aksonach różnego rodzaju komórek nerwowych, w tym komórek zwojowych siatkówki (ang. *retinal ganglion cells*; RGCs), których aksony ciągną się od siatkówki oka do odpowiednich struktur w mózgu. Udowodniono *in vivo*, że w komórkach RGC u myszy *Tsc2^{+/-}* nadaktywny szlak sygnałowy mTORC1 prowadzi do nieprawidłowego rozwoju projekcji aksonów do grzbietowej części ciała kolankowatego bocznego (ang. *dorsal lateral geniculate nucleus*; dLGN), struktury mózgu zaangażowanej w funkcje wzrokowe ssaków. Ponadto, wykazano, że ścieżka mTORC1 w aksonach jest regulowana poprzez receptorowe kinazy tyrozynowe Eph oraz ich ligandy – białka sygnałowe efryny A (ang. *ephrins A*; EphA) poprzez hamowanie kinazy ERK, co prowadzi do aktywacji białka TSC2 (Nie i wsp. 2010). Powyższe przykłady jednoznacznie wskazują na rolę kompleksów TSC1-TSC2 oraz mTORC1 w procesie prawidłowego wzrostu aksonów i łączności sieci neuronalnych.

1.4.3 Kompleks TSC1-TSC2 w dendryto- i synaptogenezie oraz funkcjonowaniu synaps

Dynamiczne przekazywanie informacji między neuronami, możliwe jest między innymi dzięki dendrytogenezie, czyli procesowi wydłużania się i rozgałęziania dendrytów. W efekcie powstają drzewka dendrytyczne, tworzące skomplikowane sieci synaptyczne. Transmisja synaptyczna to proces, w którym neurony komunikują się ze sobą za pośrednictwem synaps – struktur znajdujących się na styku aksonu i dendrytu. Chemiczna transmisja synaptyczna obejmuje uwolnienie neuroprzekaźnika z części presynaptycznej synapsy znajdującej się w obrębie aksonu i wiązanie neuroprzekaźnika ze specyficznymi receptorami części postsynaptycznej synapsy znajdującej się na dendrycie.

Dowody na to, że ścieżka TSC1-TSC2-mTORC1 pełni kluczową rolę w rozwoju drzewka dendrytycznego dostarczyli Cox i wsp. (2018) badając mysie neurony pozbawione *Tsc1*. Obserwowano nadmierne rozgałęzienia dendrytów, które można było zredukować przez zastosowanie rapamycyny jedynie w czasie korelującym z pierwszymi 2 tygodniami rozwoju postnatalnego - zanim struktury dendrytyczne stają się stabilne (Cox i wsp. 2018). Również w dojrzałych neuronach *TSC2^{-/-}* różnicowanych *in vitro* z ludzkich komórek

macierzystych stwierdzono analogiczne zaburzenia w morfologii drzewek dendrytycznych oraz dwukrotne zwiększenie długości dendrytów (Costa i wsp. 2016). Rolę szlaku TSC1-TSC2-mTORC1 w rozwoju drzewka dendrytycznego wskazali także Jaworski i wsp. (2005) oraz Kumar i wsp. (2005) wykazując, że konstytutywna aktywacja komponentów szlaku powyżej kompleksu TSC1-TSC2, takich jak kinaza PI3K i Akt wzmagają wzrost oraz rozgałęzianie się dendrytów w neuronach hipokampalnych *in vitro*. Natomiast hamowanie mTORC1 przez rapamycynę skutkowało ograniczeniem wzrostu drzewka dendrytycznego. Ponadto, Jaworski i wsp. (2005) wykazali, że regulacja aktywności mTORC1 ma krytyczny wpływ na rozwój drzewka dendrytycznego jedynie w ściśle określonym oknie czasowym.

Kolce dendrytyczne to wysoce wyspecjalizowane, bogate w aktywną wypustki dendrytów, zawierające w swoich zakończeniach część postsynaptyczną synaps pobudzających. Kolce te formowane są zwykle w sąsiedztwie części presynaptycznej aksonów innych neuronów, umożliwiając zachodzenie transmisji synaptycznej. Typowy, dojrzały kolec dendrytyczny posiada w swoim zakończeniu pojedynczą synapsę pobudzającą, dlatego też pomiar liczby kolców dendrytycznych pozwala oszacować liczbę synaps. Zmiany morfologiczne kolca odzwierciedlają siłę oraz potencjał danej synapsy – duże kolce posiadają większą liczbę receptorów glutaminergicznych w regionie zagęszczenia postsynaptycznego (ang. *post-synaptic site density*; PSD), co koreluje z siłą transmisji synaptycznej (Leuner i Shors 2010). W trakcie rozwoju dochodzi do tworzenia, ale także eliminacji i przebudowy synaps pobudzających w kolcach dendrytycznych. Procesy te wpływają na dojrzewanie i organizację sieci neuronalnych, a molekularne mechanizmy, które je kontrolują decydują o prawidłowym działaniu tych sieci (Yoshihara, De Roo, i Muller 2009). Wpływ białek TSC1 lub TSC2 na formowanie kolców nie jest do końca poznany. Wyniki dotychczasowych badań, zarówno prowadzonych *in vivo* jak i *in vitro*, są często sprzeczne, wskazując zarówno na zmniejszenie, zwiększenie, jak i brak różnic w gęstości kolców dendrytycznych (Bateup i wsp. 2011; Tavazoie i wsp. 2005; Meikle i wsp. 2008; 2007; Lozovaya i wsp. 2014; Tang i wsp. 2014). Ponadto, istnieją dowody, iż utrata funkcjonalnego kompleksu TSC1-TSC2 prowadzi do zmniejszenia degradacji synteniny – białka biorącego udział w tworzeniu cytoszkieletu kolców dendrytycznych – co skutkuje nieprawidłowościami w morfologii kolców oraz zwiększeniem gęstości synaps pobudzających na trzonie dendrytu, co wiąże się z obniżeniem lokalnego potencjału synaptycznego (Sugiura i wsp. 2015). Podsumowując, mutacje w genach *TSC1* lub *TSC2* powodują nieprawidłowości strukturalne, które prowadzą do zaburzeń funkcji sieci neuronalnych. Patologiczne zmiany w morfologii dendrytów i kolców dendrytycznych są

obserwowane w modelach zwierzęcych padaczek, jak i w tkankach pochodzących od pacjentów z epilepsją. Również w stwardnieniu guzowatym wskazuje się na związek tych fenotypów z rozwojem epilepsji (Wong i Guo 2013).

Ważnym aspektem funkcjonowania układu nerwowego jest właściwa równowaga pomiędzy procesami pobudzania i hamowania neuronów. Liczne badania wskazują, że jej brak w neurotransmisji jest istotnym elementem w patologiach takich jak epilepsja oraz w niepełnosprawności intelektualnej (Sgadò i wsp. 2011). W stwardnieniu guzowatym nieprawidłowości w przekaźnictwie synaptycznym stwierdzono zarówno w modelach komórkowych, jak i zwierzęcych. Bateup i wsp. (2013) wykazali, że utrata *Tsc1* w neuronach piramidowych warstwy CA1 hipokampa w modelu mysim prowadzi do deficytów w procesach hamowania synaptycznego i w efekcie zwiększenia aktywności sieci zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Autorzy wskazali również na powiązanie braku balansu w neurotransmisji z wysoką częstością występowania padaczki u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym. Ponadto, zastosowanie rapamycyny pozwoliło przywrócić homeostazę układu udowadniając, że nadaktywność szlaku mTOR bezpośrednio przyczynia się do obserwowanej patologii (Bateup i wsp. 2013). Podobne wyniki uzyskano w badaniach przeprowadzonych przez Zhao i wsp. (2019), w których usunięto gen *Tsc1* specyficznie we wszystkich neuronach myszy. Na podstawie pomiarów elektrofizjologicznych neuronów piramidowych kory wzrokowej u mutantów, stwierdzono zmniejszoną częstotliwość miniaturowych potencjałów postsynaptycznych hamujących (ang. *miniature inhibitory postsynaptic potentials*; mIPSPs) zależnych od receptorów GABA_A, jednocześnie przy prawidłowej częstotliwości miniaturowych potencjałów postsynaptycznych (ang. *miniature excitatory postsynaptic potentials*; mEPSPs) receptorów typu AMPA (ang. *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*), co wskazywało na nadpobudliwość badanego obwodu nerwowego. Ponadto, mutanty charakteryzowały się przedwczesną śmiertelnością oraz indukowanymi napadami drgawkowymi (Zhao i Yoshii 2019). W innych badaniach na modelu mysim zaobserwowano zmiany morfologiczne w komórkach progenitorowych interneuronów GABAergicznych z warunkowym nokautem *Tsc1*, co skutkowało zmniejszeniem liczby tych interneuronów w korze oraz hipokampie, podczas gdy pozostałe interneurony były powiększone i dysmorficzne oraz wykazywały nadaktywną sygnalizację mTORC1 (Fu i wsp. 2012). Receptory glutaminergiczne typu AMPA i typu NMDA (ang. *N-methyl-D-aspartate receptor*) znajdują się w synapsach pobudzających i regulują ich tworzenie, wzrost oraz stabilizację. W warunkach fizjologicznych stosunek tych synaps podlega homeostazie

(Rao i Finkbeiner 2007). W badaniach prowadzonych na neuronach hipokampalnych *Tsc1*^{-/-} stwierdzono znaczący wzrost liczby receptorów typu AMPA w stosunku do liczby receptorów typu NMDA, co wskazywało na nieprawidłowości w pobudzającej transmisji synaptycznej (Tavazoie i wsp. 2005). Z kolei analiza guzków korowych pochodzących od pacjentów ze stwardnieniem guzowatym wskazała na niedojrzały fenotyp transporterów jonów chlorkowych NKCC1 i KCC2 oraz zmiany w ekspresji receptorów dla GABA_A, co prowadziło do zaburzeń transmisji hamującej (Talos i wsp. 2012). Zaburzenia w ekspresji genów związanych z neurotransmisją wykazano również w indukowanych pluripotencjalnych komórkach macierzystych (ang. *induced pluripotent stem cells*; iPSC), pochodzących od pacjenta ze stwardnieniem guzowatym, spowodowanym mutacją w genie *TSC2*. Zaobserwowano podwyższony poziom mRNA zarówno dla szlaku GABAergicznego, jak i glutaminergicznego (Alsaqati, Heine, i Harwood 2020).

Od siły i skuteczności transmisji synaptycznej zależy również zdolność do modyfikowania obwodów neuronalnych, a więc plastyczność synaptyczna. Proces ten reprezentuje jedną z najbardziej fundamentalnych i najważniejszych funkcji mózgu, leżącą u podstaw procesów uczenia się i zapamiętywania. Synapsy mogą wykazywać trwały wzrost siły połączeń synaptycznych tzw. długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. *long-term potentiation*; LTP), a także trwałe spadki siły połączeń synaptycznych, znane jako długotrwałe osłabienie synaptyczne (ang. *long-term depression*; LTD) (Swiech i wsp. 2008). Uważa się, że dysfunkcja synaps w zwierzęcych modelach stwardnienia guzowatego, wiąże się z zaburzoną lokalną translacją białek, na skutek podwyższonej aktywności mTORC1, co ma kluczowe znaczenie dla plastyczności synaptycznej (Hoeffler i Klann 2010). Szczury *Tsc2*^{+/-} wykazywały wyraźną redukcję różnych form plastyczności synaptycznej. Doświadczenia przeprowadzone na skrawkach hipokampalnych pozyskanych z mózgów tych szczurów wykazały nieprawidłowości zarówno w LTP, jak i LTD (Von Der Brellie i wsp. 2006). Z kolei w skrawkach hipokampalnych z myszy *Tsc2*^{+/-} oraz z modelu całkowitego nokautu *Tsc1* indukowanego tamoksifenem, zaobserwowano obniżenie progu indukcji późnej fazy LTP (ang. *late long-term potentiation*; L-LTP), co leżało u podstaw zaobserwowanych deficytów behawioralnych u tych mutantów (Ehninger i wsp. 2008). Co więcej, w skrawkach hipokampalnych pochodzących z myszy *Tsc2*^{+/-} stwierdzono deficyty w LTD zależnym od metabotropowych receptorów glutaminianowych (ang. *metabotropic glutamate receptor*; mGluR), które dało się poprawić za pomocą zastosowania rapamycyny (Auerbach, Osterweil, i Bear 2011).

1.5 Wybrane szlaki sygnałowe ważne dla rozwoju neuronów

1.5.1 Szlak DOCK-ELMO-RAC

Przynależące do GTPaz białka z rodziny RHO (RHO, RAC, CDC42) wraz ze swoimi białkami regulatorowymi pełnią istotne funkcje podczas procesu rozwoju neuronów, w tym we wzroście i różnicowaniu neurytów, migracji neuronów, ukierunkowanym wzroście aksonów, dendrytogenezie oraz formowaniu się i stabilizacji kolców dendrytycznych (Tashiro, Minden, i Yuste 2000; Nakayama, Harms, i Luo 2000; Aoki, Nakamura, i Matsuda 2004; Hall i Lalli 2010). Biorąc pod uwagę, że są to kluczowe zjawiska w rozwoju mózgu, nieprawidłowa regulacja elementów tego szlaku jest powiązana z patoetiologią niektórych problemów neuropsychiatrycznych (Zamboni i wsp. 2018; Guo, Yang, i Shi 2020). Białko RAC1 (ang. *RAS-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1*) należy do jednej z najlepiej zbadanych GTPaz z rodziny RHO. Jego główną funkcją jest kontrola polimeryzacji aktyny oraz dynamiki cytoszkieletu w komórkach, poprzez regulację szeregu szlaków sygnałowych (Nobes i Hall 1999; 1995; Schaks, Giannone, i Rottner 2019). RAC1 odgrywa rolę w uczeniu się i formowaniu pamięci, a zaburzona ekspresja lub regulacja jego aktywności została zaobserwowana w wielu chorobach neurologicznych (Haditsch i wsp. 2009; 2013). Oprócz tego, liczne badania wykazały, że RAC1 może mieć znaczenie w dziedzicznych zaburzeniach neurorozwojowych takich jak syndrom Retta, zespół łamliwego chromosomu X, czy spektrum autyzmu, co związane jest z jego funkcją w regulacji rozwoju i struktury komórek nerwowych (Hayashi-Takagi i wsp. 2010; Bongmba i wsp. 2011; Duffney i wsp. 2015; Tian i wsp. 2018; Qian Chen i wsp. 2010; Wang i wsp. 2020).

Białka z rodziny RHO charakteryzują się zdolnością do wiązania GDP lub GTP. To, w jakiej formie występują zależy od skoordynowanej aktywności białek regulatorowych, do których zalicza się m.in. aktywatory wymiany nukleotydów (ang. *guanine nucleotide exchange factor*; GEF) oraz białka GAP. Białkami GEF dla RAC1 są między innymi białka z rodziny DOCK (ang. *dedicator of cytokinesis*). Zarówno białka z rodziny RHO, jak i DOCK są dobrze konserwowane wśród organizmów eukariotycznych (Meller, Merlot, i Guda 2005; Boureux i wsp. 2007). Do tej pory zidentyfikowano 11 białek DOCK, które na podstawie podobieństwa w sekwencji oraz organizacji strukturalnej podzielono na 4 podrodziny. Podrodzina DOCK-A zawiera białka DOCK1 (nazywany także DOCK180), DOCK2 i DOCK5, natomiast podrodzina DOCK-B białka DOCK3 i DOCK4 (Laurin i Côté 2014; Gadea i Blangy 2014). Dla pełnej aktywności katalitycznej kompleksu białek z podrodziny DOCK-A oraz DOCK-B niezbędny

jest udział białka adaptorowego ELMO (ang. *engulfment and motility*) (Brugnera i wsp. 2002). Oprócz wyżej wymienionych wyszczególniono jeszcze podrodzinę DOCK-C (zawierającą białka DOCK6-8) oraz DOCK-D (w której skład wchodzi DOCK10 i DOCK11) (Laurin i Côté 2014; Gadea i Blangy 2014). Aktywność większości białek z rodziny DOCK ma znaczenie w prawidłowym rozwoju układu nerwowego. Najlepiej dotychczas poznanym białkiem z tej rodziny jest DOCK1. W modelu mysim wykazano, że białko to przyłącza się do receptora netryny – DCC (ang. *deleted in colorectal carcinoma*) i bierze udział w indukowanej netryną aktywacji RAC1 (Li i wsp. 2008). Taka regulacja jest ważna w procesie ukierunkowanego wzrostu aksonów. Oprócz tego DOCK1 pełni rolę w procesie naprowadzania aksonów indukowanym przez efrynę B3 oraz w morfogenezie kolców dendrytycznych (Xu i Henkemeyer 2009; Kim i wsp. 2011). DOCK3 pełni kluczową rolę we wzroście neurytów i aksonów, szczególnie podczas wczesnych etapów rozwoju, działając poprzez kaskady sygnałowe związane ze szlakiem BDNF-TrkB (Namekata i wsp. 2012). Zbadano, że utrata funkcjonalnego białka DOCK3 wiąże się z występowaniem zaburzeń zachowań sensomotorycznych w modelu mysim oraz niepełnosprawności intelektualnej u ludzi zdiagnozowanych z mutacją w genie tego białka (Qi Chen i wsp. 2009; Helbig i wsp. 2017). Ścieżki sygnałowe działające poprzez kompleks DOCK4-RAC kontrolują procesy polaryzacji i różnicowania neuronów, a także są istotne dla prawidłowej transmisji synaptycznej (Xiao i wsp. 2013; Huang i wsp. 2020). Ponadto, DOCK4 jest powiązany z kilkoma chorobami neuropsychiatrycznymi, w tym spektrum autyzmu czy schizofrenią (Huang i wsp. 2020; Pagnamenta i wsp. 2010). DOCK7 ulega silnej ekspresji w rozwijającym się mózgu i reguluje neurogenezę w korze nowej poprzez promowanie różnicowania komórek gleju radialnego do neuronalnych komórek progenitorowych i neuronów (Yang, Wang, i Van Aelst 2012). Ponadto, stwierdzono jego rolę w kontroli polaryzacji neuronów i formowaniu się aksonów (Watabe-Uchida i wsp. 2006). Oprócz tego zidentyfikowano mutacje w genie *DOCK7* u pacjentów z encefalopatią padaczkową (Turkdogan i wsp. 2019; Perrault i wsp. 2014). Z kolei DOCK8 ma istotne znaczenie w procesach związanych z zapaleniem tkanki nerwowej, a mutacje genu kodującego to białko są związane z autyzmem, opóźnieniem umysłowym i neuroblastomą (Griggs i wsp. 2008; Namekata i wsp. 2019). Wskazuje to, że DOCK8 jest potrzebny do prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego.

1.5.2 Szlak BDNF-TrkB

Czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (ang. *brain-derived neurotrophic factor*; BDNF) przynależy do rodziny neurotrofin, a więc białkowych czynników wzrostu, które pełnią istotne role w funkcjonowaniu neuronów i rozwoju ośrodkowego oraz obwodowego układu nerwowego. Początkowo BDNF powstaje w formie proneurotrofiny, która przyjmuje postać dojrzałego BDNF po odpowiedniej modyfikacji potranslacyjnej w aparacie Golgiego oraz w dalszej kolejności wewnątrzkomórkowej lub zewnątrzkomórkowej proteolizie (Hing, Sathyaputri, i Potash 2018). Receptorami dla BDNF są białka z rodziny receptorów kinazy tyrozynowej B (ang. *tropomyosin receptor kinase B*; TrkB) oraz białka z rodziny receptorów czynnika martwicy nowotworu (ang. *tumor necrosis factor receptor*; p75NTR) (Woo i wsp. 2019). Dojrzała forma BDNF wykazuje większe powinowactwo do receptora TrkB w porównaniu do p75NTR, a sygnalizacja komórkowa aktywowana przez BDNF/TrkB jest krytyczna dla przeżycia, rozwoju i plastyczności neuronów (Lee i wsp. 2001; Park i Poo 2013). Wiadomo, że związanie BDNF z receptorem TrkB uczestniczy w aktywacji kaskad szlaków sygnałowych w tym PI3K-Akt, fosfolipazy C- γ (ang. *phospholipase C*; PLC- γ), kinaz aktywowanych mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinase*; MAPK) oraz GTPaz z rodziny RHO (Huang i Reichardt 2003). Każdy z nich odpowiada za ważne funkcje komórkowe. Szlak PI3K-Akt wykazuje ochronny efekt antyapoptotyczny oraz moduluje plastyczność synaptyczną zależną od receptorów typu NMDA (Gonzalez i wsp. 2016; Baydyuk i Xu 2014; Park i Poo 2013). Ścieżka PI3K-Akt aktywuje także kinazę mTOR i poprzez regulację syntezy białek oraz dynamiki cytoszkieletu, wzmacnia wzrost i rozgałęzianie dendrytów (Jaworski i wsp. 2005; Swiech i wsp. 2011). Z kolei aktywacja kaskady MAPK przez BDNF-TrkB reguluje lokalną syntezę białek podczas procesu różnicowania komórek nerwowych (Reichardt 2006). Aktywacja kinaz MAPK prowadzi do fosforylacji m.in. białka CREB (ang. *cAMP response element binding protein*). BDNF-TrkB poprzez aktywację CREB reguluje wczesną ekspresję genów w neuronach korowych (np. c-Fos i Arc), a także wzrost i rozgałęzianie dendrytów w neuronach hipokampalnych (Gonzalez i wsp. 2016; Kwon i wsp. 2011; Mowla i wsp. 2001). Szlak sygnałowy PLC- γ katalizuje przemianę fosfatydyloinozydów do trifosforanu inozytolu (ang. *inositol trisphosphate*; IP3) i diacyloglicerolu (ang. *diacylglycerole*; DAG), prowadząc do aktywacji kinaz białkowych C (ang. *protein kinase C*; PKC) i uwalniania z wewnątrzkomórkowych magazynów jonów wapnia, co przekłada się m.in. na regulację plastyczności i transmisji synaptycznej (Jang i wsp. 2013; Gonzalez i wsp. 2016). Natomiast aktywacja GTPaz z rodziny RHO przez BDNF-TrkB

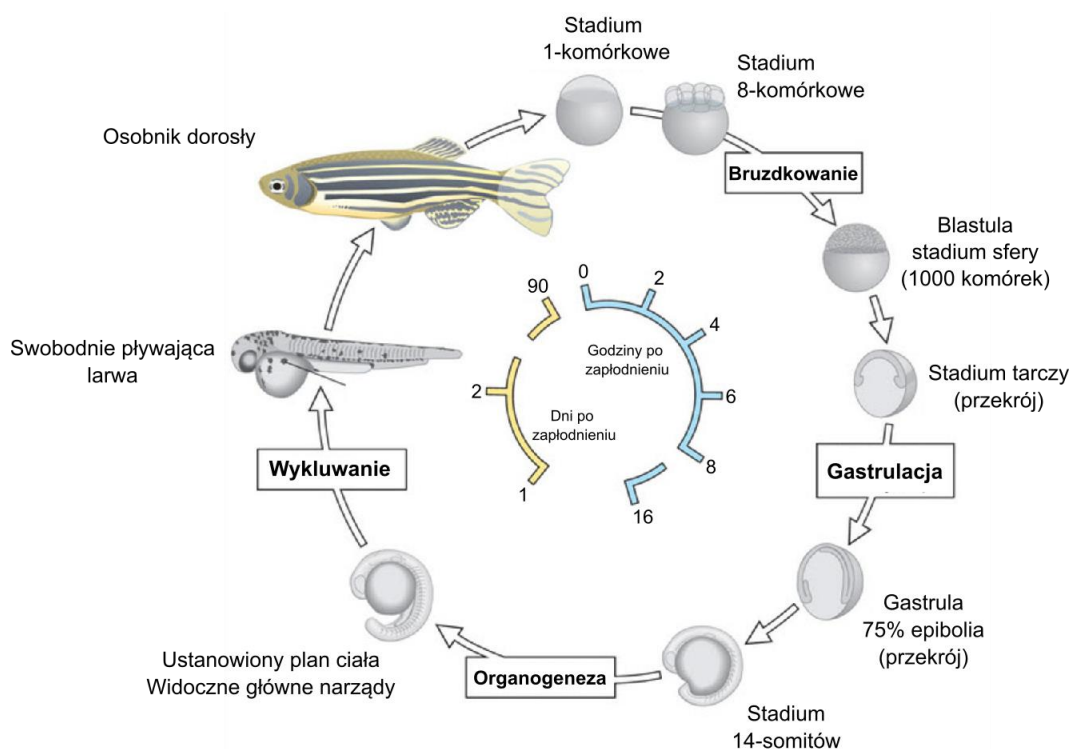
reguluje dynamikę cytoszkieletu aktywnego w komórkach. Biorąc pod uwagę centralną rolę szlaku BDNF-TrkB w funkcjonowaniu neuronów, nie jest zaskakujące, że zmiany w ekspresji lub stabilności neurotrofiny BDNF i jej receptora są wspólnym elementem wielu ludzkich patologii w tym chorób neuropsychiatrycznych i neurodegeneracyjnych, a także epilepsji (Gupta i wsp. 2013; Tejeda i Díaz-Guerra 2017; Liu i wsp. 2013).

1.6 Danio pręgowany w badaniach zaburzeń układu nerwowego

1.6.1 Danio pręgowany, jako organizm modelowy

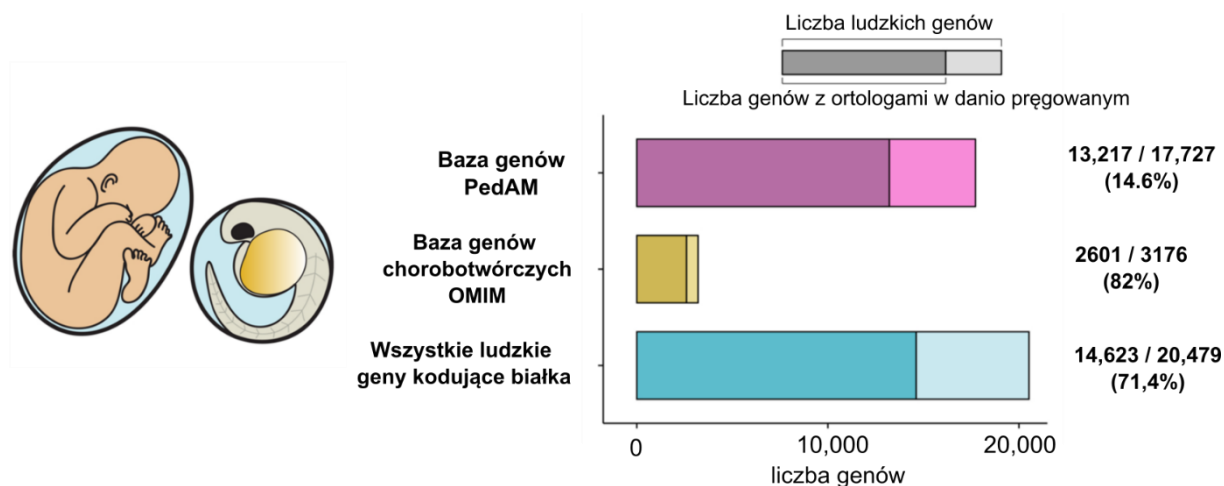
Danio pręgowany (*Danio rerio*, ang. *zebrafish*) to tropikalna ryba słodkowodna, która jako organizm modelowy wniosła imponujący wkład w poznanie mechanizmów kontrolujących embriogenezę, organogenezę, fizjologię i zachowanie. Po raz pierwszy model danio pręgowanego został użyty już w 1970 roku przez George'a Streisingera, który wykorzystał go do badań nad rozwojem i funkcjonowaniem układu nerwowego (Streisinger i wsp. 1981). Od tamtej pory model ryby wzbudza światowe zainteresowanie i jest wykorzystywany nie tylko w badaniach podstawowych, ale również biomedycznych dotyczących modelowania chorób ośrodkowego układu nerwowego i rozwoju terapii farmakologicznych.

Kilka aspektów biologii danio pręgowanego sprawia, że jest on atrakcyjnym modelem eksperymentalnym. Między innymi jest to krótki cykl rozwojowy i szybkie tempo wzrostu. Dorosłe osobniki mogą rozmnażać się już po trzech miesiącach życia (Ryc. 1.5). Ponadto, wyraźny dymorfizm płciowy w stadium dorosłym ułatwia nastawienie tarła. Samce są smukłe z wyraźnym odcieniem różu na łusce, natomiast samice posiadają uwydatnioną część brzuszną z przewagą żółci i srebra w ubarwieniu. Ponadto, para ryb jest w stanie wyprodukować od 100 do 300 jaj tygodniowo, dzięki czemu otrzymuje się wystarczającą ilość materiału do badań nawet z małym zapleczem hodowlanym. Warto wspomnieć, iż sama hodowla ryb, w porównaniu do hodowli ssaków, jest prostsza i wymaga mniejszych nakładów finansowych. Cechy te stanowią podstawę w prowadzeniu średnio- i wysokoprzepustowych badań przesiewowych zarówno farmakologicznych jak i genetycznych. Dodatkowe atrybuty, takie jak zewnętrzne zapłodnienie i optyczna transparentność embrionów danio pręgowanego, pozwalają na przyżyciowe obserwacje oraz manipulacje (genetyczne bądź chemiczne) *in vivo* na wczesnych etapach rozwoju, co jest niewątpliwą przewagą nad modelami ssaczymi oraz istotnym aspektem w badaniach nad rozwojem mózgu.



Ryc. 1.5 Cykl rozwojowy danio pręgowanego. Cykl rozpoczyna się od pojedynczego zapłodnionego jaja. Embriony rozwijają się do stadium 14 somitów w ciągu 16 godzin. Po 24 godzinach zostaje ustalony pełny plan ciała embrionu i są obecne wszystkie narządy. Dwa dni po zapłodnieniu larwy wykluwają się i swobodnie pływają. Danio pręgowany jest w pełni dojrzały w wieku 3 miesięcy. Willemsen i wsp. (2011) z modyfikacjami.

Co więcej, wykazano wysoką homologię genetyczną pomiędzy danio pręgowanym, a człowiekiem. W zsekwencjonowanym genomie ryby zidentyfikowano ponad 70% ortologów ludzkich genów, a wśród tych, które wywołują choroby aż 82% miało swój odpowiednik w danio pręgowanym (Ryc. 1.6) (Varga i wsp. 2018).



Ryc. 1.6 Graficzne przedstawienie homologii genetycznej pomiędzy człowiekiem, a danio pręgowanym. PedAM – ang. *Pediatric Disease Annotations & Medicines*, baza danych zawierająca informacje o chorobach dziecięcych; OMIM – ang. *Online Mendelian Inheritance in Man*, baza danych dotycząca wszystkich opisanych chorób uwarunkowanych genetycznie, występujących u człowieka. Varga i wsp. (2018) z modyfikacjami.

Dynamiczny rozwój technik umożliwiających ukierunkowaną edycję genomu danio pręgowanego, takich jak m.in. nukleazy z motywem palca cynkowego (ang. *zinc finger nuclease*; *ZFN*), nukleazy efektorowe przypominające aktywator transkrypcji (ang. *transcription activator-like effector nucleases*; *TALENs*), czy oparty na mechanizmie pochodzącym z bakterii system CRISPR-Cas9 (ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPR associated protein 9*) przyczynił się do powstania dużej liczby nowych modeli ludzkich chorób i schorzeń genetycznych, charakteryzujących się lepszą specyficnością niż te uzyskane za pomocą mutageny chemicznej N-etylo-nitrozomocznikiem (ang. *N-ethyl-N-nitrosourea*; *ENU*) (Doyon i wsp. 2008; Sander i wsp. 2011; Hwang i wsp. 2013). Manipulacje genetyczne są dużo łatwiejsze w danio pręgowanym w stosunku do modeli ssaczych. Dzięki rozwojowi zewnętrznemu możliwe są mikroiniekcje w stadium zygoty lub elektroporacje bezpośrednio do tkanki (np. mózgu) w rozwijającym się organizmie. Niemniej jednak model danio pręgowanego ma też swoje ograniczenia wynikające choćby z braku chromosomów płciowych, czy duplikacji niektórych genów, co może stanowić wyzwanie w badaniu ich funkcji i komplikować tworzenie modeli chorób genetycznych. Utrudnieniem w badaniach mózgu jest też inny mechanizm neurulacji w danio pręgowanym (opisany w następnym rozdziale; Ryc. 1.7), przez który topologiczne ułożenie niektórych struktur mózgu jest inne niż u ssaków.

1.6.2 Rozwój i organizacja układu nerwowego w danio pręgowanym

Pierwszym etapem rozwoju układu nerwowego kręgowców jest różnicowanie się neuroektodermy z pierwotnego listka zarodkowego. Proces ten zostaje zainicjowany podczas wczesnego rozwoju embrionalnego i nazywany jest pierwotną indukcją neuronalną. U danio pręgowanego wykazano, że potencjał rozwojowy komórek prekursorowych neuroektodermy zostaje zdefiniowany już podczas procesu gastrulacji, ok. 6 godzin po zapłodnieniu (ang. *hours post fertilization*; hpf), kiedy komórki grupują się w klastery, które w przyszłości będą odpowiadać specyficznym regionom mózgu (Woo i Fraser 1995; Wilson, Brand, i Eisen 2002). Następnie, około 10 hpf z neuroektodermy powstaje płytką nerwową, z której w kolejnych etapach neurulacji zostanie uformowana stępka nerwowa, a następnie typowa dla kręgowców cewa nerwowa. W stadium 24 hpf można zidentyfikować granice podstawowych struktur mózgu (takich jak przodomózgowie, śródmózgowie, tyłomózgowie) wraz z prostą, pierwotną siecią neuronalną, która posłuży, jako rusztowanie dla kolejnych populacji neuronów (Ryc. 1.7) (Kimmel 1993; Eisen 1991). W stadium 2-3 dni po zapłodnieniu (ang. *days post fertilization*, dpf) powstają wyspecjalizowane neurony wytwarzające neuroprzekaźniki charakterystyczne dla neurotransmisji m.in. GABAergicznej, glutaminergicznej, czy cholinergicznej (Higashijima, Mandel, i Fetcho 2004; Arenzana i wsp. 2005). Na tym etapie następuje intensywny wzrost i formowanie ostatecznych struktur mózgu.

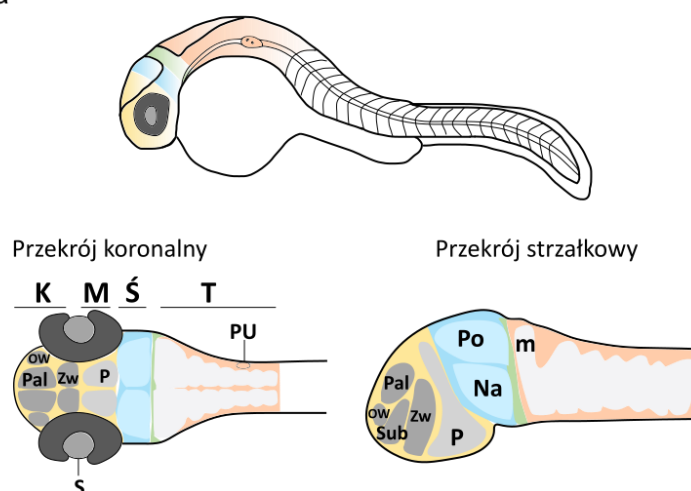
Z przodomózgowia powstaje kresomózgowie, międzymózgowie oraz siatkówka. Podobnie jak u ssaków, kresomózgowie i międzymózgowie stanowią ośrodek decyzyjny mózgu i odpowiadają za złożone procesy poznawcze. W kresomózgowiu wyróżnia się obszar nazywany *pallium* położony grzbietowo, *subpallium* położone brzusznie oraz opuszkę węchową położoną nosowo. *Pallium* bierze udział m.in. w procesach uczenia się i zapamiętywania, a także odpowiada za procesy związane orientacją przestrzenną, czy emocjami takimi jak m.in. strach (Cheng, Jesuthasan, i Penney 2014; Vargas, López, i Portavella 2009; Lal i wsp. 2018). Z kolei obszar *subpallium* jest związany z szeroko pojętymi zachowaniami społecznymi oraz lękiem (Stednitz i wsp. 2018; Geng i Peterson 2019; Assad i wsp. 2020). Opuszka węchowa jest odpowiedzialna za odbieranie sygnałów zapachowych i przekazywaniu ich do innych obszarów mózgu, pośrednicząc w kluczowych funkcjach życiowych danio pręgowanego, takich jak rozpoznawanie zagrożenia, żerowanie, czy też łączenie się w pary (Friedrich i Korsching 1997; Miyasaka i wsp. 2009).

W skład międzymózgowia danio pręgowanego wchodzi wzgórze, podwzgórze, szyszynka oraz uzdeczka. Uzdeczka (ang. *habenula*, Hb) to struktura parzysta składająca się

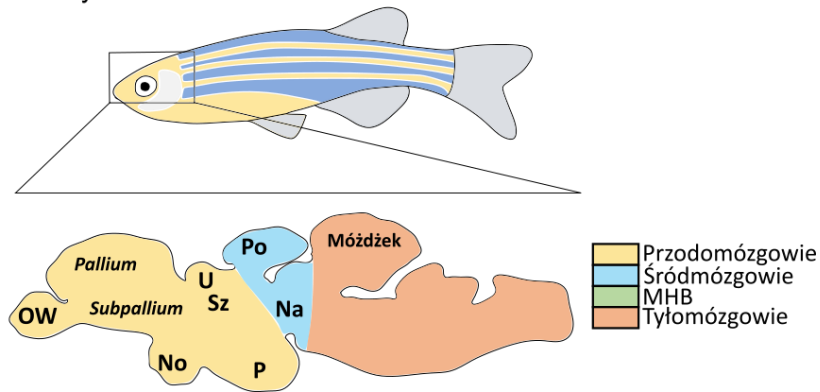
z uzdeczki lewej (LHb) oraz prawej (PHb) (Roberson i Halpern 2018). Wyróżnia się część grzbietową uzdeczki oraz część brzuszną. Obszar grzbietowy odpowiada m.in. za zachowania zależne od lęku i agresji, natomiast obszar brzuszny za zachowania adaptacyjne w odpowiedzi na stres. Oba obszary są niezbędne dla prawidłowego przetwarzania informacji sensorycznych i procesów związanych z emocjami. (Amo i wsp. 2014; Andalman i wsp. 2019).

Śródmózgowie składa się z pokrywy wzrokowej (ang. *optic tectum*), która stanowi centrum odbierania i przetwarzania informacji wzrokowych oraz nakrywki (ang. *tegmentum*), która unerwia tyłomózgowie oraz struktury rdzenia kręgowego odpowiadające za motorykę (Portugues i Engert 2009; Fritsch, Nichols, i Gaufo 2008). Pokrywa wzrokowa posiada złożoną budowę warstwową i jest połączona z siatkówką poprzez aksony komórek zwojowych siatkówki, które tworzą nerw wzrokowy (Kita, Scott, i Goodhill 2015). W rozwoju embrionalnym danio pręgowanego tyłomózgowie jest oddzielone od śródmózgowia przejściową strukturą (ang. *midbrain-hindbrain boundary*; MHB), która zanika w dorosłym mózgu, stając się częścią pokrywy wzrokowej oraz mózdzku. Tyłomózgowie u danio pręgowanego składa się z mózdzku oraz rdzenia przedłużonego, które odpowiadają za kontrolę motoryczną mięśni, odbieranie i przetwarzanie bodźców sensorycznych oraz niektóre procesy poznawcze (Rodríguez i wsp. 2005; Tsai i wsp. 2012). Z tyłomózgowia pochodzą szlaki nerwowe unerwiające głowę i inne części ciała w tym skrzela (Moens i Prince 2002; Köster i Fraser 2001). Schemat mózgu larwy oraz osobnika dorosłego został przedstawiony na Rycinie 1.7.

A. Larwa

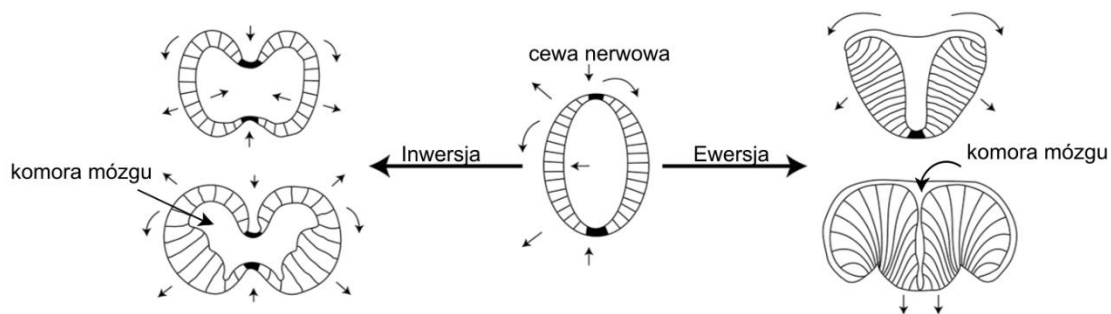


B. Osobnik dorosły



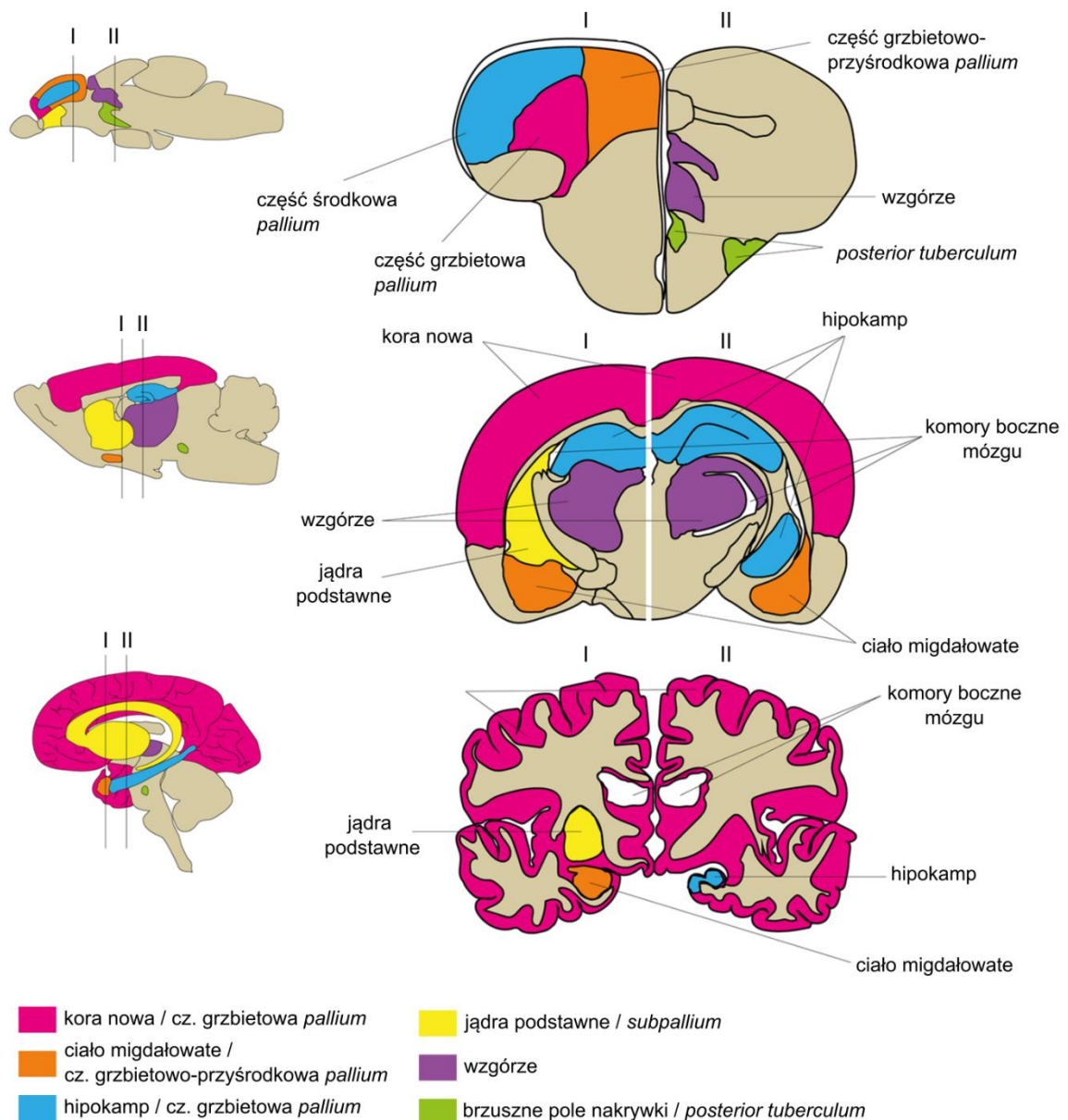
Ryc. 1.7 Rozwój mózgu danio pręgowanego. A) Schemat przedstawiający mózg larwy w stadium 30 hpf, z zaznaczonym przodomózgowiem (na żółto), śródmózgowiem (na niebiesko) i tyłomózgowiem (na pomarańczowo). Schemat przekroju koronalnego i strzałkowego pokazują zawiązki poszczególnych struktur mózgowych. Przodomózgowie składa się z kresomózgowia (ciemny szary) i międzymózgowia (jasnoszary). B) Uproszczony schemat mózgu osobnika dorosłego (bez zachowanej skali). Vaz i wsp. (2019) z modyfikacjami. Wykaz skrótów: K – kresomózgowie; M – międzymózgowie; m – mózdzek; MHB – struktura przejściowa; Na – nakrywka; No – nerw wzrokowy; OW – opuszka węchowa; P – podwzgórze; Pal – *pallium*; Po – pokrywa wzrokowa; Sub – *subpallium*; Ś – śródmózgowie; Sz- szyszynka; T – tyłomózgowie; PU – pęcherzyk ucha; U – uzdeczka; Zw – region zachyłka wzrokowego.

Wiele obszarów mózgu danio pręgowanego posiada swoje odpowiedniki u ssaków, które są homologiczne zarówno pod względem molekularnym, jak i funkcjonalnym. Potwierdzają to konserwowane wśród kręgowców wzorce ekspresji genów charakterystyczne dla obszarów przodomózgowia, śródmózgowia, tyłomózgowia i rdzenia kręgowego (Mueller 2005; Wullimann i Mueller 2004; Hauptmann, Söll, i Gerster 2002; Puelles i Rubenstein 2003). Pomimo różnic w rozwoju kresomózgowia, które u ssaków powstaje w procesie inwersji (zaginania grzbietowej części cewki nerwowej do wewnątrz), a u danio pręgowanego w procesie ewersji (odginania się grzbietowej części cewki nerwowej na boki) wyróżnia się funkcjonalne i topologiczne homologie jego poszczególnych struktur (Ryc. 1.8) (Schmidt, Strähle, i Scholpp 2013).



Rys. 1.8 Model ewersji u danio pręgowanego i inwersji u ssaków. Inwersja kresomózgowia występuje m.in. u ssaków. Polega ona na odginaniu się części grzbietowej cewy nerwowej do wewnątrz, w wyniku czego następuje podział na dwie półkule oraz tworzą się parzyste boczne, komory mózgu. Proces ewersji zachodzi u ryb promieniopłetwych i opiera się na odginaniu grzbietowej części embrionalnego kresomózgowia na zewnątrz, co prowadzi do powstania dwóch półkul otoczonych pojedynczą komorą w kształcie litery T. Langova i wsp. (2020) z modyfikacjami.

Według Mueller i wsp. (2012; 2011) część środkowa *pallium* u danio pręgowanego (ang. *medial pallium*) jest funkcjonalnym odpowiednikiem hipokampa, część grzbietowa *pallium* (ang. *dorsal pallium*) koreluje z częścią kory nowej, natomiast część grzbietowo-przyśrodkowa (ang. *dorsomedial pallial region*) odpowiada strukturze podstawno-bocznej ciała migdałowatego. Natomiast *subpallium* pełni podobną funkcję jak jądra podstawne u ssaków (Mueller, Wullimann, i Guo 2008). Z kolei uzdeczka u danio pręgowanego dzieli się na część grzbietową oraz część brzuszną, której odpowiadają kolejno jądro przyśrodkowe uzdeczki (ang. *medial habenula*) oraz jądro boczne uzdeczki (ang. *lateral habenula*) u ssaków (Amo i wsp. 2010; Agetsuma i wsp. 2010). Schematyczne porównanie wybranych struktur mózgu ryby, myszy i człowieka zostały przedstawione na Rycinie 1.9.



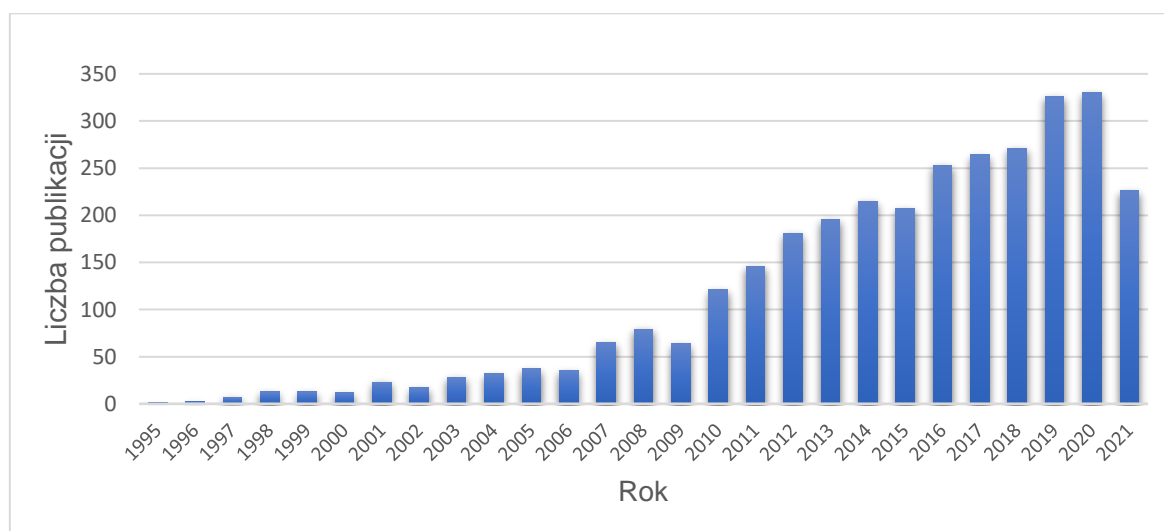
Ryc. 1.9 Porównanie budowy mózgu danio pręgowanego, myszy i człowieka. Szczegółowy opis w tekście. Langova i wsp. (2020) z modyfikacjami.

Komunikacja pomiędzy półkulami mózgowymi ma kluczowe znaczenie dla przetwarzania informacji motoryczno-sensorycznej u organizmów z symetrią dwuboczną. Odpowiadające sobie elementy układu nerwowego łączone są przez wiązki włókien nerwowych, tworzących spoidła mózgowe. Spoidła te powstają z aksonów, które charakteryzuje ukierunkowany wzrost w poprzek linii środkowej mózgu. U wszystkich gatunków kręgowców spoidła mózgowe mają wspólny plan rozwojowy oraz podobne wzorce połączeń i rozmieszczenie przestrzenne w mózgu (Rodrigo Suárez, Gobius, i Richards 2014). U danio pręgowanego i ssaków są obecne m.in. spoidło przednie, spoidło uzdeczek, spoidło postoptyczne, spoidło tylne i spoidło mózdzku (Suárez 2016; Schnabl i wsp. 2020).

Analogiczne są także szlaki nerwowe w poszczególnych strukturach mózgu takich jak wzgórze, pokrywa wzrokowa, mózdzek, rdzeń przedłużony i rdzeń kręgowy (Hashimoto i Hibi 2012; Kinkhabwalaa i wsp. 2011; Mueller 2012; Higashijima i wsp. 2004). Oprócz podobieństw neuroanatomicznych liczne badania wskazują na homologię w neurochemii mózgu ryby i człowieka uwzględniając receptory, transportery oraz enzymy odpowiadające za syntezę i metabolizm neurotransmiterów, główne białka ścieżek sygnałowych m.in. WNT, Notch, czy mTOR (Panula i wsp. 2006; Parker i wsp. 2013; Rink i Wullimann 2004; Sharma i wsp. 2010; Fleming i Rubinsztein 2011; Sharma i wsp. 2019). Obecność ewolucyjnie konserwowanych elementów ośrodkowego układu nerwowego, jego prosta budowa oraz łatwy dostęp do struktur podczas rozwoju embrionalnego u danio pręgowanego sprzyjają modelowaniu chorób neurodegeneracyjnych.

1.6.3 Przydatność danio pręgowanego w badaniach chorób ośrodkowego układu nerwowego

Mimo, że danio pręgowane jest stosunkowo nowym organizmem modelowym dla złożonych schorzeń mózgu, cieszy się dużym zainteresowaniem naukowców pod kątem kompleksowej analizy procesów związanych z rozwojem i degeneracją układu nerwowego, o czym świadczy rosnąca z roku na rok liczba publikacji z wykorzystaniem tego modelu (Ryc. 1.10)



Ryc. 1.10 Wykres przedstawiający liczbę publikacji z użyciem modelu danio pręgowanego w badaniach związanych z OUN wg bazy PubMed. Dane uzyskane z bazy PubMed w listopadzie 2021 w wyniku wyszukiwania słów kluczowych „zebrafish + neurological disease”.

Choroby dotykające ośrodkowego układu nerwowego często oprócz objawów typowo neurologicznych wiążą się z manifestacją neuropsychiatryczną, ściśle związaną z nieprawidłowym funkcjonowaniem mózgu. Danio pręgowany dysponuje bogatym repertuarem zachowań poczynając od prostych odruchów w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne, które możemy obserwować już w 24 godzinach po zapłodnieniu, poprzez bardziej skomplikowane fenotypy rozwijające się w okresie larwalnym, takie jak zachowania społeczne, uczenie się i zapamiętywanie, agresja i zachowania związane z lękiem (Kalueff i wsp. 2013; Egan i wsp. 2009; Wong i wsp. 2010; Dreosti i wsp. 2015). W przypadku tych ostatnich istotny jest fakt, iż u danio pręgowanego, tak jak u ludzi głównym uwalnianym hormonem stresu jest kortyzol (Kalueff, Stewart, i Gerlai 2014). Co istotne istnieje wiele testów pozwalających zbadać zachowanie danio pręgowanego zarówno w stadium larwalnym, jak i dorosłym, które odpowiadają testom przeprowadzonym na gryzoniach i są potwierdzone pod kątem badania określonych fenotypów. Szczegółowe zestawienie zachowań związanych z lękiem oraz opis testów do ich badania u ssaków i danio pręgowanego zostało przedstawione Tabeli 1.1. Ponadto, udowodniono, że obwody neuronalne leżące u podstaw takich zachowań jak sen i czuwanie, czy reakcja na bodziec akustyczny są konserwowane wśród kręgowców, co pozwala założyć, że odkrycia w danio pręgowanym mogą mieć istotne przełożenie w modelach ssaczych (Burgess i Granato 2007; Prober i wsp. 2006; Schoonheim i wsp. 2010; Lovett-Barron i wsp. 2017).

Tabela 1.1. Zestawienie zachowań oraz testów badających lęk u ssaków i danio pręgowanego

Zachowanie	Opis zachowania	Nazwa testu u myszy	Nazwa testu u danio pręgowanego
Tigmotaksja (ang. <i>thigmotaxis</i>)	preferencja do ścianek/obrzeży aparatu eksperymentalnego	Test otwartego pola	Test otwartego pola
Fototaksja (ang. <i>phototaxis</i>)	preferencja do przebywania w świetle i unikania ciemności,	Test ciemnego-jasnego pola	Test ciemnego-jasnego pola
Refleks wzdrygnięcia; reakcja ucieczki (ang. <i>startle response; escape response</i>)	u danio pręgowanego: instynktowna reakcja ucieczki w odpowiedzi na nowe, nieoczekiwane i/lub awersyjne bodźce (np. błysk światła, stukanie/wibracje lub głośny dźwięk) u myszy:	Test wzdrygnięcia	Test reakcji na niespodziewany bodziec/Test reakcji ucieczki

	odruch bezwarunkowy, charakteryzujący się szybkim skurczem mięśni twarzy i mięśni szkieletowych, w odpowiedzi na nieoczekiwany i intensywny bodziec		
Zamieranie/reakcja zneruchomienia (ang. <i>freezing</i>)	całkowite zneruchomienie (bezruch) w odpowiedzi na nieoczekiwany lub awersyjny bodziec	Test zamierania	Test zamierania

Niewątpliwą zaletą danio pręgowanego w badaniach schorzeń związanych z rozwojem mózgu jest możliwość łatwej wizualizacji neuronów. Dostępność licznych linii transgenicznych z wyznakowanymi fluorescencyjnie specyficznymi populacjami neuronów pozwala na przyżyciowe badania w warunkach fizjologicznych. Na przykład dzięki wykorzystaniu genetycznie kodowanej sondy wapniowej GCaMP5 w linii *Tg(HuC:GCaMP5F)* możliwe jest nieinwazyjne monitorowanie aktywności nawet w pojedynczych neuronach, co dostarcza cennych informacji na temat funkcjonowania obwodów neuronalnych (Ahrens i wsp. 2013). Oprócz tego, dzięki niewielkim rozmiarom oraz transparentności larw, możliwe jest wykonywanie barwień immunofluorescencyjnych pełnego przekroju (ang. *whole-mount*), co pozwala zobrazować wybrane białka neuronalne w nienaruszonym, utrwalonym mózgu.

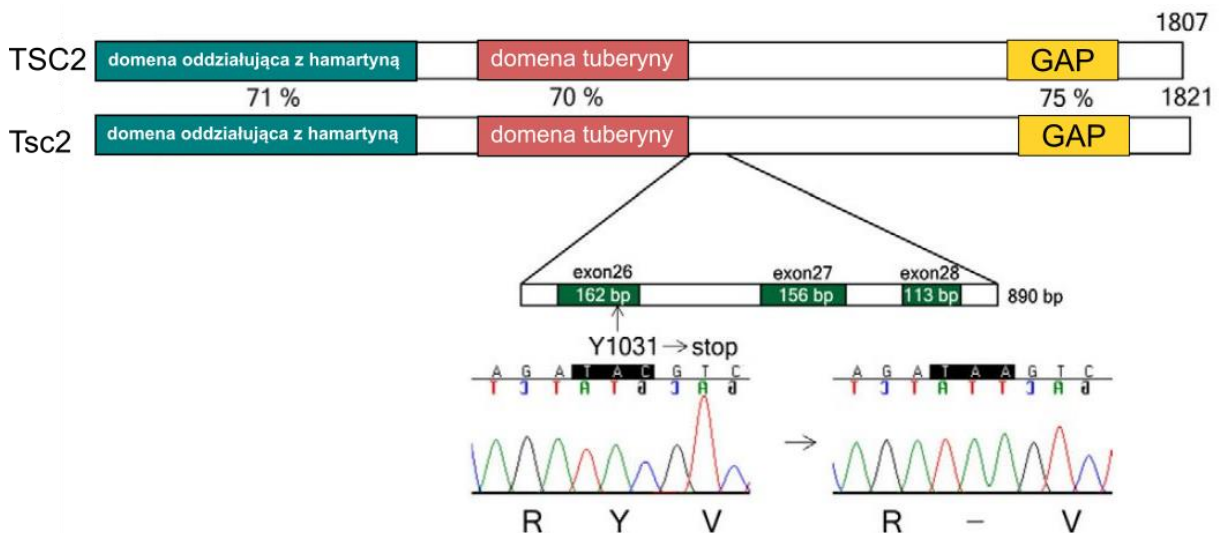
Poszukiwanie nowych leków, które łagodziłyby objawy zaburzeń neurologicznych oraz neuropsychiatrycznych jest trudnym zadaniem, a ponieważ badania *in vitro* często nie przekładają się na wyniki terapeutyczne *in vivo*, konieczne jest stosowanie modeli zwierzęcych. Dzięki małym rozmiarom embrionów oraz larw danio pręgowanego możliwe jest wykorzystanie metod wysokoprzepustowych. Ponadto, zaletą tego modelu w badaniach funkcji mózgu pod kątem farmakologii są nieskomplikowane, łatwe w kontroli metody podawania substancji. Wybrane związki farmakologiczne mogą zostać dostarczone przez bezpośrednie podanie roztworu do wody i wykorzystanie zjawiska dyfuzji przez skrzela do krwiobiegu (Goldsmith 2004). Co więcej, do stadium 8 dpf bariera krew-mózg u danio pręgowanego pozostaje całkowicie przepuszczalna, co umożliwia penetrację leków i wiąże się ze zwiększoną podatnością szlaków sygnałowych na ich działanie na wczesnych etapach rozwoju (Fleming, Diekmann, i Goldsmith 2013). Model danio pręgowanego wykorzystywany jest

z powodzeniem również w behawioralnych badaniach przesiewowych. Dobrym przykładem skriningu chemicznego są doświadczenia przeprowadzone przez Kokela i wsp. (2010), w których za pomocą zautomatyzowanego wysokoprzepustowego systemu pozwalającego na rejestrację oraz analizę zachowań stereotypowych larw danio pręgowanego przetestowano 14 000 substancji chemicznych, co pozwoliło zidentyfikować nowe związki neuroaktywne. Równie pozytywne wyniki badań przesiewowych z zastosowaniem larw uzyskał zespół Floriana Engerta odnajdując związki psychoaktywne stymulujące apetyt, których działanie potwierdzono następnie na modelu ssaczym (Jordi i wsp. 2018). Zastosowanie modelu danio pręgowanego w badaniach wysokoprzepustowych pozwala nie tylko na identyfikację oraz zbadanie bezpieczeństwa nowych substancji terapeutycznych w warunkach przedklinicznych, ale także umożliwia znalezienie nowych zastosowań istniejących leków. W ten właśnie sposób odkryto zastosowanie klemizolu - agonisty receptora serotoniny, w leczeniu lekoopornej epilepsji u ludzi z zespołem Draveta. Choroba ta spowodowana jest mutacją w genie *SCN1A* i charakteryzuje się występowaniem ciężkiej, mioklonicznej padaczki ujawniającej się w wieku niemowlęcym (Akiyama, Kobayashi, i Ohtsuka 2012). Homozygotyczny model danio pręgowanego *scn1lab* odzwierciedlał objawy kliniczne choroby, a przeprowadzony z użyciem tego modelu skrining ponad 3 000 dostępnych na rynku i zatwierdzonych przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków substancji farmakologicznych, pozwolił zidentyfikować skuteczność klemizolu w tym schorzeniu i dał początek badaniom klinicznym pierwszej fazy rozpoczętym w 2019 roku (Baraban, Dinday, i Hortopan 2013; Patton, Zon, i Langenau 2021). Podsumowując praca na danio pręgowanym otwiera nowe perspektywy w pozyskiwaniu oraz rozwoju substancji leczniczych.

1.7 Modele stwardnienia guzowego w danio pręgowanym

Pierwszy model stwardnienia guzowego z wykorzystaniem danio pręgowanego został stworzony w 2009 roku przez zespół Sun z Yale University School of Medicine. Naukowcy zidentyfikowali dwa rybie ortologi genu *TSC1*, nazwane *tscl1a* i *tscl1b*, które wykazują odpowiednio 36% i 44% identyczności pod względem sekwencji nukleotydowej z ludzkim genem. Oprócz tego geny te są w 44% identyczne same ze sobą. Aby zbadać wpływ *tscl1a* i *tscl1b* na rozwój danio pręgowanego, embriony w stadium 1-4-komórkowym nastrzyknięto antysensownymi oligonukleotydami morfolino, które poprzez wiązanie się do kodonu start w mRNA blokowały inicjację translacji. DiBella i wsp. (2009) byli szczególnie zainteresowani patologicznymi zmianami dotyczącymi nerek w stwardnieniu guzowatym, dlatego też skupiono się na mutancie *tscl1a*, u którego w stadium embrionalnym zaobserwowano

obustronne torbiele przednerczy. Oprócz tego stwierdzono brzuszne skrzywienie i defekty w ustanowieniu asymetrii planu ciała, zmiany w długości rzęsek w przewodzie przednerczy oraz potwierdzono nadaktywność szlaku mTOR. DiBella i wsp. (2009) udowodnili, że białko Tsc1a odgrywa rolę w funkcjonowaniu rzęsek oraz prawidłowym rozwoju nerek, jednak nie zajęli się kwestią nieprawidłowości w ośrodkowym układzie nerwowym. Innym modelem stwardnienia guzowego w danio pręgowanym jest stworzona za pomocą mutagenyzy chemicznej ENU linia *tsc2^{vu242}* niosąca punktową mutację typu nonsens w genie *tsc2*. W wyniku tej mutacji powstaje niepełna sekwencja aminokwasowa białka Tsc2 bez domeny katalitycznej GAP. Wykazano, że białko Tsc2 danio pręgowanego jest w 61% identyczne pod względem sekwencji aminokwasowej z ludzkim TSC2, a domena białkowa oddziałująca z hamartyną, domena tuberyny i domena GAP są ściśle konserwowane między danio pręgowanym, a człowiekiem (Ryc. 1.11) (Kim i wsp. 2011).



Ryc. 1.11 Schemat struktury przewidywanych domen białkowych TSC2 u człowieka i danio pręgowanego (Tsc2). Na niebiesko zaznaczona domena oddziałująca z hamartyną, na zielono domena tuberyny, a na czerwono domena GAP. Mutacja *vu242* powoduje powstanie przedwczesnego kodonu STOP w eksonie 26. Kim i wsp. (2011) z modyfikacjami.

Hybrydyzacja *in situ* umożliwiła zbadanie wzorców ekspresji genu *tsc2* w rozwijających się embrionach danio pręgowanego wskazując na podobieństwa z wzorcami obserwowanymi u ssaków. Stwierdzono powszechne występowanie transkryptu *tsc2* poczynając od stadium blastuli. W 25 hpf obserwowano wysoki poziom mRNA *tsc2* w rozwijającym się oku, przodomózgowiu, śródmózgowiu, bocznej części tyłomózgowia, pęcherzykach usznych i naczyniach krwionośnych. Sprawdzono, że ekspresja genu *tsc2* zmalała w oku, sercu oraz jelitach w stadium 3 dpf i równocześnie wzrosła w mózgu.

Mutanty pozbawione genu *tsc2*, *tsc2^{vu242/vu242}*, umierały we wczesnych stadiach larwalnych (do stadium 11 dpf), przejawiając wielonarządowe patologie w tym zaburzenia w organizacji istoty białej i szarej mózgu oraz występowaniem powiększonych neuronów w mózgu i rdzeniu kręgowym. Mutanty te wykazywały także nadmierną aktywację ścieżki mTORC1 w mózgu i w innych częściach ciała. Oprócz tego larwy *tsc2^{vu242/vu242}* miały problemy z napełnianiem pęcherza pławnego. Bezpośredni inhibitor mTOR, rapamycyna, zmniejszał aktywność kinazy mTORC1 w zależności od zastosowanej dawki, a także przywracał prawidłowy fenotyp komórkowy wskazując na jego zależność od szlaku mTORC1. Mutanty heterozygotyczne *tsc2^{vu242/+}* wykazywały jedynie niewielki wzrost aktywności kinazy mTORC1, poza tym miały niezmienną morfologię i normalną żywotność z zachowaną płodnością. Wyniki te sugerowały, że istnieje próg, powyżej którego zwiększona aktywność szlaku mTOR powoduje powstawanie patologicznych zmian w narządach. W 2017 r. (Scheldeman i wsp.) oraz 2019 r. (Serra i wsp.) roku ukazały się dwie kolejne prace, w których wykonano wstępną charakterystykę tego samego modelu stwardnienia guzowego w danio pręgowanym – mutantu *tsc2^{vu242/vu242}*. W pracy Scheldeman i wsp. (2017) zanalizowano zachowanie larw linii *tsc2^{vu242}* pod kątem podstawowych zdolności ruchowych oraz odpowiedzi na wybrane bodźce sensoryczne, wykazując obniżenie całkowitej aktywności mutantów homozygotycznych. Nie wyjaśniono jednak potencjalnych przyczyn fenotypów behawioralnych zaobserwowanych u mutantów homozygotycznych. Oprócz tego wykonano również pomiary elektrofizjologiczne w pokrywie wzrokowej wskazując na nieprawidłową aktywność mózgu przypominającą napady padaczkowe. Niemniej jednak należy pamiętać, że u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym epileptogennym regionem mózgu jest obszar kory mózgowej, gdzie rozwijają się charakterystyczne w tej chorobie zmiany neuropatologiczne, a odpowiednikiem kory mózgowej w danio pręgowanym jest obszar grzbietowy *pallium* (Mueller i wsp. 2011; Mueller 2012). Oprócz tego Scheldemann i wsp. (2017) przeprowadzili analizę transkryptomu u larw linii *tsc2^{vu242}*. Porównując do siostrzanych kontroli typu dzikiego u mutantów homozygotycznych stwierdzono zmiany w poziomie mRNA dla genów związanych m.in. z reakcją immunologiczną i stanem zapalnym oraz kanałami wapniowymi. Z kolei w pracy Serra i wsp. (2019) zbadano wpływ stosowania kannabidiolu (CBD) na aktywność lokomotoryczną larw oraz aktywację ścieżki mTORC1 w mózgu mutantów *tsc2^{vu242/vu242}*. Po podaniu CBD stwierdzono obniżenie całkowitej aktywności larw linii *tsc2^{vu242}* (wszystkich genotypów) oraz zmniejszenie aktywności ścieżki mTORC1 w mózgu mutantów. Niemniej jednak w żadnej z tych prac nie zbadano cech strukturalnych mózgu, które mogłyby wskazać przyczynę obserwowanych fenotypów behawioralnych. Co więcej, oprócz zaburzeń

neurologicznych oraz neuropatologicznych ważnym elementem stwardnienia guzowatego są zaburzenia neuropsychiatryczne TANDs, które do tej pory nie zostały zbadane w modelu *tsc2^{vu242/vu242}*. Z tego względu w niniejszej pracy skupiono się na pogłębionej analizie behawioralnej wybranych zachowań podobnych do TANDs oraz charakterystyce wybranych patologii neuroanatomicznych oraz molekularnych w mózgu mutantów *tsc2^{vu242/vu242}*.

2. CELE PRACY

Stwardnienie guzowate (ang. *Tuberous Sclerosis Complex*) to rzadka choroba genetyczna, spowodowana mutacją w genie *TSC1* lub *TSC2*, prowadzącą do utraty funkcji oraz nadmiernej aktywności kinazy mTOR. Na skomplikowany obraz kliniczny tego schorzenia składają się zarówno zaburzenia neurologiczne, jak i neuropsychiatryczne (ang. *TANDs - Tuberous Sclerosis Associated Neuropsychiatric Disorders*). Część objawów stwardnienia guzowatego pojawia się już na bardzo wczesnych etapach rozwoju, kiedy obserwacje przyżyciowe rozwijających się płodów ssaków wymagają skomplikowanych i często inwazyjnych metod badawczych. Ponadto, odtworzenie poszczególnych fenotypów choroby powszechnie występujących u pacjentów wymaga często zastosowania różnych modeli zwierzęcych. U ssaków całkowity nokaut genów *Tsc1* lub *Tsc2* jest letalny, dlatego też wykorzystuje się głównie modele heterozygotyczne oraz oparte na nokautach warunkowych w wybranych komórkach czy tkankach. Użyty w niniejszej pracy doktorskiej model stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym *tsc2^{vu242/vu242}* pozwala przynajmniej częściowo zaadresować te ograniczenia. Dzięki zewnętrznemu zapłodnieniu i optycznej transparentności embrionów możliwe są przyżyciowe obserwacje rozwijającego się układu nerwowego w warunkach fizjologicznych na wczesnych etapach rozwoju. Ponadto, larwy danio pręgowanego wykazują szereg zachowań, które można analizować pod kątem współlistniejących w stwardnieniu guzowatym zaburzeń neuropsychiatrycznych. **Dlatego też, celem podjętych w mojej pracy doktorskiej badań były: analiza wybranych zmian molekularnych, neuroanatomicznych oraz behawioralnych w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym *tsc2^{vu242/vu242}* oraz zbadanie działania wybranych związków farmakologicznych na zaobserwowane fenotypy.** Aby go zrealizować, skupiono się na następujących celach szczegółowych:

- 1) Charakterystyka fenotypu behawioralnego pod kątem występowania napadów padaczkowych oraz wybranych aspektów TANDs w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym.
- 2) Charakterystyka fenotypu neuroanatomicznego wybranych obwodów neuronalnych w mózgu oraz analiza ekspresji genów pod kątem zaburzeń w procesach ukierunkowanego wzrostu aksonów w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym.
- 3) Zbadanie modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym pod kątem zaburzeń w ścieżkach sygnałowych związanych z neurotransmisją hamującą.
- 4) Analiza wpływu wybranych związków farmakologicznych na obserwowane fenotypy behawioralne oraz neuroanatomiczne w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Najczęściej stosowane materiały i odczynniki

Roztwory

Roztwory (Tabela 3.1) sporządzano wykorzystując wodę oczyszczoną przez odwróconą osmozę (RO) i ultrafiltrację z użyciem filtrów Mili-Q Plus (Milipore) oraz odczynniki pochodzące z firm Sigma-Aldrich (Merck), Bioshop i POCH (o ile nie napisano inaczej).

Tabela 3.1 Stosowane w pracy roztwory i bufony

Nazwa roztworu/buforu	Skład
Praca z kwasami nukleinowymi i białkami	
5 x bufor Laemmliego	0,315 M Tris-HCl pH 6,8; 50 % glicerol; 10 % SDS; 25 % (v/v) β-merkaptotanol; 0,0125 % błękit bromofenolowy
TE (Tris-EDTA), bufor do izolacji DNA	10 mM Tris-HCL pH 8,0; 1 mM EDTA; pH 8,0
10 x Tris-Glicyna-SDS, bufor do elektroforezy białek	0,25 M Tris pH 8,4; 2 M glicyna; 10 % SDS
10 x TBE (Tris-Boran-EDTA), bufor do elektroforezy DNA	0,89 M Tris; 0,89 M kwas borowy; 20 mM EDTA; pH 8,0
Roztwór Ringera	116 mM NaCl; 2,9 mM KCl; 1,8 mM CaCl ₂ ; 5 mM HEPES, pH 7,2
Roztwór Ringera 1	4 mM leupeptyna; 0,3 mM aprotynina; 0,8 M hydrochlorek benzamidyny; 1 mM EDTA w roztworze Ringera
Roztwór Ringera 2	1 mM β-glicerofosforan disodowy; 0,25 mM Pefabloc®; 0,5 mM Na ₃ VO ₄ ; 0,25 mM pirofosforan tetrasodu; 2,5 mM NaF w roztworze Ringera 1
Roztwór proteinazy K	5 mg/ml proteinaza K (A&A Biotechnology), 50 % glicerol w TE
6 x bufor obciążający do DNA	30 % glicerol; 0,25 % błękit bromofenolowy; 0,25 % błękit ksylenowy
Barwienia immunofluorescencyjne	
Bufor utrwalający PFA	4 % paraformaldehyd (PFA) w 1 x PBS
Roztwór depigmentacyjny	3 % H ₂ O ₂ , 1 % KOH w H ₂ O
Odczynnik zamykacza	2 % 3,4,5-trihydroksybenzoesan propylu w 90 % glicerolu

10 x PBS (ang. <i>Phosphate-buffered saline</i>), roztwór soli buforowany fosforanami	1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 80 mM Na_2HPO_4 ; 14 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4
PBSTR	0,2 % Triton™ X-100 w PBS
PBSTR-DMSO	20 % DMSO w PBSTR
PBSTR-DMSO-glicyna	0,3M glicyna w PBSTR-DMSO
PBSTR-Tween	0,2 % TWEEN® 20 w PBSTR
Bufor blokujący	6 % kozia surowica w PBSTR-DMSO
Bufor do odkrywania antygenów	150 mM Tris-HCl; pH 9,0
Western Blot	
Bufor Towbina	25 mM Tris pH 8,3; 20 % metanol; 0,192 M glicyna
Roztwór czerwieni Ponceau S	40 % metanol; 15 % kwas octowy; 0,25 % czerwien Ponceau S
10 x TBS (ang. <i>Tris-buffered saline</i>) roztwór soli buforowany Tris	0,5 M Tris-HCl pH 7,5; 1,5 M NaCl
Mleko-TBS	5 % mleko odtłuszczone w TBS
BSA-TBS	5 % BSA (surowicza albumina wołowa, ang. <i>Bovine Serum Albumin</i>) w TBS
1 x TBST	0,2% TWEEN® 20 w TBS
BSA-TBST	5 % BSA w TBST
Mleko-TBST	5 % mleko odtłuszczone w TBST
Hodowla Danio pręgowanego	
60 x roztwór E3	0,87 % NaCl; 0,04 % KCl; 0,145 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,245 % $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; pH 7,2
1 x roztwór E3 z błękitem metylowym	1 ml 0,05 % błękitu metylowego, 16,7 ml 60 x E3, uzupełnione do 1 L wodą RO
1 x PTU	0,003 % fenyliotiomocznik w E3
20x mesylan trikainy (MS-222)	4 g/L MS-222; buforowane 1 M Tris, pH 7,0
Mesylan trikainy do usypiania	1 x mesylan trikainy
Mesylan trikainy do uśmiercania	3 x mesylan trikainy

Przeciwciała

Tabela 3.2 Stosowane w pracy przeciwciała pierwszorzędowe

Antygen	Pochodzenie przeciwciała	Stosowane rozcieńczenie	Numer katalogowy i producent
Acetylowana Tubulina Lys40	mysz	IF 1 : 150	GTX16292, Genetex
GAD 65/67	królik	IF 1 : 250	ab11070, ABCAM
S6	mysz	WB 1 : 250	sc-74459, Santa Cruz Biotechnology
P-S6 S235/236	królik	WB 1 : 1000	CS4858, Cell Signaling Technology
α -Tubulina	mysz	WB 1 : 2000	T5168, Sigma-Aldrich (Merck)

IF – barwienie immunofluorescencyjne, WB – Western Blot

Tabela 3.3 Stosowane w pracy przeciwciała drugorzędowe

Nazwa przeciwciała	Pochodzenie przeciwciała	Stosowane rozcieńczenie	Numer katalogowy i producent
anty-mysie Alexa Fluor™ 568	koza	IF 1 : 1000	A10037, Thermo Scientific
anty-królicze Alexa Fluor™ 488	koza	IF 1 : 1000	A21206, Thermo Scientific
anty-królicze IgG IRDye® 800CW	osioł	WB 1 : 10 000	926-68023, Li-Cor Biosciences
anty-mysie IgG IRDye® 680RD	osioł	WB 1 : 10 000	926-32212, Li-Cor Biosciences

IF – barwienie immunofluorescencyjne, WB – Western Blot

3.2 Związki farmakologiczne

Tabela 3.4 Stosowane w pracy związki farmakologiczne.

Substancja	Charakterystyka	Stosowane stężenie	Stosowany czas traktowania	Numer katalogowy i producent
rapamycyna	antybiotyk makrolidowy, inhibitor mTORC1	200 nM	<i>krótkie traktowanie:</i> 3 h w 4 dpf <i>długie traktowanie:</i> 24 h w 4 dpf <i>prewencyjne:</i> od 48 hpf	13346, Cayman Chemical Company

wigabatryna	analog kwasu γ -aminomasłowego, wybiórczo i nieodwracalnie hamuje aminotransferazę kwasu γ -aminomasłowego	60 μ M	<i>długie traktowanie:</i> 24 h w 4 dpf <i>traktowanie przewencyjne:</i> od 48 hpf	V8261, Sigma-Aldrich (Merck)
ANA-12	selektywny, niekonkurencyjny antagonist receptoru TrkB	50 nM	<i>długie traktowanie:</i> 24 h w 4 dpf	SML020, Sigma-Aldrich (Merck)

3.3 Linie danio pręgowanego

Tabela 3.5 Charakterystyka linii danio pręgowanego, które zostały wykorzystane w pracy.

Linia	Charakterystyka	Referencje
<i>tsc2^{vu242}</i> w tle genetycznym <i>ABTL</i>	Linia <i>tsc2^{vu242}</i> niesie punktową mutację typu nonsens c.3087C>A, p.Y1031X w genie <i>tsc2</i> , w wyniku czego powstaje Tuberyna pozbawiona domeny GAP, co uniemożliwia stworzenie funkcjonalnego kompleksu hamującego kinazę mTOR (ang. <i>mechanistic Target of Rapamycin</i>).	(Kim i wsp. 2011)
<i>tsc2^{vu242}</i> w tle genetycznym <i>casper</i>	Linia <i>tsc2^{vu242}</i> w tle genetycznym <i>casper</i> niesie dodatkowo mutacje w układzie homozygotycznym <i>mitfa^{w2/w2}</i> oraz <i>mpv17^{a9/a9}</i> , osobniki wykazują brak większości melanoforów i irydoforów w embriogenezie oraz dorosłości.	(White i wsp. 2008)
<i>Tg(ptf1a:GFP);tsc2^{vu242}</i> w tle genetycznym <i>casper</i>	Linia transgeniczna <i>tsc2^{vu242}</i> z wyznakowanymi fluorescencyjnie (GFP) komórkami nerwowymi z aktywną ekspresją genu <i>ptf1a</i> (podjednostka alfa czynnika transkrypcyjnego trzustki 1), uzyskana z krzyżówki linii transgenicznej <i>Tg(ath5:gapRFP/ptf1a:GFP/crx:gapCFP)</i> z <i>tsc2^{vu242/+}</i> . <i>Tg(ath5:gapRFP/ptf1a:GFP/crx:gapCFP)</i> uzyskano od Prof. Williama Harrisa (Uniwersytet w Cambridge).	(Almeida i wsp. 2014)

<p><i>Tg(HuC:GCaMP5G);tsc2^{vu242}</i> w tle genetycznym <i>casper</i></p>	<p>Linia <i>tsc2^{vu242}</i> z ekspresją sondy wapniowej GCaMP5G pod promotorem neuronalnym <i>HuC</i>, uzyskana z krzyżówki <i>tsc2^{vu242/+}</i> z linią transgeniczną <i>Tg(HuC:GCaMP5G)</i>. Linię <i>Tg(HuC:GCaMP5G)</i> uzyskano od Prof. Michaela Orgera (Centrum badań nad nieznanym Fundacji Champalimaud).</p>	<p>(Ahrens i wsp. 2013)</p>
----------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------

3.4 Hodowla Danio pręgowanego

3.4.1 Warunki hodowli dorosłych ryb

Hodowlę ryb danio pręgowany prowadzono w licencjonowanej Pracowni Hodowli danio pręgowanego Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie (numer rejestru PL14656251 - nadany przez Powiatowy Inspektorat Weterynarii w Warszawie oraz numery rejestru 064 i 051 - nadane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego). Do hodowli dorosłych osobników stosowano zautomatyzowany system wodny firmy Tecniplast (USA). Hodowlę prowadzono w stałych warunkach zgodnych z międzynarodowymi wytycznymi: temp. wody 27-28 °C, pH 6,9-7,2, przewodność ~ 800 µS, z zachowanym cyklem świetlnym 14 h światła/10 h ciemności. Maksymalne zagęszczenie ryb wynosiło 6-7 osobników na litr. Ryby karmiono 4 razy dziennie w zależności od wieku, pokarmem suchym oraz żywym (artemia).

3.4.2 Warunki hodowli larw

Uzyskaną z wytarcia minimum 2 par dorosłych osobników ikrę hodowano na szalkach Petriego o średnicy 100 mm (Ø100 mm) w roztworze E3 z dodatkiem błękitu metylowego, zapobiegającego infekcjom grzybiczym. Utrzymywano zagęszczenie maksymalnie 50 osobników na szalkę. Hodowlę prowadzono w inkubatorach z zachowanym cyklem świetlnym 14 h światła/10 h ciemności, w optymalnej dla rozwoju temperaturze 28,5 °C lub z zakresu 25-32 °C, w celu spowolnienia lub przyspieszenia tempa rozwoju. Larwy starsze niż 5 dpf karmiono wrotkami. Wiek larw wyliczano na podstawie wzoru:

HT – liczba godzin hodowli w danej temperaturze (T)

$$\mathbf{HT} = \mathbf{h}/(0,055 \times \mathbf{T} - 0,57)$$

T – zastosowana temperatura hodowli

h – docelowe stadium rozwoju podane w godzinach po zapłodnieniu

W celu zaburzenia rozwoju melanoforów i uniemożliwienia wytworzenia pigmentu, do roztworu hodowlanego codziennie dodawano PTU, przy czym pierwsze podanie następowało w ok. 20 godzinie po zapłodnieniu.

Wszystkie eksperymenty z wykorzystaniem larw danio pręgowanego przeprowadzono w zgodzie z przepisami prawa zagwarantowanymi ustawą z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych, oraz dyrektywą 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych.

3.4.3 Traktowanie larw roztworami związków farmakologicznych

Przygotowywano stężone roztwory odpowiednich związków farmakologicznych, rozpuszczając je w roztworze E3 lub dimetylosulfotlenku (DMSO, Sigma Aldrich (Merck)) i przechowywano do czasu, aż będą potrzebne, zgodnie z wytycznymi producenta. Larwy traktowano poprzez dodanie roztworu związku farmakologicznego bezpośrednio do szalki hodowlanej z roztworem E3, wykorzystując wchłanianie przez skrzela oraz skórę larw. W przypadku związków rozpuszczalnych w DMSO przeprowadzono testy toksyczności u ryb typu dzikiego nie stwierdzając żadnych efektów przy stężeniu tej substancji poniżej 0,02% w roztworze. Jako warunki kontrolne traktowano hodowlę larw w roztworze E3.

3.5 Genotypowanie larw linii *tsc2^{vu242}*

Uzyskane z krzyżówek ryb heterozygotycznych larwy mutantu *tsc2^{vu242}* poddawano analizie mutacji w genie *tsc2*, aby uzyskać informację na temat genotypu (dziki, heterozygota, homozygota), co było niezbędne do przeprowadzenia eksperymentów i analizy uzyskanych wyników. W tym celu izolowano z larw genomowe DNA (opisano w Rozdziale 3.6.1), a następnie stosowano jedną z dwóch dostępnych metod: reakcję łańcuchową polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*; PCR) połączoną z trawieniem produktu PCR enzymem

restrykcyjnym HpyCH4IV i analizą fragmentów restrykcyjnych po elektroforezie w żelu agarozowym (opisano w Rozdziale 3.5.1) lub reakcją wysokorozdzielczego topnienia matrycy (ang. *High Resolution Melting*, HRM) wraz z analizą krzywych topnienia (opisano w Rozdziale 3.5.2)

Tabela 3.6 Sekwencje starterów stosowanych w analizie mutacji *tsc2^{vu242}*

Metoda badawcza	Sekwencje starterów 5'-3'
PCR	<i>tsc2_R</i> CTCTTGGGCAGAGCAGAGAAGTT GG
	<i>tsc2_F</i> CCAGCACCCACCTGCAGTCTGG
HRM	<i>tsc2_R</i> CTTGGGCAGAGCAGAGAAGT
	<i>tsc2_F</i> GAGACCTGCCTGGACATGAT

3.5.1 Reakcja PCR

Genomowe DNA (gDNA) larw linii *tsc2^{vu242}* namnażano metodą PCR. Próbkę przygotowano w objętości 30 µl według zaleceń producenta zestawu Taq PCR Core Kit (QIAGEN, 201223), z użyciem starterów wymienionych w Tabeli 3.6. Przygotowując mieszaninę reakcyjną uwzględniano wysoką zawartość par GC w stosowanej matrycy DNA i używano znajdującego się w zestawie roztworu Q-Solution™. Reakcję przeprowadzano za pomocą termocyklera Bio-Rad T100 Thermal Cycler stosując warunki temperaturowe zamieszczone w Tabeli 3.7.

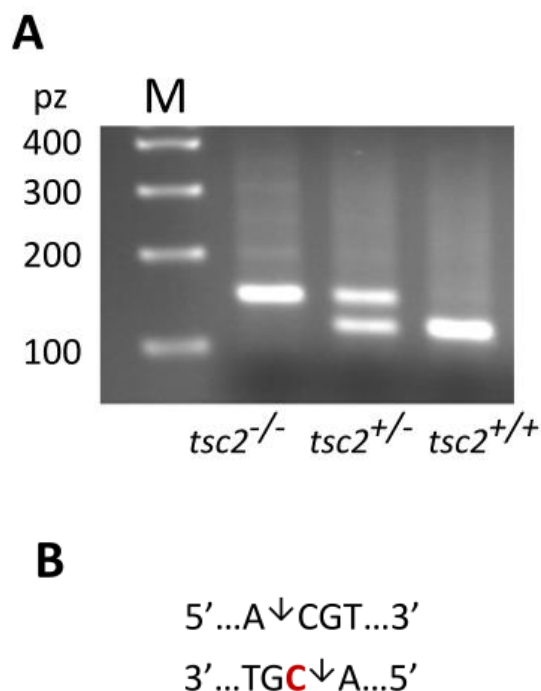
Tabela 3.7 Warunki temperaturowe reakcji PCR

Etap reakcji	Temperatura	Czas
Denaturacja wstępna	95°C	5 min
Denaturacja	95°C	30 s
Przyłączanie starterów	67°C	30 s
Wydłużanie	72°C	30 s
Wydłużanie końcowe	72°C	3 min
Chłodzenie	4°C	∞

} x 34

3.5.1.1 Trawienie DNA enzymem restrykcyjnym HpyCH4IV i elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Przygotowywano mieszaninę reakcyjną, w której skład wchodziło: 10 µl produktu PCR, 3 µl CutSmart Buffer (NEB, B7204S), 0,5 µl enzymu HpyCH4IV (NEB, R0620) i 16,5 µl wody miliQ. Próbkę inkubowano w 37 °C przez 40 min, a następnie inaktywowano w 80°C przez 10 min. W celu rozdziału fragmentów DNA o wielkości 100-200 par zasad używano 2 % żelu agarozowego w 1 x TBE z dodatkiem barwnika kwasów nukleinowych SimplySafe™ (0,05 µl/ml, EURx, E4600). Na żel nanoszono całość próbek z odpowiednio rozcieńczonym buforem obciążającym do DNA (Tabela 3.1) oraz wzorzec mas cząsteczkowych Perfect™ 100 bp DNA Ladder (EURx, E3134-01). Elektroforezę prowadzono używając aparatu do elektroforezy horyzontalnej firmy Bio-Rad w temperaturze pokojowej, przy stałym napięciu 130 V, w buforze 1 x TBE. Rozdzielone fragmenty DNA wizualizowano za pomocą transluminatora GeneFlash (Syngene). Przykładowy wynik analizy wraz z pokazaną sekwencją rozpoznawaną przez enzym HpyCH4IV przedstawiono na Ryc. 3.1.



Ryc. 3.1 Przedstawienie metody analizy restrykcyjnej DNA larw linii *tsc2*^{vu242}
A) Przykładowy wynik analizy fragmentów restrykcyjnych po elektroforezie w żelu agarozowym. M – marker wielkości DNA, Perfect™ 100 bp DNA Ladder; pz – pary zasad; Mutacja typu nonsense w genie *tsc2* (c.3087C>A) powoduje utratę miejsca cięcia dla enzymu HpyCH4IV. Analiza fragmentów restrykcyjnych pozwala zidentyfikować wszystkie 3 genotypy. B) Sekwencja rozpoznawana przez enzym HpyCH4IV, znajdująca się w miejscu

mutacji genu *tsc2*. Na czerwono zaznaczono cytozynę, ulegającą substytucji do adeniny c.3087C>A.

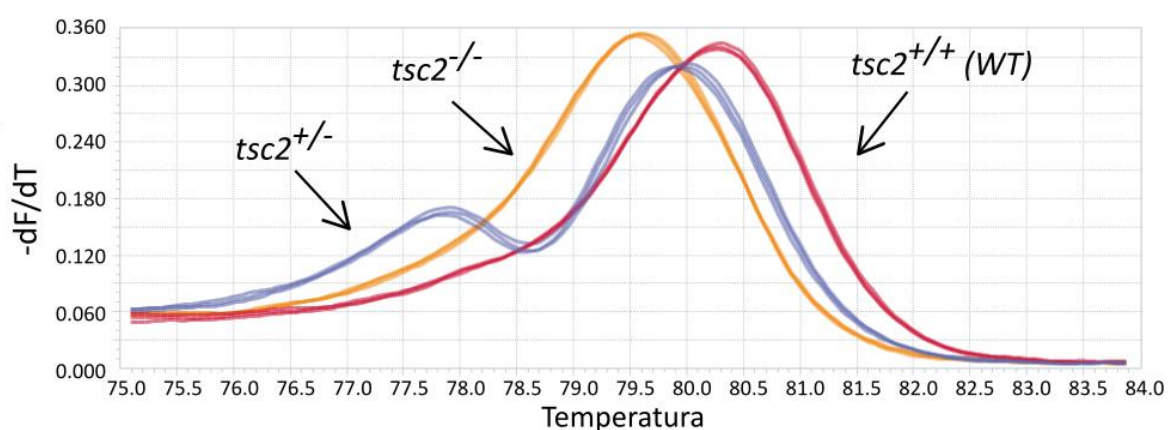
3.5.2 Analiza profilu topnienia matrycy w wysokiej rozdzielczości HRM

Analizę mutacji u larw linii *tsc2^{vu242}* wykonywano za pomocą metody HRM opartej na wykrywaniu różnic w krzywych topnienia cząsteczek DNA namnażanych w reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *Real Time PCR*; RT-PCR). Próbkę przygotowano w objętości 10 µl według zaleceń producenta zestawu Luminaris Color HRM qPCR Master Mix (ThermoFisher, K1antit031BID) z użyciem starterów wymienionych w Tabeli 3.6. Reakcję przeprowadzono za pomocą Roche LightCycler® 96 System stosując warunki temperaturowe zamieszczone w Tabeli 3.8. Przykładowy wynik analizy HRM przedstawiono na Ryc. 3.2.

Tabela 3.8 Warunki temperaturowe reakcji HRM

Etap reakcji	Temperatura	Czas
Preinkubacja	95°C	7 min
2-stopniowa amplifikacja	95°C	10 s
	60°C	15 s
HRM	95°C	15 s
	60°C	15 s
	95°C	∞

} x 40



Ryc. 3.2 Przykładowy wynik analizy HRM w celu zidentyfikowania genotypów larw linii *tsc2^{vu242}* na podstawie krzywych topnienia. $-dF/dT$ – pochodna krzywej topnienia. Strzałki wskazują krzywe topnienia charakterystyczne dla poszczególnych genotypów larw linii *tsc2^{vu242}*. Substytucja cytozyny na adeninę w genie *tsc2* u mutantu *tsc2^{-/-}* prowadzi do zmiany temperatury topnienia (T_m) analizowanego amplikonu o 0,7 °C względem larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}* (WT). W wyniku zamiany pojedynczego nukleotydu następuje przesunięcie pikiny krzywej topnienia, a więc punktu, w którym 50% cząsteczek DNA uległo denaturacji i rozpleceniu do postaci jednoniciowej.

3.6 Metody pracy z kwasami nukleinowymi

3.6.1 Izolacja genomowego DNA

Genomowe DNA izolowano z ogonów lub całych larw linii *tsc2^{vu242}*. Ryby uśmiercano przez przedawkowanie mesylanu trikainy (Sigma-Aldrich, E10521), a następnie pobrany materiał umieszczano w płytkach 96-dołkowych w buforze TE (20 µl/dołek), w którym mógł być zamrożony i przechowywany w -20 °C aż do dalszej analizy. W kolejnym etapie materiał inkubowano 10 min w 95 °C w celu inaktywacji endogennych nukleaz. Następnie dodawano roztwór proteinazy K (stężenie końcowe 0,5 mg/ml) i próbkę umieszczano w 55 °C na 3 h aby usunąć białka. Na końcu inaktywowano proteinazę K (10 min, 95 °C). Uzyskane gDNA wykorzystywano do genotypowania lub przechowywano w -20 °C.

3.6.2 Izolacja mRNA i synteza cDNA

Narzędzia używane podczas izolacji RNA oczyszczano za pomocą odczynnika RNaseZAP™ (Sigma-Aldrich (Merck), R2020-250ML). Głowy larw linii *tsc2^{vu242}* o znanych genotypach (genotypowanie wg Rozdziału 3.5) zbierano do probówek z buforem StayRNA™ (A&A Biotechnology, 038-250); ok. 30 larw na dany wariant. Po krótkim odwirowaniu i zlaniu supernatantu do probówek dodawano 300 µl odczynnika TRIzol™ (Invitrogen™, 15596026). Próbkę poddawano sonikacji w temperaturze pokojowej (2 pulsy po 30 s, amplituda 70 %) z użyciem sonikatora VCX 130 (PROScientific). Następnie dodawano kolejną porcję 300 µl odczynnika TRIzol™, mieszano przez pipetowanie i inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej. Dodawano 120 µl chloroformu i energicznie mieszano z użyciem wytrząsarki typu wortex. Po krótkiej, 3 min inkubacji w temperaturze pokojowej, próbki wirowano przez 2 min w 4 °C, przy 20 000 x g w celu oddzielenia fazy wodnej, zawierającej RNA, od fazy organicznej oraz białkowej. Następnie przenoszono fazę wodną do nowej probówki i dodawano do niej równą objętość izopropanolu. W kolejnym kroku próbki inkubowano 10 min na lodzie w celu precipitacji RNA i wirowano przez 30 min w 4 °C przy 20 000 x g. Ostrożnie zlewano supernatant. Uzyskany osad płukano 0,7 ml świeżo przygotowanego 75 % etanolu, ponownie wirowano (5 min, 4 °C). Następnie osad pozostawiano do odparowania resztek alkoholu w temperaturze pokojowej. Na końcu zawieszano go w 30 µl wody wolnej od nukleaz (traktowanej wodorowęglanem dietylu, DEPC). W celu dodatkowego oczyszczenia roztworu RNA używano zestawu RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research, R1013), postępując zgodnie z protokołem producenta. Po zmierzeniu stężenia oraz przeprowadzeniu analizy jakościowej RNA (opisano w Rozdziale 3.6.5), próbki przechowywano w -80 °C aż do dalszej

analizy. Do syntezy matrycy cDNA zastosowano zestaw RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, K1632) postępując zgodnie z protokołem producenta.

3.6.3 Reakcja ddPCR (ang. *Digital Droplet PCR*)

Całość procedury wykonywano za pomocą systemu QX200™ Droplet Digital PCR System oraz odczynników firmy BioRad. Mieszaninę reakcyjną przygotowano w objętości 20 µl według protokołu producenta zestawu QX200™ ddPCR™ EvaGreen® Supermix (1864034) z dodatkiem odpowiednich starterów wyszczególnionych w Tabeli 3.9 oraz 50 ng matrycy cDNA. Gotowe próbki ładowano do studzienek wkładu DG8™ Cartridges for QX200™/QX100™ Droplet Generator. Następnie dodawano 70 µl oleju QX200™ Droplet Generation Oil for EvaGreen (1864005) do studzienek przeznaczonych na olej. Postępując zgodnie z instrukcją producenta, generowano z każdej próbki krople wodno-olejowe z użyciem generatora kropeł QX200™ Droplet Generator. Uzyskane próbki w postaci kropeł emulsji woda-olej przenoszono na płytkę 96-dołkową ddPCR 96-Well Plate (12001925), uszczelniano folią z użyciem PX1 PCR Plate Sealer i przeprowadzano reakcję ddPCR z użyciem termocyklera C1000 Touch™ Thermal Cycler zgodnie z protokołem producenta. Następnie, odczytywano wyniki za pomocą czytnika płytek QX200™ Droplet Reader i analizowano dane z użyciem oprogramowania QuantaSoft Software™, uzyskując bezwzględną liczbę kopii danej cząsteczki DNA na µl próbki. Jako gen referencyjny wybrano dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; gapdh*), natomiast jako próby kontrolne traktowano wyniki uzyskane dla genotypu dzikiego.

Tabela 3.9 Startery używane w reakcji ddPCR

Nazwa genu	Sekwencja startera 5'-3'
<i>dcc</i>	Fw GTTTCTCCGACCTCAATCCA Rv CAGTCCCTCCATCCTGTAGC
<i>dock1</i>	Fw CCAAGATGGACTACGGGAAC Rv GATGCGAGCTTCAATCTGCT
<i>dock3</i>	Fw GCAGAGTTTGTGAGGGGAAC Rv TGTGGTGGAGAACAACAGGA
<i>dock4</i>	Fw AATCCATCCACCTGTTCTG Rv ACATTCGCCACCTCTCTCAT
<i>dock7</i>	Fw GTTGGGCACAGCATTTAACC Rv TCAATTGACATGGACCTTCG
<i>dock8</i>	Fw GCCTTTGCTACGGTCAACAT Rv GCCTTTGCTACGGTCAACAT
<i>elmo1</i>	Fw GCCCACCAGCTCTATGTTCT Rv TTGGACTCGCATTCAACATC
<i>elmo2</i>	Fw TGCAGGTGCTGACCTTTAAC Rv GCTTTCCTCTTCTCGGTTCC
<i>rac1</i>	Fw CATCCTGGTGGGAACATAAGC Rv AGTGCCGAGCATTCCAGATA
<i>rhoaa</i>	Fw GAGATGGAGCCTGTGGAAAG Rv GGCCAGCTGTATCCCATAGA
<i>gapdh</i>	Fw GTGGAGTCTACTGGTGTCTTC Rv GTGCAGGAGGCATTGCTTACA

3.6.4 Jednoetapowa ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym (ang. *one-step real-time quantitative PCR*)

Mieszaninę reakcyjną przygotowano w objętości 10 µl według zaleceń producenta zestawu TranScriba 1step PCR Mix SYBR® (A&A Biotechnology, 2008-100S) z dodatkiem odpowiednich starterów wyszczególnionych w Tabeli 3.10 oraz 150 ng RNA z larw linii *tsc2^{vu242}* (patrz Rozdział 3.6.2). Reakcję przeprowadzano na płytkach 96-dółkowych z pomocą Roche LightCycler® 96 System, stosując warunki temperaturowe zamieszczone w Tabeli 3.11.

Dla każdego genu wykonywano 3 powtórzenia techniczne. Jako gen referencyjny wybrano *gapdh*, natomiast jako próby kontrolne traktowano wyniki uzyskane dla genotypu dzikiego. Po przeprowadzonej reakcji wykonywano analizę wartości cyklu progowego (ang. *threshold cycle*; C_t) dla każdego z genów, czyli cyklu, w którym zostaje przekroczony progowy poziom fluorescencji i następuje wzrost wykładniczy ilości produktu PCR. Wyznaczano następujące wartości:

- ΔC_t – różnica między wartością C_t genu badanego, a genu referencyjnego

- $\Delta\Delta C_t$ – różnica między wartościami ΔC_t próby badanej, a próby kontrolnej
- $2^{-\Delta\Delta C_t}$ – znormalizowana wartość poziomu ekspresji badanego genu względem kontroli

Tabela 3.10 Startery używane w jednoetapowej reakcji real-time qPCR

Nazwa genu	Sekwencja startera 5'-3'
<i>gabr a3</i>	Fw CCATCTTCACCCGGATCTTA Rv TACTGGTCCGAAGCTTGTC
<i>gabr a4</i>	Fw TACCCGGAAAATTTACACG Rv TCAGAAACTGGGCCAAAAC
<i>gabr a5</i>	Fw TGGCAAGTCTGTGGTAGTGG Rv TCAGGTAGAAGTGGGCCATC
<i>gabr b3</i>	Fw CAGACCTACATGCCCTCGAT Rv CAAGTGGGTGTTGATTGTGG
<i>gabr g3</i>	Fw GGTTCTTTCTGGGTCTCCT Rv AGGTCCATCGCTGTGACATA
<i>gad65</i>	Fw AGGCTGAGAAAGCAGCTCAA Rv CTCCGTCCAGTGCAGGTAAC
<i>calcr</i>	Fw ACTCAGCCTTCACCATCGTC Rv ATCCCTTCACAGAGCATCCA
<i>gad67b</i>	Fw GCTGGACTTCCATCATCCTC Rv CATTCTCCAGCCAGACCAAT
<i>gapdh</i>	Fw GTGGAGTCTACTGGTGTCTTC Rv GTGCAGGAGGCATTGCTTACA

Tabela 3.11 Warunki temperaturowe jednoetapowej reakcji real-time qPCR

Etap reakcji	Temperatura	Czas
Preinkubacja	50 °C	10 min
	95 °C	3 min
Amplifikacja	95 °C	15 s
	60 °C	25 s
Krzywa topnienia	95 °C	5 s
	60 °C	60 s
	95 °C	∞

} x 40

3.6.5 Analiza ilościowa oraz jakościowa DNA i RNA

Analizę ilościową oraz jakościową wykonywano z użyciem metod spektrofotometrycznych z zastosowaniem spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). W celu kalibracji urządzenia wykonywano próbę ślepą (woda DEPC). Stężenie kwasów nukleinowych określano w oparciu o wartość absorbancji przy 260 nm. Mierzono współczynnik absorbancji przy 260 nm do absorbancji przy 280 nm oraz przy 230 nm. Współczynnik czystości $A_{260}/280 \sim 1,8$ świadczy o czystości DNA, natomiast $\sim 2,0$ o czystości RNA. Wartości $< 1,8$ dla DNA i $< 2,0$ dla RNA mogą wskazywać na zanieczyszczenia białkami lub fenolem. Współczynnik czystości $A_{260}/230$ w zakresie 1,8 – 2,2 determinuje czystość DNA i RNA. Wartości $< 1,8$ mogą świadczyć o zanieczyszczeniach substancjami silnie absorbującymi przy 230 nm np. EDTA.

3.7 Metody pracy z białkami

3.7.1 Izolacja białek z tkanek larw linii *tsc2^{vu242}*

W celu izolacji białek, larwy w wieku 4-5 dpf uśmiercano przez przedawkowanie mesylanu trikainy (Sigma-Aldrich (Merck), E10521), a następnie zbierano do probówek ze schłodzonym buforem Ringer 1 z dodatkiem EDTA i inhibitorów proteaz. Za pomocą pipety (50-200 μ l) z podciętym na końcu tipsem usuwano szczątkowe żółtko, uszkadzając je mechanicznie podczas pipetowania. Materiał przepłukiwano dwa razy zimnym buforem Ringer 2, w celu wypłukania oraz zahamowania aktywności uwolnionych z żółtka proteaz i fosfataz. Od tak przygotowanych larw odcinano ogony w celu genotypowania. Natomiast głowy, do uzyskania wyników genotypowania, przechowywano w $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ w buforze Ringer 2 (30 μ l/1 głowa). Głowy larw o tym samym genotypie zbierano do probówek, odwirowano resztki buforu i dodawano buforu Laemmliego (1x), w objętości 6 μ l na jedną larwę. Następnie próbki sonikowano w temperaturze pokojowej (2 pulsy po 15 s, amplituda 60 %) z użyciem sonikatora VCX 130 (PROScientific). W kolejnym etapie próbki denaturowano w bloku grzewczym Thermomixer Comfort (Eppendorf®) w temperaturze $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 10 min, po czym zwirowywano je, aby oddzielić pigment od supernatantu zawierającego wyizolowane białka. Tak przygotowane próbki białkowe używano bezpośrednio po zagotowaniu do elektroforezy SDS-PAGE (opisano w Rozdziale 3.7.2) lub przechowywano w $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.7.2 Elektroforeza białek w warunkach denaturujących SDS-PAGE

Przygotowywano dwuwarstwowe żele poliakryloamidowe (80 x 100 x 1 mm): górną warstwę stanowił 5 % żel zagęszczający (ok. 2 ml/żel; 5 % akryloamid/bis-akryloamid 9:1, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS) dolną w zależności od masy cząsteczkowej badanych białek 8-10 % żel rozdzielający (5 ml/żel; 8-10 % akryloamid/bis-akryloamid 9:1, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS). W celu polimeryzacji żeli dodawano nadsiarczanu amonu i katalizatora TEMED do stężenia końcowego odpowiednio 0,05 % i 0,01 %. Na żel nakładano po 24 µl próbki do studzienki, co odpowiadało białku pozyskanemu z 4 głów larw. Jako wzorca masy cząsteczkowej białek używano PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, 26619). Elektroforezę białek w warunkach denaturujących SDS-PAGE (ang. *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) prowadzono w systemie wertykalnym Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad), w buforze 1x Tris-Glicyna-SDS przy napięciu 90 V do czasu przejścia czoła barwnika przez granicę żelu zagęszczającego, a następnie przy 120 V aż do pełnego rozdzielenia wzorca.

3.7.3 Technika Western Blot

Immunodetekcję białek przeprowadzano za pomocą techniki Western Blot. Po zakończeniu elektroforezy SDS-PAGE białka przenoszono z żelu na membranę PVDF (Sigma-Aldrich (Merck)) metodą elektrotransferu z użyciem systemu Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad). Błonę PVDF aktywowano przez 5 min w 100 % metanolu. Transfer prowadzono przez 90 min w buforze Towbina, w 4 °C przy stałym natężeniu 400 mA. Po zakończeniu transferu, aby ocenić jego wydajność, membranę inkubowano przez 3 min w roztworze czerwieni Ponceau S, a nadmiar barwnika odpłukiwano wodą dejonizowaną. Następnie blokowano niespecyficzne miejsca wiązania białek inkubując membranę w buforze do blokowania Mleko-TBS przez 1 h w temperaturze pokojowej. W kolejnym kroku membranę inkubowano przez noc w 4 °C z wybranymi przeciwciałami pierwszorzędowymi (zamieszczone w Tabeli 3.2). w buforze Mleko-TBS lub BSA-TBS, zgodnie z zaleceniami producenta przeciwciał. W kolejnym dniu membranę płukano 3 razy po 10 min w buforze TBST, a następnie inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej w buforze Mleko-TBST z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z fluoroforami (zamieszczone w Tabeli 3.3). Po tym czasie membranę płukano 3 razy po 10 min w buforze TBST, jednorazowo płukano wodą dejonizowaną i pozostawiano do wysuszenia w temperaturze pokojowej. Białka wizualizowano za pomocą aparatu Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Bioscience), a następnie analizowano w programie Image Studio Lite v.5.2 (LI-COR Bioscience).

3.7.4 Izolacja kortyzolu z larw *tsc2^{vu242}* oraz ELISA

Larwy w wieku 5 dpf poddawano sedacji pod wpływem niskiej temperatury, na szalkach umieszczonych na lodzie, wypełnionych schłodzonym w temperaturze 4 °C roztworem E3. Na każdej szalce znajdowało się ok. 35 larw. W pierwszej kolejności pobierano ogony larw do genotypowania i umieszczano na szalce 96-dołkowa wypełnionej TE, natomiast ciało larw przenoszono na szalkę 96-dołkową umieszczoną na suchym lodzie, co pozwalało na natychmiastowe zamrożenie tkanki. Tkanki przechowywano w -20 °C aż do uzyskania wyników genotypowania. Tkanki o znanych genotypach zbierano do schłodzonych próbek (po 30 ciał larw w próbce), odwirowywano resztki E3, po czym dodawano 150 µl schłodzonego w temperaturze 4 °C buforu PBS. Tkanki homogenizowano na lodzie (20 s, amplituda 60%) z użyciem sonikatora VCX 130 (PROScientific). Następnie do każdej próbki dodawano 1 ml octanu etylu (Sigma-Aldrich (Merck), 319902) i intensywnie wytrząsano na wytrząsarce typu worteks. Próbkę zwirowywano przez 5 min przy 3000 x g, w 4 °C w celu oddzielenia fazy wodnej od fazy organicznej zawierającej kortyzol, którą zbierano do nowych próbek. Próbkę odparowywano w wirówce próżniowej (CentriVap Vacuum Concentrator with Cold Trap, Labconco). Osad zawierający kortyzol rozpuszczano w 50 µl PBS.

Test immunoenzymatyczny ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) przeprowadzano na płytkach 96-dołkowych według protokołu producenta zestawu Salivary Cortisol Enzyme Immunoassay Kit (Salimetrics, 1-3002). Odczyt kolorymetryczny reakcji przeprowadzano z użyciem czytnika płytek Sunrise™ (Tecan) przy długości fali światła 450 nm oraz przy 490 nm w celu korekty filtra (korekta tła). Poziom kortyzolu w próbkach wyliczano według zaleceń producenta, stosując 4-parametryczne dopasowanie krzywej regresji nieliniowej, bazując na krzywej standardowej przygotowanej z próbek o znanych stężeniach w porównaniu do próbek badanych.

3.8 Testy behawioralne

3.8.1 Warunki wspólne dla wszystkich testów behawioralnych

Warunki eksperymentalne zostały wprowadzone do oprogramowania ZebraLab Software (ViewPoint Life Science) w oparciu o pracę Wintera i wsp. (2008). Testy przeprowadzano w zautomatyzowanej komorze z wysoko przepustowym systemem monitorowania ZebraBox (ViewPoint Life Science). Aktywność lokomotoryczną larw mierzono w 3 zakresach prędkości < 0,5 cm/s odpowiadającej braku aktywności, 0,5-2 cm/s

odpowiadającej normalnej aktywności oraz > 2 cm/s odpowiadającej hiperaktywności. W każdym eksperymencie używano larw w stadium 5 dpf, po uprzedniej 5 min aklimatyzacji w pokoju doświadczalnym. Uzyskane dane analizowano za pomocą programu RStudio.

3.8.2 Podstawowy test aktywności lokomotorycznej

Test przeprowadzano w szalkach 24-dołkowych wypełnionych roztworem E3 (ze związkiem farmakologicznym lub bez, w zależności od eksperymentu) zachowując objętość 0,5 ml na dołek. W przeddzień doświadczenia w każdym dołku umieszczano 1 larwę, a następnie poddawano je całonocnej habituacji w cieplarni w warunkach hodowli. Eksperyment przeprowadzano w warunkach ciemności, nagrywając aktywność larw przez 1 h, z 5-sekundowym interwałem czasowym zapisu danych (Winter i wsp. 2008).

3.8.3 Test jasnego-ciemnego pola (ang. *light-dark box test*)

Test przeprowadzano na szalce Petriego Ø100 mm wypełnioną 30 ml roztworu E3 (ze związkiem farmakologicznym lub bez, w zależności od eksperymentu) ze ściankami zaklejonymi nieprzezroczystą czarną i białą taśmą w celu ograniczenia dostępu światła (oklejona odpowiednio połowa szalki). Połowę szalki osłonięto od góry dwoma filtrami fotograficznymi o neutralnej gęstości (ND4 + ND8, Cokin.com), co pozwalało uzyskać 100 % ciemności. Bezpośrednio przed eksperymentem pojedyncze larwy umieszczano w nieosłoniętej części szalki, a następnie nagrywano przez 8 min, z włączonym górnym źródłem światła, o mocy 25 % oraz z 5-sekundowym interwałem czasowym zapisu danych (Steenbergen, Richardson, i Champagne 2012).

3.8.4 Test w otwartym polu (ang. *open-field test*)

Test przeprowadzano na szalce Petriego Ø100 mm wypełnioną 30 ml roztworu E3 (ze związkiem farmakologicznym lub bez, w zależności od eksperymentu). Za pomocą oprogramowania ZebraLab wydzielano dwie strefy, w których rejestrowano aktywność larw: obszar środka szalki oraz obrzeży szalki. Bezpośrednio przed eksperymentem pojedyncze larwy umieszczano na środku szalki, a następnie nagrywano przez 8 min z włączonym górnym źródłem światła o mocy 25 % oraz z 5-sekundowym interwałem czasowym zapisu danych.

3.8.5 Test badający reakcję na nagłe zmiany oświetlenia

Test przeprowadzano w półprzezroczystych szalkach 24-dołkowych wypełnionych roztworem E3 (ze związkiem farmakologicznym lub bez, w zależności od eksperymentu)

zachowując objętość 0,5 ml na dołek. W przeddzień doświadczenia w każdym dołku umieszczano 1 larwę, a następnie poddawano je całonocnej habituacji w cieplarni w warunkach hodowli. Eksperyment prowadzono przez 30 min z 5-sekundowym interwałem czasowym zapisu danych. Podczas eksperymentu stosowano fazy świetlne: ciemność-światło-ciemność, trwające każda po 10 min, z wykorzystaniem dolnego źródła światła o mocy 60 % w przypadku fazy światła.

3.8.6 Test badający reakcję ucieczki oraz habituację larw w odpowiedzi na nagły, powtarzający się bodziec świetlny

Test przeprowadzano w półprzezroczystych szalkach 24-dołkowych wypełnionych roztworem E3 zachowując objętość 0,5 ml na dołek. W dzień doświadczenia w każdym dołku umieszczano 1 larwę, a następnie poddawano je minimum 2-godzinnej habituacji. W pierwszym etapie przez 5 min mierzono aktywność larw w ciemności, następnie w kolejnych 5 min eksperymentu stosowano następujące po sobie przejścia świetlne na podstawie protokołu Nortona i wsp. (2012), tj. nagłe pulsy światła w odstępach, co 3 sekundy, z 3-sekundowym interwałem czasowym zapisu danych podczas całego doświadczenia.

3.9 Barwienia immunofluorescencyjne pełnego przekroju (ang. *whole-mount antibody staining*)

3.9.1 Przygotowanie materiału do barwień oraz protokół barwienia

W celu uzyskania materiału do barwień larwy w wieku 5 lub 7,5 dpf uśmiercano przez przedawkowanie mesylanu trikainy (Sigma-Aldrich (Merck), E10521), następnie cięto w celu pozyskania ogonów do genotypowania oraz głów do barwień. Głowy larw utrwalano przez 24 h w buforze PFA, a następnie przechowywano w PBS w 4 °C do uzyskania wyników genotypowania. W kolejnym kroku głowy larw o znanych genotypach łączono w jednej próbówce i przemywano buforem PBS (2 razy po 1 h inkubacji). Następnie, aby pozbyć się pigmentu tkankę inkubowano w świeżo przygotowanym roztworze depigmentacyjnym przez ok. 30-40 min. W celu zwiększenia penetracji przeciwciał tkankę płukano w temperaturze pokojowej buforami: PBSTr (przez 1 h), PBSTr-DMSO (przez 1 h) a następnie 0,2 % TWEEN® 20 w PBSTr-DMSO przez noc. W celu związania wolnych grup aldehydowych wykazujących autofluorescencję, tkankę inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej w buforze TBSTr-DMSO-glicyna. Następnie, aby zablokować niespecyficzne miejsca wiązania dla przeciwciał pierwszorzędowych, tkankę inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej w buforze blokującym. W kolejnym kroku, w celu związania glikoprotein na

powierzchni komórek, tkankę inkubowano przez noc w temperaturze pokojowej, w buforze 0,2% TWEEN® 20, 10 µg/ml heparyna w PBS. Następnie tkankę inkubowano przez 72 h, w temperaturze pokojowej z wybranymi przeciwciałami pierwszorzędowymi (zamieszczone w Tabeli 3.2) w buforze 0,2% TWEEN® 20, 10 µg/ml heparyna w PBS w stosunku 1:50 – 1:200, w zależności od poziomu ekspresji białka w ciele ryby. W kolejnym kroku tkankę inkubowano przez 48 h, w temperaturze pokojowej z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi (zamieszczone w Tabeli 3.3) w buforze 0,2% TWEEN® 20, 10 µg/ml heparyna w PBS w stosunku 1:1000. Po tym czasie, aby wypłukać niezwiązane przeciwciała drugorzędowe, tkankę płukano buforem 0,2% TWEEN® 20, 10 µg/ml heparyna w PBS (2 razy po 1 min), a następnie inkubowano przez noc. Po odsączeniu tkanek inkubowano je w gradiencie glicerolu w PBS zaczynając od stężenia 30 %, a kończąc na 70 %. Każda inkubacja trwała około 12 h. W ostatnim etapie usuwano resztki glicerolu oraz zalewano preparaty roztworem zamykacza i przechowywano w 4 °C.

3.9.2 Izolacja mózgow oraz przygotowanie preparatów do obrazowania

Izolacja mózgow z wybarwionych głów 7,5-dniowych larw polegała na usuwaniu oczu oraz otaczających mózg tkanek miękkich za pomocą cienkich igieł (0,3 x 12 mm, Sterican B. Braun) oraz przy użyciu binokularu, z zachowaniem struktur mózgu: przodomózgowie, śródmózgowie, mózdzek i pień mózgu. Preparacja wykonywana była na szkiełku podstawowym w kropli buforu PBS w celu zapobiegnięcia wysuszeniu tkanek. Wyizolowane mózgi przechowywano w roztworze zamykacza w 4 °C i w kolejnym etapie układano po 3 sztuki w specjalnie przygotowanych na szkiełku podstawowym komorach wypełnionych kroplą zamykacza, które zabezpieczano okrągłymi szkiełkami nakrywkowymi, co umożliwiała obrazowanie preparatów za pomocą mikroskopii konfokalnej z odwróconym obiektywem.

3.10 Techniki mikroskopowe

3.10.1 Akwizycja obrazów mikroskopowych

Akwizycja obrazu utrwalonych preparatów pełnego przekroju (WMAS) była wykonywana za pomocą mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM800 lub mikroskopii LSFM za pomocą mikroskopu Zeiss Lightsheet Z.1. Przyżyciowe obrazowanie aksonów wykonywano z zastosowaniem mikroskopii LSFM (ang. *Light Sheet Fluorescence Microscopy*), za pomocą mikroskopu Zeiss Lightsheet Z.1. W przypadku mikroskopii konfokalnej używano obiektywu 40x (NA=1.0) z immersją olejową. Parametry obrazowania oraz moc laserów były stałe dla wszystkich wariantów w doświadczeniu. Obrazy zbierano w rozdzielczości 1024 x 1024

pikseli, w trybie „z-stack” polegającym na akwizycji wielu obrazów w osi Z ze stałą odległością pomiędzy płaszczyznami tych obrazów (ok. 0,5 μm), co pozwalało uzyskać obraz o zwiększonej głębi ostrości.

W przypadku mikroskopii LSFM stosowano obiektyw 40x (NA=1.3) z immersją wodną. Parametry obrazowania oraz moc laserów były stałe dla wszystkich wariantów w doświadczeniu. Obrazy zbierano w rozdzielczości 1024 x 1024 pikseli, w trybie „z-stack”, z optymalną odległością pomiędzy płaszczyznami tych obrazów (ok. 0,48 μm).

W celu oceny morfologii oraz stadium rozwoju larw danio przegowanego wykorzystywano binokular Leica M60 z kamerą Leica DMC 2900.

3.10.2 Analiza obrazu mikroskopowego

Wszystkie obrazy mikroskopowe opracowywano za pomocą programów ImageJ2 oraz Fiji stosując metody manualne oraz pół-automatyczne wraz z wybranymi funkcjami programów wyszczególnionymi w opisach konkretnych analiz (Schindelin i wsp. 2012; Schneider, Rasband, i Eliceiri 2012).

3.10.3 Analiza szerokości spoidła przedniego

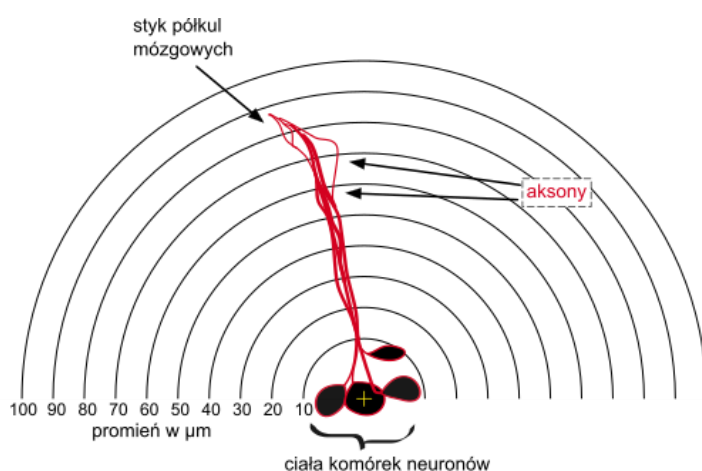
W celu wykonania pomiarów szerokości spoidła przedniego w utrwalonych preparatach pełnego przekroju wykorzystywano obrazy uzyskane za pomocą mikroskopii konfokalnej. Do analizy wybierano odpowiednie sekcje („z-stacki”) zawierające w swojej płaszczyźnie spoidło przednie. Następnie, za pomocą funkcji projekcji maksymalnej intensywności „*Maximum Intensity projection*” uzyskiwano zbiorczy obraz spoidła i wykonywano pomiar szerokości na styku półkul mózgowych, z użyciem narzędzia pomiarowego w postaci prostej linii „*Measurment line*”.

3.10.4 Analiza morfologii neuronów w 3D

W celu wykonania analizy morfologii aksonów neuronów GFP-pozytywnych u larw linii *Tg(ptf1a:GFP);tsc2^{vu242}* wykorzystywano obrazy mikroskopowe uzyskane za pomocą mikroskopii LSFM.

W pierwszym etapie wykonywano filtrowanie medianą („*Median filtering*”), binaryzację obrazu, a następnie półautomatyczną segmentację obrazu za pomocą wtyczki „*Skeletonize (2D/3D)*”, co pozwalało uzyskać szkielety wiązek aksonów (Lee, Kashyap, i Chu 1994). Następnie wyznaczano dla każdej półkuli mózgowej obszar zainteresowania (ang.

region of interest; roi) od ciała komórki aż do styku półkul mózgowych. Za pomocą wtyczki „Sholl Analysis” wykonywano analizę Sholla szkieletów w 3D. Punkt początkowy w każdej półkuli stanowiły ciała komórek. Schemat przedstawiający analizę Sholla przedstawiono na Ryc. 3.3. W analizie tej uzyskiwano informacje na temat liczby aksonów przecinających okręgi o rosnącym promieniu, których środek znajduje się w centrum ciała komórki (przy czym promień określa odległość od ciała komórki), co pozwala wyznaczyć stopień rozgałęzienia. Odległość od ciała komórki do styku półkul mózgu określono na około 80-90 μm za pomocą pomiarów liniowych typu „*Measurment line*”. Model regresyjny został zbudowany na podstawie danych empirycznych przy użyciu regresji typu „*loess*” i funkcji wygładzania (metoda najmniejszych kwadratów) w programie RStudio dla danych w odległości ok. 80 μm od ciała komórki, reprezentujących aksony na styku półkul mózgowych.



Ryc. 3.3 Schemat przedstawiający analizę Sholla dla półkuli mózgu. Szczegółowy opis w tekście.

3.10.5 Analiza poziomu dekarboksylazy glutaminianowej (GAD)

W celu wykonania analizy poziomu białek dekarboksylazy glutaminianowej 65/67 (Gad65/67) w barwionych immunofluorescencyjnie utrwalonych preparatach pełnego przekroju (WMAS) wykorzystywano obrazy uzyskane za pomocą mikroskopii LSM. W pierwszym etapie wybierano 20 sekcji („z-stacków”) obrazów mikroskopowych obejmujących obszar pallium w kresomózgowiu. Następnie wykonywano redukcję szumu za pomocą funkcji „*Mediana 3D*” oraz odcięcie sygnału tła za pomocą funkcji „*Subtract background*” z włączonym algorytmem „*Sliding paraboloid*” stosując te same wartości progowe w obrębie jednego eksperymentu. W kolejnym kroku za pomocą funkcji „*Sum slices*” uzyskiwano zbiorczy obraz sygnału fluorescencji z wybranych sekcji, a następnie ręcznie wyznaczano

obszar zainteresowania obejmujący kresomózgowie i za pomocą funkcji „*Measure*” analizowano średnią intensywność sygnału Gad65/67.

3.11 Analiza statystyczna

Do obliczeń oraz prezentacji graficznej wyników wykorzystywano program RStudio 1.4.1717 (rstudio.com). Aby ocenić czy rozkład danych spełnia założenia rozkładu normalnego stosowano test Shapiro-Wilka oraz sprawdzano graficzną reprezentację danych w postaci wykresu typu kwantyl-kwantyl (QQ). Homogeniczność wariancji oceniano za pomocą testu Levene'a. W przypadku danych o rozkładzie normalnym oraz równej wariancji do oceny istotności statystycznej różnic pomiędzy grupami stosowano jednoczynnikową lub dwuczynnikową (w zależności od liczby czynników) analizę wariancji ANOVA z testem *post-hoc* Tukeya HSD lub Dunnetta. W przypadku danych o rozkładzie odbiegającym od normalnego stosowano test Kruskalla-Wallisa z testem *post-hoc* Dunn. Do oceny istotności różnic pomiędzy grupami zależnymi wykorzystywano test Wilcoxon'a dla par obserwacji. W przypadku analizy Western Blot stosowano centralizację danych względem wyników uzyskanych dla larw *tsc2^{vu242}* w warunkach kontrolnych. Stosowano następujące oznaczenia poziomów istotności: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$. W większości przypadków zapewniano losowość przez brak wiedzy o genotypach podczas wykonywania doświadczeń oraz pół-automatyczną analizę danych. Informacje na temat przeprowadzonej analizy statystycznej znajdują się pod rycinami. Odchylenia na wykresach słupkowych zaznaczono w postaci błędu standardowego średniej (ang. *standard error of the mean*, SEM). Linia pozioma na wykresach pudełkowych prezentuje wartość mediany. Wąsy górne sięgają najwyższego wyniku, który nie jest obserwacją odstającą, wąsy dolne sięgają najniższego wyniku, który nie jest obserwacją odstającą. Obserwacje odstające (ang. *outliers*) zaznaczono na wykresach, jako czarne punkty.

4. WYNIKI

Do tej pory próby odtworzenia ludzkiego fenotypu stwardnienia guzowego w modelach zwierzęcych opierały się głównie na zastosowaniu heterozygotycznych modeli mysich, bądź warunkowych nokautów genów *Tsc1* lub *Tsc2* w specyficznych rodzajach komórek albo tkanek (patrz Wstęp). Model stwardnienia guzowego w danio pręgowanym wyróżnia się tym, że jako jedyny model tej choroby wśród kręgowców umożliwia badania w organizmie całkowicie pozbawionym genu *tsc2*. Usunięcie genu *tsc2* następuje już na etapie zygoty i nie prowadzi do natychmiastowej śmierci homozygotycznych mutantów. Dzięki ich przeżywalności sięgającej ok. 11 dni po zapłodnieniu można badać patologię mózgu już na wczesnych etapach rozwoju (Kalueff i wsp. 2013; Basnet i wsp. 2019; Orger i de Polavieja 2017; Kim i wsp. 2011).

W niniejszej pracy doktorskiej charakteryzowano aspekty stwardnienia guzowego, które do tej pory nie były analizowane w modelu danio pręgowanego, a także badano działanie wybranych związków farmakologicznych na zaobserwowane fenotypy behawioralne oraz neurologiczne. Pierwsza część rozprawy dotyczy zmian behawioralnych, analizowanych pod kątem występowania epilepsji oraz nasilonego lęku, często rozpoznawanego u pacjentów z TANDs (4.1 i 4.2). Druga część niniejszej pracy skupiona jest na charakterystyce zmian anatomicznych oraz molekularnych związanych z połączeniami nerwowymi pomiędzy półkulami mózgowymi oraz neurotransmisją hamującą w badanym przeze mnie modelu doświadczalnym (4.3).

4.1 Analiza podstawowych zdolności lokomotorycznych modelu stwardnienia guzowego w danio pręgowanym oraz zbadanie wpływu wybranych substancji farmakologicznych na obserwowane fenotypy

Zaburzenia w pracy mózgu wiążą się bezpośrednio z problemami neuropsychiatrycznymi oraz neurologicznymi, które mają swoje odzwierciedlenie również w zachowaniu. W związku z tym, m.in. testy behawioralne są odpowiednim narzędziem do oceny funkcji mózgu, która determinuje występowanie określonych fenotypów behawioralnych.

Danio pręgowany wykazuje szereg złożonych i dobrze scharakteryzowanych fenotypów behawioralnych już w okresie larwalnym, dzięki czemu możliwe było wykonanie pogłębionej analizy zachowania larw danio pręgowanego w modelu stwardnienia guzowego.

Z uwagi na wczesną śmiertelność homozygot linii *tsc2^{vu242}*, do eksperymentów użyto krzyżówki wsobnej ryb heterozygotycznych. Rozmieszczenie poszczególnych genotypów na

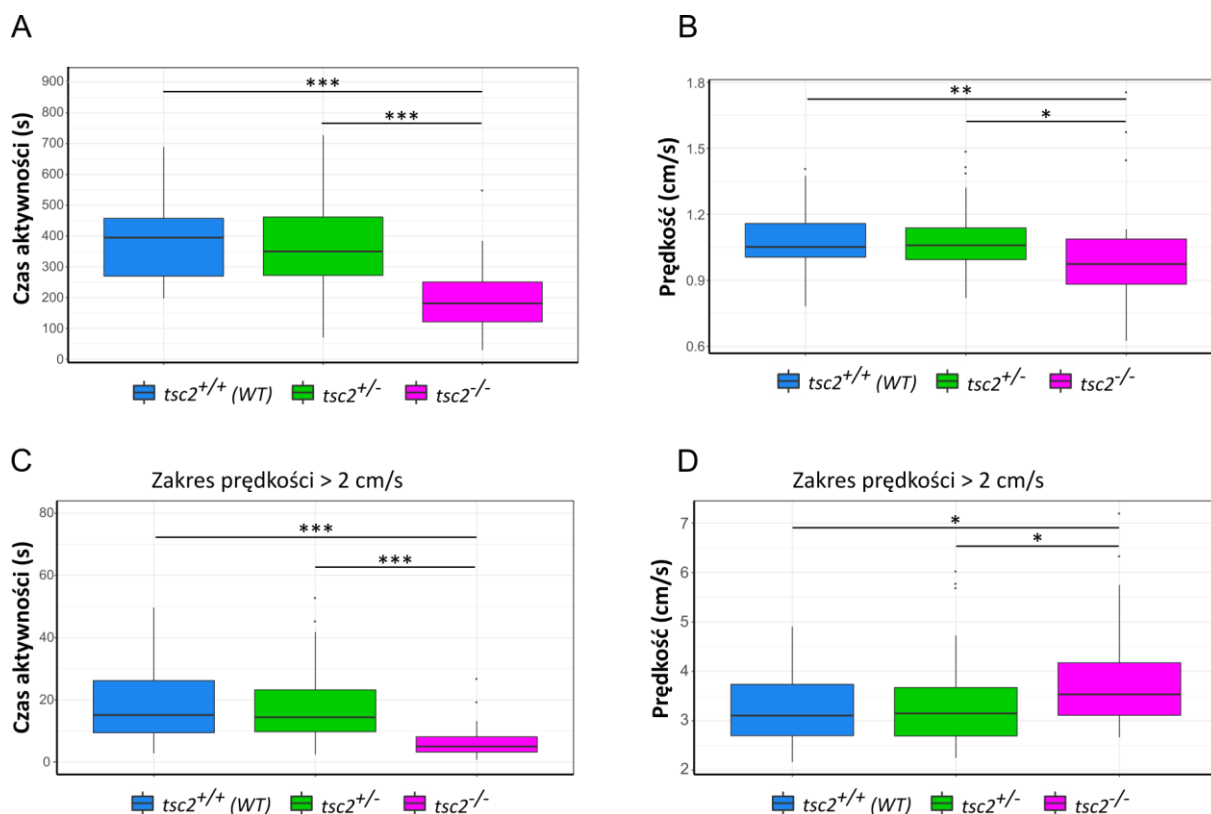
szalkach eksperymentalnych było losowe. W niniejszej pracy larwy heterozygotyczne $tsc2^{vu242/+}$ oraz homozygotyczne $tsc2^{vu242/vu242}$ będą nazywane odpowiednio $tsc2^{+/-}$ i $tsc2^{-/-}$.

4.1.1 Analiza podstawowych zdolności lokomotorycznych larw linii $tsc2^{vu242}$

W celu scharakteryzowania podstawowych zdolności lokomotorycznych larw $tsc2^{vu242}$ wykonano analizę ruchu ryb za pomocą urządzenia do zautomatyzowanego śledzenia ruchu Zebrabox. Rejestrację pomiarów prowadzono przez 1 godzinę w ciemności z uwzględnieniem 3 rodzajów prędkości, odpowiadających normalnemu ruchowi (0,5 – 2 cm/s), hiperaktywności (>2 cm/s) oraz braku aktywności (<0,5 cm/s) (Winter i wsp. 2008). Analizę uzyskanych danych wykonano po zgenotypowaniu larw (opisano w Materiałach i Metodach). Larwy typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ stanowiły siostrzaną kontrolę dla mutantów $tsc2^{+/-}$ oraz $tsc2^{-/-}$. Skupiono się na dwóch parametrach aktywności larw $tsc2^{vu242}$ w różnych zakresach prędkości tj. obliczono sumaryczny czas aktywności lokomotorycznej oraz średnią prędkość ruchu.

U mutantów $tsc2^{-/-}$ zaobserwowano obniżenie sumarycznego czasu aktywności lokomotorycznej oraz średniej prędkości w porównaniu do larw typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ lub mutantów $tsc2^{+/-}$ (Ryc. 4.1A, B). Analiza aktywności w zakresie prędkości > 2 cm/s wskazującej na hiperaktywność wykazała, że mutanty $tsc2^{-/-}$ charakteryzują się silnie obniżoną aktywnością lokomotoryczną w tym zakresie ruchu, ale jednocześnie poruszają się z wyższą średnią prędkością w porównaniu do larw typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ lub mutantów $tsc2^{+/-}$ (Ryc. 4.1C, D). Oznacza to, że larwy mutantów $tsc2^{-/-}$ są aktywne dużo krócej niż ich siostrzane kontrole typu dzikiego lub mutanty $tsc2^{+/-}$, ale w trakcie aktywności lokomotorycznej poruszają się z wyższą prędkością wskazującą na hiperaktywność.

Podwyższona średnia prędkość w zakresie hiperaktywności oraz obniżona aktywność mutantów homozygotycznych $tsc2^{-/-}$ może wskazywać na epilepsję. Napady drgawkowe u danio przegowanego mogą objawiać się wysoką prędkością ruchów larw w przypadku drgawek motorycznych podobnych do mioklonicznych, ale także znieruchomieniem spowodowanym drgawkami podobnymi do tonicznymi lub napadami akinetycznymi (Fontana i wsp. 2019; Stewart i wsp. 2012). Inną przyczyną obserwowanego zachowania larw może być nasilony lęk (Kalueff i wsp. 2013). Tak więc, zarówno obniżenie aktywności, jak i podwyższona prędkość w zakresie hiperaktywności mogą wynikać z epilepsji lub nasilonego lęku.



Ryc. 4.1 Wyniki analizy podstawowych zdolności lokomotorycznych larw linii *tsc2*^{vu242}.

- A)** Wykresy pudełkowe przedstawiają wyniki analizy sumarycznego czasu aktywności larw *tsc2*^{vu242} w wieku 5 dpf, 1 godzinie zautomatyzowanego śledzenia ruchu larw w warunkach ciemności. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego: $df = 2$; $H = 36,141$; $p = 1,42 \times 10^{-8}$, $p = 1,1 \times 10^{-7}$ dla *tsc2*^{-/-} vs. *tsc2*^{+/+}; $p = 1,06 \times 10^{-6}$ dla *tsc2*^{-/-} vs. *tsc2*^{+/+}; wyniki nieistotne statystycznie (ns) dla *tsc2*^{+/-} vs. *tsc2*^{+/+}. Liczba larw (genotyp): 37 (*tsc2*^{+/+}), 51 (*tsc2*^{+/-}), 34 (*tsc2*^{-/-}); *** $p < 0,005$.
- B)** Wykresy pudełkowe przedstawiają wyniki analizy średniej prędkości larw *tsc2*^{vu242} w 5 dpf, po 1 godzinie zautomatyzowanego śledzenia ruchu larw w warunkach ciemności. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego: $df = 2$; $H = 10,558$; $p = 0,0051$; $p = 0,0096$ dla *tsc2*^{-/-} vs. *tsc2*^{+/+}; $p = 0,0157$ dla *tsc2*^{-/-} vs. *tsc2*^{+/+}; ns dla *tsc2*^{+/-} vs. *tsc2*^{+/+}. Liczba larw (genotyp): 37 (*tsc2*^{+/+}), 51 (*tsc2*^{+/-}), 34 (*tsc2*^{-/-}); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.
- C)** Wykresy pudełkowe przedstawiają wyniki analizy sumarycznego czasu aktywności larw *tsc2*^{vu242} w przedziale aktywności powyżej 2 cm/s (hiperaktywność), w wieku 5 dpf, po 1 godzinie zautomatyzowanego śledzenia ruchu larw w warunkach ciemności. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego: $df = 2$; $H = 42,355$; $p = 0,00635$; $p = 5,42 \times 10^{-8}$ dla *tsc2*^{-/-} vs. *tsc2*^{+/+}; $p = 1,33 \times 10^{-8}$ dla *tsc2*^{-/-} vs. *tsc2*^{+/+}; ns dla *tsc2*^{+/-} vs. *tsc2*^{+/+}. Liczba larw (genotyp): 37 (*tsc2*^{+/+}), 51 (*tsc2*^{+/-}), 34 (*tsc2*^{-/-}); *** $p < 0,005$.

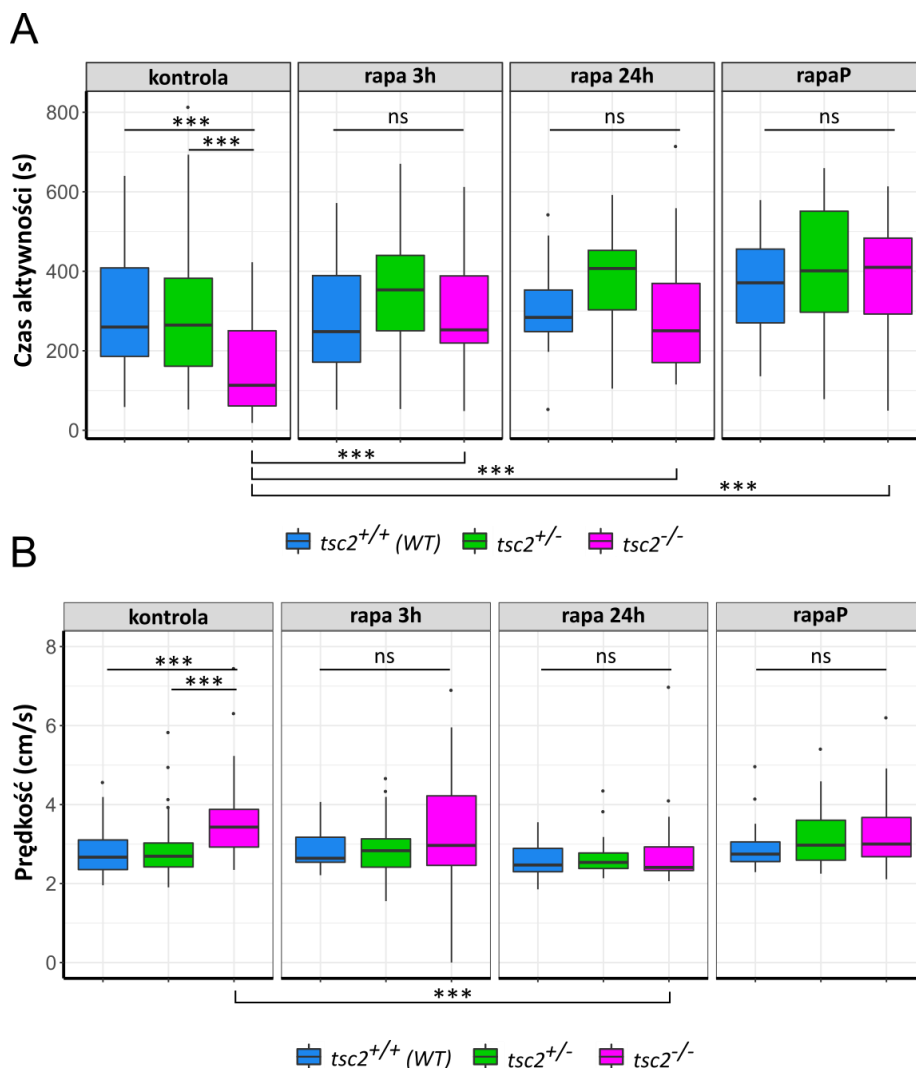
D) Wykresy pudełkowe przedstawiają wyniki analizy średniej prędkości larw $tsc2^{vu242}$ w przedziale aktywności powyżej 2 cm/s (hiperaktywność), w wieku 5 dpf, po 1 godzinie zautomatyzowanego śledzenia ruchu larw w warunkach ciemności. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego: $df = 2$; $H = 8,862$; $p = 0,0119$; $p = 0,0279$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; $p = 0,0234$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/-}$; ns dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$. Liczba larw (genotyp): 37 ($tsc2^{+/+}$), 51 ($tsc2^{+/-}$), 34 ($tsc2^{-/-}$); * $p < 0,05$.

4.1.2 Analiza wpływu hamowania aktywności szlaku mTORC1 za pomocą rapamycyny na zdolności lokomotoryczne larw linii $tsc2^{vu242}$ oraz analiza biochemiczna działania rapamycyny na aktywację mTORC1

W celu sprawdzenia, czy obniżona aktywność lokomotoryczna oraz podwyższona średnia prędkość w zakresie hiperaktywności u larw $tsc2^{-/-}$ są związane z nadmierną aktywacją szlaku sygnałowego kinazy mTOR, przeprowadzono analizę podstawowych zdolności lokomotorycznych u larw $tsc2^{vu242}$ po uprzednim traktowaniu rapamycyną, która jest allosterycznym inhibitorem kompleksu mTORC1 (Wong 2013). Analogi rapamycyny są powszechnie wykorzystywane w terapiach pacjentów ze stwardnieniem guzowatym, pozytywnie wpływając na niektóre z objawów choroby, m.in. napady epileptyczne (Switon i wsp. 2016; Wong 2013; Curatolo i wsp. 2018). Zastosowano trzy warianty traktowań: podanie leku 3 godziny (rapa 3 h) lub 24 godziny (rapa 24 h) przed eksperymentem lub zaczynając od stadium 48 hpf. Ostatni wariant traktowania rapamycyną stosowano na tyle wcześnie w rozwoju danio pręgowanego, aby zapobiec rozwinięciu fenotypów związanych ze stwardnieniem guzowatym (wariant ten będzie oznaczony w tej pracy jako rapaP – prewencja). W tym samym czasie w celu potwierdzenia skuteczności działania rapamycyny w modelu danio pręgowanego, sprawdzono poziom aktywacji szlaku mTORC1 za pomocą metody Western Blot. Larwy $tsc2^{vu242}$ hodowano w warunkach kontrolnych lub traktowano rapamycyną tak, jak opisano powyżej. Białka wyizolowano z przednich części ciała zawierających głowy larw $tsc2^{vu242}$, natomiast ogony posłużyły do genotypowania.

Wyniki analizy testów behawioralnych wykazały, że każdy z wariantów traktowania rapamycyną podwyższył sumaryczny czas aktywności lokomotorycznej mutantów $tsc2^{-/-}$ w porównaniu do larw $tsc2^{-/-}$ nietraktowanych lekiem (Ryc. 4.2A). Największy wzrost w aktywności lokomotorycznej larw $tsc2^{-/-}$ wykazano przy prewencyjnym zastosowaniu rapamycyny, aczkolwiek w tym wariantcie zwiększył się również sumaryczny czas aktywności lokomotorycznej siostrzanych kontroli typu dzikiego oraz mutantów $tsc2^{+/-}$ (Ryc. 4.2A). W przypadku parametru podwyższonej średniej prędkości w zakresie hiperaktywności

u mutantów *tsc2^{-/-}* istotne efekty zaobserwowano jedynie przy traktowaniu przez 24 godziny (Ryc. 4.2B). Przy traktowaniu larw *tsc2^{-/-}* przez 3 godziny zaobserwowano zwiększony rozrzut danych oraz obniżenie mediany średniej prędkości w zakresie > 2 cm/s w stosunku do larw *tsc2^{-/-}* nietraktowanych lekiem, co wskazuje, że jedynie u części mutantów *tsc2^{-/-}* tak krótkie traktowanie rapamycyną zmniejszyło hiperaktywność, a u niektórych nie przyniosło efektu (Ryc. 4.2B). Zastosowanie wariantu rapaP u larw *tsc2^{-/-}* nie spowodowało istotnych zmian porównując do homozygotycznych larw nietraktowanych lekiem, co może wynikać z faktu, że prewencyjne zastosowanie rapamycyny zwiększało aktywność we wszystkich genotypach (Ryc. 4.2A, B).



Ryc. 4.2 Wyniki analizy podstawowych zdolności lokomotorycznych larw linii *tsc2^{vu242}* traktowanych rapamycyną.

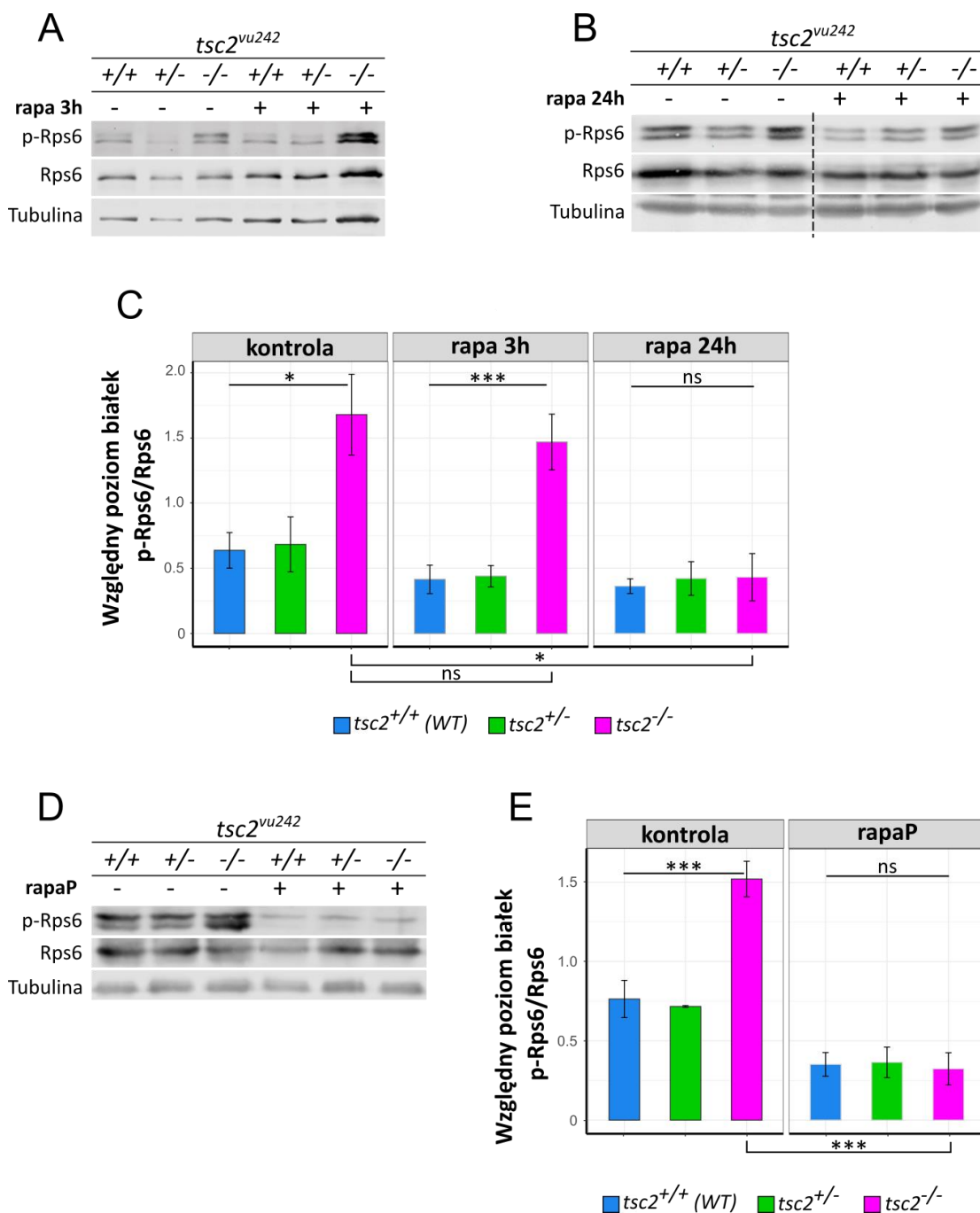
A) Wykresy pudełkowe przedstawiają wyniki analizy sumarycznego czasu aktywności larw *tsc2^{vu242}* w wieku 5 dpf, po 1 godzinie zautomatyzowanego śledzenia ruchu larw

w warunkach ciemności, po traktowaniu rapamycyną przez 3 godziny (rapa 3 h) lub 24 godziny (rapa 24 h) przed eksperymentem bądź podając lek od stadium 48 hpf (rapaP - prewencja). Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego: $df = 2$; $H = 32,17$; $p = 1,02 \times 10^{-7}$; $p = 4,85 \times 10^{-7}$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; $p = 9,74 \times 10^{-7}$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/-}$; ns dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; Liczba larw (genotyp): 71 ($tsc2^{+/+}$), 130 ($tsc2^{+/-}$), 47 ($tsc2^{-/-}$); dla sumarycznego czasu aktywności larw $tsc2^{-/-}$ w warunkach kontrolnych vs. $tsc2^{-/-}$ po podaniu leku: $df = 3$; $H = 38,54$; $p = 2,17 \times 10^{-8}$; $p = 0,0042$ dla rapa 3 h; $p = 0,0027$ dla rapa 24 h; $p = 1,6940 \times 10^{-8}$ dla rapaP; Liczba larw (traktowanie lekiem): 26 (rapa 3 h), 23 (rapa 24 h), 28 (rapaP); *** $p < 0,005$; ns – wyniki nieistotne statystycznie.

B) Wykresy pudełkowe przedstawiają wyniki analizy średniej prędkości larw $tsc2^{vu242}$ w przedziale aktywności powyżej 2 cm/s (hiperaktywność) w wieku 5 dpf, po 1 godzinie zautomatyzowanego śledzenia ruchu larw w warunkach ciemności, po traktowaniu rapamycyną przez 3 godziny (rapa 3 h) lub 24 godziny (rapa 24 h) przed eksperymentem bądź zaczynając podawanie leku od stadium 48 hpf (rapaP - prewencja). Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego: $df = 2$; $H = 31,73$; $p = 1,28 \times 10^{-7}$; $p = 4,78 \times 10^{-6}$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; $p = 2,07 \times 10^{-7}$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/-}$; ns dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; dla średniej prędkości > 2 cm/s u mutantów $tsc2^{-/-}$ w warunkach kontrolnych vs. $tsc2^{-/-}$ po podaniu leku: $df = 3$; $H = 29,68$; $p = 4,52 \times 10^{-5}$; ns dla rapa 3 h, $p = 0,0033$ dla rapa 24 h, ns dla rapaP; Liczba larw (traktowanie lekiem): 26 (rapa 3 h), 23 (rapa 24 h), 28 (rapaP); *** $p < 0,005$; ns – wyniki nieistotne statystycznie.

Poziom aktywności szlaku kinazy mTORC1 obliczono na podstawie ilości ufosforylowanej formy białka Rps6 (Ser235/236; P-Rps6) do całkowitej ilości białka Rps6. Analiza ilościowa stosunku poziomu form białka P-Rps6 do Rps6 wykazała, że u mutantów $tsc2^{-/-}$ poziom fosforylacji białka Rps6 jest wyższy porównując do larw typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ lub mutantów $tsc2^{+/-}$, co świadczy o zwiększonej aktywacji szlaku kinazy mTORC1 (Ryc. 4.3). Krótkie, 3-godzinne traktowanie larw $tsc2^{vu242}$ rapamycyną nie zmieniło poziomu fosforylacji białka Rps6 wykrywanego metodą Western Blot, a więc nie wpłynęło istotnie na aktywność szlaku kinazy mTORC1 (Ryc. 4.3A, C). Natomiast dłuższe traktowania rapamycyną (rapa 24 h oraz rapaP) skutecznie zmniejszyły aktywność szlaku kinazy mTORC1 u larw $tsc2^{vu242}$ porównując do larw nietraktowanych lekiem (Ryc. 4.3 B, C, D, E).

Powyższe wyniki wskazują, że obserwowane u larw $tsc2^{-/-}$ fenotypy behawioralne są związane z podwyższonym poziomem aktywności szlaku kinazy mTORC1 i dłuższe stosowanie inhibitora tego szlaku – rapamycyny – pozwala na poprawę zdolności lokomotorycznych mutantów.



Ryc. 4.3 Wyniki analizy biochemicznej wpływu rapamycyny na aktywację szlaku mTORC1 u larw *tsc2^{vu242}*

- A) Reprezentatywny wynik analizy Western Blot poziomu białek P-Rps6 (Ser235/236), Rps6 i α -Tubuliny u larw *tsc2^{vu242}* w warunkach kontrolnych oraz traktowanych rapamycyną przez 3 godziny (rapa 3 h) przed eksperymentem. Poziom α -Tubuliny stanowi kontrolę ilości lizatu białkowego nałożonego na żel.
- B) Reprezentatywny wynik analizy Western Blot poziomu białek P-Rps6 (Ser235/236), Rps6 i α -Tubuliny u larw *tsc2^{vu242}* w warunkach kontrolnych oraz po traktowaniu rapamycyną przez 24 godziny (rapa 24 h) przed eksperymentem. Poziom α -Tubuliny stanowi kontrolę i odzwierciedla ilość białka nałożonego na żel.

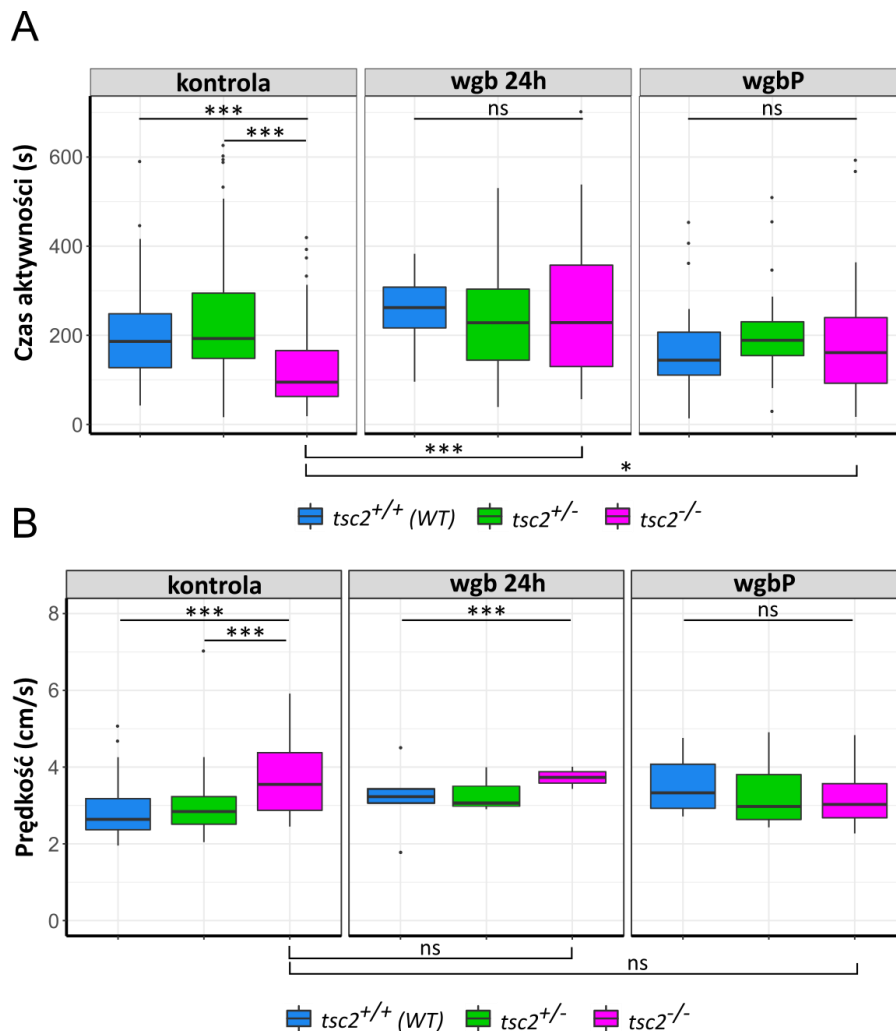
- C) Wykresy słupkowe przedstawiają wyniki analizy stosunku intensywności sygnałów dla ufosforylowanej formy białka P-Rps6 (Ser235/236) do całkowitego białka Rps6 w warunkach kontrolnych oraz po traktowaniu rapamycyną 3 godziny (rapa 3 h) lub 24 godziny (rapa 24 h) przed eksperymentem. Wyniki przedstawiono, jako wartości średnie centralizowane. Wyniki pochodzą z 3 niezależnych doświadczeń. Słupki błędów pokazują SEM. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu do porównań wielokrotnych *post-hoc* Dunnetta dla stosunku sygnału P-Rps6/Rps6 u larw *tsc2^{vu242}* w warunkach kontrolnych: $df = 2$; $F = 6,53$; $p = 0,018$; $p = 0,0197$ dla *tsc2^{-/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; ns *tsc2^{+/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; dla stosunku sygnału P-Rps6/Rps6 u mutantów *tsc2^{-/-}* warunkach kontrolnych vs. u *tsc2^{-/-}* po podaniu leku: $df = 2$; $F = 3,98$; $p = 0,0418$; ns dla rapa 3 h; $p = 0,0306$ dla rapa 24 h; * $p < 0,01$; ns – wyniki nieistotne statystycznie.
- D) Reprezentatywny wynik analizy Western Blot poziomu białek P-Rps6 (Ser235/236), Rps6 i α -Tubuliny u larw *tsc2^{vu242}* w warunkach kontrolnych oraz po uprzednim zastosowaniu rapamycyny zaczynając podawanie leku od stadium 48 hpf (rapaP). Poziom α -Tubuliny stanowi kontrolę i odzwierciedla ilość białka nałożonego na żel.
- E) Wykresy słupkowe przedstawiają wyniki analizy stosunku intensywności sygnałów dla ufosforylowanej formy białka P-Rps6 (Ser235/236) do całkowitego białka Rps6 w warunkach kontrolnych oraz po uprzednim traktowaniu rapamycyną od stadium 48 hpf. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie centralizowane. Wyniki pochodzą z 3 niezależnych doświadczeń. Słupki błędów pokazują SEM. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu do porównań wielokrotnych *post-hoc* Dunnetta dla stosunku sygnału P-Rps6/Rps6 u larw *tsc2^{vu242}* w warunkach kontrolnych: $df = 2$; $F = 23,18$; $p = 0,0015$; $p = 0,002$ dla *tsc2^{-/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; ns dla *tsc2^{+/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; dla stosunku sygnału P-Rps6/Rps6 u mutantów *tsc2^{-/-}* warunkach kontrolnych vs. u *tsc2^{-/-}* po podaniu leku: $df = 2$; $F = 62,62$; $p = 0,0013$; *** $p < 0,005$; ns – wyniki nieistotne statystycznie.

4.1.3 Analiza zachowania larw *tsc2^{vu242}* pod kątem napadów drgawkowych

Aby sprawdzić, czy obniżona aktywność lub podwyższona prędkość w zakresie hiperaktywności u mutantów *tsc2^{-/-}* jest spowodowana napadami drgawkowymi związanymi z fenotypem przypominającym padaczkę użyto stosowany klinicznie w stwardnieniu guzowatym lek przeciwpadaczkowy, wigabatrynę (wgb). Wcześniejsze wyniki z naszego laboratorium (dr Justyna Zmorzyńska, nieopublikowane) wykazały, że krótkie traktowanie wigabatryną nie wpływało istotnie na aktywność larw *tsc2^{vu242}*, dlatego zastosowano dłuższe warianty traktowań: podanie leku na 24 godziny przed testem (wgb 24 h) lub zaczynając od stadium 48 hpf (wgbP). Podanie wigabatryny we wczesnym stadium rozwoju – wariant wgbP – miało na celu zapobiec rozwojowi fenotypów związanych z epilepsją w badanym modelu stwardnienia guzowatego (prewencja). Wyniki analizy wykazały, że oba warianty traktowania

wigabatryną istotnie zwiększając sumaryczny czas aktywności mutantów $tsc2^{-/-}$ w porównaniu do mutantów $tsc2^{-/-}$ nietraktowanych lekiem (Ryc. 4.4A). Wariant wgb 24 h nie obniżył istotnie średniej prędkości larw $tsc2^{-/-}$ w zakresie hiperaktywności (Ryc. 4.4B). Z kolei zastosowanie wgbP obniżało medianę średniej prędkości u mutantów $tsc2^{-/-}$, jednakże takie zastosowanie wigabatryny obniżało również sumaryczny czas aktywności u larw typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ oraz mutantów heterozygotycznych $tsc2^{+/-}$, co wskazuje na niespecyficzny efekt długiego traktowania tym lekiem (Ryc. 4.4A, B).

Wyniki te wskazują, że obniżona aktywność larw $tsc2^{-/-}$ może być spowodowana występowaniem napadów epileptycznych. Jednocześnie drgawki prawdopodobnie nie są przyczyną zwiększonej średniej prędkości w zakresie > 2 cm/s u larw $tsc2^{-/-}$.



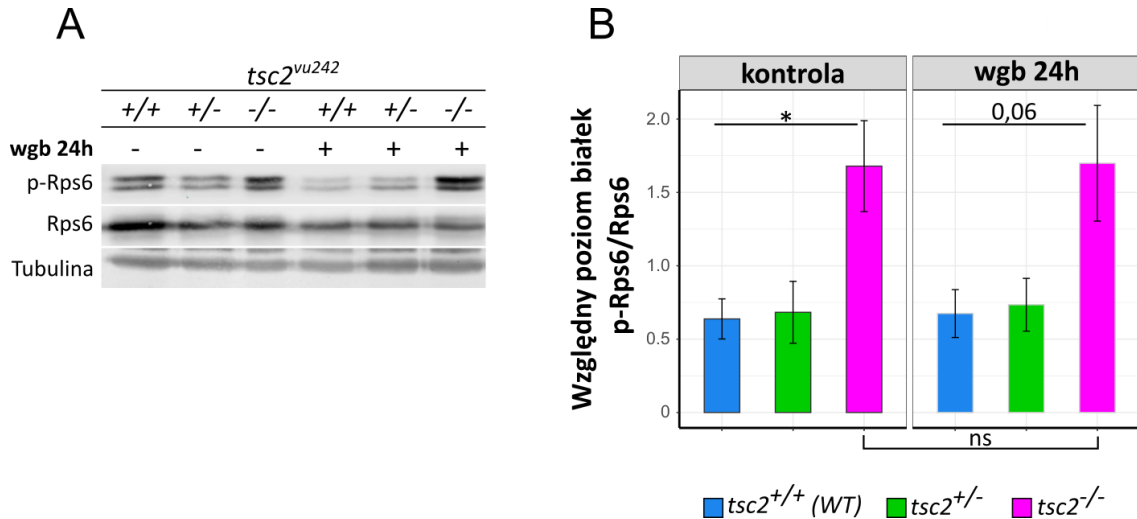
Ryc. 4.4 Wyniki analizy podstawowych zdolności lokomotorycznych larw linii $tsc2^{vu242}$ traktowanych wigabatryną.

A) Wykresy pudełkowe przedstawiają wyniki analizy sumarycznego czasu aktywności larw $tsc2^{vu242}$ w wieku 5 dpf, po 1 godzinie zautomatyzowanego śledzenia ruchu larw

w warunkach ciemności, po traktowaniu wigabatryną przez 24 godziny (wgb 24 h) przed eksperymentem bądź zaczynając podawanie leku od stadium 48 hpf (wgbP - prewencja). Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego: $df = 2$; $H = 49,99$; $p = 1,39 \times 10^{-11}$; $p = 2,33 \times 10^{-6}$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; $p = 1,34 \times 10^{-11}$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/-}$; ns dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; Liczba larw (genotyp): 66 ($tsc2^{+/+}$), 105 ($tsc2^{+/-}$), 53 ($tsc2^{-/-}$); dla sumarycznego czasu aktywności larw $tsc2^{-/-}$ w warunkach kontrolnych vs. $tsc2^{-/-}$ po podaniu leku: $df = 2$; $H = 23,69$; $p = 7,16 \times 10^{-7}$; $p = 6,64 \times 10^{-6}$ dla wgb 24 h, $p = 0,0355$ dla wgbP; Liczba larw (traktowanie lekiem): 27 (wgb 24 h), 31 (wgbP); *** $p < 0,005$; ns – wyniki nieistotne statystycznie.

B) Wykresy pudełkowe przedstawiają wyniki analizy średniej prędkości larw $tsc2^{vu242}$ w przedziale aktywności powyżej 2 cm/s (hiperaktywność), w wieku 5 dpf, po 1 godzinie zautomatyzowanego śledzenia ruchu larw w warunkach ciemności, po traktowaniu wigabatryną przez 24 godziny (wgb 24 h) przed eksperymentem bądź zaczynając podawanie leku od stadium 48 hpf (wgbP - prewencja). Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego: $df = 2$; $H = 14,22$; $p = 8,13 \times 10^{-4}$; $p = 0,0013$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; $p = 0,0022$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/-}$; ns dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; Liczba larw (genotyp): 66 ($tsc2^{+/+}$), 105 ($tsc2^{+/-}$), 53 ($tsc2^{-/-}$); dla średniej prędkości > 2 cm/s mutantów $tsc2^{-/-}$ w warunkach kontrolnych vs. $tsc2^{-/-}$ po podaniu leku: $df = 2$; $H = 4,40$; $p = 0,1105$; ns dla wgb 24 h, ns dla wgbP; Liczba larw (traktowanie lekiem): 27 (wgb 24 h), 31 (wgbP); *** $p < 0,005$; ns – wyniki nieistotne statystycznie.

W związku z wynikami testów podstawowych zdolności lokomotorycznych, w których traktowanie wigabatryną istotnie poprawiło fenotyp mutantów $tsc2^{-/-}$, postanowiono sprawdzić, czy w linii $tsc2^{vu242}$ lek ten wpływa na aktywność szlaku kinazy mTORC1, jak sugerowały to wcześniejsze badania w modelach mysich (Zhang i wsp. 2013). Do analizy Western Blot wybrano wariant traktowania przez 24 godziny, ze względu na to, że przyniósł on najlepsze efekty w poprawie zdolności lokomotorycznych mutantów $tsc2^{-/-}$. Larwy $tsc2^{vu242}$ hodowano w warunkach kontrolnych lub traktowano wigabatryną przez 24 godziny przed eksperymentem. Przygotowanie próbek białkowych oraz analiza ilościowa stosunku poziomu białka P-Rps6 do Rps6 zostały przeprowadzone, tak jak opisano wcześniej dla rapamycyny. Analiza Western Blot wykazała, że wigabatryna nie wpływa na aktywność szlaku kinazy mTORC1 u larw $tsc2^{vu242}$, porównując do larw nietraktowanych lekiem (Ryc. 4.5A, B).



Ryc. 4.5 Wyniki analizy biochemicznej wpływu wigabatryny na aktywację szlaku mTORC1 u larw linii *tsc2^{vu24}*.

- A)** Analiza Western Blot poziomu białek P-Rps6 (Ser235/236), Rps6 i α -Tubuliny u larw *tsc2^{vu242}* w warunkach kontrolnych oraz po traktowaniu wigabatryną przez 24 godziny (wgb 24 h) przed eksperymentem. Poziom α -Tubuliny stanowi kontrolę i odzwierciedla ilość białka nałożonego na żel.
- B)** Wykresy słupkowe przedstawiają wyniki analizy stosunku intensywności sygnałów dla białek P-Rps6 (Ser235/236) do Rps6 w warunkach kontrolnych oraz po traktowaniu wigabatryną 24 godziny przed eksperymentem. Wyniki przedstawiono, jako wartości średnie centralizowane. Wyniki pochodzą z 3 niezależnych doświadczeń. Słupki błędów pokazują SEM. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu do porównań wielokrotnych post-hoc Dunnetta dla stosunku sygnału P-Rps6/Rps6 u larw *tsc2^{vu242}* w warunkach kontrolnych: $df = 2$; $F = 6,53$; $p = 0,018$; $p = 0,0197$ dla *tsc2^{-/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; nieistotne statystycznie (ns) dla *tsc2^{+/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; dla stosunku sygnału P-Rps6/Rps6 u mutantów *tsc2^{-/-}* warunkach kontrolnych vs. u *tsc2^{-/-}* po podaniu leku: $p = 0,061$ dla wgb 24 h; $*p < 0,05$.

4.2 Analiza poziomu lęku w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym

Analiza podstawowej aktywności lokomotorycznej po zastosowaniu leku przeciwdrgawkowego – wigabatryny – wykazała, że podwyższona średnia prędkość mutantów *tsc2^{-/-}* w zakresie hiperaktywności (> 2 cm/s) może nie wynikać ze stanów drgawkowych, ponieważ wigabatryna nie była skuteczna w poprawie tego parametru. Postanowiono więc zbadać, czy obserwowany fenotyp jest związany z nasilonym lękiem. W tym celu wykonano 4 testy behawioralne u larw *tsc2^{vu242}* służące ocenie poziomu lęku.

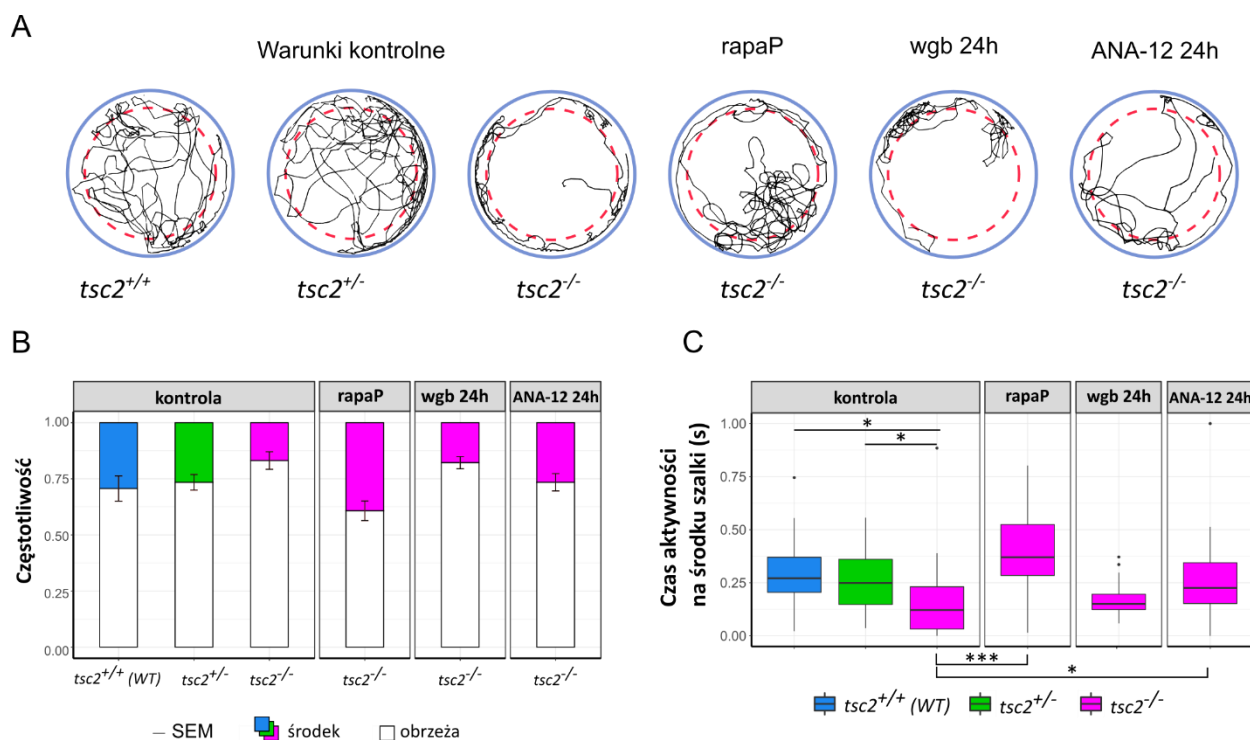
W celu zbadania, czy można zahamować rozwój obserwowanych fenotypów przez prewencyjne hamowanie nadmiernej aktywności szlaku kinazy mTOR zastosowano

traktowanie rapamycyną zaczynając od wczesnych stadiów rozwojowych. Natomiast żeby sprawdzić, czy fenotypy te zależą od drgawek zastosowano traktowanie wigabatryną przez 24 h przed eksperymentem. Dodatkowo, na podstawie dostępnych danych literaturowych oraz badań przesiewowych związków farmakologicznych wykonanych przez dr Justynę Zmorzyńską, wytypowano nowy związek – ANA-12, będący antagonistą receptora TrkB. Wykazała ona, że zastosowanie ANA-12 przez 24 godziny przed eksperymentem poprawia fenotypy związane z podstawową aktywnością lokomotoryczną oraz podwyższoną średnią prędkością ruchu w zakresie hiperaktywności u larw *tsc2^{-/-}* (Kedra i wsp. 2020). Ponadto, związek ten wykazywał działanie przeciwlękowe w myszach i szczurach (Cazorla i wsp. 2011; Azogu i Plamondon 2017). Testy przeprowadzano w wieku 5 dpf.

4.2.1 Analiza zachowania larw linii *tsc2^{vu242}* w teście w otwartym polu

W wieku 5 dpf larwy danio pręgowanego wykazują tigmotaksję, czyli unikanie przebywania na otwartej przestrzeni i preferencję do obszaru blisko ścianek szalki. W przypadku zwiększonego lęku, następuje nasilenie tigmotaksji, czyli larwy są mniej chętne do eksplorowania środka szalki. W teście w otwartym polu aktywność larw mierzono w dwóch obszarach: w środku szalki oraz na obrzeżach, blisko ścianek (Ryc. 4.6A). Na podstawie uzyskanych danych obliczono sumaryczny czas aktywności larw *tsc2^{vu242}* na środku szalki względem całkowitego czasu eksperymentu (Ryc. 4.6B). Analiza zachowania larw *tsc2^{vu242}* hodowanych w warunkach kontrolnych wykazała, że mutanty *tsc2^{-/-}* spędzają istotnie mniej czasu na eksplorowaniu środka szalki w porównaniu do larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}* lub mutantów *tsc2^{+/-}* (Ryc. 4.6B, C). Wyniki te sugerują podwyższony poziom lęku u larw *tsc2^{-/-}*. Zachowanie mutantów *tsc2^{+/-}* nie różniło się od zachowania larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}*.

Larwy *tsc2^{-/-}* traktowane prewencyjnie rapamycyną przebywały istotnie dłużej na środku szalki w porównaniu do larw nietraktowanych lekiem, co sugeruje, że wczesne hamowanie nadmiernej aktywacji ścieżki mTORC1 zapobiega wystąpieniu nasilonego lęku u mutantów *tsc2^{-/-}* (Ryc. 4.6B, C). Traktowanie larw *tsc2^{-/-}* wigabatryną nie wpłynęło na czas spędzony na eksplorowaniu środka szalki, z czego można wywnioskować, że to nie napady drgawkowe są przyczyną obniżenia czasu eksploracji szalki u mutantów *tsc2^{-/-}* (Ryc. 4.6B, C). Natomiast larwy *tsc2^{-/-}* traktowane związkiem o potencjalnych właściwościach przeciwlękowych – ANA-12 – spędziły istotnie dłuższy czas na eksplorowaniu środka szalki w porównaniu do larw *tsc2^{-/-}* hodowanych w warunkach kontrolnych, potwierdzając, że obserwowany fenotyp wynika z nasilonego lęku (Ryc. 4.6B, C).



Ryc. 4.6 Wyniki analizy zachowania larw linii $tsc2^{vu242}$ w teście w otwartym polu.

- A)** Reprezentatywne schematy drogi pokonanej przez larwy $tsc2^{vu242}$ podczas testu w otwartym polu, z uwzględnieniem obszaru środka szalki (czerwona linia przerywana) i obrzeża szalki blisko jej ścianek (niebieska linia ciągła), w warunkach kontrolnych oraz po podaniu związków farmakologicznych.
- B)** Wykres słupkowy przedstawia czas spędzony na środku szalki (kolor) oraz czas spędzony blisko ścianek szalki (biały) względem całkowitego czasu eksperymentu. Eksperyment przeprowadzono w warunkach kontrolnych oraz po traktowaniu rapamycyną zaczynając podawanie leku od stadium 48 dpf (rapaP) lub wigabatryną (wgb 24 h) lub ANA-12 (ANA-12 24 h) podając związek farmakologiczny 24 godziny przed testem. Słupki błędów pokazują SEM.
- C)** Wykres pudełkowy przedstawia czas spędzony przez larwy $tsc2^{vu242}$ na środku szalki w warunkach kontrolnych oraz po potraktowaniu związkami farmakologicznymi jak opisano powyżej, względem całkowitego czasu eksperymentu. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego dla względnej aktywności larw $tsc2^{vu242}$ na środku szalki, w warunkach kontrolnych: $df = 2$; $H = 8,3268$; $p = 0,01555$; $p = 0,0288$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; $p = 0,0119$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/-}$; ns dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; Liczba larw (genotyp): 14 ($tsc2^{+/+}$), 21 ($tsc2^{+/-}$), 24 ($tsc2^{-/-}$); dla względnej aktywności na środku szalki u $tsc2^{-/-}$ w warunkach kontrolnych vs. u $tsc2^{-/-}$ po podaniu związku farmakologicznego: $df = 3$; $H = 25,925$; $p = 9,98 \times 10^{-6}$; $p = 1,23 \times 10^{-5}$ dla rapaP; wyniki nieistotne statystycznie dla wgb 24 h; $p = 0,0467$ dla ANA-12. Liczba larw (traktowanie związkiem farmakologicznym): 23 (rapaP), 13 (wgb 24 h), 27 (ANA-12); Słupki błędów pokazują SEM; * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

4.2.2 Analiza zachowania larw linii *tsc2^{vu242}* w teście jasnego-ciemnego pola

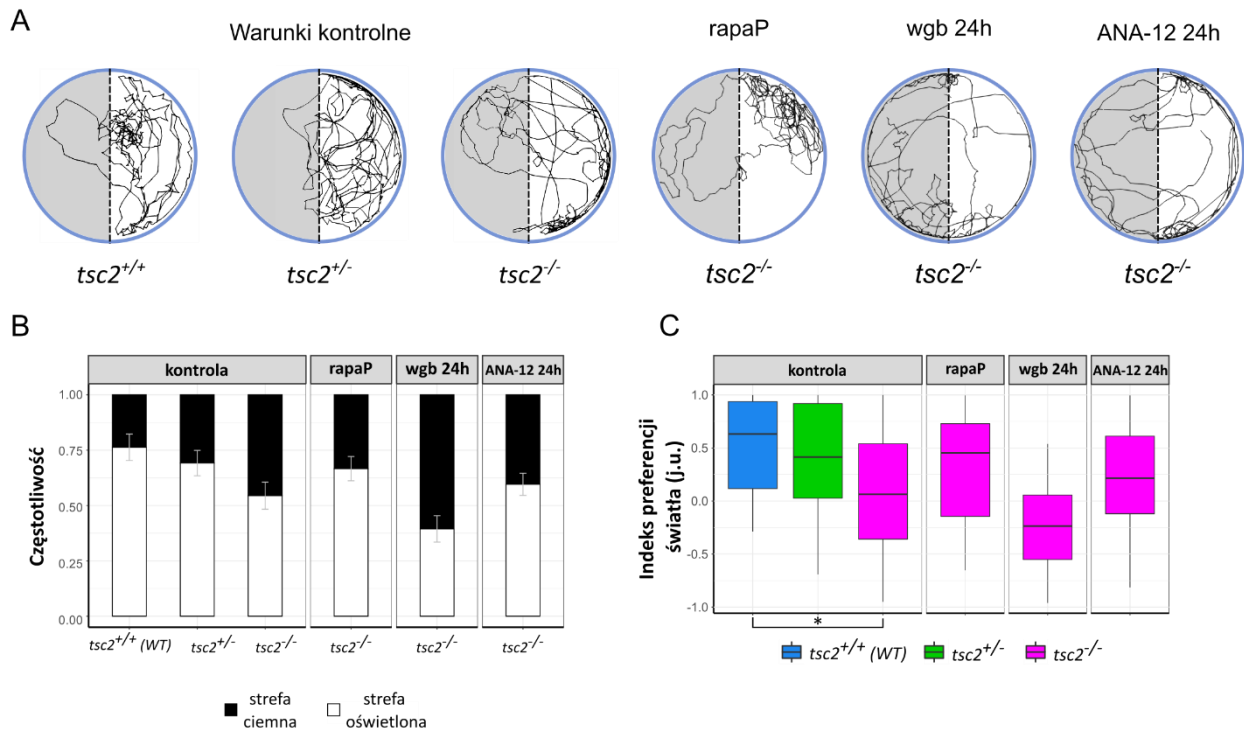
W wieku 5 dpf larwy danio pręgowanego wykazują preferencję do przebywania w świetle i unikania ciemności. Jest to zjawisko fototaksji (Bai i wsp. 2016; Orger i Baier 2005). W teście jasnego-ciemnego pola rejestrowano aktywność larw *tsc2^{vu242}* w obrębie dwóch wyznaczonych stref szalki: ciemnej zakrytej od góry nieprzepuszczającymi światła filtrami słonecznymi oraz oświetlonej (Ryc. 4.7A). Uważa się, że zwiększony procent czasu spędzonego przez larwy danio pręgowanego w strefie jasnej, czyli aktywne unikanie ciemności, odzwierciedla nasilony lęk (Bai i wsp. 2016; Steenbergen, Richardson, i Champagne 2012). W celu oceny poziomu lęku u larw *tsc2^{vu242}* obliczono sumaryczny czas spędzony przez larwy w strefie jasnej oraz ciemnej względem całkowitego czasu eksperymentu, a także wyznaczono indeks preferencji warunków świetlnych (Steenbergen, Richardson, i Champagne 2012).

Analiza zachowania larw *tsc2^{vu242}* hodowanych w warunkach kontrolnych wykazała, że larwy typu dzikiego *tsc2^{+/+}* przez większość czasu przebywały w oświetlonej części szalki, co było oczekiwanym wynikiem. Natomiast w przypadku mutantów *tsc2^{-/-}* stwierdzono, że nie posiadają one preferencji do żadnego z warunków świetlnych, ponieważ spędzają podobny czas zarówno w jasnej, jak i w ciemnej strefie szalki (Ryc. 4.7B, C). Tak więc, mutanty homozygotyczne *tsc2^{-/-}* wykazywały wyraźnie słabszą fototaksję niż siostrzane kontrole typu dzikiego *tsc2^{+/+}*. Natomiast zachowanie mutantów *tsc2^{+/-}* nie różniło się istotnie od zachowania larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}* (Ryc. 4.7B, C).

Zaobserwowano, że larwy *tsc2^{-/-}* traktowane prewencyjnie rapamycyną spędzały nieco więcej czasu w oświetlonej strefie szalki, co jest widoczne również na wykresie indeksu preferencji warunków świetlnych, gdzie mediana osiągnęła wyższe wartości niż u mutantów *tsc2^{-/-}* nietraktowanych lekiem (Ryc. 4.7C). Niemniej jednak nie był to efekt istotny statystycznie. Zastosowanie wigabatryny spowodowało przesunięcie preferencji larw *tsc2^{-/-}* w stronę warunków ciemności (Ryc. 4.7C). Wynik ten może być związany z niepożądanymi skutkami działania wigabatryny, gdyż w niektórych przypadkach stosowanie tego leku na wczesnych etapach rozwoju działało upośledzająco na układ wzrokowy (Wang i wsp. 2008; Golec i wsp. 2021). Zachowanie larw *tsc2^{-/-}* po traktowaniu ANA-12 nie różniło się istotnie od larw *tsc2^{-/-}* nietraktowanych tym związkami.

Wyniki testu jasnego-ciemnego pola wskazują, że preferencja świetlna larw *tsc2^{-/-}* jest zaburzona w porównaniu do larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}*, przy czym traktowanie rapamycyną jedynie częściowo odwraca ten fenotyp sugerując, że nadmierna aktywność szlaku mTORC1

może być tylko jedną z przyczyn obserwowanego zachowania mutantów $tsc2^{-/-}$. Brak efektu po traktowaniu ANA-12 sugeruje, że obserwowane zachowanie larw $tsc2^{-/-}$ nie jest związane z lękiem.



Ryc. 4.7 Wyniki analizy zachowania larw linii $tsc2^{vu242}$ w teście jasnego-ciemnego pola.

A) Reprezentatywne schematy drogi pokonanej przez larwy $tsc2^{vu242}$ podczas testu jasnego-ciemnego pola w warunkach kontrolnych oraz po podaniu związków farmakologicznych. Ciemne pole zaznaczono na szaro.

B) Wykres słupkowy przedstawia czas spędzony w świetle (kolor biały) oraz w ciemności (kolor czarna) względem całkowitego czasu eksperymentu. Eksperyment przeprowadzono w warunkach kontrolnych oraz po traktowaniu rapamycyną zaczynając podawanie leku od stadium 48 dpf (rapaP) lub wigabatryną (wgb 24 h) lub ANA-12 (ANA-12 24 h) podając lek 24 godziny przed testem. Słupki błędów pokazują SEM.

C) Wykres pudełkowy przedstawia wyniki analizy indeksu preferencji światła u larw $tsc2^{vu242}$ w warunkach kontrolnych oraz po potraktowaniu związkami farmakologicznymi jak opisano powyżej. Wartości powyżej zera wskazują na preferencję do przebywania w świetle, natomiast wartości poniżej zera wskazują na preferencję do przebywania w ciemności. Słupki błędów pokazują SEM. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu 1-czynnikowej ANOVY z testem typu *post-hoc* Tukeya HSD dla względnej aktywności larw $tsc2^{vu242}$ w ciemności, w warunkach kontrolnych: $df = 2$; $F = 3,302$; $p = 0,0444$; $p = 0,0486$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; ns dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/-}$; ns dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$;

Liczba larw (N): $tsc2^{+/+}$ (14), $tsc2^{+/-}$ (21), $tsc2^{-/-}$ (22); dla względnej aktywności larw $tsc2^{-/-}$ w ciemności, w warunkach kontrolnych vs. $tsc2^{-/-}$ po podaniu związków farmakologicznych: $df = 3$; $F = 3,14$; $p = 0,0297$; wyniki nieistotne statystycznie (ns) dla rapaP; ns dla wgb 24 h; ns dla ANA-12; Liczba larw (N): 23 (rapaP), 13 (wgb 24 h), 27 (ANA-12); * $p < 0,05$.

4.2.3 Analiza zachowania larw linii $tsc2^{vu242}$ w teście badającym reakcję na nagłe zmiany oświetlenia

Larwy danio pręgowanego w odpowiedzi na naprzemienne zmiany oświetlenia wykazują charakterystyczny wzorzec ruchu wynikający z reakcji lękowych. W momencie nagłego przejścia z cyklu ciemności do cyklu światła, aktywność larw gwałtownie spada, następuje nagłe znieruchomienie (ang. *freezing behaviour*), odzwierciedlające wzrost lęku w odpowiedzi na niespodziewane zapalenia światła. Z kolei w przypadku przejścia z cyklu światła do cyklu ciemności aktywność larw gwałtownie wzrasta, co przypisuje się zwiększonemu poziomowi lęku związanego z ponownym znalezieniem się w ciemności (MacPhail i wsp. 2009; Basnet i wsp. 2019; Vignet i wsp. 2013). W teście badającym reakcję na nagłe zmiany oświetlenia u larw $tsc2^{vu242}$ mierzono aktywność mutantów podczas trzech 10-minutowych cykli świetlnych: ciemności-światła-ciemności.

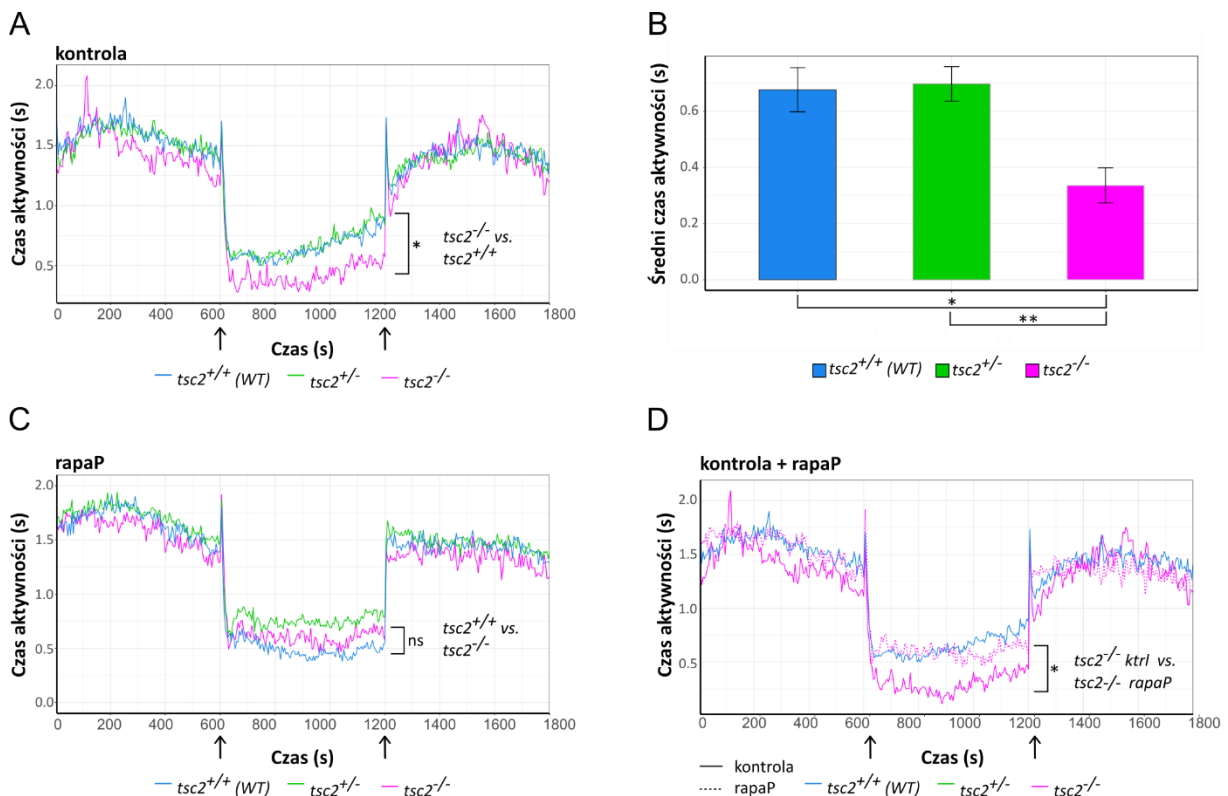
Na podstawie analizy zachowania larw $tsc2^{vu242}$ hodowanych w warunkach kontrolnych stwierdzono, że podczas pierwszego cyklu ciemności mutanty $tsc2^{-/-}$ wykazywały podwyższoną całkowitą aktywność, która niemal dorównywała aktywności larw typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ oraz mutantów $tsc2^{+/-}$ (Ryc. 4.8A). Przejście do cyklu światła wywoływało u larw $tsc2^{vu242}$ reakcję znieruchomienia, przy czym u mutantów $tsc2^{-/-}$ zaobserwowano istotnie mniejszą aktywność w fazie światła w porównaniu do larw typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ lub mutantów $tsc2^{+/-}$ (Ryc. 4.8A, B). Ponownie przejście do cyklu ciemności wywoływało hiperaktywność larw, przy czym u mutantów $tsc2^{-/-}$ zaobserwowano najwyższe piki aktywności, świadczące o zwiększonej sile reakcji larw, w porównaniu do larw typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ lub mutantów $tsc2^{+/-}$ (Ryc. 4.8A).

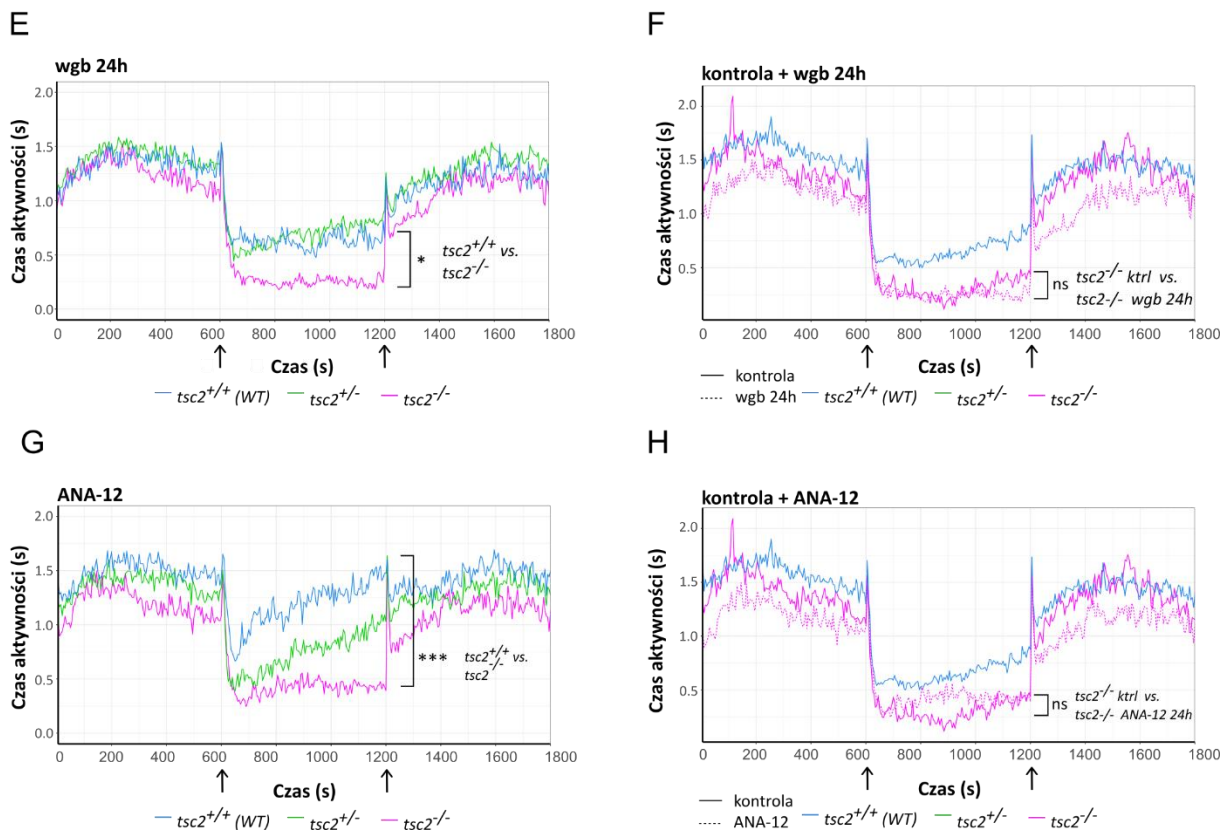
Larwy $tsc2^{-/-}$ po prewencyjnym traktowaniu rapamycyną wykazywały łagodniejsze reakcje w odpowiedzi na zmiany w cyklach świetlnych, porównywalne z zachowaniem larw typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ (Ryc. 4.8C, D). Zaobserwowano, że aktywność larw $tsc2^{-/-}$ po przejściu z cyklu ciemności do cyklu światła była istotnie większa (krótszy czas znieruchomienia) porównując do mutantów $tsc2^{-/-}$ nietraktowanych lekiem. Z kolei po ponownym przejściu do cyklu ciemności larwy $tsc2^{-/-}$ traktowane rapamycyną nie wykazywały hiperaktywności, jaką

obserwowano u nietraktowanych larw $tsc2^{-/-}$, a ich aktywność nie różniła się od larw typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ (Ryc. 4.8 C, D).

U larw $tsc2^{vu242}$ traktowanych wigabatryną stwierdzono obniżenie całkowitej aktywności niezależnie od warunków świetlnych oraz genotypu. Niemniej jednak po zastosowaniu wigabatryny larwy $tsc2^{-/-}$ wciąż wykazywały silniejsze zneruchomienie w porównaniu do larw typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ oraz mutantów $tsc2^{+/-}$ w cyklu światła, natomiast nie wykryto hiperaktywności u $tsc2^{-/-}$ w cyklach ciemności (Ryc. 4.8E, F).

W przypadku mutantów $tsc2^{-/-}$ traktowanych ANA-12 zaobserwowano niewielki wzrost aktywności podczas cyklu światła oraz stwierdzono spadek hiperaktywności w cyklach ciemności porównując do larw $tsc2^{-/-}$ nietraktowanych tym związkiem (Ryc. 4.8G, H). Niemniej jednak zmiany te nie były istotne statystycznie. Odnotowano również, że traktowanie ANA-12 zwiększyło aktywność mutantów $tsc2^{+/-}$ oraz larw $tsc2^{+/+}$ podczas cyklu światła, co sugeruje, że w przypadku reakcji zneruchomienia związek ten mógł wpłynąć anksjolitycznie na wszystkie genotypy linii $tsc2^{vu242}$ (Ryc. 4.8G).





Ryc. 4.8 Wyniki analizy zachowania larw linii $tsc2^{vu242}$ w teście badającym reakcję na nagle zmiany oświetlenia.

- A)** Wykresy liniowe przedstawiają uśredniony czas aktywności larw $tsc2^{vu242}$ w warunkach kontrolnych. Aktywność zmierzono w trzech 10-minutowych cyklach świetlnych: ciemności-światło-ciemności. Zmiana warunków świetlnych następowała kolejno w punktach czasowych 600 sekund oraz 1200 sekund zaznaczonych na wykresie za pomocą czarnych strzałek. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego dla czasu aktywności mutantów $tsc2^{-/-}$ vs. larw typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ w fazie światła: $df = 2$; $H = 13,301$; $p = 1,293 \times 10^{-3}$; $p = 0,0117$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; Liczba larw (N): $tsc2^{+/+}$ (49), $tsc2^{+/-}$ (63), $tsc2^{-/-}$ (29); * $p < 0,05$.
- B)** Wykres słupkowy przedstawia średni czas aktywności larw $tsc2^{vu242}$ podczas cyklu światła, w warunkach kontrolnych. Słupki błędów pokazują SEM. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego dla czasu aktywności larw $tsc2^{vu242}$ w fazie światła: $df = 2$; $H = 13,301$; $p = 1,293 \times 10^{-3}$; $p = 0,0117$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; $p = 0,0011$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/-}$; nieistotne statystycznie (ns) dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.
- C)** Wykresy liniowe przedstawiają uśredniony czas aktywności larw $tsc2^{vu242}$ po traktowaniu rapamycyną (rapaP). Eksperyment przeprowadzono, tak jak opisano w pkt. A. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego dla czasu aktywności larw $tsc2^{vu242}$ w fazie światła:

$df = 2$; $H = 6,466$, $p = 0,03944$; ns dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; Liczba larw (N): $tsc2^{+/+}$ (49), $tsc2^{-/-}$ (77), $tsc2^{-/-}$ (34).

- D)** Wykresy liniowe przedstawiają uśredniony czas aktywności mutantów $tsc2^{-/-}$ i larw typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ w warunkach kontrolnych (linia ciągła) oraz mutantów $tsc2^{-/-}$ po traktowaniu rapamycyną (rapaP, linia przerywana). Eksperyment przeprowadzono, tak jak opisano w pkt. A. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego dla czasu aktywności mutantów $tsc2^{-/-}$ w fazie światła, w warunkach kontrolnych vs. $tsc2^{-/-}$ po podaniu rapaP: $df = 3$; $H = 17,074$; $p = 6,824 \times 10^{-4}$; $p = 0,0245$ dla ktrl vs. rapaP; Liczba larw (N): kontrola (29); rapaP (34); * $p < 0,05$.
- E)** Wykresy liniowe przedstawiają uśredniony czas aktywności larw $tsc2^{vu242}$ po traktowaniu wigabatryną (wgb 24 h). Eksperyment przeprowadzono, tak jak opisano w pkt. A. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego dla czasu aktywności larw $tsc2^{vu242}$ w fazie światła: $df = 2$; $H = 16,753$, $p = 2,3 \times 10^{-4}$; $p = 0,022$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; Liczba larw (N): $tsc2^{+/+}$ (24), $tsc2^{+/-}$ (60), $tsc2^{-/-}$ (43); * $p < 0,05$.
- F)** Wykresy liniowe przedstawiają uśredniony czas aktywności mutantów $tsc2^{-/-}$ i larw typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ w warunkach kontrolnych (linia ciągła) oraz mutantów $tsc2^{-/-}$ po traktowaniu wigabatryną (wgb 24 h, linia przerywana). Eksperyment przeprowadzono, tak jak opisano w pkt. A. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego dla czasu aktywności mutantów $tsc2^{-/-}$ w fazie światła, w warunkach kontrolnych vs. $tsc2^{-/-}$ po podaniu wgb 24 h: $df = 3$; $H = 17,074$; $p = 6,824 \times 10^{-4}$; ns dla ktrl vs. wgb 24 h; Liczba larw (N): kontrola (29); wgb 24 h (43).
- G)** Wykresy liniowe przedstawiają uśredniony czas aktywności larw $tsc2^{vu242}$ po traktowaniu ANA-12 (ANA-12 24 h). Eksperyment przeprowadzono, tak jak opisano w pkt. A. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego dla czasu aktywności larw $tsc2^{vu242}$ w fazie światła: $df = 2$; $H = 24,594$, $p = 4,57 \times 10^{-7}$; $p = 2,15 \times 10^{-6}$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; Liczba larw (N): $tsc2^{+/+}$ (26), $tsc2^{+/-}$ (30), $tsc2^{-/-}$ (33); *** $p < 0,005$.
- H)** Wykresy liniowe przedstawiają uśredniony czas aktywności mutantów $tsc2^{-/-}$ i larw typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ w warunkach kontrolnych (linia ciągła) oraz mutantów $tsc2^{-/-}$ po traktowaniu ANA-12 (ANA-12 24 h, linia przerywana). Eksperyment przeprowadzono, tak jak opisano w pkt. A. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego dla czasu aktywności mutantów $tsc2^{-/-}$ w fazie światła, w warunkach kontrolnych vs. $tsc2^{-/-}$ po podaniu ANA-12 24 h: $df = 3$; $H = 17,074$; $p = 6,824 \times 10^{-4}$; ns dla ktrl vs. ANA-12 24 h; Liczba larw (N): kontrola (29); ANA-12 24 h (33).

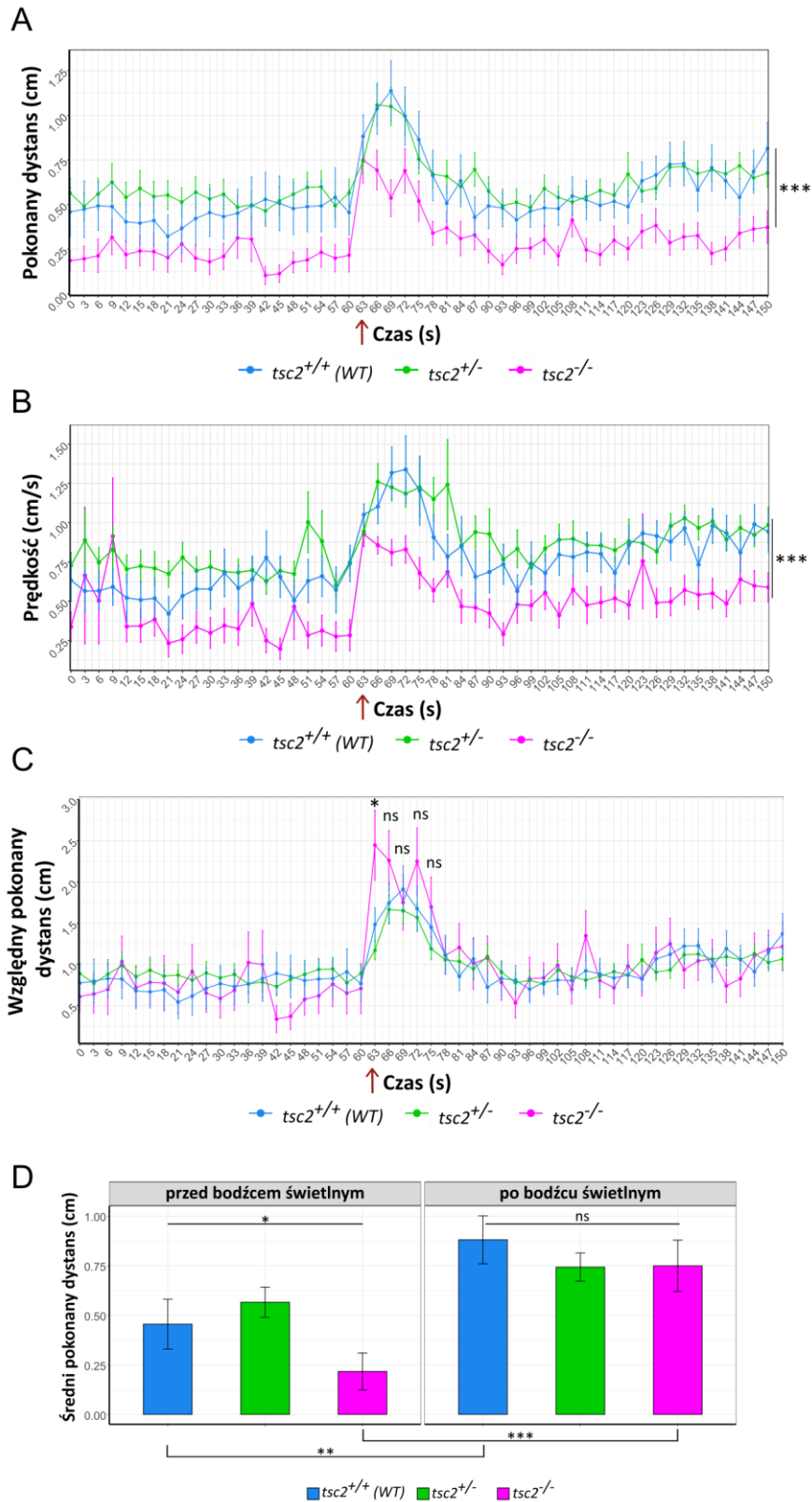
4.2.4 Analiza zachowania larw linii *tsc2^{vu242}* w teście badającym reakcję ucieczki oraz habituację w odpowiedzi na bodziec świetlny

Reakcja ucieczki jest uniwersalną, ochronną reakcją sensomotoryczną zarówno u osobników dorosłych, jak i u larw danio pręgowanego, która polega na wzmożeniu aktywności w odpowiedzi na niespodziewane bodźce np. świetlne. Reakcja ta może służyć określeniu statusu integracji bodźców sensorycznych i motorycznych. W tym doświadczeniu badano aktywność larw *tsc2^{vu242}* w odpowiedzi na powtarzający się bodziec świetlny. Odzwierciedleniem aktywności larw *tsc2^{vu242}* był dystans pokonany przez larwy podczas doświadczenia. Natomiast długość dystansu przebytego przez larwy *tsc2^{vu242}* po kolejnych pulsach światła odpowiadała sile reakcji ucieczki w odpowiedzi na bodziec. Eksperyment składał się z dwóch części. Przez pierwsze 5 minut mierzono aktywność larw w warunkach ciemności przy braku bodźców, uzyskując wyniki początkowej, spontanicznej aktywności larw. Następnie, przez kolejne 5 minut mierzono aktywność larw podczas powtarzającego się w równych odstępach czasu bodźca w postaci pulsu światła.

Podczas eksperymentu larwy *tsc2^{-/-}* pokonały krótszy dystans niż larwy typu dzikiego *tsc2^{+/+}* lub mutanty *tsc2^{+/-}* (Ryc. 4.9A). Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi obserwacjami wskazującymi na zmniejszone zdolności lokomotoryczne mutantów *tsc2^{-/-}* (Ryc. 4.1A). Również średnia prędkość mutantów *tsc2^{-/-}* była obniżona w stosunku do larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}* lub mutantów *tsc2^{+/-}* (Ryc. 4.9B). Mimo to, po pierwszym pulsie światła wywołującym reakcję ucieczki larwy *tsc2^{-/-}*, *tsc2^{+/-}* oraz larwy typu dzikiego *tsc2^{+/+}* pokonały podobną drogę (Ryc. 4.9A, C, D). Biorąc pod uwagę, że wyjściowa aktywność larw *tsc2^{-/-}* była istotnie mniejsza niż u siostrzanych kontroli *tsc2^{+/+}* i *tsc2^{+/-}* wynik ten wskazuje na silniejszą reakcję ucieczki (Ryc. 4.9C). U mutantów *tsc2^{+/-}* oraz u larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}* zaobserwowano wzmocnienie reakcji ucieczki wraz z kolejnymi dwoma pulsami świetlnymi, po których larwy te pokonywały dłuższe dystanse. Natomiast mutanty *tsc2^{-/-}* przy kolejnych bodźcach świetlnych pokonywały coraz krótszą drogę, co świadczyło o osłabieniu reakcji na bodziec. Wynik ten sugeruje wcześniejszą habituację mutantów *tsc2^{-/-}* niż larw *tsc2^{+/+}* i *tsc2^{+/-}* lub, co bardziej prawdopodobne – problem z przetwarzaniem informacji sensomotorycznej (Ryc. 4.9). W około 93 sekundzie eksperymentu larwy *tsc2^{vu242}* osiągnęły bazową aktywność lokomotoryczną, co świadczy o przyzwyczajeniu się do bodźca świetlnego (Ryc. 4.9A). Nie odnotowano istotnych różnic w reakcji ucieczki pomiędzy mutantami *tsc2^{+/-}*, a larwami typu dzikiego *tsc2^{+/+}*.

W tym teście nie sprawdzono działania stosowanych wcześniej substancji farmakologicznych ze względu na fakt, że w eksperymencie badającym reakcję na nagłe

zmiany oświetlenia (opisano w Rozdziale 4.2.3) nie zaobserwowano wpływu rapamycyny ani ANA-12 na nagły wzrost aktywności larw zaraz po zgaszeniu lub zapaleniu światła, natomiast wigabatryna we wszystkich testach pogarszała fenotypy związane z nasilonym lękiem u larw *tsc2^{-/-}*.



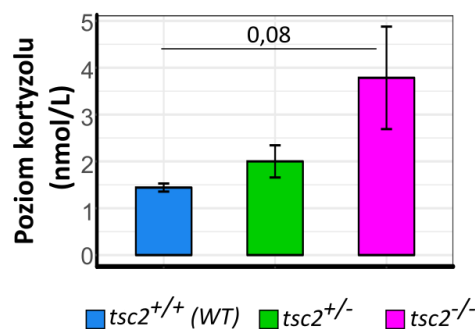
Ryc. 4.9 Wyniki testu badającego reakcję ucieczki oraz habituację larw linii $tsc2^{vu242}$ w odpowiedzi na nagły, powtarzający się bodziec świetlny.

- A)** Wykres liniowy przedstawia dystans (cm) pokonany przez larwy $tsc2^{vu242}$ podczas eksperymentu, uśredniony dla danego genotypu. Każdy punkt na wykresie reprezentuje średnią z pomiarów zebranych w danym punkcie czasowym (co 3 sekundy). Słupki błędów pokazują SEM. Pierwsze 60 sekund na wykresie odpowiada ostatniej minucie eksperymentu prowadzonego w warunkach kontrolnych (ciemność, brak bodźców) i reprezentuje dystans pokonywany przez larwy $tsc2^{vu242}$ podczas spontanicznej aktywności. Strzałka na wykresie wskazuje pojawienie się pierwszego bodźca świetlnego, który był następnie powtarzany co 3 sekundy do końca eksperymentu. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego dla średniego dystansu pokonanego przez larwy $tsc2^{vu242}$ podczas eksperymentu: $df = 2$; $H = 51,002$; $p = 8,414 \times 10^{-12}$; $p = 1,78 \times 10^{-4}$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; $p = 3,19 \times 10^{-12}$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/-}$; wyniki nieistotne statystycznie (ns) dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; dla średniej prędkości larw $tsc2^{vu242}$ podczas eksperymentu: $df = 2$; $H = 69,708$; $p = 7,29 \times 10^{-16}$; $6,12 \times 10^{-6}$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; $p = 1 \times 10^{-15}$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/-}$; ns dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; Liczba larw (genotyp): 27 ($tsc2^{+/+}$), 62 ($tsc2^{+/-}$), 30 ($tsc2^{-/-}$); *** $p < 0,005$.
- B)** Wykres liniowy przedstawia prędkość (cm/s) z jaką poruszały się larwy $tsc2^{vu242}$ podczas eksperymentu, uśrednioną dla danego genotypu. Eksperyment przeprowadzono, tak jak opisano w pkt. A.
- C)** Wykres liniowy przedstawia względne wartości dystansu (cm) pokonanego przez larwy $tsc2^{vu242}$ podczas eksperymentu, uśrednione dla danego genotypu. Wyniki zebrane w kolejnych punktach czasowych podzielono przez średnią wartość pokonanego dystansu podczas całości eksperymentu odpowiednią dla każdego genotypu. Słupki błędów pokazują SEM. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego dla względnego pokonanego dystansu przez larwy $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$ w 63, sekundzie eksperymentu: $df = 2$; $H = 22,168$; $p = 1,54 \times 10^{-5}$; $p = 0,0394$; * $p < 0,05$; dla pozostałych danych: wyniki nieistotne statystycznie.
- D)** Wykres słupkowy przedstawia średni dystans (cm) pokonany przez larwy $tsc2^{vu242}$ podczas ostatniego pomiaru aktywności w warunkach kontrolnych (przed bodźcem, w 60 sekundzie) oraz po pierwszym bodźcu świetlnym (w 63 sekundzie). Słupki błędów pokazują SEM. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu Kruskala-Wallisa z testem typu *post-hoc* Dunn z poprawką Bonferroniego dla średniego dystansu pokonanego przez larwy $tsc2^{vu242}$ w 60 sekundzie eksperymentu: $df = 2$; $H = 13,035$; $p = 0,0014$; $p = 0,0363$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; $p = 0,0011$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/-}$; ns dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; dla średniego dystansu pokonanego przez larwy $tsc2^{vu242}$ po pierwszym bodźcu świetlnym: $df = 2$; $H = 1,3622$; $p = 0,5061$; ns dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; ns dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/-}$; ns dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$, oraz za pomocą testu Wilcoxon dla prób zależnych: dla porównania średniego dystansu pokonanego przez larwy danego genotypu w 60 sekundzie eksperymentu i po

pierwszym bodźcu świetlnym: $V = 71$; $p = 9,22 \times 10^{-4}$ dla $tsc2^{-/-}$; $V = 60,5$; $p = 0,0036$ dla $tsc2^{+/+}$; ns dla $tsc2^{+/-}$; Liczba larw (genotyp): 27 ($tsc2^{+/+}$), 62 ($tsc2^{+/-}$), 30 ($tsc2^{-/-}$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

4.2.5 Analiza ilościowa poziomu kortyzolu u larw linii $tsc2^{vu242}$ w wieku 5 dpf

Glukokortykoidy pełnią ważne funkcje regulacyjne w wielu procesach fizjologicznych i są krytycznymi mediatorami odpowiedzi na stres. Zarówno u dorosłych osobników, jak i u larw danio pręgowanego wykazano, że w reakcji na stres i lęk wydzielane są zwiększone ilości kortyzolu (Alsop i Vijayan 2008; Steenbergen i wsp. 2012). W celu potwierdzenia nasilonego lęku u larw mutantów $tsc2^{-/-}$ na poziomie biochemicznym, zmierzono poziom kortyzolu za pomocą komercyjnego testu immunoenzymatycznego ELISA w próbkach pozyskanych z larw $tsc2^{vu242}$ (opisano w Materiałach i Metodach). Zaobserwowano, że u mutantów $tsc2^{-/-}$ występuje podwyższony poziom kortyzolu w porównaniu do larw typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ oraz mutantów $tsc2^{+/-}$ (Ryc. 4.10). Wynik ten wspiera wyniki testów behawioralnych, w których stwierdzono nasilony lęk u mutantów $tsc2^{-/-}$.

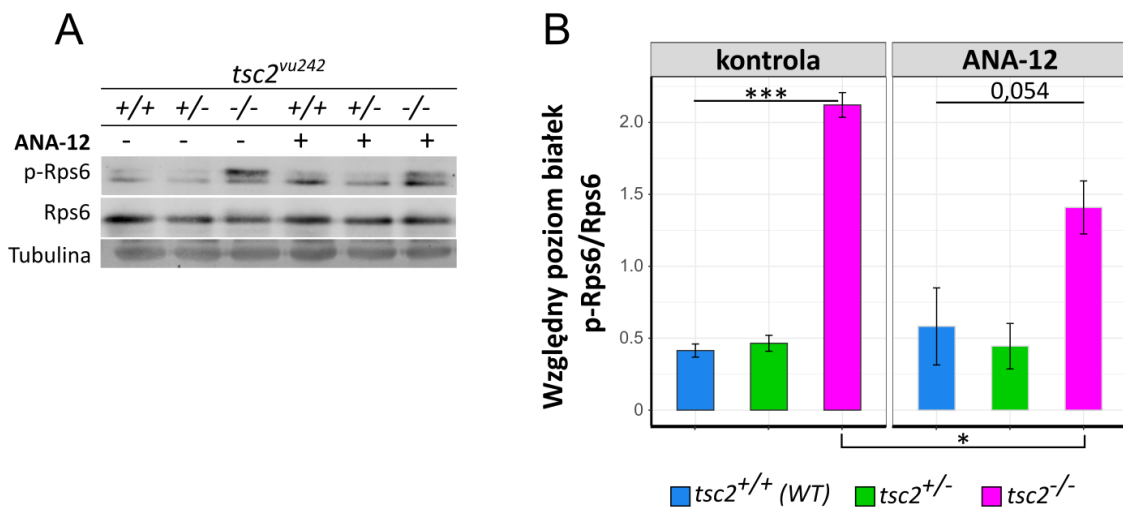


Ryc. 4.10 Wyniki analizy poziomu kortyzolu z użyciem testu immunoenzymatycznego ELISA u larw linii $tsc2^{vu242}$ w wieku 5 dpf.

Wyniki analizy ilościowej poziomu kortyzolu u mutantów $tsc2^{vu242}$. Wykres słupkowy pokazuje stężenie kortyzolu (nmol/L) zmierzone w próbkach pozyskanych z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Słupki błędów pokazują SEM. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu do porównań wielokrotnych *post-hoc* Dunnetta dla poziomu kortyzolu u larw $tsc2^{vu242}$: $df = 2$, $F = 3,395$; $p = 0,103$; $p = 0,081$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; nieistotne statystycznie dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$.

4.2.6 Określenie wpływu ANA-12 na poziom aktywności szlaku mTORC1 u larw linii *tsc2^{vu242}*

W związku z tym, że zastosowanie ANA-12 częściowo poprawiało fenotypy związane z nasilonym lękiem u mutantów *tsc2^{-/-}*, postanowiono sprawdzić, czy związek ten wpływa na aktywność szlaku kinazy mTORC1. Larwy *tsc2^{vu242}* hodowano w warunkach kontrolnych lub traktowano ANA-12 przez 24 godziny przed eksperymentem. Przygotowanie próbek białkowych oraz analiza ilościowa stosunku poziomu białka P-Rps6 do Rps6 zostały przeprowadzone jak w poprzednich doświadczeniach z użyciem techniki Western Blot (opisano w Rozdziale 4.1.2). Analiza wykazała, że mutanty *tsc2^{-/-}* traktowane ANA-12 mają istotnie obniżony poziom aktywności kinazy mTORC1 w porównaniu do larw nietraktowanych tym związkiem, jednak fosforylacja białka Rps6 jest nadal podwyższona w stosunku do larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}* czy mutantów *tsc2^{+/-}*. Sugeruje to, że zastosowany wariant traktowania ANA-12 jedynie częściowo obniża aktywność ścieżki sygnałowej prowadzącej od TrkB do kinazy mTORC1 (Ryc. 4.11).



Ryc. 4.11 Wyniki analizy biochemicznej wpływu ANA-12 na poziom aktywności szlaku mTORC1 u larw *tsc2^{vu242}*.

- A)** Analiza Western Blot poziomu białek P-Rps6 (Ser235/236), Rps6 i α -Tubuliny u larw *tsc2^{vu242}* w warunkach kontrolnych oraz po zastosowaniu ANA-12 (ANA-12 24 h) na 24 godziny przed eksperymentem. Poziom α -Tubuliny stanowi kontrolę i odzwierciedla ilość białka nałożonego na żel.
- B)** Wykresy słupkowe przedstawiają wyniki analizy stosunku intensywności sygnałów dla białka P-Rps6 (Ser235/236) do Rps6 w warunkach kontrolnych oraz po uprzednim traktowaniu ANA-12. Wyniki przedstawiono, jako wartości średnie, centralizowane.

Wyniki pochodzą z 3 niezależnych doświadczeń. Słupki błędów pokazują SEM. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu do porównań wielokrotnych *post-hoc* Dunnetta dla stosunku sygnału P-Rps6/Rps6 u *tsc2^{vu242}* w warunkach kontrolnych: $df = 2$; $F = 225,2$; $p = 2,27 \times 10^{-6}$; $p = 2,8 \times 10^{-6}$ dla *tsc2^{-/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; wyniki nieistotne statystycznie (ns) dla *tsc2^{+/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; dla stosunku sygnału P-Rps6/Rps6 u *tsc2^{-/-}* w warunkach kontrolnych vs. u *tsc2^{-/-}* po podaniu ANA-12: $df = 1$; $F = 12,25$; $p = 0,0249$ dla *tsc2^{-/-}* vs. *tsc2^{-/-}*; * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

4.3 Charakterystyka morfologii wybranych obwodów neuronalnych w mózgu w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym oraz poszukiwanie mechanizmów komórkowych i molekularnych odpowiedzialnych za patogenezę tej choroby

4.3.1 Analiza zmian anatomicznych oraz molekularnych w łączności wybranych obwodów neuronalnych u larw *tsc2^{vu242}*

Prawidłowy wzrost aksonów jest krytycznym procesem podczas wczesnego rozwoju, niezbędnym do utworzenia funkcjonalnych obwodów neuronalnych. U pacjentów ze stwardnieniem guzowatym obserwuje się problemy z łącznością istoty białej, w tym nieprawidłowości w rozwoju aksonów, które prowadzą do dezorganizacji włókien nerwowych (Prohl i wsp. 2019; Krishnan i wsp. 2010). Ponadto, często z obecnością zaburzeń struktury istoty białej wiąże się również diagnoza zaburzeń ze spektrum TANDs takich, jak autyzm czy niepełnosprawność intelektualna (Peters i wsp. 2012; Tsai i wsp. 2021). Stwierdzono również, że efekt występowania zaburzeń takich, jak epilepsja i TANDs, jest addytywny tzn. u pacjentów z większą liczbą zdiagnozowanych, współistniejących zaburzeń neurologicznych, obserwuje się większe nieprawidłowości w łączności istoty białej mózgu (Baumer i wsp. 2018). W związku z tym, że zagadnienie problemów z połączeniami nerwowymi nie było do tej pory zbadane w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym, postanowiono zbadać morfologię wybranych obwodów neuronalnych u larw linii *tsc2^{vu242}*.

4.3.1.1 Analiza szerokości spoidła przedniego w mózgach larw *tsc2^{vu242}* oraz zbadanie wpływu wybranych substancji farmakologicznych na obserwowane fenotypy

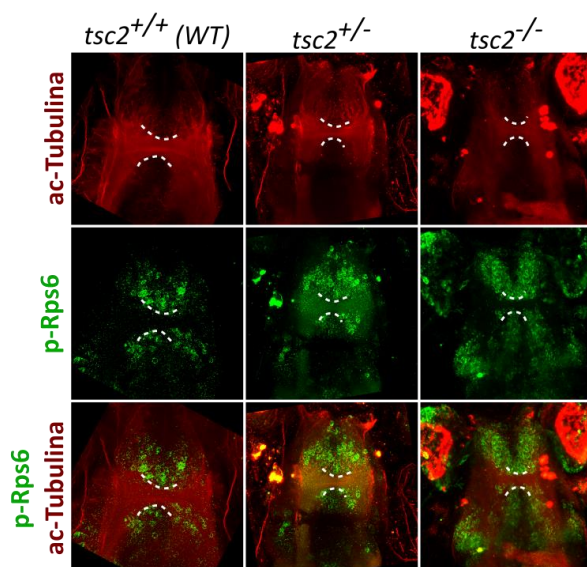
U ludzi ze zdiagnozowanym stwardnieniem guzowatym obserwuje się m.in. nieprawidłowości w budowie ciała modelowego, które stanowi największe spoidło łączące dwie półkule mózgu u człowieka (Baumer i wsp. 2018; Krishnan i wsp. 2010). W związku z tym zmierzono szerokość głównego spoidła w przodomózgowiu u larw *tsc2^{vu242}*.

W tym celu przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne pełnego przekroju larw *tsc2^{vu242}* w wieku 7,5 dpf z zastosowaniem przeciwciała anty-acetylowana Tubulina, dzięki

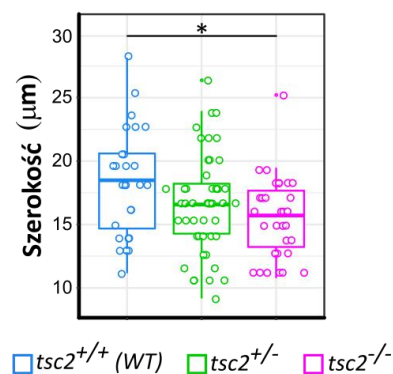
któremu uwidoczniło wiązki aksonów tworzące spoidła mózgowie (Ryc. 4.12A). Do analizy wybrano główne spoidło znajdujące się w przodomózgowiu tj. spoidło przednie. Oprócz tego w barwieniu zastosowano również przeciwciała specyficzne dla ufosforylowanej formy białka Rps6. Zbadano korelację pomiędzy szerokością spoidła mózgowego, a ilością komórek w kresomózgowiu z sygnałem fluorescencji dla P-Rps6, które odzwierciedla aktywność kinazy mTORC1. Miało to na celu sprawdzenie, czy istnieje związek pomiędzy poziomem aktywności szlaku mTORC1, a nasileniem zmian morfologicznych spoidła przedniego oraz genotypem larw linii *tsc2^{vu242}*.

Pomiary spoidła przedniego wykazały, że u mutantów *tsc2^{-/-}* jest ono istotnie cieńsze w porównaniu do larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}* (Ryc. 4.12A, B). Zaobserwowano również, że u mutantów *tsc2^{+/-}* średnia szerokość spoidła przedniego jest mniejsza niż u larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}* (Ryc. 4.12A, B). Ponadto, stwierdzono, że larwy homozygotyczne mają podwyższony poziom P-Rps6 w mózgu w porównaniu do larw typu dzikiego i mutantów *tsc2^{+/-}*. Wyniki analizy korelacji Spearmana wskazały, że u larw *tsc2^{vu242}* istnieje ujemna korelacja pomiędzy liczbą komórek z sygnałem fluorescencji dla P-Rps6 w mózgu, a szerokością spoidła przedniego, która jest zależna od genotypu. Tak więc, larwy z podwyższoną aktywnością kinazy mTORC1 w mózgu miały cieńsze spoidło przednie i były to głównie homozygoty (Ryc. 4.12C).

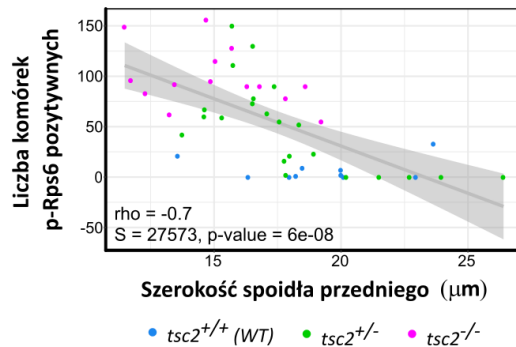
A



B



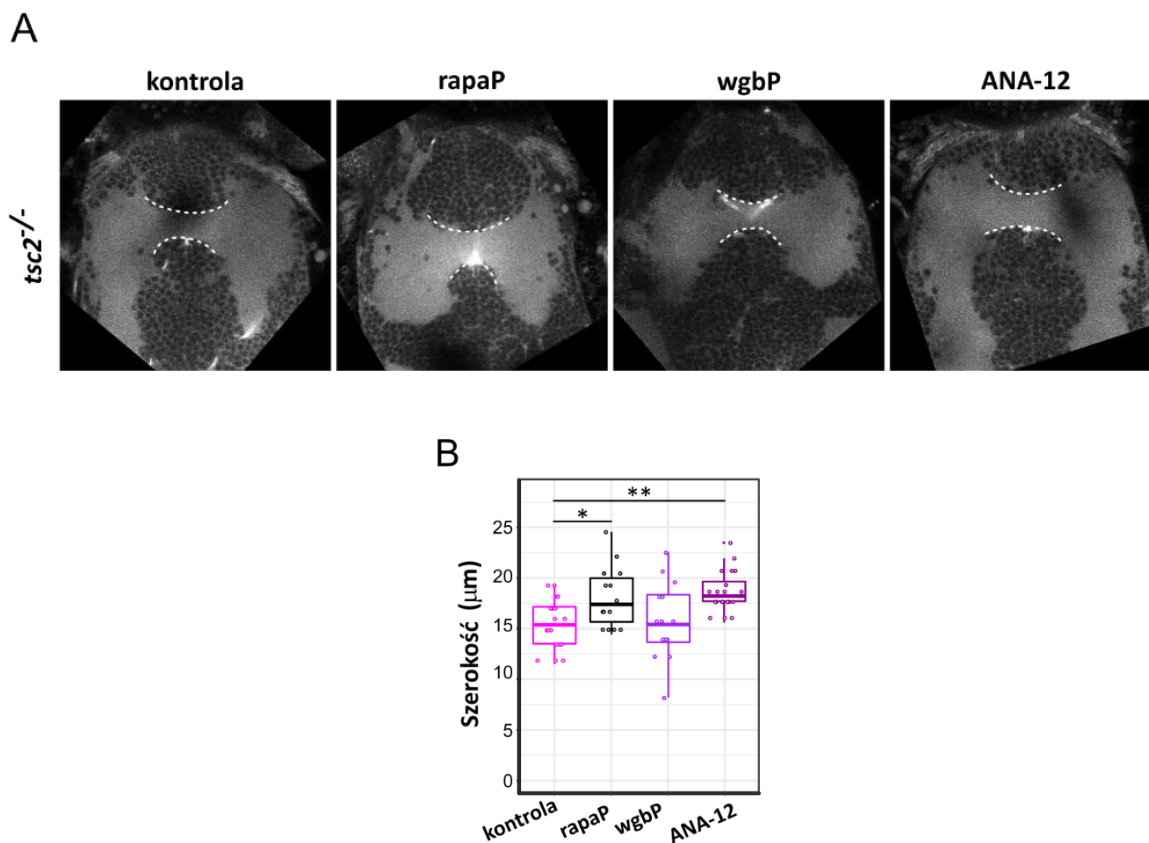
C



Ryc. 4.12 Wyniki analizy szerokości spoidła przedniego w mózgu larw *tsc2^{vu242}*.

- A) Reprezentatywne obrazy mikroskopii konfokalnej wybranych sekcji preparatów pełnego przekroju larw *tsc2^{vu242}* barwionych immunofluorescencyjnie przeciwciałem anty-acetylowana Tubulina (Ac-Tubulina, kanał czerwony) oraz anty-P-Rps6 (kanał zielony). Biała linia przerywana wskazuje spoidło przednie.
- B) Wykres pudełkowy przedstawia szerokość spoidła przedniego zmierzoną w mózgu larw *tsc2^{vu242}*. Każdy punkt odpowiada jednej larwie. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu do porównań wielokrotnych *post-hoc* Dunnetta dla szerokości spoidła przedniego: $df = 2$; $F = 4,053$; $p = 0,0202$; $p = 0,011$ dla *tsc2^{-/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; wyniki nieistotne statystycznie (ns) dla *tsc2^{+/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; Liczba larw (genotyp): 27 (*tsc2^{+/+}*), 47 (*tsc2^{+/-}*), 31 (*tsc2^{-/-}*); * $p < 0,05$.
- C) Wykres przedstawia wyniki analizy korelacji Spearmana pomiędzy szerokością spoidła przedniego (oś x), a intensywnością sygnału P-Rps6 (oś y) u larw *tsc2^{vu242}*. Ujemna wartość współczynnika korelacji rho informuje, że wzrostowi liczby komórek posiadających sygnał fluorescencji dla białka P-Rps6 towarzyszył spadek średnich wartości pomiarów szerokości spoidła przedniego. Każdy punkt w określonym kolorze reprezentuje jedną larwę danego genotypu. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą testu korelacji Spearmana: $\rho = -0,7$; $S = 27573$, $p = 6 \times 10^{-8}$; Liczba larw (genotyp): 10 (*tsc2^{+/+}*), 21 (*tsc2^{+/-}*), 14 (*tsc2^{-/-}*).

W kolejnym kroku zbadano wpływ zastosowania wybranych związków farmakologicznych na morfologię spoidła przedniego mutantów *tsc2^{-/-}*. Analiza szerokości spoidła przedniego po uprzednim traktowaniu związkami farmakologicznymi wykazała, że zastosowanie rapamycyny oraz ANA-12 skorygowało patologiczny fenotyp spoidła przedniego (Ryc. 4.13A, B). U larw *tsc2^{-/-}* w przypadku traktowania wigabatryną nie zaobserwowano korzystnego wpływu na fenotyp spoidła przedniego (Ryc. 4.13A, B).



Ryc. 4.13 Wyniki analizy wpływu wybranych substancji farmakologicznych na szerokość spoidła przedniego u mutantów *tsc2*^{-/-}.

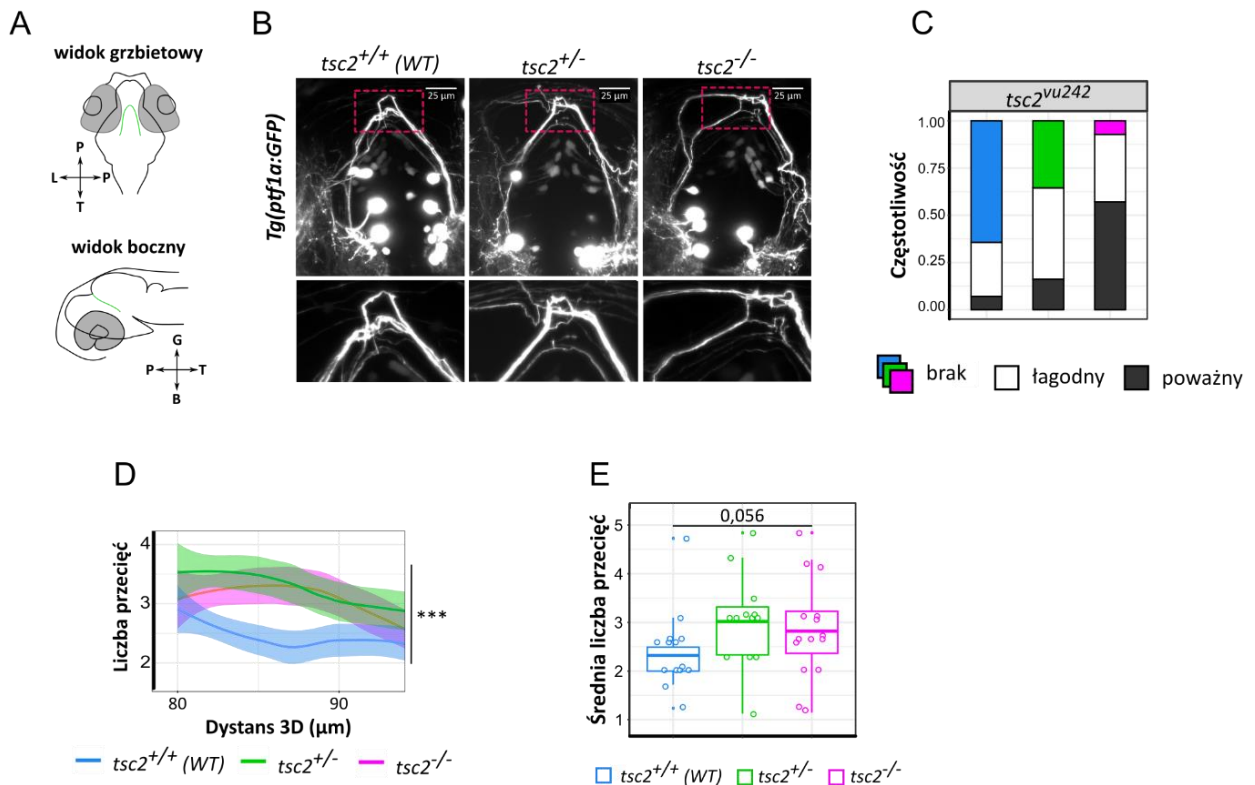
A) Reprezentatywne obrazy mikroskopii konfokalnej wybranych sekcji pełnego przekroju larw *tsc2*^{vu242} w warunkach kontrolnych oraz uprzednio traktowanych rapamycyną (rapaP) lub wigabatryną (wgbP) zaczynając od stadium 48 hpf lub ANA-12 (ANA-12 24 h) przez 24 godziny przy podaniu w stadium 4 dpf. Widok grzbietowy. Biała linia przerywana wskazuje spoidło przednie.

B) Wykres pudełkowy przedstawia szerokość spoidła przedniego zmierzoną u larw *tsc2*^{vu242} w warunkach kontrolnych oraz po uprzednim traktowaniu odpowiednimi związkami farmakologicznymi jak opisano powyżej. Każdy punkt odpowiada jednej larwie. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu do porównań wielokrotnych post-hoc Dunnetta: dla szerokości spoidła przedniego u mutantów *tsc2*^{-/-} hodowanych w warunkach kontrolnych vs. u *tsc2*^{-/-} po podaniu związku farmakologicznego: $df = 3$; $F = 5,83$; $p = 1,42 \times 10^{-3}$; $p = 0,049$ dla rapaP; nieistotnie statystycznie (ns) dla wgbP; $p = 0,002$ dla ANA-12; Liczba larw (N): kontrola (18); rapaP (14), wgb 24 h (14); ANA-12 (20). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.3.1.2 Analiza morfologii wiązek aksonów GFP-pozytywnych u larw *Tg(ptf1a:GFP);tsc2^{vu242}* pod kątem zaburzeń w procesie ukierunkowanego wzrostu

Analiza szerokości spoidła przedniego u larw *tsc2^{vu242}* wykazała problemy z łącznością istoty białej między półkulami w mózgu, co sugeruje niewłaściwy rozwój aksonów. W związku z tym postanowiono sprawdzić, czy nieprawidłowości w morfologii spoidel mózgowych mogą wynikać z zaburzeń w procesie ukierunkowanego wzrostu aksonów. Użycie transgenicznej linii *Tg(ptf1a:GFP);tsc2^{vu242}* pozwoliło zobrazować neurony produkujące białko zielonej fluorescencji (GFP) pod kontrolą promotora *ptf1a* (podjednostka alfa czynnika transkrypcyjnego trzustki 1). Ekspresja czynnika transkrypcyjnego *ptf1a* w neuronach w obszarze *posterior tuberculum* międzymózgowia w wyżej wymienionej linii transgenicznej, umożliwia obrazowanie rozwoju pojedynczych aksonów łączących przeciwległe półkule mózgowe u danio pręgowanego. Larwy obrazowano przyżyciowo w wieku 3 dpf z użyciem mikroskopii LSM.

W każdej półkuli mózgu obecne były około 4-5 ciał komórek wykazujących fluorescencję dla GFP w regionie *posterior tuberculum*, których aksony tworzyły wspólną wiązkę, przechodzącą przez spoidło mózgowie łączące przeciwległe półkule mózgu u larw *Tg(ptf1a:GFP);tsc2^{vu242}* (Ryc. 4.14A). Zaobserwowano, że mutanty *tsc2^{-/-}* oraz *tsc2^{+/-}* mają problemy z tworzeniem ścisłej wiązki aksonów GFP-pozytywnych łączących półkule mózgowe w międzymózgowiu (Ryc. 4.14B). Stwierdzono, że na styku półkul mózgowych larw *tsc2^{-/-}* i *tsc2^{+/-}* występują silne, nieregularne rozgałęzienia, w porównaniu do larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}*, u których nie zaobserwowano zaburzeń morfologii wiązek. Następnie policzono częstotliwość występowania nieprawidłowej morfologii wiązek aksonów z wyróżnieniem stopnia nasilenia zmian. Wyniki tej analizy wykazały przeważające występowanie patologicznego fenotypu u mutantów homozygotycznych *tsc2^{-/-}* (Ryc. 4.14C). Analiza Sholla w trzech wymiarach umożliwiła policzenie liczby rozgałęzień wiązek aksonów w odległości od ciał komórek do styku półkul mózgowych (odległość ok. 80-90 μm od ciał komórek; opisano szczegółowo w Materiałach i Metodach). Wyniki tej analizy potwierdziły, że u larw *tsc2^{+/-}* oraz *tsc2^{-/-}* na styku półkul mózgowych występuje istotnie więcej rozgałęzień wiązek aksonów, w porównaniu do larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}* (Ryc. 4.14D, E). Nieprawidłowości w utrzymywaniu ścisłej wiązki aksonów, które mają za zadanie połączyć ze sobą przeciwległe półkule mózgu sugerują problemy w procesach ukierunkowanego wzrostu.



Ryc. 4.14 Wyniki analizy morfologii wiązek aksonów GFP-pozytywnych u larw linii *tsc2*^{vu242} *Tg(ptf1a:GFP)* pod kątem zaburzeń w procesie ukierunkowanego wzrostu.

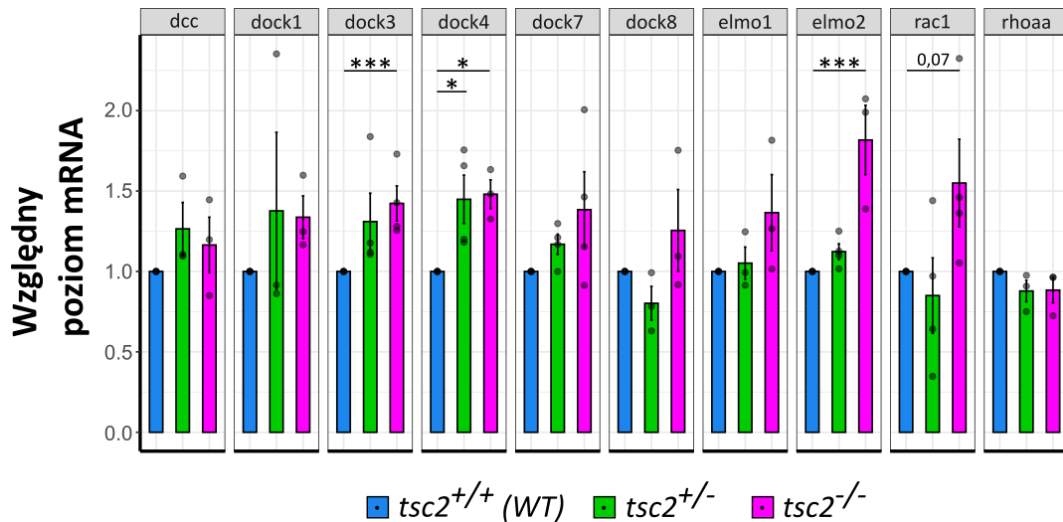
- A)** Schematyczny rysunek lokalizacji neuronów GFP-pozytywnych w mózgu larwy *tsc2*^{vu242} *Tg(ptf1a:GFP)*.
- B)** Reprezentatywne obrazy mikroskopowe projekcji 3D wiązek aksonów GFP-pozytywnych u 3 dpf transgenicznych larw *Tg(ptf1a:GFP);tsc2*^{vu242} (widok grzbietowy) zobrazowanych z użyciem mikroskopii LSFM. Powiększone fragmenty pokazują problemy z tworzeniem ścisłej wiązki na styku półkul mózgowych, u mutantów *tsc2*^{-/-} widoczne są liczne rozgałęzienia.
- C)** Wykres słupkowy przedstawia rozkład częstotliwości występowania nieprawidłowości w fenotypie wiązek aksonów GFP-pozytywnych na styku półkul mózgowych larw *Tg(ptf1a:GFP);tsc2*^{vu242} z uwzględnieniem stopnia nasilenia zmian (brak, łagodne, poważne).
- D)** Wykres liniowy reprezentujący wyniki trójwymiarowej analizy Sholla uwzględniającej liczbę rozgałęzień (przecięć) wiązek aksonów GFP-pozytywnych mierzonych w 3D na styku półkul mózgowych larw *Tg(ptf1a:GFP);tsc2*^{vu242}. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu do porównań wielokrotnych *post-hoc* Dunnetta dla liczby przecięć zmierzonych na styku półkul mózgowych w odległości 80-90 μm od ciała komórki: $df = 2$; $F = 23,84$; $p = 7,4 \times 10^{-11}$; $p = 2,3 \times 10^{-6}$ dla *tsc2*^{-/-} vs. *tsc2*^{+/+}; Liczba larw (genotyp): 15 (*tsc2*^{+/+}), 13 (*tsc2*^{+/-}), 16 (*tsc2*^{-/-}); *** $p < 0,005$.

E) Wykres pudełkowy przedstawia średnią liczbę rozgałęzień wiązek aksonów GFP-pozytywnych na styku półkul mózgowych linii *tsc2^{vu242} Tg(ptf1a:GFP)* z uwzględnieniem poszczególnych genotypów. Pojedynczy punkt odzwierciedla jedną larwę. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu do porównań wielokrotnych *post-hoc* Dunnetta dla liczby przecięć na styku półkul mózgowych w odległości 80-90 μm od ciała komórki: $df = 2$; $F = 5,398$; $p = 0,00657$, $p = 0,054$ dla *tsc2^{-/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; $p = 0,004$ dla *tsc2^{-/-}* vs. *tsc2^{+/-}*. Liczba larw (genotyp): 15 (*tsc2^{+/+}*), 13 (*tsc2^{+/-}*), 16 (*tsc2^{-/-}*); *** $p < 0,005$.

4.3.1.3 Analiza ekspresji wybranych genów szlaku Dock-Elmo-Rac1 u larw *tsc2^{vu242}*

Problemy z formowaniem uporządkowanych wiązek aksonów mogą wynikać z nieprawidłowości zachodzących na poziomie szlaków sygnałowych związanych z procesami ukierunkowanego wzrostu. W związku z tym postanowiono sprawdzić szlak molekularny Dock-Elmo-Rac1 pod kątem zmian w ekspresji wybranych genów, których produkty białkowe biorą udział m.in. w reorganizacji cytoszkieletu aktynowego podczas procesów ukierunkowanego wzrostu aksonów (Namekata i wsp. 2010; Shi 2013; Gadea i Blangy 2014). W tym celu wyizolowano RNA z przednich części ciała larw *tsc2^{vu242}* w wieku 5 dpf i za pomocą techniki PCR emulsyjnego (ddPCR) przeprowadzono ilościową analizę poziomu mRNA dla wybranych genów szlaku Dock-Elmo-Rac1. Obliczono wyjściową ilość produktów amplifikacji u mutantów *tsc2^{-/-}* i *tsc2^{+/-}* względem wyników uzyskanych u larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}*.

Analiza ddPCR wykazała istotnie podwyższony poziom mRNA dla genów *dock3*, *dock4* oraz *elmo2* u mutantów *tsc2^{-/-}* w porównaniu do siostrzanych kontroli typu dzikiego, *tsc2^{+/+}* (Ryc. 4.15). Stwierdzono również wzrost w poziomie mRNA dla genu *rac1*, jednak wynik ten nie był istotny statystycznie (Ryc. 4.15). W przypadku mutantów *tsc2^{+/-}* stwierdzono istotne statystycznie różnice jedynie w poziomie mRNA genu *dock4* względem poziomów obserwowanych u larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}* (Ryc. 4.15) Produkty białkowe genów *dock3*, *dock4*, *elmo2* oraz *rac1* pełnią kluczowe role w procesach naprowadzania i ukierunkowanego wzrostu aksonów (Makihara i wsp. 2018). Tak więc, zmiany w poziomie mRNA tych genów są spójne z obserwacjami zaburzeń w morfologii wiązek aksonów u mutantów homozygotycznych (patrz Rozdział 4.3.1.2) i odzwierciedlają nieprawidłowości dotyczące procesów ukierunkowanego wzrostu na poziomie molekularnym.



Ryc. 4.15 Wyniki analizy ekspresji wybranych genów szlaku Dock-Elmo-Rac1 u larw linii *tsc2*^{vu242}.

Wyniki analizy ddPCR ekspresji genów związanych z ukierunkowanym wzrostem aksonów dla ścieżek Dock-Elmo-Rac1. Wykresy słupkowe przedstawiają relatywny poziom ekspresji wybranych genów u larw mutantów *tsc2*^{-/-} i *tsc2*^{+/-} względem larw typu dzikiego *tsc2*^{+/+}. Słupki błędów pokazują SEM. Każda kropka odzwierciedla pomiar uzyskany z niezależnego powtórzenia biologicznego (N = 3). Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu do porównań wielokrotnych *post-hoc* Dunnetta dla względnego poziomu mRNA genów: **dock3** *df*= 2; *F* = 10,22; *p* = 6.26 × 10⁻³; *p* = 0,00401 dla *tsc2*^{-/-} vs. *tsc2*^{+/+}; wyniki nieistotne statystycznie (ns) dla *tsc2*^{+/-} vs. *tsc2*^{+/+}; **dock4** *df* = 2; *F* = 6,863; *p* = 0,0184; *p* = 0,0245 dla *tsc2*^{-/-} vs. *tsc2*^{+/+}; *p* = 0,0235 dla *tsc2*^{+/-} vs. *tsc2*^{+/+}; **elmo2** *df* = 2; *F* = 16,62; *p* = 1,41 × 10⁻³; *p* = 1.12 × 10⁻³ dla *tsc2*^{-/-} vs. *tsc2*^{+/+}; ns dla *tsc2*^{+/-} vs. *tsc2*^{+/+}; **rac1** *df* = 2; *F* = 3,155; *p* = 0,092; *p* = 0,072 dla *tsc2*^{-/-} vs. *tsc2*^{+/+}; ns dla *tsc2*^{+/-} vs. *tsc2*^{+/+}; * *p* < 0,05; *** *p* < 0,005.

4.3.2 Analiza modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym pod kątem zaburzeń w ścieżkach sygnałowych związanych z neurotransmisją hamującą

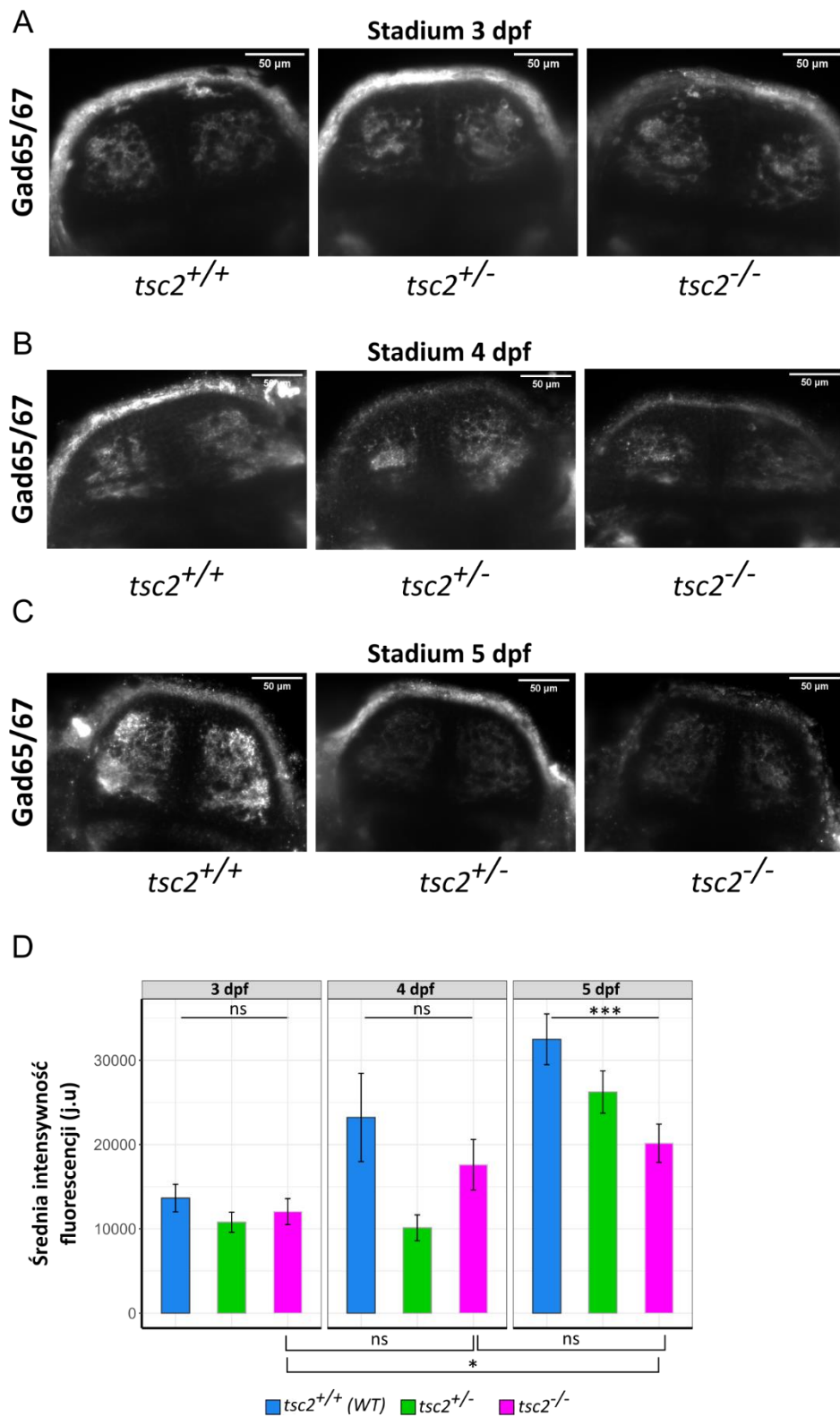
U pacjentów ze stwardnieniem guzowatym, jako jedną z przyczyn patologii neurologicznych takich jak epilepsja, podaje się zaburzenia w neuroprzebieżności, czyli w przekazywaniu informacji pomiędzy komórkami nerwowymi. Kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu mózgu stanowi równowaga pomiędzy neurotransmisją hamującą, a pobudzającą (Coghlan i wsp. 2012). W mózгах dorosłych ssaków główną formą neurotransmisji hamującej jest transmisja GABAergiczna, gdzie neurotransmiterem jest kwas γ -aminomasłowy. Badania immunohistochemiczne przeprowadzone na guzach pochodzących od pacjentów ze stwardnieniem guzowatym wykazały szereg zmian, które mogą wpływać na fizjologię neuronów, w tym zaburzenia neurotransmisji hamującej wraz ze znaczącym

zmniejszeniem ilości receptorów dla GABA oraz niedojrzałym fenotypem transporterów chlorkowych KCC2/NKCC1, które pośredniczą w regulacji fizjologicznych efektów GABA (White i wsp. 2001; Talos i wsp. 2012). Co więcej, dysfunkcja układu GABAergicznego jest związana również z zaburzeniami neuropsychiatrycznymi, m.in. z lękiem, depresją, czy ogólnym upośledzeniem funkcji poznawczych (Sohal i Rubenstein 2019). Zagadnienie zaburzeń neurotransmisji hamującej nie było do tej pory zbadane w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym, a jest to ważny aspekt choroby, często wiązany z rozwojem TANDs.

4.3.2.1 Analiza morfologii mózgow larw *tsc2^{vu242}* pod kątem neurotransmisji hamującej

W celu określenia zmian w szlaku GABAergicznym w rozwoju larw *tsc2^{vu242}* wykonano barwienie immunofluorescencyjne pełnego przekroju, aby sprawdzić poziom dwóch izoform białka dekarboksylazy glutaminianowej – Gad65/67 (ang. *glutamate decarboxylase*; GAD), które są kluczowymi enzymami biorącymi udział w syntezie neuroprzekaźnika GABA w mózgu ryb i ssaków. Barwienie wykonano w trzech stadiach rozwoju tj. w wieku 3, 4 oraz 5 dpf (Ryc. 4.16A, B, C).

Wyniki analizy mikroskopowej wykazały, że poziom białek Gad65/67 u larw danio pręgowanego rośnie wraz ze stadium rozwojowym, jednak u mutantów *tsc2^{-/-}* jest on mimo wszystko obniżony w porównaniu do larw *tsc2^{+/+}*. Istotne różnice w poziomie białek Gad65/67 pomiędzy larwami homozygotycznymi *tsc2^{-/-}* i siostrzanymi kontrolami typu dzikiego *tsc2^{+/+}* stwierdzono w stadium 5 dpf (Ryc. 4.16C). W stadium 3 oraz 4 dpf nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy mutantami *tsc2^{-/-}* a larwami *tsc2^{+/+}*, co sugeruje, że nieprawidłowości nasilają się w trakcie rozwoju (Ryc. 4.16A, B). Wyniki te korespondują z zaburzeniami neurotransmisji hamującej obserwowanej u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym.



Ryc. 4.16 Wyniki analizy mikroskopowej poziomu dekarboksylazy glutaminianowej (GAD65/67) w kresomózgowiu larw *tsc2^{vu242}* na różnych stadiach rozwoju.

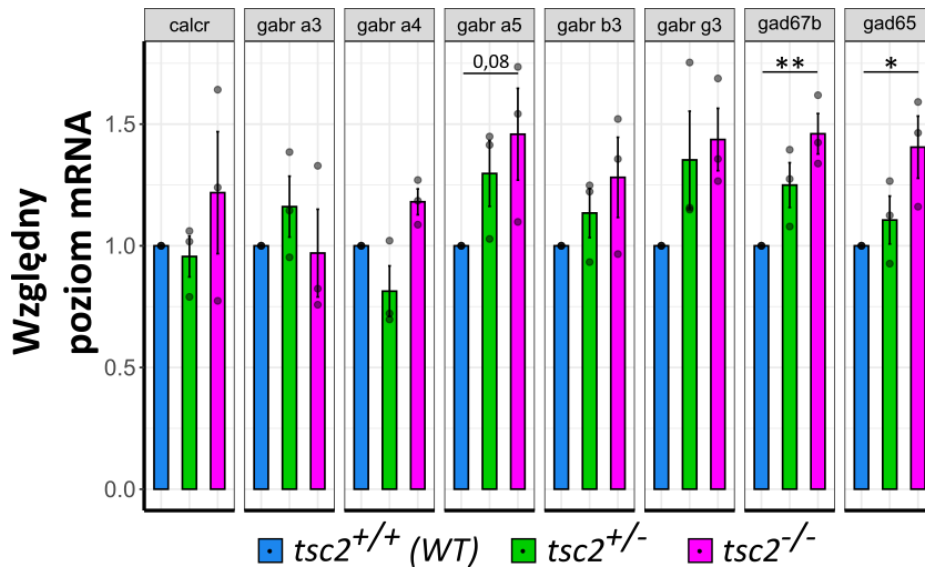
A) Reprezentatywne obrazy mikroskopowe barwienia immunofluorescencyjnego pełnego przekroju na obecność Gad65/67 w mózgach *tsc2^{vu242}* w stadium 3 dpf (widok grzbietowy).

- B)** Reprezentatywne obrazy mikroskopowe barwienia immunofluorescencyjnego pełnego przekroju na obecność Gad65/67 w mózgach *tsc2^{vu242}* w stadium 4 dpf (widok grzbietowy).
- C)** Reprezentatywne obrazy mikroskopowe barwienia immunofluorescencyjnego pełnego przekroju na obecność Gad65/67 w mózgach *tsc2^{vu242}* w stadium 5 dpf (widok grzbietowy).
- D)** Wykres słupkowy przedstawia poziom białek Gad65/67 na podstawie pomiaru intensywności fluorescencji z 20 kolejnych sekcji (z-stacków) preparatów pełnego przekroju larw *tsc2^{vu242}* w stadium 3 dpf, 4 dpf i 5 dpf. Słupki błędów pokazują SEM. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu do porównań wielokrotnych post-hoc Dunnetta dla średniego poziomu białek Gad65/67: w stadium 3 dpf: $df = 2$; $F = 0,916$; $p = 0,407$; ns dla *tsc2^{-/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; ns dla *tsc2^{+/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; Liczba larw (genotyp): 17 (*tsc2^{+/+}*), 16 (*tsc2^{+/-}*), 18 (*tsc2^{-/-}*); w stadium 4 dpf: $df = 2$; $F = 2,637$; $p = 0,0854$; ns dla *tsc2^{-/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; ns dla *tsc2^{+/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; Liczba larw (genotyp): 14 (*tsc2^{+/+}*), 11 (*tsc2^{+/-}*), 13 (*tsc2^{-/-}*); w stadium 5 dpf: $df = 2$; $F = 5,548$; $p = 7,58 \times 10^{-3}$; $p = 3,66 \times 10^{-3}$ dla *tsc2^{-/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; ns dla *tsc2^{+/-}* vs. *tsc2^{+/+}*; Liczba larw (genotyp): 14 (*tsc2^{+/+}*), 14 (*tsc2^{+/-}*), 14 (*tsc2^{-/-}*); w mózgu larw *tsc2^{-/-}* w różnych stadiach rozwoju: $df = 2$; $F = 3,853$; $p = 0,0299$; ns dla 3 dpf vs. 4 dpf; ns dla 4 dpf vs. 5 dpf; $p = 0,023$ dla 3 dpf vs. 5 dpf; * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$; ns – wyniki nieistotne statystycznie.

4.3.2.2 Analiza ekspresji wybranych genów związanych z neurotransmisją hamującą u larw *tsc2^{vu242}*

W kolejnym kroku postanowiono zbadać, czy wyniki analizy mikroskopowej przeprowadzonej u larw *tsc2^{vu242}* pod kątem Gad65/67 mają odzwierciedlenie w poziomie mRNA wybranych genów, których produkty białkowe są komponentami GABAergicznego szlaku sygnałowego. Ze względu na to, że istotne statystycznie różnice zaobserwowano u larw w wieku 5 dpf, analizę ekspresji genów wykonano również w tym stadium rozwojowym. RNA wyizolowano z przednich części ciała larw, a następnie przeprowadzono analizę ilościową qPCR. Ilość produktów amplifikacji u mutantów *tsc2^{-/-}* i *tsc2^{+/-}* obliczono względem wyników uzyskanych u larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}*. Jako gen referencyjny, charakteryzujący się stałą ekspresją, niezależną od czynników biologicznych, wybrano *gapdh*.

U mutantów *tsc2^{-/-}* stwierdzono podwyższony poziom mRNA dla receptorów GABA typu A, jednak wyniki te nie były istotne statystycznie (Ryc. 4.17). Ponadto, uzyskano istotne statystycznie różnice w poziomie mRNA dla genów *gad65* oraz *gad67*, który był podwyższony u larw *tsc2^{-/-}* w porównaniu do larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}* (Ryc. 4.17). Natomiast nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy mutantami *tsc2^{+/-}*, a larwami typu dzikiego *tsc2^{+/+}*.



Ryc. 4.17 Wyniki badań ekspresji wybranych genów związanych z neurotransmisją hamującą u larw $tsc2^{vu242}$.

Wyniki analizy ekspresji genów qPCR związanych ze szlakiem kwasu γ -aminomasłowego (GABA). Wykresy słupkowe przedstawiają relatywny poziom ekspresji wybranych genów u mutantów $tsc2^{+/-}$ i $tsc2^{-/-}$ względem larw typu dzikiego $tsc2^{+/+}$. Słupki błędów pokazują SEM. Każda kropka odzwierciedla pomiar uzyskany dla niezależnego powtórzenia biologicznego. Istotność statystyczną wyników sprawdzono za pomocą 1-czynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu do porównań wielokrotnych *post-hoc* Dunnetta dla względnego poziomu mRNA genów: **gabr a5** $df = 2$; $F = 3,018$; $p = 0,124$; $p = 0,08$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; wyniki nieistotne statystycznie (ns) dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; **gad65** $df = 2$; $F = 5,103$; $p = 0,0507$; $p = 0,038$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; ns dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; **gad67b** $df = 2$; $F = 10,37$; $p = 0,0113$; $p = 6,97 \times 10^{-3}$ dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; $p = 0,083$ dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5. DYSKUSJA

5.1 Danio pręgowany jako model stwardnienia guzowatego (*tsc2^{vu242/vu242}*)

Eksperymentalne modele zwierzęce są niezwykle cennym narzędziem umożliwiającym badanie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw ludzkich chorób, a także odkrycie nowych celów terapeutycznych, które będą mogły zostać wykorzystane w klinice. Niemniej jednak, ze względu na złożoność chorób ludzkich oraz różnice międzygatunkowe, nawet najlepsze modele zwierzęce pozwalają odzwierciedlić dane schorzenie tylko w ograniczonym stopniu lub w konkretnym jego aspekcie. W takich przypadkach, konieczne jest korzystanie z wielu modeli dobieranych pod kątem badanego symptomu chorobowego. Stwardnienie guzowate to choroba charakteryzująca się szerokim spektrum objawów, w tym objawów neuropsychiatrycznych, które pojawiają się w różnym wieku oraz mogą różnić się u poszczególnych pacjentów. Z tego względu dobór odpowiedniego modelu zwierzęcego dla tej choroby jest trudny i wymaga wykorzystywania różnych modeli, które pozwolą odwzorować poszczególne fenotypy obserwowane u pacjentów i będą mieć zastosowanie w badaniach przedklinicznych. Jedne z pierwszych kryteriów oceny modeli zwierzęcych pod kątem ludzkich schorzeń zostały zaproponowane przez McKinneya i Bunneya w 1969 roku (1969) i dotyczyły modelowania zaburzeń afektywnych. Jednakże obecnie powszechnie stosowane i akceptowane są 3 kryteria zaproponowane przez Willnera w 1984 (1984) oparte na: 1) odzwierciedleniu mechanizmu powstawania choroby (ang. *construct validity*), 2) podobieństwie objawów (ang. *face validity*) oraz 3) przewidywalności strategii terapeutycznych (ang. *predictive validity*).

Celem podjętych w mojej pracy doktorskiej badań było scharakteryzowanie wybranych zmian molekularnych, neuroanatomicznych oraz behawioralnych w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym *tsc2^{vu242/vu242}* (nazywany w tej pracy *tsc2^{-/-}*). Uzyskane wyniki pozwoliły wskazać, że model *tsc2^{-/-}* wykazuje fenotypy behawioralne związane z padaczką oraz niektórymi zaburzeniami ze spektrum TANDs. Ponadto, stwierdzono nieprawidłowości w strukturze istoty białej mutantów, a także potencjalne zaburzenia w szlaku związanym z neurotransmisją hamującą. Zbadano również wpływ wybranych związków farmakologicznych na zaobserwowane fenotypy. W świetle uzyskanych przeze mnie wyników, w poniższej Dyskusji, skupiłam się na ocenie modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym *tsc2^{-/-}* w kontekście wyżej wymienionych kryteriów oceny modeli zwierzęcych.

5.1.1 Odzwierciedlenie mechanizmów powstawania choroby w modelu stwardnienia guzowego *tsc2^{-/-}* w danio pręgowanym

Stwardnienie guzowate to choroba genetyczna spowodowana mutacją w genie *TSC1* lub *TSC2*, co powoduje nadmierną aktywację kinazy mTORC1. Obecność patogennych wariantów tych genów, przez które produkty białkowe nie są syntetyzowane lub powstają w formie niefunkcjonalnej stanowią podstawowe genetyczne kryterium diagnostyczne stwardnienia guzowego u ludzi (Northrup i wsp. 2021). Mutacje w genie *TSC2* obejmują aż 70% przypadków i wiążą się z cięższym przebiegiem choroby, objawiającym się wcześniejszą inicjacją napadów padaczkowych, niższymi zdolnościami intelektualnymi oraz większą liczbą zmian typu SEN i AML, porównując do manifestacji choroby przy mutacji w genie *TSC1* (Marom 2020). Użyty w niniejszej rozprawie doktorskiej model *tsc2^{-/-}* niesie punktową mutację typu nonsense w genie *tsc2*, w wyniku czego powstaje skrócone białko Tsc2, które ulega degradacji (opisano szczegółowo we Wstępie) (Kim i wsp. 2011).

Wcześniejsze badania immunohistochemiczne w modelu *tsc2^{-/-}* wykazały obecność białka P-Rps6 w komórkach w mózgu, oku, rdzeniu kręgowym, trzustce, jelicie oraz nerkach u larw w stadium 7 dpf, co wskazywało na nadaktywność ścieżki mTORC1 w tych tkankach (Kim i wsp. 2011; Scheldeman i wsp. 2017). Również analiza Western Blot z lizatów pozyskanych z larw w 7 dpf potwierdziła zwiększony poziom białka P-Rps6 u mutantów homozygotycznych (Kim i wsp. 2011; Scheldeman i wsp. 2017). W niniejszej pracy przy pomocy analizy Western Blot potwierdzono podwyższony poziom aktywności kinazy mTORC1 w stadium 5 dpf, widoczny jako zwiększony poziom fosforylacji białka P-Rps6 u mutantów *tsc2^{-/-}* oraz *tsc2^{+/-}* porównując do siostrzanej kontroli typu dzikiego. Ponadto, w pracy Kedra i wsp. (2020) za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego wykazano nadmierną aktywację mTORC1 bezpośrednio w regionie *pallium* mózgu mutantu *tsc2^{-/-}*, co jest zgodne z wcześniejszymi badaniami w danio pręgowanym oraz tymi przeprowadzonymi na modelach komórkowych i tkankach pozyskanych pośmiertnie od pacjentów ze stwardnieniem guzowatym (Tsai i wsp. 2014). Tak więc, użyty w mojej pracy model *tsc2^{-/-}* dobrze odzwierciedla molekularne podstawy stwardnienia guzowego. Warto jednak, analizując mechanizmy powstawania tej choroby i oceniając badane modele zwierzęce pod tym kątem, pamiętać o dwóch ważnych i trudnych do odzwierciedlenia aspektach tej choroby: złożonej genetyce oraz potencjalnym wpływie środowiska na część symptomów.

Należy wziąć pod uwagę, że w przeważającej części przypadków pacjenci ze stwardnieniem guzowatym są heterozygotami z mutacjami germinalnymi w genach *TSC1* lub

TSC2, a do rozwoju większości guzów takich jak AML, SEN, czy SEGA konieczna jest utrata drugiego, prawidłowego allelu genu (Marom 2020). W przypadku guzków korowych utrata heterozygotyczności jest identyfikowana rzadziej (ok. 35% badanych przypadków według Martin i wsp. (2017)), co sugeruje, że zjawisko to dotyczy jedynie niewielkiej części guza, co utrudnia wykrycie mutacji, bądź też monoalleliczna mutacja jest wystarczająca dla rozwoju patologicznych zmian w korze mózgowej (Salussolia i wsp. 2019). Oprócz tego pacjenci wykazują także mozaicyzm somatyczny, gdzie tylko część komórek organizmu posiada wariant patogenny genów *TSC1* lub *TSC2*. Przebieg choroby u takich osób jest zwykle łżejszy, niemniej jednak mogą wystąpić również poważniejsze manifestacje (Treichel i wsp. 2019; Tyburczy i wsp. 2015). Tak więc, dokładne odzwierciedlenie profilu genetycznego stwardnienia guzowatego w modelach zwierzęcych wraz z fenotypami odpowiadającymi tym u człowieka jest trudne. W przeciwieństwie do ludzi, w danio pręgowanym heterozygoty wykazują bardzo zróżnicowane zmiany lub ich brak, a silna manifestacja choroby występuje tylko u mutantów homozygotycznych (Kedra i wsp. 2020; Scheldeman i wsp. 2017; Serra i wsp. 2019; Kim i wsp. 2011). Niemniej jednak również w modelach mysich oraz szczurzych mutanty heterozygotyczne nie odwzorowują wielu aspektów choroby, natomiast mutanty homozygotyczne są letalne (Switon i wsp. 2017). Wymusza to stosowanie skomplikowanych technik genetycznych w celu uzyskania poszczególnych patologicznych fenotypów w mutantach tkankowo i komórkowo specyficznych (patrz Wstęp). W związku z tym, wykorzystanie modeli ssaczy w badaniach na większą skalę jest trudne w realizacji, zarówno pod kątem czasu potrzebnego do uzyskania wyników, jak i niezbędnego nakładu finansowego. Natomiast danio pręgowany ze względu na dodatkowe atuty, takie jak wysoka płodność oraz szybki rozwój, jest doskonałym modelem dla średnioskalowych i wysokoprzepustowych badań przesiewowych pod kątem nowych terapii. Ponadto, całkowicie zewnętrzny rozwój umożliwia obserwacje przyżyciowe już od stadium jednej komórki, co jest niezwykle pomocne w badaniu mechanizmów chorób takich jak stwardnienie guzowate, w których pierwsze patologiczne zmiany pojawiają się już w życiu płodowym.

Średnio 90% pacjentów ze stwardnieniem guzowatym wykazuje, oprócz problemów neurologicznych, również szerokie spektrum zaburzeń neuropsychiatrycznych. Istnieją przesłanki oparte na modelach zwierzęcych wskazujące, że mutacje w genach *TSC1* lub *TSC2* są wystarczające do wywołania objawów z grupy TANDs. Przykładowo mysie mutanty *Tsc1*^{+/-} i *Tsc2*^{+/-} przejawiały upośledzenie w zależnych od hipokampa procesach uczenia się i zapamiętywania oraz deficyty w uwarunkowanej reakcji strachu, pomimo że nie wykryto

u nich wyraźnych nieprawidłowości neuropatologicznych (Goorden i wsp. 2007; Ehninger i wsp. 2008). Z kolei szczury *Tsc2^{+/-}* (Ekeru) wykazywały deficyty w interakcjach społecznych i eksploracyjnych, które ulegały pogorszeniu po napadach padaczki (Waltereit i wsp. 2011). Drugą kwestią jest to, jak wyraźnie wybrany wariant genetyczny danej choroby będzie korelował z wystąpieniem określonych zaburzeń. W stwardnieniu guzowatym nawet u osób z tymi samymi, wysoce penetrującymi mutacjami obserwuje się szerokie spektrum objawów neuropsychiatrycznych. Z tego względu część badaczy wskazuje wpływ czynników środowiskowych oraz indywidualnych polimorfizmów genetycznych, czy epigenetycznych na obraz kliniczny tej choroby. Ich obecność może zwiększać podatność na rozwinięcie danego zaburzenia (efekt kumulacji) lub działać protekcyjnie (de Vries i wsp. 2018). W związku z tym, że mechanizmy powstawania zaburzeń neuropsychiatrycznych w stwardnieniu guzowatym nie są dobrze poznane, ogranicza to możliwość oceny modeli zwierzęcych pod kątem omawianego kryterium. Nie oznacza to jednak, że stworzenie użytecznego modelu pod kątem TANDs nie jest możliwe, a raczej to, że nie będzie on odzwierciedlał pełnego zakresu objawów zaburzeń obserwowanych u ludzi.

5.1.2 Podobieństwo objawów choroby w modelu stwardnienia guzowatego *tsc2^{-/-}* w danio pręgowanym

Kryterium podobieństwa objawów dotyczy tego jak dobrze model zwierzęcy danej choroby odzwierciedla fenotyp obserwowany u człowieka. Kryterium to odnosi się do zmian biochemicznych, neuropatologicznych, anatomicznych oraz behawioralnych. W przypadku niniejszej pracy i badanego modelu skupiłam się na ocenie podobieństwa fenotypów stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym *tsc2^{-/-}* do sytuacji klinicznej i innych powszechnie używanych modeli eksperymentalnych.

5.1.2.1 Epilepsja w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym

W stwardnieniu guzowatym u niemal 90% pacjentów rozwija się epilepsja, przy czym często następuje to już w pierwszym roku życia. Ponadto, obserwuje się wiele rodzajów napadów padaczkowych, w tym charakteryzujące się występowaniem różnego typu drgawek (np. napady toniczne i miokloniczne) czy też atoniczne, wiążące się z nagłą utratą napięcia mięśniowego oraz napady nieświadomości. Jednymi z najczęstszych typów diagnozowanych już u niemowląt są napady zgięciowe (syndrom Westa), przy których stosuje się leczenie wigabatryną (Lagae i wsp. 2010; Nabbout i wsp. 2021).

U larw danio pręgowanego, w celu badania fenotypów powiązanych z padaczką można stosować analizę aktywności lokomotorycznej oraz funkcjonalne obrazowanie mózgu pozwalające na pomiar zmian komórkowego poziomu wapnia z zastosowaniem mikroskopii *in vivo*, a także badania elektrofizjologiczne (Kedra i wsp. 2020; Scheldeman i wsp. 2017; Prentzell i wsp. 2021; Afrikanova i wsp. 2013; Gawel i wsp. 2020). Napady padaczkowe u danio pręgowanego mogą objawiać się zarówno hipolokomocją, czyli niską aktywnością lokomotoryczną wynikającą z napadów akinetycznych, a także nadmierną prędkością ruchu i hiperaktywnością w przypadku napadów drgawek motorycznych, przypominających toniczne lub miokloniczne (Stewart i wsp. 2012). W niniejszej pracy doktorskiej wykazano, że mutanty $tsc2^{-/-}$ mają znacząco obniżoną aktywność lokomotoryczną, przy czym w pracy Kedra i wsp. (2020) sprawdzono, że nie jest to wynikiem bezpośrednich problemów związanych z układem motorycznym ani wzrokowym. Jednocześnie zaobserwowano, że w momencie ruchu, larwy mutantów homozygotycznych $tsc2^{-/-}$ poruszają się z wyższą prędkością w zakresie > 2 cm/s niż larwy typu dzikiego $tsc2^{+/+}$ lub heterozygoty $tsc2^{+/-}$, co wskazuje na hiperaktywność. W eksperymentach, w których podawano lek antypadaczkowy stosowany w stwardnieniu guzowatym klinicznie – wigabatrynę, zaobserwowano poprawę lokomotoryki mutantów $tsc2^{-/-}$, co potwierdziło, że zmniejszona aktywność wynika z napadu padaczkowego u larw. Natomiast w przypadku obserwowanej u mutantów $tsc2^{-/-}$ zwiększonej prędkości ruchu w zakresie hiperaktywności zastosowanie wigabatryny nie poprawiło istotnie tego parametru, co sugerowało, że napady drgawkowe nie są przyczyną obserwowanego zachowania. Oprócz wyników opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej, istnieje szereg dodatkowych dowodów na to, że u mutantów $tsc2^{-/-}$ dochodzi do epilepsji, jak i, że można w nich badać poprzedzającą jej wystąpienie epileptogenezę. W pracy Kedra i wsp. (2020) zastosowano etosuksymid, który jest lekiem pierwszego rzutu w napadach nieświadomości u ludzi, stwierdzając poprawę fenotypu związanego z hipolokomocją oraz przeżywalnością larw homozygotycznych $tsc2^{-/-}$. Wykonano także przyżyciową analizę aktywności neuronalnej opartej na pomiarach zmian w poziomie Ca^{2+} u larw linii transgenicznej $Tg(HuC:GCaMP5G);tsc2^{vu242}$ i wykazano nadmierną pobudliwość neuronów w regionie *pallium* mózgu mutantów $tsc2^{-/-}$ (Kedra i wsp. 2020). Wybrana część mózgu jest funkcjonalnym odpowiednikiem kory mózgowej u ssaków, która stanowi główny obszar patologii w stwardnieniu guzowatym u człowieka (patrz Wstęp, Rozdział 1.6.2). Z kolei w pracy Scheldeman i wsp. 2017, która powstała podczas realizacji mojego projektu doktorskiego zbadano aktywność mózgu larw $tsc2^{vu242}$ w stadium 7 dpf, rejestrując miejscowe zmiany pola elektrycznego (ang. *local-field potential*; LFP) w pokrywie wzrokowej. Stwierdzono istotnie większą liczbę nawracających wyładowań przypominających

napady padaczkowe u homozygotycznych mutantów w porównaniu do larw typu dzikiego i mutantów *tsc2^{+/-}* (Scheldeman i wsp. 2017). Co więcej, w pracy Kedra i wsp. na podstawie pomiarów charakterystycznych, spontanicznych ruchów embrionów w chorionach, które były wcześniej powiązane ze stanami padaczkowymi, udowodniono, że mutanty *tsc2^{-/-}* wykazują epileptogenezę już w stadium 24 hpf.

Podsumowując, zgromadzone dane udowadniają, że w modelu stwardnienia guzowego w danio pręgowanym można badać fenotyp odzwierciedlający występowanie napadów akinetycznych oraz charakterystycznej dla epilepsji aktywności mózgu, jednak należy pamiętać, że pacjenci wykazują różne rodzaje napadów drgawkowych, których tutaj nie badano.

5.1.2.2 TANDs w modelu stwardnienia guzowego w danio pręgowanym

Jak wcześniej wspomniano w stwardnieniu guzowatym ważnym aspektem choroby są współistniejące objawy neuropsychiatryczne – TANDs. Jednymi z często występujących patologii, które towarzyszą pacjentom ze stwardnieniem guzowatym są zaburzenia lękowe oraz różny stopień niepełnosprawności intelektualnej związany m.in. z zaburzeniami funkcji poznawczych.

Badacze zwracają uwagę również na to, że rozwój epilepsji u pacjentów wiąże się z wyższym stopniem niepełnosprawności intelektualnej, natomiast inne zaburzenia ze spektrum TANDs występują zarówno w przypadku zdiagnozowania obu tych przypadłości, jak i niezależnie od nich – choć niewątpliwie są to czynniki zwiększające ryzyko rozwinięcia zaburzeń neuropsychiatrycznych (Tye i wsp. 2020; de Vries i wsp. 2020). Uważa się, że objawy obserwowane u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym mogą wynikać bezpośrednio ze zmian molekularnych powodowanych utratą funkcjonalnego kompleksu TSC1-TSC2 lub stanowić psychologiczną odpowiedź na trudne okoliczności związane z koniecznością życia z tym schorzeniem (Ehninger, de Vries, i Silva 2009; de Vries i Howe 2007). Badania wskazują, że chociaż 90% pacjentów ze stwardnieniem guzowatym cierpi na przynajmniej jeden rodzaj TANDs, tylko 20% z nich otrzymuje odpowiednią diagnozę i leczenie (De Vries i wsp. 2015; Waltereit i wsp. 2019; Leclezio i wsp. 2015; Leclezio, Gardner-Lubbe, i de Vries 2018). W tym rozdziale skupiłam się na ocenie badanego przeze mnie modelu stwardnienia guzowego w danio pręgowanym pod kątem zachowań związanych z lękiem oraz zachowań wskazujących na zaburzenia poznawcze.

5.1.2.2.1 Zaburzenia związane z lękiem

Molekularne mechanizmy strachu i lęku są wysoce konserwowane u kręgowców i są obecne również we wczesnym okresie rozwoju danio pręgowanego. Larwy w odpowiedzi na stres wykazują podwyższony poziom kortyzolu i są wrażliwe na te same leki przeciwlękowe, które są stosowane w leczeniu lęku u ludzi (Colwill i Creton 2011; Jesuthasan 2012). Stany emocjonalne, takie jak strach i lęk, mogą być wywoływane, poprzez narażenie larw na bodźce, przed którymi normalnie uciekają lub których unikają. Nadmierny lęk oraz stres w zależności od stresora mogą objawiać się zarówno wzrostem aktywności lokomotorycznej, jak i zneruchomieniem. Oprócz tego na wzmożony lęk u larw danio pręgowanego wskazuje nasiloną tigmotaksję, czy silniejsza reakcja ucieczki w odpowiedzi na awersyjny bodziec. W niniejszej pracy po raz pierwszy wykonano kompleksową analizę zachowania pod kątem występowania nasilonego lęku w modelu stwardnienia guzowego w danio pręgowanym.

Na podstawie uzyskanych wyników wykluczono, aby nadmierna prędkość ruchu mutantów *tsc2^{-/-}* w teście badającym podstawową aktywność lokomotoryczną, była związana z napadami drgawkowymi, gdyż działająca przeciwpadaczkowo wigabatryna nie poprawiła tego parametru. W związku z tym, zbadano model pod kątem zaburzeń związanych z lękiem. Na podstawie wyników testów behawioralnych mających na celu zmierzyć poziom lęku stwierdzono, że homozygotyczne larwy *tsc2^{-/-}* wykazują zwiększony lęk w stosunku do larw typu dzikiego *tsc2^{+/+}* i mutantów *tsc2^{+/-}*. Wskazywały na to: 1) zwiększona tigmotaksja w teście otwartego pola, 2) silniejsze zneruchomienie w fazie światła oraz wzrost aktywności w fazie ciemności w teście badającym reakcje na nagłe zmiany oświetlenia, 3) silniejsza reakcja ucieczki w odpowiedzi na niespodziewany bodziec świetlny. Z kolei w teście w jasnym-ciemnym polu larwy homozygotyczne *tsc2^{-/-}* nie miały preferencji do żadnego z warunków świetlnych, co sugerowało, że podstawą tego zachowania nie jest lęk, a raczej nieprawidłowości w funkcjonowaniu mózgu i odbiorze bodźców sensomotorycznych. Wigabatryna przesunęła preferencję mutantów *tsc2^{-/-}* jeszcze mocniej w stronę ciemności, co z kolei wykluczyło, rolę drgawek w obserwowanym zachowaniu larw. Podwyższony poziom kortyzolu u larw homozygotycznych dodatkowo potwierdził hipotezę o nadmiernym lęku w modelu stwardnienia guzowego w danio pręgowanym. Warto podkreślić, iż dotychczas, z wyjątkiem pracy Kedra i in (2020), ukazało się jedynie kilka prac badających aspekty TANDs w modelach zwierzęcych stwardnienia guzowego, w tym tylko jedna bezpośrednio dotycząca stanów lękowych. W pracy Ehningera i Silva (2011) potwierdzono występowanie nasilonego lęku u myszy transgeniczných z nadprodukcją dominującego-negatywnego mutantu *Tsc2* w skórze

i mózgu. Niemniej jednak jest to jedyny model ssaczy, w którym wykazano zachowania lękowe, w pozostałych zaś albo nie zajmowano się tą tematyką albo nie stwierdzono istotnych zmian. W przypadku heterozygotycznych myszy z mutacjami germinalnymi w genach *Tsc1* i *Tsc2*, zachowanie w testach w otwartym polu oraz jasnym-ciemnym polu nie różniło się od zachowania myszy typu dzikiego, podobnie u szczurów Ekeru *Tsc2^{+/-}*, gdzie również nie stwierdzono zmian (Sato i wsp. 2012; Ehninger i wsp. 2008; Tsai i wsp. 2012). Jak wcześniej wspomniano, rozbieżności w obserwowanych fenotypach między kolejnymi modelami stwardnienia guzowatego, mogą wynikać z tego, że różne warianty mutacji powodujących rozwój choroby mogą wiązać się z wykształceniem odmiennych profili behawioralnych. Dotyczy to nie tylko modeli zwierzęcych stwardnienia guzowatego, ale również TANDs u poszczególnych pacjentów. Podsumowując model danio pręgowany wykazuje zachowania wskazujące na nasilony lęk, które można badać za pomocą technik badawczych stosowanych również w modelach ssaczy (techniki przedstawione w Tabeli 1.1, Rozdział 1.6.3).

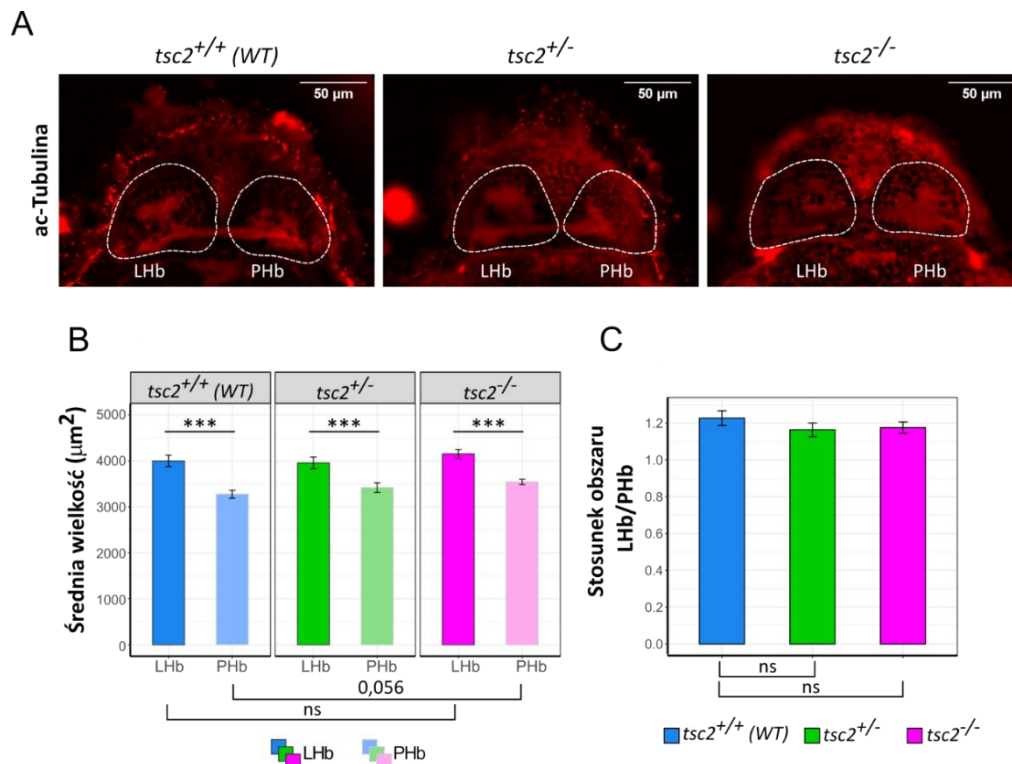
5.1.2.2.2 Zaburzenia związane z funkcjami poznawczymi

Często współistniejąca w stwardnieniu guzowatym niepełnosprawność intelektualna wiąże się m.in. z opóźnieniem w rozwoju i zaburzeniem procesów poznawczych. Procesy poznawcze polegają na przetwarzaniu informacji z otoczenia za pośrednictwem układu nerwowego, a więc odbieraniu ich, przechowywaniu i przekształcaniu, a następnie odpowiedzi organizmu na te informacje w postaci zachowania. Larwy danio wykazują proste, stereotypowe i dobrze scharakteryzowane reakcje sensomotoryczne (Kalueff i wsp. 2013; Meshalkina i wsp. 2017). Ze względu na szybki rozwój larw, zachowania te mogą być badane już w ciągu pierwszego tygodnia po zapłodnieniu. Wszelkie zmiany i odstępstwa we wzorcach tych zachowań odzwierciedlają zaburzenia wynikające z patologicznych procesów chorobowych i mają swoje podłoże w nieprawidłowym funkcjonowaniu mózgu.

Podobny czas spędzony przez larwy *tsc2^{-/-}* w oświetlonej oraz ciemnej strefie szalki eksperymentalnej w teście jasnego-ciemnego pola nie mógł wynikać ze zmniejszonego lęku, gdyż inne testy behawioralne potwierdziły nasilony lęk, a poziom kortyzolu u mutantów homozygotycznych był podwyższony. Brak preferencji świetlnej mógł być więc skutkiem dysfunkcji mózgu, wynikającej z zaburzeń specyficznych połączeń nerwowych, które odpowiadają za zjawisko fototaksji. W danio pręgowanym strukturą mózgu odpowiedzialną za regulację preferencji świetlnej jest uzdeczka (Bai bing Zhang i wsp. 2017; Cheng i wsp. 2017). Jest to jedna z najlepiej konserwowanych ewolucyjnie części mózgu wśród kręgowców

(Stephenson-Jones i wsp. 2011). W związku z wynikami testu jasnego-ciemnego pola dotyczącymi braku preferencji mutantów *tsc2^{-/-}* do konkretnego warunku świetlnego, podjęto próbę sprawdzenia, czy w modelu stwardnienia guzowego w danio pręgowanym uzdeczka jest właściwie rozwinięta. Dodatkowym powodem przemawiającym za zbadaniem tej struktury był fakt, że w danio pręgowanym uzdeczka moduluje również zachowania związane z emocjami, w tym lękiem, który był nasilony u mutantów *tsc2^{-/-}* (Duboué i wsp. 2017; Mathuru i Jesuthasan 2013; Jesuthasan 2012).

W normalnych warunkach uzdeczka charakteryzuje się asymetrią anatomiczną – uzdeczka lewa (LHb) jest wyraźnie większa od prawej. Wiadomo również, że zaburzenie asymetrii w tej strukturze prowadzi do utraty prawidłowych reakcji na bodźce sensoryczne (Dreosti i wsp. 2014). Analiza obrazów mikroskopowych barwienia pełnego przekroju na acetylowaną Tubulinę wykazała, że asymetria anatomiczna uzdeczki mutantów homozygotycznych jest zachowana, przy czym na podstawie stosunku wielkości obszaru uzdeczki lewej do uzdeczki prawej oceniono, że nie ma istotnych różnic w poziomie asymetrii (Ryc. 5.1).



Ryc. 5.1 Wyniki analizy morfologii uzdeczek u larw linii *tsc2^{vu242}*

A) Reprezentatywne obrazy mikroskopowe sekcji horyzontalnych przechodzących przez spoidło uzdeczek *tsc2^{vu242}* w stadium 5 dpf, w preparatach pełnego przekroju barwionych immunofluorescencyjnie na acetylowaną Tubulinę. Biała linia przerywana wskazuje granice

części grzbietowych uzdeczki lewej i prawej. LHb – uzdeczka lewa; PHb – uzdeczka prawa. B) Wykres słupkowy przedstawia średnią wielkość uzdeczki lewej i prawej dla każdego z genotypów linii $tsc2^{vu242}$, obliczoną z pola powierzchni zaznaczonego na Ryc. 5.1A regionu zainteresowania. Słupki błędów pokazują SEM. Istotność statystyczna wyników: 2-czynnikowa ANOVA z testem *post-hoc* Tukeya HSD dla wielkości uzdeczki lewej vs. prawej dla danego genotypu: (wielkość uzdeczki × genotyp) $df = 2$; $F = 0,437$; $p = 0,647$; $p = 8,49 \times 10^{-4}$ dla $tsc2^{-/-}$ LHb vs. PHb; $p = 4,7 \times 10^{-3}$ dla $tsc2^{+/-}$ LHb vs. PHb; $p = 4,22 \times 10^{-5}$ dla $tsc2^{+/+}$ LHb vs. PHb; Liczba larw (genotyp): 14 ($tsc2^{+/+}$), 14 ($tsc2^{+/-}$), 14 ($tsc2^{-/-}$); *** $p < 0,005$; ns – wyniki nieistotne statystycznie. C) Wykres słupkowy przedstawia stosunek wielkości uzdeczki lewej do uzdeczki prawej dla każdego z genotypów linii $tsc2^{vu242}$. Słupki błędów pokazują SEM. Istotność statystyczna wyników: Kruskal-Wallis z testem *post-hoc* Dunn $df = 2$; $H = 4,5764$; $p = 0,1014$; ns dla $tsc2^{-/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; ns dla $tsc2^{+/-}$ vs. $tsc2^{+/+}$; ns – wyniki nieistotne statystycznie.

Uzyskane wstępne wyniki nie wykazały zmian, które świadczyłyby, że przyczyną obserwowanego zachowania larw są nieprawidłowości w morfologii uzdeczek, niemniej jednak należałoby przeprowadzić dodatkowe badania, aby z większą pewnością wykluczyć rolę uzdeczki w obserwowanej patologii. U kręgowców uzdeczka jest elementem ważnego obwodu nerwowego łączącego obszary przodomózgowia ze śródmózgiem oraz mózdzkiem. W pracy Bartoszek i wsp. (2021) udowodniono, że uzdeczka integruje nie tylko informacje z narządów zmysłów, ale również te pochodzące ze struktur mózgu odpowiadających ciału migdałowatemu oraz hipokampowi. W związku z tym, zbadanie morfologii połączeń bezpośrednio unerwiających uzdeczkę mogłoby pomóc zweryfikować hipotezę o roli tej struktury zarówno w zaburzeniach preferencji świetlnej, jak i zachowaniach związanych z lękiem w modelu stwardnienia guzowatego w danio przegowanym. Z drugiej strony przeprowadzenie testu w jasnym-ciemnym polu na starszych larwach pozwoliłoby zbadać, czy obserwowany brak preferencji świetlnej nie jest związany z tym, że to konkretne zachowanie adaptacyjne nie wykształciło się jeszcze u larw homozygotycznych w stadium 5 dpf.

Z kolei w teście badającym reakcję ucieczki oraz habituację w efekcie powtarzającego się bodźca świetlnego, zaobserwowano szybszy czas osłabienia reakcji na błysk światła u mutantów homozygotycznych w porównaniu do ich siostrzanych kontroli. Wyniki poprzednich testów behawioralnych wskazywały na nasilony lęk, ale także problemy neurologiczne u larw $tsc2^{-/-}$. Możliwe jest więc, że szybsze osłabienie reakcji na bodziec sensoryczny nie jest wynikiem szybszej habituacji, a raczej adaptacji sensorycznej. Zarówno habituacja, jak i adaptacja sensoryczna powodują zmniejszenie reakcji na bodźce sensoryczne, jednakże podstawy neurobiologiczne obydwu procesów są odmienne. Habituacja stanowi podstawową, nieasocjacyjną formę uczenia się, definiowaną jako ustanie wrodzonej reakcji na

powtarzający się lub trwały bodziec sensoryczny. Natomiast adaptacja sensoryczna ma miejsce, gdy istotny bodziec ostatecznie wysyci wrażliwość komórek odpowiedzialnych za odbieranie tego bodźca i dlatego przestaje być zauważalny. Dodatkowo, o prawidłowej habituacji świadczyło to, że po około 100 s eksperymentu larwy wszystkich genotypów osiągnęły bazowy poziom aktywności. Na podstawie uzyskanych danych można więc wnioskować, że mutanty homozygotyczne *tsc2^{-/-}* mają problemy z przetwarzaniem bodźców w postaci krótkich pulsów światła, co może być odzwierciedleniem nieprawidłowości w obwodach nerwowych i/lub zaburzeń poznawczych. Wydaje się, że różnice w reakcji ucieczki mogą wynikać z nieprawidłowości w połączeniach nerwowych odpowiadających specyficznemu za przetwarzanie bodźców świetlnych. Wskazują na to wyniki Scheldeman i wsp. (2017), w których wykazano, że w stadium 7 dpf nie ma różnic w reakcji na dotyk pomiędzy mutantami homozygotycznymi *tsc2^{-/-}*, a siostrzanymi kontrolami. Na tej podstawie autorzy zasugerowali, że obwody, tworzone przez neurony mechanosensoryczne odpowiadające za odbieranie bodźców dotykowych, są nienaruszone. Natomiast w celu potwierdzenia, że mutanty homozygotyczne *tsc2^{-/-}* faktycznie wykazują prawidłową habituację na bodziec, a osłabienie reakcji nie wynika np. z fizycznego zmęczenia, bądź napadów padaczkowych należałoby przeprowadzić eksperyment badający dyshabituację. Dyshabituacja definiowana jest, jako natychmiastowe przywrócenie reakcji, która uległa habituacji na dany bodziec, po zastosowaniu innego, silnego bodźca (Rosas 2017). W przypadku badanego testu bodźcem pierwotnym są pulsy światła, natomiast bodźcem dyshabituującym mógłby być impuls dźwiękowy w postaci wibracji o określonym natężeniu.

Podsumowując przeprowadzone przeze mnie doświadczenia wykazały, że model stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym odtwarza patologiczne fenotypy behawioralne związane z nasilonym lękiem, ale także wskazuje na inne nieprawidłowości w funkcjonowaniu mózgu, które mogą wynikać z problemów neurologicznych i/lub zaburzeń poznawczych, co w przypadku ludzi przekłada się na stopień niepełnosprawności intelektualnej. Aby stwierdzić, czy obserwowane fenotypy behawioralne u mutantu *tsc2^{-/-}* są związane z zaburzeniami poznawczymi i czy odzwierciedlają niepełnosprawność intelektualną u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym potrzebne są dokładniejsze badania. Ponadto, uzyskane wyniki wspierają hipotezę, że mutacja w genie *tsc2* jest wystarczająca do wywołania niektórych fenotypów związanych z TANDs, gdyż wykształciły się one pomimo braku zmian neuropatologicznych, takich jak guzki korowe.

5.1.2.3 Patologie związane z morfologią połączeń nerwowych w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym

Obwody neuronalne, czyli połączenia pomiędzy neuronami, silnie modulują zachowania ludzi i zwierząt, a różne schorzenia psychiatryczne są coraz częściej uznawane za zaburzenia spowodowane nieprawidłowymi połączeniami nerwowymi w mózgu. Patologiczne zmiany w mikrostrukturze istoty białej są opisywane m.in. w schorzeniach związanych z lękiem, stresem i depresją (Liu i wsp. 2020; Yang i wsp. 2020). Również w stwardnieniu guzowatym wskazuje się, że zaburzenia łączności neuronalnej mogą leżeć u podstaw TANDs (Tsai i wsp. 2021). U pacjentów ze stwardnieniem guzowatym najczęściej można odnaleźć informacje na temat zmian w morfologii i strukturze spoidła wielkiego mózgu (ciała modzelowatego), często w odniesieniu do współwystępującego w tej chorobie spektrum autyzmu (Prohl i wsp. 2019; Baumer i wsp. 2018; Peters i wsp. 2012). Niemniej jednak, podłoże powstawania zaburzeń istoty białej jest słabo poznane.

W niniejszej pracy wykazano, że u mutantów *tsc2^{-/-}* tworzy się cieńsze spoidło przednie, które jest jednym z głównym spoidła mózgowych u danio pręgowanego, a także występują problemy z ukierunkowanym wzrostem aksonów komórek GFP-pozytywnych zlokalizowanych w międzymózgowiu w linii *Tg(ptf1a:GFP);tsc2^{vu242}*. Połączenia nerwowe pomiędzy półkulami mózgu w linii *Tg(ptf1a:GFP);tsc2^{vu242}* tworzone są przez aksony, które w normalnych warunkach występują w postaci zwartych wiązek. Stwierdzono, że na styku półkul mózgowych mutantów *tsc2^{-/-}* aksony nie tworzyły ścisłej wiązki w porównaniu do siostrzanych kontroli typu dzikiego *tsc2^{+/+}*, co wskazuje na problemy z formowaniem prawidłowych połączeń nerwowych. Co więcej, na podstawie wyników zamieszczonych w pracy Kędra i wsp. (2020) stwierdzono, że problemy w morfologii wiązek aksonów są niezależne od prawidłowej struktury mostków komórek glejowych zlokalizowanych wokół spoidła mózgowego, które tworzą specyficzne mikrośrodowisko dla wydłużających się aksonów, dostarczając im odpowiednich cząsteczek sygnałowych wskazujących kierunek wzrostu (Richards 2002; Shu i wsp. 2003). Wynik ten sugerował, że istotą obserwowanych defektów mogą być problemy z odpowiedzią stożków wzrostu aksonów na sygnały naprowadzające, co powoduje ich wadliwy wzrost. Rolę w tym procesie mogą odgrywać białka szlaku Dock-Elmo-Rac1, w którym poziom mRNA wybranych genów był istotnie podwyższony u mutantów homozygotycznych *tsc2^{-/-}*. Ponadto, w pracy Kedra i wsp. (2020) za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego pełnego przekroju wykazano podwyższony poziom białek Dock4 oraz Elmo2 bezpośrednio w mózgu mutantów *tsc2^{-/-}*. Szlak DOCK-

ELMO-RAC1 bierze udział w regulacji cytoszkieletu aktynowego podczas procesów migracji oraz ukierunkowanego wzrostu aksonów. U ssaków białko DOCK3 oddziałuje z ELMO oraz białkiem z rodziny RHO i za pośrednictwem RAC1 aktywuje wzrost neurytów (Shi 2013; Namekata i wsp. 2010). Z kolei białko DOCK4 reguluje rozwój neurytów i dendrytów (Xiao i wsp. 2013). W związku z tym, wydaje się, że zmiany w poziomie mRNA dla genów *dock3*, *dock4*, *elmo2* oraz *rac1* wskazują molekularne podłoże problemów z tworzeniem prawidłowych połączeń neuronalnych w badanym przeze mnie modelu.

Ponadto w pracy Kędra i wsp. (2020) potwierdzono, że problem z łącznością istoty białej może być globalny, ponieważ dotyczy również spoidła postoptycznego oraz zaburzeń wzrostu młodych aksonów sensorycznych wydłużających się z regionu plakody węchowej (w stadium 24-27 hpf), z której rozwiną się komórki węchowe. Wyniki te korelują z danymi zamieszczonymi w pracy Switon i wsp. (2017), gdzie pomiary nerwu wzrokowego w modelu *tsc2^{vu242}* wskazały na zmniejszoną średnicę nerwu wzrokowego u mutantów homozygotycznych *tsc2^{-/-}*. Z kolei w modelu heterozygotycznym myszy *Tsc2^{+/-}*, badano aksony neuronów siatkówki i stwierdzono defekty w ich ukierunkowanym wzroście, a także brak wrażliwości na cząsteczki sygnałowe (Nie i wsp. 2010). Badania przeprowadzone na neuronach *TSC2^{+/-}* różnicowanych z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych iPSC pochodzących od pacjentów ze stwardnieniem guzowatym sugerują, że problemy z łącznością neuronalną mogą wynikać z deregulacji ścieżki GTPazy RHOA zależnej od kompleksu TSC1-TSC2, ale niezależnie od aktywności mTORC1 (Catlett i wsp. 2021). Białka efektorowe RAC1 i RHOA ściśle współregulują wzrost i rozwój aksonów w sposób przeciwstawny, dlatego zaburzenia w jednym ze szlaków mogą generować nieprawidłowości w drugim. Podsumowując w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym wykryto zaburzenia łączności istoty białej mózgu, które należą do neuropatologicznych objawów stwardnienia guzowatego u ludzi. Modelowanie tego typu zmian w danio pręgowanym umożliwia łatwiejsze badanie ich podłoża molekularnego. Dzięki zewnętrznemu rozwojowi oraz transparentności larw można obserwować początkowe etapy powstawania wybranych połączeń nerwowych za pomocą nieinwazyjnych technik przyżyciowych, co daje przewagę nad modelami ssaczymi, w których eksperymenty *in utero* wiążą się ze stosowaniem skomplikowanych metod badawczych.

5.1.2.4 Zaburzenia poziomu białek i poziomu mRNA komponentów szlaku związanego z neurotransmisją hamującą w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym

Zaburzenia w równowadze transmisji synaptycznej pobudzającej i hamującej zaobserwowano zarówno w modelach zwierzęcych, jak i w tkankach nerwowych pochodzących od pacjentów ze stwardnieniem guzowatym (Lozovaya i wsp. 2014; Talos i wsp. 2012; Bateup i wsp. 2013). W środowisku naukowym istnieje hipoteza, że obniżona neurotransmisja hamująca i nasilona neurotransmisja pobudzająca w stwardnieniu guzowatym przyczyniają się do inicjacji napadów padaczkowych w tej chorobie (Ruffolo i wsp. 2016; Fu i wsp. 2012). Uważa się, że istotą obserwowanych zmian jest niedojrzałość sieci neuronalnej, czego dowodzą badania przeprowadzone na guzach korowych pozyskanych od pacjentów ze stwardnieniem guzowatym, gdzie wykazano m.in. obniżoną ekspresję genów dla podjednostek receptorów jonotropowych GABA_A, czy też zwiększony stosunek kotransporterów chlorkowych NKCC1 do KCC2, który powoduje, że neuroprzekaźnik GABA ma działanie pobudzające zamiast hamującego. Taki stan uniemożliwia efektywną neurotransmisję hamującą (Ben-Ari 2014; Talos i wsp. 2012; Ruffolo i wsp. 2016).

GABA jest podstawowym neuroprzekaźnikiem hamującym w mózgu (Bloom i Iversen 1971). Syntetyzowany jest z glutaminianu poprzez działanie enzymów dekarboksylazy glutaminianu, wśród których wyróżnia się dwie główne izoformy: GAD65 i GAD67. Białka te są zlokalizowane głównie w zakończeniach presynaptycznych aksonów oraz w ciele komórki, a ich ekspresja oraz aktywność ściśle korelują z poziomem neuroprzekaźnika GABA, a w dalszej kolejności z neurotransmisją hamującą. Uzyskane w tej pracy doktorskiej wyniki badań wykazały, że również w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym obserwuje się zmiany molekularne w GABAergicznym szlaku sygnałowym, widoczne w postaci obniżonego poziomu białek Gad65/67 w rejonie *pallium* w mózgach mutantów *tsc2*^{-/-} oraz nieprawidłowości w poziomie mRNA genów związanych z tą ścieżką. Analiza mikroskopowa wykazała, że zmiany w poziomie Gad65/67 u mutantów homozygotycznych postępują wraz z rozwojem. Liczne badania pokazują, że szlak GABAergiczny pełni istotną rolę w procesach neurogenezy, a jego ścisła regulacja jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju sieci neuronalnych i plastyczności synaptycznej (Wu i Sun 2015; Sernagor i wsp. 2010). Jest więc prawdopodobne, że obserwowane w badanym przeze mnie modelu zmiany w poziomie Gad65/67 wraz ze stwierdzoną nadmierną pobudliwością sieci neuronów mogą mieć przełożenie na procesy neurotransmisji synaptycznej, a w konsekwencji na obserwowane

problemy behawioralne (Kedra i wsp. 2020). Co więcej, istnieje szereg badań przeprowadzonych na heterozygotycznych myszach *Gad67* oraz warunkowych, komórkowo-specyficznych nokautach *Gad67* lub nokautach *Gad65*, w których niedobór tych białek powiązано z występowaniem deficytów w neurotransmisji hamującej oraz rozwojem depresji, czy zaburzeń lękowych (Miyata i wsp. 2019; Lazarus, Krishnan, i Huang 2015; Lau i Murthy 2012; Stork i wsp. 2000; Stork i wsp. 2003). Podobnie w stwardnieniu guzowatym, uznaje się, że problemy neuropsychiatryczne wynikają potencjalnie z deregulacji neuroprzebieżnictwa synaptycznego (Curatolo, Moavero, i de Vries 2015; Ehninger, de Vries, i Silva 2009).

W przeciwieństwie do poziomu białek Gad65/67 w konkretnych regionach mózgu, poziom mRNA dla genów *gad65* i *gad67* był istotnie podwyższony u mutantów homozygotycznych *tsc2^{-/-}*. Przyczyną takiej rozbieżności może być efekt kompensacyjny na poziomie transkrypcji, w wyniku którego organizm próbuje zwiększyć syntezę neuroprzebieżnika GABA poprzez zwiększenie ekspresji genów enzymów odpowiedzialnych za ten proces. Ponadto należy pamiętać, że powstanie ostatecznego produktu białkowego zależy od wielu modyfikacji post-transkrypcyjnych oraz potranslacyjnych. Z drugiej strony, podobne wyniki uzyskano w pracy Alsaqati i wsp. (2020), gdzie badano neurony różnicowane z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych pochodzących od pacjenta ze stwardnieniem guzowatym oraz stwierdzonym spektrum autyzmu. Wykryto podwyższony poziom mRNA w stosunku do neuronów, dla genów *GAD65* i *GAD67*, a także genów wybranych podjednostek receptorów GABA_A (Alsaqati, Heine, i Harwood 2020). Z kolei w sekcjach guzków korowych pacjentów ze stwardnieniem guzowatym zaobserwowano obniżony poziom mRNA dla genu *GAD65* oraz niektórych podjednostek receptorów GABA_A, co sugeruje, że zmiany te są zależne od profilu klinicznego lub od rodzaju badanych komórek (np. komórki z guzków korowych vs. zróżnicowane neurony pozbawione TSC2) (R. White i wsp. 2001).

Wykonana w pracy Kedra i wsp. (2020) przyżyciowa analiza aktywności neuronalnej w mózgu oraz wyniki Scheldeman i wsp. (2017) dotyczące zmian w LFP dostarczyły dowodów na nadmierne pobudzenie neuronów w mózgu mutantów *tsc2^{-/-}*, co sugeruje, że istotnie w badanym przeze mnie modelu występuje niedostateczne hamowanie synaptyczne. Jednakże, aby jednoznacznie rozstrzygnąć, czy równowaga pomiędzy wzbudzeniem i hamowaniem jest zaburzona w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym, należałoby wykonać pomiary elektrofizjologiczne pojedynczych neuronów *in vivo* metodą patch-clamp. Zastosowanie tej techniki może stanowić wyzwanie ze względu na niewielkie rozmiary

neuronów w mózgu larw danio pręgowanego, jednak tego typu pomiary były już z powodzeniem wykonywane w innych laboratoriach (Wei i wsp. 2012; Zhang i Du 2016).

5.1.3 Przewidywalność strategii terapeutycznych w modelu stwardnienia guzowego *tsc2^{-/-}* w danio pręgowanym

Ostatnie kryterium oceny przydatności modelu zwierzęcego dotyczy przewidywalności efektywności strategii terapeutycznych, a więc odpowiedzi na standardowe kliniczne leczenie, które jest stosowane u człowieka, a także możliwości odkrywania nowych celów terapeutycznych, które będą skuteczne w leczeniu klinicznym.

Jak opisano we Wstępie (Rozdział 1.1.3 Kliniczne leczenie farmakologiczne stwardnienia guzowego) lekami powszechnie stosowanymi w stwardnieniu guzowatym u pacjentów są analogi rapamycyny oraz wigabatryna. Wigabatryna jest skutecznym lekiem pierwszego rzutu w epilepsji, natomiast stosowane eksperymentalnie rapalogi powodują istotną redukcję napadów padaczkowych, co związane jest prawdopodobnie z ich bezpośrednim wpływem na szlak mTORC1 (Nabbout i wsp. 2021). W niniejszej pracy wykazano, że zarówno wigabatryna, jak i rapamycyna skutecznie poprawiają fenotypy związane z obniżoną aktywnością lokomotoryczną u mutantów homozygotycznych, a także potwierdzono skuteczność działania rapamycyny na szlak kinazy mTORC1 w badanym przeze mnie modelu doświadczalnym. Niemniej jednak wigabatryna nie wpływała na poziom aktywności mTORC1, co sugeruje, że w tym przypadku poprawa fenotypu była związana wyłącznie z właściwościami wigabatryny, jako selektywnego inhibitora aminotransferazy GABA, niż ze zmniejszeniem aktywności kinazy mTORC1. U pacjentów ze stwardnieniem guzowatym efekt przeciwpadaczkowy wigabatryny opiera się na zwiększeniu neurotransmisji hamującej w mózgu poprzez zapobieganie rozkładowi głównego neuroprzekaźnika hamującego tj. GABA (Wang i wsp. 2008; Citraro i wsp. 2016; Ben-Menachem 2011). Obserwowany obniżony poziom białek Gad65/67 w mózгах mutantów *tsc2^{-/-}* dodatkowo potwierdza konieczność stosowania wigabatryny, która ma zdolność do przywrócenia równowagi neuroprzekaźnika GABA. Wyniki te są spójne z najnowszymi obserwacjami przeprowadzonymi na mysim modelu stwardnienia guzowego, gdzie wigabatryna poprawiała parametry życiowe mutantu oraz fenotyp związany z padaczką, jednak nie wpływała na szlak sygnałowy mTORC1 (Koene i wsp. 2019).

W niniejszej pracy zbadano również wpływ wybranych związków farmakologicznych na fenotypy związane z lękiem w badanym przeze mnie modelu stwardnienia guzowego. Wyniki

przedstawione w niniejszej rozprawie dowiodły, że zahamowanie szlaku kinazy mTORC1 przez rapamycynę na wczesnych etapach rozwoju larw *tsc2^{-/-}* pozwala zapobiec wykształceniu fenotypów związanych z lękiem obserwowanych w teście w otwartym polu oraz w teście badającym reakcję na nagłe zmiany oświetlenia. Z kolei Tsai i wsp. (2012) udowodnili, że w modelu mysim z komórkowo specyficzną utratą *Tsc1* w komórkach Purkiniego mózdzku, za pomocą rapamycyny, można poprawić deficyty w zachowaniach socjalnych i procesach uczenia się odwrotnego (ang. *reversal learning*). Pozytywny wpływ rapalogów na niektóre aspekty TANDs stwierdzono również u ludzi w studium przypadku, w którym wzięło udział sześciu pacjentów ze stwardnieniem guzowatym, ze współistniejącymi objawami neuropsychiatrycznymi (mediana wieku 16,5 lat). Wykazano tam, że zastosowanie analogu rapamycyny spowodowało poprawę nie tylko w kontroli epilepsji, ale również objawów emocjonalnych i behawioralnych (Kilincaslan i wsp. 2017). Natomiast zastosowanie wigabatryny w badanym przez mnie modelu doświadczalnym nie przyniosło pozytywnych efektów w żadnym z testów badających lęk. Wyniki te sugerują, że osłabienie neurotransmisji GABAergiczej nie jest bezpośrednią przyczyną obserwowanego zachowania mutantów *tsc2^{-/-}*.

Oprócz klasycznych leków stosowanych u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym, w niniejszej rozprawie, zastosowano również antagonistę receptora TrkB – ANA-12. Szlak sygnałowy BDNF/TrkB pełni istotne funkcje w rozwoju neuronów, w plastyczności i funkcjonowaniu synaps, a zmiany w aktywności tego szlaku są opisywane zarówno w schorzeniach takich jak epilepsja czy autyzm, oraz innych zaburzeniach związanych ze stresem (Iughetti i wsp. 2018; Lin i wsp. 2020; Correia i wsp. 2010). Ponadto, dr Justyna Zmorzyńska wykazała zwiększoną aktywność tego szlaku w badanym w niniejszej pracy modelu stwardnienia guzowatego *tsc2^{-/-}*, a także potwierdziła skuteczność ANA-12 w jej hamowaniu. Udowodniła także, że ANA-12 poprawia zdolności lokomotoryczne mutantów *tsc2^{-/-}*, w tym nadmierną prędkość ruchu (Kedra i wsp. 2020). W doświadczeniach badających poziom lęku, zastosowanie ANA-12 istotnie poprawiło eksplorację środka szalki u mutantów homozygotycznych *tsc2^{-/-}* w teście w otwartym polu oraz spowodowało niewielkie zmiany w reakcji znieruchomienia. Różna efektywność działania ANA-12 w testach badających lęk może być związana z tym, że larwy *tsc2^{-/-}* mają problem z przetwarzaniem bodźców świetlnych (brak preferencji świetlnej w teście jasnego-ciemnego pola, odpowiedź na światło w teście badającym reakcję ucieczki). Spowodowałoby to, że w teście badającym reakcję na nagłe zmiany oświetlenia obserwowany fenotyp *tsc2^{-/-}* jest związany nie tylko z lękiem, ale także z nieprawidłowym przetwarzaniem bodźców sensomotorycznych. Na te ostatnie związki

anksjolityczne nie miałyby wpływu. Innym wyjaśnieniem może być to, że ANA-12 nie wykazuje silnych właściwości anksjolitycznych w badanym przeze mnie modelu doświadczalnym, chociaż wydaje się to mało prawdopodobne, ponieważ wykazywała właściwości przeciwlękowe w modelu mysim oraz szczurzym (Cazorla i wsp. 2011; Azogu i Plamondon 2017). Aby jednoznacznie potwierdzić wpływ ANA-12 na lęk w badanym przeze mnie modelu doświadczalnym należałoby zmierzyć poziom kortyzolu po zastosowaniu tego związku.

ANA-12 okazała się także skuteczna w poprawie morfologii spoidła przedniego u mutantów *tsc2^{-/-}*, podobnie jak rapamycyna. Pozytywne efekty stosowania ANA-12 mogą wynikać z funkcji szlaku BDNF/TrkB w regulacji wzrostu i polaryzacji neuronów. Woo i wsp. (2019) wykazali, że lokalna aktywacja TrkB na końcu neurytu promuje jego specyfikację w akson poprzez regulację dynamiki aktyny i indukowanie formowania stożka wzrostu, pośrednicząc w sygnalizacji szlaku Rac1. Wyniki te wskazują, że nadmierna aktywność szlaku BDNF/TrkB, może więc bezpośrednio wiązać się z zaburzeniami łączności istoty białej w badanym przeze mnie modelu stwardnienia guzowatego. W przypadku rapamycyny, analiza danych klinicznych z rezonansu magnetycznego wykazała, że ewerolimus poprawia właściwości struktury istoty białej ciała modelowego (Peters i wsp. 2019). Nieprawidłowości w połączeniach nerwowych mózgu mogą wpływać na funkcje poznawcze oraz zachowania związane z lękiem, czy stresem jednak na całość obserwowanego fenotypu behawioralnego składają się również aktywności szlaku mTORC1 oraz szlaku GABAergicznego.

W niniejszej pracy udowodniono, że w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym rapamycyna oraz wigabatryna wywierają pozytywne efekty na fenotypy przypominające padaczkę u pacjentów, a także wskazano potencjalny wpływ inhibitora TrkB, ANA-12 na obserwowane patologie związane z lękiem i zaburzeniami struktury istoty białej. Mimo, że uzyskane dane nie są wystarczające, aby móc wnioskować na temat potencjalnego działania ANA-12 w leczeniu stwardnienia guzowatego u ludzi, są one dobrą bazą do kontynuacji badań nad rolą szlaku BDNF/TrkB w patogenezie stwardnienia guzowatego. Podsumowując model stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym spełnia kryterium przewidywalności strategii terapeutycznych, pod względem testowanych związków farmakologicznych.

5.2 Podsumowanie

Uzyskane w niniejszej pracy dane pozwoliły na charakterystykę modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym oraz ocenę tego modelu pod kątem trzech kryteriów oceny przydatności modeli zwierzęcych w badaniach nad ludzkimi chorobami. Udowodniono, że model *tsc2^{-/-}* odtwarza znane, genetyczne i biochemiczne mechanizmy powstawania stwardnienia guzowatego. Ponadto, odzwierciedla wybrane fenotypy związane z występowaniem epilepsji, TANDs dotyczących lęku i funkcji poznawczych oraz przejawia charakterystyczne dla pacjentów zmiany w strukturze istoty białej. Co więcej, w badanym przeze mnie modelu stwardnienia guzowatego wskazano na prawdopodobne zaburzenia równowagi w neurotransmisji synaptycznej, które obserwuje się u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym, a więc wpisuje się w kryterium podobieństwa objawów. Użycie powszechnie stosowanych w klinice leków rapamycyny i wigabatryny pozwoliło na poprawę wybranych patologii behawioralnych oraz anatomicznych, co wskazuje, że strategie terapeutyczne stosowane u ludzi mają przełożenie w organizmie danio pręgowanego. Zidentyfikowano również nową substancję, ANA-12, wywierającą pozytywne efekty, w niektórych testach badających lęk w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym. Niemniej jednak, rola inhibitora TrkB, ANA-12 w poprawie fenotypów stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym musi zostać lepiej zbadana, a dokładny mechanizm działania odkryty, aby móc wnioskować na temat potencjalnego zastosowania tego związku farmakologicznego u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym.

6. WNIOSKI

Na podstawie uzyskanych wyników badań wyciągnięto następujące wnioski:

1. Model stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym $tsc2^{vu242/vu242}$ wykazuje fenotypy behawioralne podobne do epilepsji, zaburzeń lękowych oraz zaburzeń funkcji poznawczych, które są charakterystyczne dla patologii neurologicznych oraz TANDs obserwowanych pacjentów ze stwardnieniem guzowatym.
2. W modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym $tsc2^{vu242/vu242}$ występują nieprawidłowości w morfologii spoidła przedniego mózgu oraz problemy z tworzeniem ścisłej wiązki aksonów łączących przeciwległe półkule w regionie *posterior tuberculum*, które jest strukturą mózgu homologiczną do jąder podstawnych u ssaków. Wynik ten wraz ze zmianami poziomu mRNA dla genów szlaku Dock-Elmo-Rac1 wskazuje na globalny problem z łącznością istoty białej mózgu, co odpowiada patologiom obserwowanym u pacjentów ze stwardnieniem guzowatym.
3. W modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym $tsc2^{vu242/vu242}$ stwierdzono zmiany w poziomie białek oraz mRNA głównych komponentów ścieżki sygnałowej związanej z neurotransmisją hamującą, co sugeruje zaburzenia w równowadze tego procesu i koreluje z wynikami badań przeprowadzonymi na modelach ssaczych oraz tkance nerwowej pochodzącej od pacjentów.
4. Stosowane w leczeniu pacjentów ze stwardnieniem guzowatym rapamycyna oraz wigabatryna poprawiają wybrane patologie behawioralne i neuroanatomiczne, co wskazuje, że strategie terapeutyczne stosowane u ludzi mają przełożenie w modelu tej choroby w danio pręgowanym $tsc2^{vu242/vu242}$.
5. Dotąd niebadany w stwardnieniu guzowatym związek – inhibitor TrkB ANA-12 działał korzystnie na niektóre patologie behawioralne oraz anatomiczne w modelu stwardnienia guzowatego w danio pręgowanym $tsc2^{vu242/vu242}$ wskazując nowy potencjalny cel terapeutyczny w tej chorobie.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Afrikanova, Tatiana, Ann Sophie K. Serruys, Olivia E.M. Buenafe, Ralph Clinckers, Ilse Smolders, Peter A.M. de Witte, Alexander D. Crawford, i Camila V. Esguerra. 2013. „Validation of the Zebrafish Pentylentetrazol Seizure Model: Locomotor versus Electrographic Responses to Antiepileptic Drugs”. *PLoS ONE* 8 (1).
2. Agetsuma, Masakazu, Hidenori Aizawa, Tazu Aoki, Ryoko Nakayama, Mikako Takahoko, Midori Goto, Takayuki Sassa, i wsp. 2010. „The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish”. *Nature Neuroscience* 13 (11): 1354–56.
3. Ahrens, Misha B., Michael B. Orger, Drew N. Robson, Jennifer M. Li, i Philipp J. Keller. 2013. „Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy”. *Nature Methods* 10 (5): 413–20.
4. Akiyama, Mari, Katsuhiko Kobayashi, i Yoko Ohtsuka. 2012. „Dravet syndrome: a genetic epileptic disorder”. *Acta medica Okayama* 66 (5): 369–76.
5. Almeida, Alexandra D., Henrik Boije, Renee W. Chow, Jie He, Jonathan Tham, Sachihiko C. Suzuki, i William A. Harris. 2014. „Spectrum of Fates: a new approach to the study of the developing zebrafish retina”. *Development*.
6. Alsaqati, Mouhamed, Vivi M. Heine, i Adrian J. Harwood. 2020. „Pharmacological intervention to restore connectivity deficits of neuronal networks derived from ASD patient iPSC with a TSC2 mutation”. *Molecular Autism* 11 (1).
7. Alsop, Derek, i Mathilakath M. Vijayan. 2008. „Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish”. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 294 (3).
8. Amo, Ryunosuke, Hidenori Aizawa, Mikako Takahoko, Megumi Kobayashi, Rieko Takahashi, Tazu Aoki, i Hitoshi Okamoto. 2010. „Identification of the zebrafish ventral habenula as a homolog of the mammalian lateral habenula”. *Journal of Neuroscience* 30 (4): 1566–74.
9. Amo, Ryunosuke, Felipe Fredes, Masae Kinoshita, Ryo Aoki, Hidenori Aizawa, Masakazu Agetsuma, Tazu Aoki, i wsp. 2014. „The habenulo-raphe serotonergic circuit encodes an aversive expectation value essential for adaptive active avoidance of danger”. *Neuron* 84 (5): 1034–48.
10. Andalman, Aaron S., Vanessa M. Burns, Matthew Lovett-Barron, Michael Broxton, Ben Poole, Samuel J. Yang, Logan Grosenick, i wsp. 2019. „Neuronal Dynamics

- Regulating Brain and Behavioral State Transitions”. *Cell* 177 (4): 970-985.e20.
11. Aoki, Kazuhiro, Takeshi Nakamura, i Michiyuki Matsuda. 2004. „Spatio-temporal Regulation of Rac1 and Cdc42 Activity during Nerve Growth Factor-induced Neurite Outgrowth in PC12 Cells”. *Journal of Biological Chemistry* 279 (1): 713–19.
 12. Arenzana, Francisco Javier, Diego Clemente, Rosario Sánchez-González, Ángel Porteros, José Aijón, i Rosario Arévalo. 2005. „Development of the cholinergic system in the brain and retina of the zebrafish”. W *Brain Research Bulletin*, 66:421–25.
 13. Assad, Nadyme, Waldo Lucas Luz, Mateus Santos-Silva, Tayana Carvalho, Suellen Moraes, Domingos Luiz Wanderley Picanço-Diniz, Carlomagno Pacheco Bahia, i wsp. 2020. „Acute Restraint Stress Evokes Anxiety-Like Behavior Mediated by Telencephalic Inactivation and GABAergic Dysfunction in Zebrafish Brains”. *Scientific Reports* 10 (1).
 14. Auerbach, Benjamin D., Emily K. Osterweil, i Mark F. Bear. 2011. „Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology”. *Nature* 480 (7375): 63–68.
 15. Azogu, Idu, i Helene Plamondon. 2017. „Inhibition of TrkB at the nucleus accumbens, using ANA-12, regulates basal and stress-induced orexin A expression within the mesolimbic system and affects anxiety, sociability and motivation”. *Neuropharmacology* 125 (październik): 129–45.
 16. Bai, Yiming, Harrison Liu, Bo Huang, Mahendra Wagle, i Su Guo. 2016. „Identification of environmental stressors and validation of light preference as a measure of anxiety in larval zebrafish”. *BMC Neuroscience* 17 (1): 63.
 17. Baraban, Scott C., Matthew T. Dinday, i Gabriela A. Hortopan. 2013. „Drug screening in Scn1a zebrafish mutant identifies clemizole as a potential Dravet syndrome treatment”. *Nature Communications* 4.
 18. Barkovich, Anthony James, Ruben I. Kuzniecky, Graeme D. Jackson, Renzo Guerrini, i William B. Dobyns. 2005. „A developmental and genetic classification for malformations of cortical development”. *Neurology*. Neurology.
 19. Barnes, Anthony P., i Franck Polleux. 2009. „Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons”. *Annual Review of Neuroscience*. Annu Rev Neurosci.
 20. Bartoszek, Ewelina Magdalena, Anna Maria Ostenrath, Suresh Kumar Jetti, Bram Serneels, Aytac Kadir Mutlu, Khac Thanh Phong Chau, i Emre Yaksi. 2021. „Ongoing habenular activity is driven by forebrain networks and modulated by olfactory stimuli”. *Current Biology* 31 (17): 3861-3874.e3.

21. Basnet, Ram Manohar, Daniela Zizioli, Somrat Taweedet, Dario Finazzi, i Maurizio Memo. 2019. „Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology”. *Biomedicines*. MDPI AG.
22. Bateup, Helen S., Caroline A. Johnson, Cassandra L. Deneffrio, Jessica L. Saulnier, Karl Kornacker, i Bernardo L. Sabatini. 2013. „Excitatory/Inhibitory Synaptic Imbalance Leads to Hippocampal Hyperexcitability in Mouse Models of Tuberous Sclerosis”. *Neuron*.
23. Bateup, Helen S., Kevin T. Takasaki, Jessica L. Saulnier, Cassandra L. Deneffrio, i Bernardo L. Sabatini. 2011. „Loss of Tsc1 in vivo impairs hippocampal mGluR-LTD and increases excitatory synaptic function”. *Journal of Neuroscience* 31 (24): 8862–69.
24. Baumer, Fiona M., Jurriaan M. Peters, Sean Clancy, Anna K. Prohl, Sanjay P. Prabhu, Benoit Scherrer, Floor E. Jansen, i wsp. 2018. „Corpus callosum white matter diffusivity reflects cumulative neurological comorbidity in tuberous sclerosis complex”. *Cerebral Cortex* 28 (10): 3665–72.
25. Baydyuk, Maryna, i Baoji Xu. 2014. „BDNF signaling and survival of striatal neurons”. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media SA.
26. Ben-Ari, Y. 2014. „The GABA excitatory/inhibitory developmental sequence: A personal journey”. *Neuroscience*. Pergamon.
27. Ben-Menachem, E. 2011. „Mechanism of action of vigabatrin: Correcting misperceptions”. *Acta Neurologica Scandinavica* 124 (SUPPL. 192): 5–15.
28. Benvenuto, Giovanna, Shaowei Li, Samantha J. Brown, Richard Braverman, William C. Vass, Jeremy P. Cheadle, Dicky J.J. Halley, Julian R. Sampson, Ralf Wienecke, i Jeffrey E. DeClue. 2000. „The tuberous sclerosis-1 (TSC1) gene product hamartin suppresses cell growth and augments the expression of the TSC2 product tuberin by inhibiting its ubiquitination”. *Oncogene* 19 (54): 6306–16.
29. Bloom, F. E., i L. L. Iversen. 1971. „Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography”. *Nature* 229 (5287): 628–30.
30. Bongaarts, Anika, Krinio Giannikou, Roy J. Reinten, Jasper J. Anink, James D. Mills, Floor E. Jansen, Wim G.M. Spliet, i wsp. 2017. „Subependymal giant cell astrocytomas in Tuberous Sclerosis Complex have consistent TSC1/TSC2 biallelic inactivation, and no BRAF mutations”. *Oncotarget* 8 (56): 95516–29.
31. Bongmba, Odelia Y.N., Luis A. Martinez, Mary E. Elhardt, Karlis Butler, i Maria V. Tejada-Simon. 2011. „Modulation of dendritic spines and synaptic function by Rac1: A possible link to Fragile X syndrome pathology”. *Brain Research* 1399 (lipiec): 79–95.

32. Boureux, Anthony, Emmanuel Vignal, Sandrine Faure, i Philippe Fort. 2007. „Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes”. *Molecular Biology and Evolution* 24 (1): 203.
33. Brellie, Christian Von Der, Robert Waltereit, Lian Zhang, Heinz Beck, i Timo Kirschstein. 2006. „Impaired synaptic plasticity in a rat model of tuberous sclerosis”. *European Journal of Neuroscience* 23 (3): 686–92.
34. Brugnera, Enrico, Lisa Haney, Cynthia Grimsley, Mingjian Lu, Scott F. Walk, Annie Carole Tosello-Tramont, Ian G. Macara, Hiten Madhani, Gerald R. Fink, i Kodimangalam S. Ravichandran. 2002. „Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex”. *Nature Cell Biology* 4 (8): 574–82.
35. Burgess, Harold A., i Michael Granato. 2007. „Sensorimotor gating in larval zebrafish”. *Journal of Neuroscience* 27 (18): 4984–94.
36. Carson, Robert P., Dominic L. Van Nielen, Peggy A. Winzenburger, i Kevin C. Ess. 2012. „Neuronal and glia abnormalities in Tsc1-deficient forebrain and partial rescue by rapamycin”. *Neurobiology of Disease* 45 (1): 369–80.
37. Catlett, Timothy S., Massimo M. Onesto, Alec J. McCann, Sarah K. Rempel, Jennifer Glass, David N. Franz, i Timothy M. Gómez. 2021. „RHOA signaling defects result in impaired axon guidance in iPSC-derived neurons from patients with tuberous sclerosis complex”. *Nature Communications* 12 (1): 1–15.
38. Cazorla, Maxime, Joël Prémont, Andre Mann, Nicolas Girard, Christoph Kellendonk, i Didier Rognan. 2011. „Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice”. *Journal of Clinical Investigation* 121 (5): 1846–57.
39. Chen, Qi, Charles A. Peto, G. Diane Shelton, Andrew Mizisin, Paul E. Sawchenko, i David Schubert. 2009. „Loss of modifier of cell adhesion reveals a pathway leading to axonal degeneration”. *Journal of Neuroscience* 29 (1): 118–30.
40. Chen, Qian, Yong Chuan Zhu, Jing Yu, Sheng Miao, Jing Zheng, Li Xu, Yang Zhou, i wsp. 2010. „CDKL5, a protein associated with Rett syndrome, regulates neuronal morphogenesis via Rac1 signaling”. *Journal of Neuroscience* 30 (38): 12777–86.
41. Cheng, Ruey Kuang, Suresh J. Jesuthasan, i Trevor B. Penney. 2014. „Zebrafish forebrain and temporal conditioning”. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. The Royal Society.
42. Cheng, Ruey Kuang, Seetha Krishnan, Qian Lin, Caroline Kibat, i Suresh Jesuthasan. 2017. „Characterization of a thalamic nucleus mediating habenula responses to changes

- in ambient illumination". *BMC Biology* 15 (1).
43. Choi, Jungwon, Jie Chen, Stuart L. Schreiber, i Jon Clardy. 1996. „Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP". *Science* 273 (5272): 239–42.
 44. Choi, Yong Jin, Alessia Di Nardo, Ioannis Kramvis, Lynsey Meikle, David J. Kwiatkowski, Mustafa Sahin, i Xi He. 2008. „Tuberous sclerosis complex proteins control axon formation". *Genes and Development*.
 45. Citraro, Rita, Antonio Leo, Andrew Constanti, Emilio Russo, i Giovambattista De Sarro. 2016. „mTOR pathway inhibition as a new therapeutic strategy in epilepsy and epileptogenesis". *Pharmacological Research*. Pharmacol Res.
 46. Coghlan, Suzanne, Jamie Horder, Becky Inkster, M. Andreina Mendez, Declan G. Murphy, i David J. Nutt. 2012. „GABA system dysfunction in autism and related disorders: From synapse to symptoms". *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Neurosci Biobehav Rev.
 47. Colwill, Ruth M., i Robbert Creton. 2011. „Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae". *Reviews in the Neurosciences* 22 (1): 63–73.
 48. Cooper, Jonathan A. 2013. „Mechanisms of cell migration in the nervous system". *Journal of Cell Biology*. J Cell Biol.
 49. Correia, C. T., A. M. Coutinho, A. F. Sequeira, I. G. Sousa, L. Lourenço Venda, J. P. Almeida, R. L. Abreu, i wsp. 2010. „Increased BDNF levels and NTRK2 gene association suggest a disruption of BDNF/TrkB signaling in autism". *Genes, Brain and Behavior* 9 (7): 841–48.
 50. Costa, Veronica, Stefan Aigner, Mirko Vukcevic, Evelyn Sauter, Katharina Behr, Martin Ebeling, Tom Dunkley, i wsp. 2016. „mTORC1 Inhibition Corrects Neurodevelopmental and Synaptic Alterations in a Human Stem Cell Model of Tuberous Sclerosis". *Cell Reports* 15 (1): 86–95.
 51. Cox, Rebecca L., Froylan Calderon de Anda, Tomer Mangoubi, i Akira Yoshii. 2018. „Multiple critical periods for rapamycin treatment to correct structural defects in Tsc-1-suppressed brain". *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11 (listopad): 409.
 52. Curatolo, Paolo. 2007. „Tuberous Sclerosis Complex: from basic science to clinical phenotypes - NEW". *Developmental Medicine & Child Neurology* 46 (9): 625–625.
 53. Curatolo, Paolo, Sergiusz Józwiak, i Rima Nabbout. 2012. „Management of epilepsy associated with tuberous sclerosis complex (TSC): Clinical recommendations". *European Journal of Paediatric Neurology*. Eur J Paediatr Neurol.

54. Curatolo, Paolo, Romina Moavero, i Petrus J. de Vries. 2015. *Neurological and neuropsychiatric aspects of tuberous sclerosis complex. The Lancet Neurology*. T. 14.
55. Curatolo, Paolo, Rima Nabbout, Lieven Lagae, Eleonora Aronica, José Carlos Ferreira, Martha Feucht, Christoph Hertzberg, i wsp. 2018. „Management of epilepsy associated with tuberous sclerosis complex: Updated clinical recommendations”. *European Journal of Paediatric Neurology*. Eur J Paediatr Neurol.
56. Curatolo, Paolo, Valerio Napolioni, i Romina Moavero. 2010. „Autism spectrum disorders in tuberous sclerosis: Pathogenetic pathways and implications for treatment”. *Journal of Child Neurology*. SAGE Publications Inc.
57. D’Agati, Elisa, Romina Moavero, Caterina Cerminara, i Paolo Curatolo. 2009. „Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) and tuberous sclerosis complex”. *Journal of Child Neurology*. J Child Neurol.
58. Dabora, Sandra L., David J. Kwiatkowski, David Neal Franz, Penelope S. Roberts, Andres Nieto, Joon Chung, Yew Sing Choy, i wsp. 2001. „Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs”. *American Journal of Human Genetics* 68 (1): 64–80.
59. Davies, D. Mark, Petrus J. De Vries, Simon R. Johnson, Deborah L. McCartney, Jane A. Cox, Andreas L. Serra, Peter C. Watson, i wsp. 2011. „Sirolimus therapy for angiomyolipoma in tuberous sclerosis and sporadic lymphangiomyomatosis: A phase 2 trial”. *Clinical Cancer Research* 17 (12): 4071–81.
60. Dibble, Christian C., Winfried Elis, Suchithra Menon, Wei Qin, Justin Klekota, John M. Asara, Peter M. Finan, David J. Kwiatkowski, Leon O. Murphy, i Brendan D. Manning. 2012. „TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1”. *Molecular Cell* 47 (4): 535–46.
61. Dibella, Linda M., Alice Park, i Zhaoxia Sun. 2009. „Zebrafish Tsc1 reveals functional interactions between the cilium and the TOR pathway”. *Human Molecular Genetics* 18 (4): 595–606.
62. DiMario, Francis J. 2004. „Brain abnormalities in tuberous sclerosis complex”. *Journal of Child Neurology* 19 (9): 650–57.
63. Doyon, Yannick, Jasmine M. McCammon, Jeffrey C. Miller, Farhoud Faraji, Catherine Ngo, George E. Katibah, Rainier Amora, i wsp. 2008. „Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases”. *Nature Biotechnology* 26 (6): 702–8.

64. Dreosti, Elena, Gonçalo Lopes, Adam R. Kampff, i Stephen W. Wilson. 2015. „Development of social behavior in young zebrafish”. *Frontiers in Neural Circuits* 9 (AUGUST).
65. Dreosti, Elena, Nuria Vendrell Llopis, Matthias Carl, Emre Yaksi, i Stephen W. Wilson. 2014. „Left-Right Asymmetry Is Required for the Habenulae to Respond to Both Visual and Olfactory Stimuli”. *Current Biology* 24 (4): 440–45.
66. Duboué, Erik R., Elim Hong, Kiara C. Eldred, i Marnie E. Halpern. 2017. „Left Habenular Activity Attenuates Fear Responses in Larval Zebrafish”. *Current Biology* 27 (14): 2154-2162.e3.
67. Duffney, Lara J., Ping Zhong, Jing Wei, Emmanuel Matas, Jia Cheng, Luye Qin, Kaijie Ma, i wsp. 2015. „Autism-like Deficits in Shank3-Deficient Mice Are Rescued by Targeting Actin Regulators”. *Cell Reports* 11 (9): 1400–1413.
68. Dumont, Francis J., i Qingxiang Su. 1995. „Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin”. *Life Sciences*. Life Sci.
69. Eden, Kate E., Petrus J. De Vries, Jo Moss, Caroline Richards, i Chris Oliver. 2014. „Self-injury and aggression in tuberous sclerosis complex: Cross syndrome comparison and associated risk markers”. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 6 (1).
70. Egan, Rupert J., Carisa L. Bergner, Peter C. Hart, Jonathan M. Cachat, Peter R. Canavello, Marco F. Elegante, Salem I. Elkhayat, i wsp. 2009. „Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish”. *Behavioural Brain Research* 205 (1): 38–44.
71. Ehninger, Dan, Sangyeul Han, Carrie Shilyansky, Yu Zhou, Weidong Li, David J. Kwiatkowski, Vijaya Ramesh, i Alcino J. Silva. 2008. „Reversal of learning deficits in a Tsc2^{+/-} mouse model of tuberous sclerosis”. *Nature Medicine* 14 (8): 843–48.
72. Ehninger, Dan, i Alcino J. Silva. 2011. „Increased levels of anxiety-related behaviors in a Tsc2 dominant negative transgenic mouse model of tuberous sclerosis”. *Behavior Genetics* 41 (3): 357–63.
73. Ehninger, Dan, P. J. de Vries, i A. J. Silva. 2009. „From mTOR to cognition: Molecular and cellular mechanisms of cognitive impairments in tuberous sclerosis”. *Journal of Intellectual Disability Research*. NIH Public Access.
74. Eisen, J. S. 1991. „Developmental neurobiology of the zebrafish”. *Journal of Neuroscience* 11 (2): 311–17.
75. Ensembl Genomes. b.d. „Gene: TSC1 (ENSG00000165699) - Orthologues - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 104”. Udostępniono 26 październik 2021a.

- https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Compara_Ortholog?db=core;g=ENSG00000165699;r=9:132891348-132946874.
76. Ensembl Genomes. b.d. „Gene: TSC2 (ENSG00000103197) - Orthologues - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 104”. Udostępniono 26 października 2021b. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Compara_Ortholog?db=core;g=ENSG00000103197;r=16:2047967-2089491.
 77. Feliciano, David M. 2020. „The Neurodevelopmental Pathogenesis of Tuberous Sclerosis Complex (TSC)”. *Frontiers in Neuroanatomy*. Frontiers Media S.A.
 78. Feliciano, David M., Tiffany V. Lin, Nathaniel W. Hartman, Christopher M. Bartley, Cathryn Kubera, Lawrence Hsieh, Carlos Lafourcade, Rachel A. O’Keefe, i Angélique Bordey. 2013. „A circuitry and biochemical basis for tuberous sclerosis symptoms: From epilepsy to neurocognitive deficits”. *International Journal of Developmental Neuroscience*. Int J Dev Neurosci.
 79. Feliciano, David M., Jennifer L. Quon, Tiffany Su, M. Morgan Taylor, i Angélique Bordey. 2012. „Postnatal neurogenesis generates heterotopias, olfactory micronodules and cortical infiltration following single-cell TSC1 deletion”. *Human Molecular Genetics* 21 (4): 799–810.
 80. Feliciano, David M., Tiffany Su, Jean Lopez, Jean-Claude Platel, i Angélique Bordey. 2011. „Single-cell Tsc1 knockout during corticogenesis generates tuber-like lesions and reduces seizure threshold in mice”. *Journal of Clinical Investigation* 121 (4): 1596–1607.
 81. Fleming, Angeleen, Heike Diekmann, i Paul Goldsmith. 2013. „Functional Characterisation of the Maturation of the Blood-Brain Barrier in Larval Zebrafish”. *PLoS ONE*.
 82. Fleming, Angeleen, i David C. Rubinsztein. 2011. „Zebrafish as a model to understand autophagy and its role in neurological disease”. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Elsevier.
 83. Fontana, Barbara D, Paola R Ziani, Julia Canzian, Nathana J Mezzomo, Talise E Müller, Matheus M. dos Santos, Vania L Loro, Nilda V Barbosa, Carlos F Mello, i Denis B Rosemberg. 2019. „Taurine Protects from Pentylentetrazole-Induced Behavioral and Neurochemical Changes in Zebrafish”. *Molecular Neurobiology* 56 (1): 583–94.
 84. Franz, David N., Elena Belousova, Steven Sparagana, E. Martina Bebin, Michael D. Frost, Rachel Kuperman, Olaf Witt, i wsp. 2016. „Long-term use of everolimus in patients with tuberous sclerosis complex: Final results from the EXIST-1 study”. *PLoS*

ONE 11 (6).

85. Friedrich, Rainer W., i Sigrun I. Korsching. 1997. „Combinatorial and chemotopic odorant coding in the zebrafish olfactory bulb visualized by optical imaging”. *Neuron* 18 (5): 737–52.
86. Fritzsche, Bernd, Dave Nichols, i Gary O. Gauthier. 2008. „Evolution of the Hindbrain”. W *Encyclopedia of Neuroscience*, 1351–56. Springer Berlin Heidelberg.
87. Fu, Cary, Bryan Cawthon, William Clinkscales, Adrienne Bruce, Peggy Winzenburger, i Kevin C. Ess. 2012. „GABAergic interneuron development and function is modulated by the Tsc1 gene”. *Cerebral Cortex* 22 (9): 2111–19.
88. Gadea, Gilles, i Anne Blangy. 2014. „Dock-family exchange factors in cell migration and disease”. *European Journal of Cell Biology*. Eur J Cell Biol.
89. Gawel, Kinga, Melanie Langlois, Teresa Martins, Wietske van der Ent, Ettore Tiraboschi, Maxime Jacmin, Alexander D. Crawford, i Camila V. Esguerra. 2020. „Seizing the moment: Zebrafish epilepsy models”. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Pergamon.
90. Geng, Yijie, i Randall T. Peterson. 2019. „The zebrafish subcortical social brain as a model for studying social behavior disorders”. *DMM Disease Models and Mechanisms*. Company of Biologists.
91. Goldsmith, Paul. 2004. „Zebrafish as a pharmacological tool: The how, why and when”. *Current Opinion in Pharmacology*. Curr Opin Pharmacol.
92. Golec, Weronika, Elżbieta Sołowiej, Jolanta Strzelecka, Elżbieta Jurkiewicz, i Sergiusz Józwiak. 2021. „Vigabatrin — new data on indications and safety in paediatric epilepsy”. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, wrzesień.
93. Gonzalez, Andres, Guillermo Moya-Alvarado, Christian Gonzalez-Billaut, i Francisca C. Bronfman. 2016. „Cellular and molecular mechanisms regulating neuronal growth by brain-derived neurotrophic factor”. *Cytoskeleton*. Cytoskeleton (Hoboken).
94. Goorden, Susanna M.I., Geeske M. Van Woerden, Louise Van Der Weerd, Jeremy P. Cheadle, i Ype Elgersma. 2007. „Cognitive deficits in Tsc1^{+/-} mice in the absence of cerebral lesions and seizures”. *Annals of Neurology* 62 (6): 648–55.
95. Goto, June, Delia M. Talos, Peter Klein, Wei Qin, Yvonne I. Chekaluk, Stefanie Anderl, Izabela A. Malinowska, i wsp. 2011. „Regulable neural progenitor-specific Tsc1 loss yields giant cells with organellar dysfunction in a model of tuberous sclerosis complex”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (45).

96. Griggs, Bradley L., Sydney Ladd, Robert A. Saul, Barbara R. DuPont, i Anand K. Srivastava. 2008. „Dedicator of cytokinesis 8 is disrupted in two patients with mental retardation and developmental disabilities”. *Genomics* 91 (2): 195–202.
97. Guo, Daji, Xiaoman Yang, i Lei Shi. 2020. „Rho GTPase Regulators and Effectors in Autism Spectrum Disorders: Animal Models and Insights for Therapeutics”. *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
98. Gupta, Vivek K., Yuyi You, Veer Bala Gupta, Alexander Klistorner, i Stuart L. Graham. 2013. „TrkB receptor signalling: Implications in neurodegenerative, psychiatric and proliferative disorders”. *International Journal of Molecular Sciences*. Int J Mol Sci.
99. Haditsch, Ursula, Matthew P. Anderson, Julia Freewoman, Branden Cord, Harish Babu, Cord Brakebusch, i Theo D. Palmer. 2013. „Neuronal Rac1 is required for learning-evoked neurogenesis”. *Journal of Neuroscience* 33 (30): 12229–41.
100. Haditsch, Ursula, Dino P. Leone, Mélissa Farinelli, Anna Chrostek-Grashoff, Cord Brakebusch, Isabelle M. Mansuy, Susan K. McConnell, i Theo D. Palmer. 2009. „A central role for the small GTPase Rac1 in hippocampal plasticity and spatial learning and memory”. *Molecular and Cellular Neuroscience* 41 (4): 409–19.
101. Hall, Alan, i Giovanna Lalli. 2010. „Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching.” *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
102. Hancock, Eleanor, i John P. Osborne. 1999. „Vigabatrin in the treatment of infantile spasms in tuberous sclerosis: Literature review”. *Journal of Child Neurology* 14 (2): 71–74.
103. Hashimoto, Mitsuhiro, i Masahiko Hibi. 2012. „Development and evolution of cerebellar neural circuits”. *Development, Growth & Differentiation* 54 (3): 373–89.
104. Hauptmann, Giselbert, Iris Söll, i Thomas Gerster. 2002. „The early embryonic zebrafish forebrain is subdivided into molecularly distinct transverse and longitudinal domains”. *W Brain Research Bulletin*, 57:371–75. Brain Res Bull.
105. Hayashi-Takagi, Akiko, Manabu Takaki, Nick Graziane, Saurav Seshadri, Hannah Murdoch, Allan J. Dunlop, Yuichi Makino, i wsp. 2010. „Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1”. *Nature Neuroscience* 13 (3): 327–32.
106. Helbig, K. L., C. Mroske, D. Moorthy, S. A. Sajan, i M. Velinov. 2017. „Biallelic loss-of-function variants in DOCK3 cause muscle hypotonia, ataxia, and intellectual disability”. *Clinical Genetics* 92 (4): 430–33.

107. Higashijima, Shin Ichi, Gail Mandel, i Joseph R. Fetcho. 2004. „Distribution of prospective glutamatergic, glycinergic, and gabaergic neurons in embryonic and larval zebrafish”. *Journal of Comparative Neurology* 480 (1): 1–8.
108. Higashijima, Shin Ichi, Mark A. Masino, Gail Mandel, i Joseph R. Fetcho. 2004. „Engrailed-1 expression marks a primitive class of inhibitory spinal interneuron”. *Journal of Neuroscience* 24 (25): 5827–39.
109. Hing, Benjamin, Leela Sathyaputri, i James B. Potash. 2018. „A comprehensive review of genetic and epigenetic mechanisms that regulate BDNF expression and function with relevance to major depressive disorder”. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.
110. Hodges, Angela K., Shaowei Li, Julie Maynard, Lee Parry, Richard Braverman, Jeremy P. Cheadle, Jeffrey E. DeClue, i Julian R. Sampson. 2001. „Pathological mutations in TSC1 and TSC2 disrupt the interaction between hamartin and tuberlin”. *Human Molecular Genetics* 10 (25): 2899–2905.
111. Hoeffler, Charles A., i Eric Klann. 2010. „mTOR signaling: At the crossroads of plasticity, memory and disease”. *Trends in Neurosciences*. Trends Neurosci.
112. Holmes, Gregory L., Carl E. Stafstrom, Scott C. Baraban, Edward Bertram, Patrick Bolton, Amy Brooks-Kayal, Harry T. Chugani, i wsp. 2007. „Tuberous sclerosis complex and epilepsy: Recent developments and future challenges”. *Epilepsia*. Epilepsia.
113. Huang, Eric J., i Louis F. Reichardt. 2003. „Trk receptors: Roles in neuronal signal transduction”. *Annual Review of Biochemistry*. Annu Rev Biochem.
114. Huang, Jingxiang, i Brendan D. Manning. 2008. „The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth”. *Biochemical Journal*.
115. Huang, Miaoqi, Chunmei Liang, Shengnan Li, Jifeng Zhang, Daji Guo, Bo Zhao, Yuyang Liu, i wsp. 2020. „Two Autism/Dyslexia Linked Variations of DOCK4 Disrupt the Gene Function on Rac1/Rap1 Activation, Neurite Outgrowth, and Synapse Development”. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13 (styczeń).
116. Hwang, W Y, Y Fu, D Reyon, M L Maeder, S Q Tsai, J D Sander, R T Peterson, J R Yeh, i J K Joung. 2013. „Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system”. *Nat Biotechnol*.
117. Im, Kiho, Banu Ahtam, Daniel Haehn, Jurriaan M. Peters, Simon K. Warfield, Mustafa Sahin, P. Ellen Grant, i P. Ellen Grant. 2016. „Altered Structural Brain Networks in Tuberous Sclerosis Complex”. *Cerebral Cortex* 26 (5): 2046–58.

118. Inoki, Ken, Yong Li, Tian Xu, i Kun Liang Guan. 2003. „Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling”. *Genes and Development* 17 (15): 1829–34.
119. Inoki, Ken, Yong Li, Tianquan Zhu, Jun Wu, i Kun Liang Guan. 2002. „TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling”. *Nature Cell Biology* 4 (9): 648–57.
120. Inoki, Ken, Tianqing Zhu, i Kun Liang Guan. 2003. „TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival”. *Cell* 115 (5): 577–90.
121. Iughetti, Lorenzo, Laura Lucaccioni, Francesco Fugetto, Barbara Predieri, Alberto Berardi, i Fabrizio Ferrari. 2018. „Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy: a systematic review”. *Neuropeptides*. Churchill Livingstone.
122. Jang, Hyun Jun, Yong Ryoul Yang, Jung Kuk Kim, Jang Hyun Choi, Young Kyo Seo, Yong Hwa Lee, Jeung Eun Lee, Sung Ho Ryu, i Pann Ghill Suh. 2013. „Phospholipase C- γ 1 involved in brain disorders”. *Advances in Biological Regulation*. Adv Biol Regul.
123. Jaworski, Jacek, Samantha Spangler, Daniel P. Seeburg, Casper C. Hoogenraad, i Morgan Sheng. 2005. „Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase- Akt-mammalian target of rapamycin pathway”. *Journal of Neuroscience* 25 (49): 11300–312.
124. Jesuthasan, Suresh. 2012. „Fear, anxiety, and control in the zebrafish”. *Developmental Neurobiology* 72 (3): 395–403.
125. Jones, Iwan, Anna Carin Häggglund, Gunilla Törnqvist, Christoffer Nord, Ulf Ahlgren, i Leif Carlsson. 2015. „A novel mouse model of tuberous sclerosis complex (tsc): Eye-specific tsc1-Ablation disrupts visual-pathway development”. *DMM Disease Models and Mechanisms* 8 (12): 1517–29.
126. Jordi, Josua, Drago Guggiana-Nilo, Andrew D. Bolton, Srishti Prabha, Kaitlyn Ballotti, Kristian Herrera, Andrew J. Rennekamp, Randall T. Peterson, Thomas A. Lutz, i Florian Engert. 2018. „High-throughput screening for selective appetite modulators: A multibehavioral and translational drug discovery strategy”. *Science Advances* 4 (10): 1966.
127. Kalueff, Allan V., Adam Michael Stewart, i Robert Gerlai. 2014. „Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders”. *Trends in Pharmacological Sciences*.
128. Kalueff, Allan V, Michael Gebhardt, Adam Michael Stewart, Jonathan M Cachat, Mallorie Brimmer, Jonathan S Chawla, Cassandra Craddock, i wsp. 2013. „Towards a

- comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond.” *Zebrafish* 10 (1): 70–86.
129. Kedra, Magdalena, Katarzyna Banasiak, Katarzyna Kisielewska, Lidia Wolinska-Nizioł, Jacek Jaworski, i Justyna Zmorzynska. 2020. „TrkB hyperactivity contributes to brain dysconnectivity, epileptogenesis, and anxiety in zebrafish model of Tuberous Sclerosis Complex”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (4): 2170–79.
 130. Kilincaslan, Ayse, Burcu Ece Kok, Pinar Tekturk, Cengiz Yalcinkaya, Cigdem Ozkara, i Zuhai Yapici. 2017. „Beneficial Effects of Everolimus on Autism and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Symptoms in a Group of Patients with Tuberous Sclerosis Complex”. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology* 27 (4): 383–88.
 131. Kim, Hyeonhui, Minki Kim, Sun-Kyoung Im, i Sungsoon Fang. 2018. „Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes”. *Laboratory Animal Research* 34 (4): 147.
 132. Kim, Jang Keun, i Jeong Ho Lee. 2019. „Mechanistic target of rapamycin pathway in epileptic disorders”. *Journal of Korean Neurosurgical Society* 62 (3): 272–87.
 133. Kim, Jeong Yoon, Mi Hee Oh, Laura P. Bernard, Ian G. Macara, i Huaye Zhang. 2011. „The RhoG/ELMO1/Dock180 signaling module is required for spine morphogenesis in hippocampal neurons”. *Journal of Biological Chemistry* 286 (43): 37615–24.
 134. Kim, Seok Hyung, Christina K. Speirs, Lilianna Solnica-Krezel, i Kevin C. Ess. 2011. „Zebrafish model of tuberous sclerosis complex reveals cell-autonomous and non-cell-autonomous functions of mutant tuberin”. *DMM Disease Models and Mechanisms* 4 (2): 255–67.
 135. Kimmel, Charles B. 1993. „Patterning the Brain of the Zebrafish Embryo”. *Annual Review of Neuroscience* 16 (1): 707–32.
 136. Kinkhabwalaa, Amina, Michael Riley, Minoru Koyama, Joost Monen, Chie Satou, Yukiko Kimura, Shin Ichi Higashijima, i Joseph Fetcho. 2011. „A structural and functional ground plan for neurons in the hindbrain of zebrafish”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (3): 1164–69.
 137. Kishi, Masashi, Y. Albert Pan, Justin Gage Crump, i Joshua R. Sanes. 2005. „Mammalian SAD kinases are required for neuronal polarization”. *Science* 307 (5711): 929–32.
 138. Kita, Elizabeth M., Ethan K. Scott, i Geoffrey J. Goodhill. 2015. „Topographic wiring of the retinotectal connection in zebrafish”. *Developmental Neurobiology* 75 (6): 542–

56.

139. Knox, Sarah, Hong Ge, Brian D. Dimitroff, Yi Ren, Katie A. Howe, Andrew M. Arsham, Mathew C. Easterday, Thomas P. Neufeld, Michael B. O'Connor, i Scott B. Selleck. 2007. „Mechanisms of TSC-mediated Control of Synapse Assembly and Axon Guidance”. Zredagowane przez Hugo J. Bellen. *PLoS ONE* 2 (4): e375.
140. Koene, Linda M.C., Saskia E. van Grondelle, Martina Proietti Onori, Ilse Wallaard, Nathalie H.R.M. Kooijman, Annabel van Oort, Jadwiga Schreiber, i Ype Elgersma. 2019. „Effects of antiepileptic drugs in a new TSC/mTOR-dependent epilepsy mouse model”. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 6 (7): 1273–91.
141. Kokel, David, Jennifer Bryan, Christian Laggner, Rick White, Chung Yan J. Cheung, Rita Mateus, David Healey, i wsp. 2010. „Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish”. *Nature Chemical Biology* 6 (3): 231–37.
142. Köster, Reinhard W., i Scott E. Fraser. 2001. „Direct imaging of in vivo neuronal migration in the developing cerebellum”. *Current Biology* 11 (23): 1858–63.
143. Kotulska, Katarzyna, Elzbieta Jurkiewicz, Dorota Domańska-Pakieła, Wiesława Grajkowska, Marek Mandra, Julita Borkowska, i Sergiusz Józwiak. 2014. „Epilepsy in newborns with tuberous sclerosis complex”. *European Journal of Paediatric Neurology* 18 (6): 714–21.
144. Krishnan, Michelle L., Olivier Commowick, Shafali S. Jeste, Neil Weisenfeld, Arne Hans, Matthew C. Gregas, Mustafa Sahin, i Simon K. Warfield. 2010. „Diffusion Features of White Matter in Tuberous Sclerosis With Tractography”. *Pediatric Neurology* 42 (2): 101–6.
145. Krueger, Darcy A., Marguerite M. Care, Karen Agricola, Cindy Tudor, Maxwell Mays, i David Neal Franz. 2013. „Everolimus long-term safety and efficacy in subependymal giant cell astrocytoma”. *Neurology* 80 (6): 574–80.
146. Krueger, Darcy A., Anjali Sadhwani, Anna W. Byars, Petrus J. de Vries, David N. Franz, Vicky H. Whittemore, Rajna Filip-Dhima, Donna Murray, Kush Kapur, i Mustafa Sahin. 2017. „Everolimus for treatment of tuberous sclerosis complex-associated neuropsychiatric disorders”. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 4 (12): 877–87.
147. Krueger, Darcy A., Angus A. Wilfong, Maxwell Mays, Christina M. Talley, Karen Agricola, Cindy Tudor, Jamie Capal, Katherine Holland-Bouley, i David Neal Franz. 2016. „Long-term treatment of epilepsy with everolimus in tuberous sclerosis”. *Neurology* 87 (23): 2408–15.

148. Kumar, Vikas, Ming Xiang Zhang, Michael W. Swank, Jeannette Kunz, i Gang Yi Wu. 2005. „Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways”. *Journal of Neuroscience* 25 (49): 11288–99.
149. Kwon, Munjin, José R. Fernández, Gregory F. Zegarek, Sean B. Lo, i Bonnie L. Firestein. 2011. „BDNF-promoted increases in proximal dendrites occur via CREB-dependent transcriptional regulation of cypin”. *Journal of Neuroscience* 31 (26): 9735–45.
150. Lagae, Lieven, Helène Verhelst, Bertien Ceulemans, Linda De Meirleir, Marie Cécile Nassogne, Valerie De Borchgrave, Marc D’Hooghe, Martine Foulon, i Patrick Van Bogaert. 2010. „Treatment and long term outcome in West syndrome: The clinical reality. A multicentre follow up study”. *Seizure* 19 (3): 159–64.
151. Lal, Pradeep, Hideyuki Tanabe, Maximiliano L. Suster, Deepak Ailani, Yuri Kotani, Akira Muto, Mari Itoh, i wsp. 2018. „Identification of a neuronal population in the telencephalon essential for fear conditioning in zebrafish”. *BMC Biology* 16 (1).
152. Langova, Veronika, Karel Vales, Petra Horka, i Jiri Horacek. 2020. „The Role of Zebrafish and Laboratory Rodents in Schizophrenia Research”. *Frontiers in Psychiatry*. Frontiers Media SA.
153. Lau, C. Geoffrey, i Venkatesh N. Murthy. 2012. „Activity-dependent regulation of inhibition via GAD67”. *Journal of Neuroscience* 32 (25): 8521–31.
154. Laurin, Mélanie, i Jean François Côté. 2014. „Insights into the biological functions of Dock family guanine nucleotide exchange factors”. *Genes and Development*.
155. Lazarus, Matthew S., Keerthi Krishnan, i Z. Josh Huang. 2015. „GAD67 deficiency in parvalbumin interneurons produces deficits in inhibitory transmission and network disinhibition in mouse prefrontal cortex”. *Cerebral Cortex* 25 (5): 1290–96.
156. Leclezio, Loren, Sugnet Gardner-Lubbe, i Petrus J. de Vries. 2018. „Is It Feasible to Identify Natural Clusters of TSC-Associated Neuropsychiatric Disorders (TAND)?” *Pediatric Neurology* 81 (kwiecień): 38–44.
157. Leclezio, Loren, Anna Jansen, Vicky H. Whittemore, i Petrus J. De Vries. 2015. „Pilot validation of the tuberous sclerosis-associated neuropsychiatric disorders (TAND) checklist”. *Pediatric Neurology* 52 (1): 16–24.
158. Lee, Allana, Michelle Maldonado, Marianna Baybis, Christopher A. Walsh, Bernd Scheithauer, Raymond Yeung, Jack Parent, Howard L. Weiner, i Peter B. Crino. 2003. „Markers of cellular proliferation are expressed in cortical tubers”. *Annals of Neurology* 53 (5): 668–73.

159. Lee, R., P. Kermani, K. K. Teng, i B. L. Hempstead. 2001. „Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins”. *Science* 294 (5548): 1945–48.
160. Lee, T. C., R. L. Kashyap, i C. N. Chu. 1994. „Building Skeleton Models via 3-D Medial Surface Axis Thinning Algorithms”. *CVGIP: Graphical Models and Image Processing* 56 (6): 462–78.
161. Leuner, B., i T. J. Shors. 2010. „Synapse Formation and Memory”. W *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*, 349–55. Academic Press.
162. Lewis, J. C., H. V. Thomas, K. C. Murphy, i J. R. Sampson. 2004. „Genotype and psychological phenotype in tuberous sclerosis”. *Journal of Medical Genetics* 41 (3): 203–7.
163. Li, Xiaoling, Xue Gao, Guofa Liu, Wencheng Xiong, Jane Wu, i Yi Rao. 2008. „Netrin signal transduction and the guanine nucleotide exchange factor DOCK180 in attractive signaling”. *Nature Neuroscience* 11 (1): 28–35.
164. Lin, Thiri W., Stephen C. Harward, Yang Zhong Huang, i James O. McNamara. 2020. „Targeting BDNF/TrkB pathways for preventing or suppressing epilepsy”. *Neuropharmacology*. Pergamon.
165. Lipton, Jonathan O., i Mustafa Sahin. 2014. „The Neurology of mTOR”. *Neuron* 84 (2): 275–91.
166. Liu, Gumei, Bin Gu, Xiao Ping He, Rasesh B. Joshi, Harold D. Wackerle, Ramona Marie Rodriguiz, William C. Wetsel, i James O. McNamara. 2013. „Transient Inhibition of TrkB Kinase after Status Epilepticus Prevents Development of Temporal Lobe Epilepsy”. *Neuron* 79 (1): 31–38.
167. Liu, Jia, Ekaterina Likhtik, A. Duke Shereen, Tracy A. Dennis-Tiwary, i Patrizia Casaccia. 2020. „White Matter Plasticity in Anxiety: Disruption of Neural Network Synchronization During Threat-Safety Discrimination”. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14 (listopad): 351.
168. Lovett-Barron, Matthew, Aaron S. Andalman, William E. Allen, Sam Vesuna, Isaac Kauvar, Vanessa M. Burns, i Karl Deisseroth. 2017. „Ancestral Circuits for the Coordinated Modulation of Brain State”. *Cell* 171 (6): 1411-1423.e17.
169. Lozovaya, N., S. Gataullina, T. Tsintsadze, V. Tsintsadze, E. Pallesi-Pocachard, M. Minlebaev, N. A. Goriounova, i wsp. 2014. „Selective suppression of excessive GluN2C expression rescues early epilepsy in a tuberous sclerosis murine model”. *Nature Communications* 5 (1): 1–15.
170. Luo, Yongting, Wenyi Xu, Guannan Li, i Wei Cui. 2018. „Weighing in on mTOR

- complex 2 signaling: The expanding role in cell metabolism". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited.
171. Ma, Li, Zhenbang Chen, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, i Pier Paolo Pandolfi. 2005. „Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk: Implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis". *Cell* 121 (2): 179–93.
 172. MacPhail, R. C., J. Brooks, D. L. Hunter, B. Padnos, T. D. Irons, i S. Padilla. 2009. „Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol". *NeuroToxicology* 30 (1): 52–58.
 173. Magri, Laura, Marco Cambiaghi, Manuela Cominelli, Clara Alfaro-Cervello, Marco Corsi, Mauro Pala, Alessandro Bulfone, i wsp. 2011. „Sustained activation of mTOR pathway in embryonic neural stem cells leads to development of tuberous sclerosis complex-associated lesions". *Cell Stem Cell* 9 (5): 447–62.
 174. Makihara, Shirin, Steves Morin, Julien Ferent, Jean François Côté, Patricia T. Yam, i Frédéric Charron. 2018. „Polarized Dock Activity Drives Shh-Mediated Axon Guidance". *Developmental Cell* 46 (4): 410-425.e7.
 175. Marom, Daphna. 2020. „Genetics of tuberous sclerosis complex: an update". *Child's Nervous System* 36 (10): 2489–96.
 176. Martin, Katie R., Wanding Zhou, Megan J. Bowman, Juliann Shih, Kit Sing Au, Kristin E. Dittenhafer-Reed, Kellie A. Sisson, i wsp. 2017. „The genomic landscape of tuberous sclerosis complex". *Nature Communications* 8 (czerwiec): 15816.
 177. Mathuru, Ajay S., i Suresh Jesuthasan. 2013. „The medial habenula as a regulator of anxiety in adult zebrafish." *Frontiers in neural circuits*. Front Neural Circuits.
 178. McKinney, William T, i William E Bunney. 1969. „Animal model of depression: I. Review of evidence: Implications for research". *Archives of general psychiatry* 21 (2): 240–48.
 179. Meikle, Lynsey, Kristen Pollizzi, Anna Egnor, Ioannis Kramvis, Heidi Lane, Mustafa Sahin, i David J. Kwiatkowski. 2008. „Response of a neuronal model of tuberous sclerosis to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors: Effects on mTORC1 and Akt signaling lead to improved survival and function". *Journal of Neuroscience* 28 (21): 5422–32.
 180. Meikle, Lynsey, Delia M. Talos, Hiroaki Onda, Kristen Pollizzi, Alexander Rotenberg, Mustafa Sahin, Frances E. Jensen, i David J. Kwiatkowski. 2007. „A mouse model of tuberous sclerosis: Neuronal loss of Tsc1 causes dysplastic and ectopic neurons, reduced myelination, seizure activity, and limited survival". *Journal of Neuroscience* 27 (21):

- 5546–58.
181. Meller, Nahum, Sylvain Merlot, i Chittibabu Guda. 2005. „CZH proteins: A new family of Rho-GEFs”. *Journal of Cell Science*. The Company of Biologists.
 182. Meshalkina, Darya A., Marina N. Kizlyk, Elana V. Kysil, Adam D. Collier, David J. Echevarria, Murilo S. Abreu, Leonardo J.G. Barcellos, Cai Song, i Allan V. Kalueff. 2017. „Understanding zebrafish cognition”. *Behavioural Processes* 141: 229–41.
 183. Miyasaka, Nobuhiko, Kozo Morimoto, Tatsuya Tsubokawa, Shin Ichi Higashijima, Hitoshi Okamoto, i Yoshihiro Yoshihara. 2009. „From the olfactory bulb to higher brain Centers: Genetic visualization of secondary olfactory pathways in zebrafish”. *Journal of Neuroscience* 29 (15): 4756–67.
 184. Miyata, Shigeo, Ryota Kumagaya, Toshikazu Kakizaki, Kazuyuki Fujihara, Kaori Wakamatsu, i Yuchio Yanagawa. 2019. „Loss of glutamate decarboxylase 67 in somatostatin-expressing neurons leads to anxiety-like behavior and alteration in the akt/gsk3 β signaling pathway”. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 13 (maj).
 185. Mizuguchi, Masashi. 2007. „Abnormal giant cells in the cerebral lesions of tuberous sclerosis complex”. *Congenital Anomalies* 47 (1): 2–8.
 186. Mizuguchi, Masashi, i Sachio Takashima. 2001. „Neuropathology of tuberous sclerosis”. *W Brain and Development*, 23:508–15. Brain Dev.
 187. Moens, Cecilia B., i Victoria E. Prince. 2002. „Constructing the hindbrain: Insights from the zebrafish”. *Developmental Dynamics*. John Wiley & Sons, Ltd.
 188. Moon, Uk Yeol, Jun Young Park, Raehee Park, Jennifer Y. Cho, Lucinda J. Hughes, James McKenna, Laura Goetzl, i wsp. 2015. „Impaired Reelin-Dab1 signaling contributes to neuronal migration deficits of tuberous sclerosis complex”. *Cell Reports* 12 (6): 965–78.
 189. Mowla, S. Javad, Hooman F. Farhadi, Sangeeta Pareek, Jasvinder K. Atwal, Stephen J. Morris, Nabil G. Seidah, i Richard A. Murphy. 2001. „Biosynthesis and Post-translational Processing of the Precursor to Brain-derived Neurotrophic Factor”. *Journal of Biological Chemistry* 276 (16): 12660–66.
 190. Mueller, Thomas. 2005. *Atlas of early zebrafish brain development: a tool for molecular neurogenetics / Thomas Mueller and Mario F. Wullmann*.
 191. Mueller, Thomas. 2012. „What is the thalamus in zebrafish?” *Frontiers in Neuroscience* 6 (MAY): 1–14.
 192. Mueller, Thomas, Zhiqiang Dong, Michael A. Berberoglu, i Su Guo. 2011. „The dorsal pallium in zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei)”. *Brain Research* 1381

- (marzec): 95–105.
193. Mueller, Thomas, Mario F. Wullimann, i Su Guo. 2008. „Early teleostean basal ganglia development visualized by zebrafish *Dlx2a*, *Lhx6*, *Lhx7*, *Tbr2* (*eomesa*), and *GAD67* gene expression”. *Journal of Comparative Neurology* 507 (2): 1245–57.
 194. Nabbout, Rima, Mathieu Kuchenbuch, Catherine Chiron, i Paolo Curatolo. 2021. „Pharmacotherapy for Seizures in Tuberous Sclerosis Complex”. *CNS Drugs*. CNS Drugs.
 195. Nakayama, Ann Y., Matthew B. Harms, i Liqun Luo. 2000. „Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons”. *Journal of Neuroscience* 20 (14): 5329–38.
 196. Namekata, Kazuhiko, Xiaoli Guo, Atsuko Kimura, Nobutaka Arai, Chikako Harada, i Takayuki Harada. 2019. „DOCK8 is expressed in microglia, and it regulates microglial activity during neurodegeneration in murine disease models”. *Journal of Biological Chemistry* 294 (36): 13421–33.
 197. Namekata, Kazuhiko, Chikako Harada, Choji Taya, Xiaoli Guo, Hideo Kimura, Luis F. Parada, i Takayuki Harada. 2010. „Dock3 induces axonal outgrowth by stimulating membrane recruitment of the WAVE complex”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (16): 7586–91.
 198. Namekata, Kazuhiko, Hayaki Watanabe, Xiaoli Guo, Daiji Kittaka, Kazuto Kawamura, Atsuko Kimura, Chikako Harada, i Takayuki Harada. 2012. „Dock3 regulates BDNF-TrkB signaling for neurite outgrowth by forming a ternary complex with Elmo and RhoG”. *Genes to Cells* 17 (8): 688–97.
 199. Nie, Duyu, Alessia Di Nardo, Juliette M. Han, Hasani Baharanyi, Ioannis Kramvis, Thanhthao Huynh, Sandra Dabora, i wsp. 2010. „Tsc2-Rheb signaling regulates EphA-mediated axon guidance”. *Nature Neuroscience* 13 (2): 163–72.
 200. Nobes, Catherine D., i Alan Hall. 1995. „Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia”. *Cell* 81 (1): 53–62.
 201. Nobes, Catherine D., i Alan Hall. 1999. „Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement”. *Journal of Cell Biology* 144 (6): 1235–44.
 202. Northrup, Hope, Mary E. Aronow, E. Martina Bebin, John Bissler, Thomas N. Darling, Petrus J. de Vries, Michael D. Frost, i wsp. 2021. „Updated International Tuberous Sclerosis Complex Diagnostic Criteria and Surveillance and Management Recommendations”. *Pediatric Neurology* 123 (październik): 50–66.

203. Norton, William H. J. 2012. „Measuring Larval Zebrafish Behavior: Locomotion, Thigmotaxis, and Startle”. W .
204. Orger, Michael B., i Herwig Baier. 2005. „Channeling of red and green cone inputs to the zebrafish optomotor response”. *Visual Neuroscience* 22 (3): 275–81.
205. Orger, Michael B., i Gonzalo G. de Polavieja. 2017. „Zebrafish Behavior: Opportunities and Challenges”. *Annual Review of Neuroscience* 40 (1): annurev-neuro-071714-033857.
206. OSBORNE, JOHN P., ALAN FRYER, i DAVID WEBB. 1991. „Epidemiology of Tuberous Sclerosis”. *Annals of the New York Academy of Sciences* 615 (1): 125–27.
207. Pagnamenta, Alistair T., Elena Bacchelli, Maretha V. De Jonge, Ghazala Mirza, Thomas S. Scerri, Fiorella Minopoli, Andreas Chiochetti, i wsp. 2010. „Characterization of a family with rare deletions in CNTNAP5 and DOCK4 suggests novel risk loci for autism and dyslexia”. *Biological Psychiatry* 68 (4): 320–28.
208. Panula, Pertti, Ville Sallinen, Maria Sundvik, Juha Kolehmainen, Veera Torkko, Anu Tiittula, Maxim Moshnyakov, i Piotr Podlasz. 2006. „Modulatory Neurotransmitter Systems and Behavior: Towards Zebrafish Models of Neurodegenerative Diseases”. *Zebrafish*.
209. Park, Hyungju, i Mu Ming Poo. 2013. „Neurotrophin regulation of neural circuit development and function”. *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group.
210. Parker, Matthew O., Alistair J. Brock, Robert T. Walton, i Caroline H. Brennan. 2013. „The role of zebrafish (*Danio rerio*) in dissecting the genetics and neural circuits of executive function”. *Frontiers in Neural Circuits* 7 (April): 63.
211. Patton, Elizabeth, Leonard I. Zon, i David M. Langenau. 2021. „Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials”. *Nature Reviews Drug Discovery*. Nat Rev Drug Discov.
212. Perrault, Isabelle, Fadi F. Hamdan, Marlène Rio, José Mario Capo-Chichi, Nathalie Boddaert, Jean Claude Décarie, Bruno Maranda, i wsp. 2014. „Mutations in DOCK7 in individuals with epileptic encephalopathy and cortical blindness”. *American Journal of Human Genetics* 94 (6): 891–97.
213. Peters, Jurriaan M., Anna Prohl, Kush Kapur, Audrey Nath, Benoit Scherrer, Sean Clancy, Sanjay P. Prabhu, i wsp. 2019. „Longitudinal Effects of Everolimus on White Matter Diffusion in Tuberous Sclerosis Complex”. *Pediatric Neurology* 90 (styczeń): 24–30.
214. Peters, Jurriaan M., Mustafa Sahin, Vanessa K. Vogel-Farley, Shafali S. Jeste, Charles

- A. Nelson, Matthew C. Gregas, Sanjay P. Prabhu, Benoit Scherrer, i Simon K. Warfield. 2012. „Loss of White Matter Microstructural Integrity Is Associated with Adverse Neurological Outcome in Tuberous Sclerosis Complex”. *Academic Radiology* 19 (1): 17–25.
215. Petrasek, Tomas, Iveta Vojtechova, Ondrej Klovrc, Klara Tuckova, Cestmir Vejmla, Jakub Rak, Anna Sulakova, i wsp. 2021. „mTOR inhibitor improves autistic-like behaviors related to Tsc2 haploinsufficiency but not following developmental status epilepticus”. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 13 (1): 14.
216. Piedimonte, Leandro R., Ian K. Wailes, i Howard L. Weiner. 2006. „Tuberous sclerosis complex: molecular pathogenesis and animal models.” *Neurosurgical focus*. Neurosurg Focus.
217. Portugues, Ruben, i Florian Engert. 2009. „The neural basis of visual behaviors in the larval zebrafish”. *Current Opinion in Neurobiology*. Curr Opin Neurobiol.
218. Prentzell, Mirja Tamara, Ulrike Rehbein, Marti Cadena Sandoval, Ann Sofie De Meulemeester, Ralf Baumeister, Laura Brohée, Bianca Berdel, i wsp. 2021. „G3BPs tether the TSC complex to lysosomes and suppress mTORC1 signaling”. *Cell* 184 (3): 655-674.e27.
219. Prober, David A., Jason Rihel, Anthony A. Onah, Rou Jia Sung, i Alexander F. Schier. 2006. „Hypocretin/orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in zebrafish”. *Journal of Neuroscience* 26 (51): 13400–410.
220. Prohl, Anna K., Benoit Scherrer, Xavier Tomas-Fernandez, Peter E. Davis, Rajna Filip-Dhima, Sanjay P. Prabhu, Jurriaan M. Peters, i wsp. 2019. „Early white matter development is abnormal in tuberous sclerosis complex patients who develop autism spectrum disorder”. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 11 (1).
221. Puelles, Luis, i John L.R. Rubenstein. 2003. „Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model”. *Trends in Neurosciences* 26 (9): 469–76.
222. Pulsifer, Margaret B., Elisabeth B. Winterkorn, i Elizabeth A. Thiele. 2007. „Psychological profile of adults with tuberous sclerosis complex”. *Epilepsy and Behavior* 10 (3): 402–6.
223. Qin, Wei, Jennifer A. Chan, Harry V. Vinters, Gary W. Mathern, David N. Franz, Bruce E. Taillon, Pascal Bouffard, i David J. Kwiatkowski. 2010. „Analysis of TSC cortical tubers by deep sequencing of TSC1, TSC2 and KRAS demonstrates that small second-hit mutations in these genes are rare events”. *Brain Pathology*.
224. Rao, Vikram R., i Steven Finkbeiner. 2007. „NMDA and AMPA receptors: old

- channels, new tricks”. *Trends in Neurosciences*. Trends Neurosci.
225. Reichardt, Louis F. 2006. „Neurotrophin-Regulated Signalling Pathways”. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 361 (1473): 1545–64.
 226. Richards, L. J. 2002. „Axonal pathfinding mechanisms at the cortical midline and in the development of the corpus callosum”. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35 (12): 1431–39.
 227. Rink, Elke, i Mario F. Wullimann. 2004. „Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*)”. *Brain Research* 1011 (2): 206–20.
 228. Roberson, Sara, i Marnie E. Halpern. 2018. „Development and connectivity of the habenular nuclei”. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Semin Cell Dev Biol.
 229. Rodríguez, F., E. Durán, A. Gómez, F. M. Ocaña, E. Álvarez, F. Jiménez-Moya, C. Broglio, i C. Salas. 2005. „Cognitive and emotional functions of the teleost fish cerebellum”. *W Brain Research Bulletin*, 66:365–70. Brain Res Bull.
 230. Rosas, Juan M. 2017. „Dishabituation BT - Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior”. W , zredagowane przez Jennifer Vonk i Todd Shackelford, 1–2. Cham: Springer International Publishing.
 231. Ruffolo, Gabriele, Anand Iyer, Pierangelo Cifelli, Cristina Roseti, Angelika Mühlebner, Jackelien van Scheppingen, Theresa Scholl, i wsp. 2016. „Functional aspects of early brain development are preserved in tuberous sclerosis complex (TSC) epileptogenic lesions”. *Neurobiology of Disease* 95: 93–101.
 232. Ruvinsky, Igor, Nitzan Sharon, Tal Lerer, Hannah Cohen, Miri Stolovich-Rain, Tomer Nir, Yuval Dor, Philip Zisman, i Oded Meyuhas. 2005. „Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis”. *Genes and Development* 19 (18): 2199–2211.
 233. Salussolia, Catherine L., Katarzyna Klonowska, David J. Kwiatkowski, i Mustafa Sahin. 2019. „Genetic Etiologies, Diagnosis, and Treatment of Tuberous Sclerosis Complex”. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 20 (sierpień): 217–40.
 234. Samueli, Sharon, Klaus Abraham, Anastasia Dressler, Gudrun Gröppel, Angelika Mühlebner-Fahrngruber, Theresa Scholl, Gregor Kasprian, Franco Laccone, i Martha Feucht. 2016. „Efficacy and safety of Everolimus in children with TSC - associated epilepsy - Pilot data from an open single-center prospective study”. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 11 (1): 1–8.
 235. Sancak, Ozgur, Mark Nellist, Miriam Goedbloed, Peter Elfferich, Cokkie Wouters,

- Anneke Maat-Kievit, Bernard Zonnenberg, Senno Verhoef, Dicky Halley, i Ans van den Ouweland. 2005. „Mutational analysis of the TSC1 and TSC2 genes in a diagnostic setting: Genotype-phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in tuberous sclerosis complex”. *European Journal of Human Genetics* 13 (6): 731–41.
236. Sander, Jeffry D., Lindsay Cade, Cyd Khayter, Deepak Reyon, Randall T. Peterson, J. Keith Joung, i Jing Ruey J. Yeh. 2011. „Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs”. *Nature Biotechnology*. NIH Public Access.
237. Sato, Atsushi, Shinya Kasai, Toshiyuki Kobayashi, Yukio Takamatsu, Okio Hino, Kazutaka Ikeda, i Masashi Mizuguchi. 2012. „Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex” 3 (1): 1–9.
238. Schaks, Matthias, Grégory Giannone, i Klemens Rottner. 2019. „Actin dynamics in cell migration”. *Essays in Biochemistry* 63 (5): 483–95.
239. Scheldeman, Chloë, James D. Mills, Aleksandra Siekierska, Ines Serra, Daniëlle Copmans, Anand M. Iyer, Benjamin J. Whalley, i wsp. 2017. „mTOR-related neuropathology in mutant *tsc2* zebrafish: Phenotypic, transcriptomic and pharmacological analysis”. *Neurobiology of Disease* 108 (September): 225–37.
240. Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, i wsp. 2012. „Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.” *Nature methods* 9 (7): 676–82.
241. Schmidt, Rebecca, Uwe Strähle, i Steffen Scholpp. 2013. „Neurogenesis in zebrafish - from embryo to adult”. *Neural Development*. BioMed Central.
242. Schnabl, J, M. P.H. Litz, C Schneider, N. PenkoffLidbeck, S Bashiruddin, M. S. Schwartz, K Alligood, i M. J.F. Barresi. 2020. „Characterizing the diverse cells that associate with the developing commissures of the zebrafish forebrain”. *bioRxiv*, lipiec, 2020.07.16.205153.
243. Schneider, Caroline A, Wayne S Rasband, i Kevin W Eliceiri. 2012. „NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis”. *Nature Methods* 2012 9:7 9 (7): 671–75.
244. Schoonheim, Peter J., Aristides B. Arrenberg, Filippo Del Bene, i Herwig Baier. 2010. „Optogenetic localization and genetic perturbation of saccade-generating neurons in Zebrafish”. *Journal of Neuroscience* 30 (20): 7111–20.
245. Sernagor, Evelyne, Francois Chabrol, Guillaume Bony, i Laura Cancedda. 2010. „GABAergic control of neurite outgrowth and remodeling during development and adult neurogenesis: general rules and differences in diverse systems”. *Frontiers in*

- Cellular Neuroscience* 0 (APR): 11.
246. Serra, Ines, Chloë Scheldeman, Michael Bazelot, Benjamin J. Whalley, Mark L. Dallas, Peter A.M. de Witte, i Claire M. Williams. 2019. „Cannabidiol modulates phosphorylated rpS6 signalling in a zebrafish model of Tuberous Sclerosis Complex”. *Behavioural Brain Research* 363 (maj): 135–44.
 247. Sgadò, Paola, Mark Dunleavy, Sacha Genovesi, Giovanni Provenzano, i Yuri Bozzi. 2011. „The role of GABAergic system in neurodevelopmental disorders: a focus on autism and epilepsy”. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology* 3 (3): 223.
 248. Sharma, Ali, Charles A Hoeffler, Yukihiro Takayasu, Takahiro Miyawaki, Sean M McBride, Eric Klann, i R Suzanne Zukin. 2010. „Dysregulation of mTOR signaling in fragile X syndrome.” *The Journal of neuroscience*.
 249. Sharma, Priyanka, Vishnu Muraleedharan Saraswathy, Li Xiang, i Maximilian Fürthauer. 2019. „Notch-mediated inhibition of neurogenesis is required for zebrafish spinal cord morphogenesis”. *Scientific Reports* 9 (1): 1–18.
 250. Shi, Lei. 2013. „Dock protein family in brain development and neurological disease”. *Communicative and Integrative Biology*. Taylor & Francis.
 251. Shu, Tianzhi, Kenneth G. Butz, Celine Plachez, Richard M. Gronostajski, i Linda J. Richards. 2003. „Abnormal development of forebrain midline glia and commissural projections in Nfia knock-out mice”. *Journal of Neuroscience* 23 (1): 203–12.
 252. Singh, Raman, i Robert P. Carson. 2021. „Vigabatrin”. *StatPearls*, maj.
 253. Slegtenhorst, Marjon Van, Mark Nellist, Bas Nagelkerken, Jeremy Cheadle, Russell Snell, Ans Van Den Ouweland, Arnold Reuser, Julian Sampson, Dicky Halley, i Peter Van Der Sluijs. 1998. „Interaction between hamartin and tuberlin, the TSC1 and TSC2 gene products”. *Human Molecular Genetics* 7 (6): 1053–57.
 254. Sohal, Vikaas S., i John L.R. Rubenstein. 2019. „Excitation-inhibition balance as a framework for investigating mechanisms in neuropsychiatric disorders”. *Molecular Psychiatry* 24 (9): 1248–57.
 255. Stednitz, Sarah J., Erin M. McDermott, Denver Ncube, Alexandra Tallafuss, Judith S. Eisen, i Philip Washbourne. 2018. „Forebrain Control of Behaviorally Driven Social Orienting in Zebrafish”. *Current Biology* 28 (15): 2445-2451.e3.
 256. Steenbergen, Peter J., Juriaan R. Metz, Gert Flik, Michael K. Richardson, i Danielle L. Champagne. 2012. „Methods to Quantify Basal and Stress-Induced Cortisol Response in Larval Zebrafish”. W , 121–41. Humana Press, Totowa, NJ.

257. Steenbergen, Peter J., Michael K. Richardson, i Danielle L. Champagne. 2012. „The Light–Dark Preference Test for Larval Zebrafish”. W , 21–35.
258. Stephenson-Jones, M., E. Samuelsson, J. Ericsson, B. Robertson, i S. Grillner. 2011. „Evolutionary conservation of the basal ganglia as a common vertebrate mechanism for action selection.” *Current biology : CB* 21 (13): 1081–91.
259. Stewart, Adam Michael, Daniel Desmond, Evan Kyzar, Siddharth Gaikwad, Andrew Roth, Russell Riehl, Christopher Collins, Louis Monnig, Jeremy Green, i Allan V. Kalueff. 2012. „Perspectives of zebrafish models of epilepsy: What, how and where next?” *Brain Research Bulletin* 87 (2–3): 135–43.
260. Stork, Oliver, H. Yamanaka, S. Stork, N. Kume, i K. Obata. 2003. „Altered conditioned fear behavior in glutamate decarboxylase 65 null mutant mice”. *Genes, Brain and Behavior* 2 (2): 65–70.
261. Stork, Oliver, Feng Yun Ji, Koichi Kaneko, Simone Stork, Yuko Yoshinobu, Takahiro Moriya, Shigenobu Shibata, i Kunihiko Obata. 2000. „Postnatal development of a GABA deficit and disturbance of neural functions in mice lacking GAD65”. *Brain Research* 865 (1): 45–58.
262. Streisinger, George, Charline Walker, Nancy Dower, Donna Knauber, i Fred Singer. 1981. „Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*)”. *Nature* 291 (5813): 293–96.
263. Suárez, Rodrigo 2016. „Evolution of Telencephalic Commissures: Conservation and Change of Developmental Systems in the Origin of Brain Wiring Novelties”. W *Evolution of Nervous Systems: Second Edition*, 2–4:205–23. Elsevier Inc.
264. Suárez, Rodrigo, Han Gobius, i Linda J. Richards. 2014. „Evolution and development of interhemispheric connections in the vertebrate forebrain”. *Frontiers in Human Neuroscience* 8 (JULY).
265. Sugiura, Hiroko, Shin Yasuda, Shutaro Katsurabayashi, Hiroyuki Kawano, Kentaro Endo, Kotaro Takasaki, Katsunori Iwasaki, i wsp. 2015. „Rheb activation disrupts spine synapse formation through accumulation of syntenin in tuberous sclerosis complex”. *Nature Communications* 6 (kwiecień).
266. Swiech, Lukasz, Magdalena Blazejczyk, Malgorzata Urbanska, Patrycja Pietruszka, Bjorn R Dortland, Anna R Malik, Phebe S Wulf, Casper C Hoogenraad, i Jacek Jaworski. 2011. „Cellular/Molecular CLIP-170 and IQGAP1 Cooperatively Regulate Dendrite Morphology”.
267. Swiech, Lukasz, Malgorzata Perycz, Anna Malik, i Jacek Jaworski. 2008. „Role of

- mTOR in physiology and pathology of the nervous system". *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*.
268. Switon, Katarzyna, Katarzyna Kotulska, Aleksandra Janusz-Kaminska, Justyna Zmorzynska, i Jacek Jaworski. 2016. „Tuberous sclerosis complex: From molecular biology to novel therapeutic approaches". *IUBMB Life* 68 (12): 955–62.
 269. Switon, Katarzyna, Katarzyna Kotulska, Aleksandra Janusz-Kaminska, Justyna Zmorzynska, i Jacek Jaworski. 2017. „Molecular neurobiology of mTOR". *Neuroscience* 341: 112–53.
 270. Takei, Nobuyuki, i Hiroyuki Nawa. 2014. „mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development". *Frontiers in Molecular Neuroscience* 7 (April): 1–12.
 271. Talos, Delia M., Hongyu Sun, Bela Kosaras, Annelise Joseph, Rebecca D. Folkerth, Annapurna Poduri, Joseph R. Madsen, Peter M. Black, i Frances E. Jensen. 2012. „Altered inhibition in tuberous sclerosis and type IIb cortical dysplasia". *Annals of Neurology* 71 (4): 539–51.
 272. Tang, Guomei, Kathryn Gudsnuk, Sheng Han Kuo, Marisa L. Cotrina, Gorazd Rosoklija, Alexander Sosunov, Mark S. Sonders, i wsp. 2014. „Loss of mTOR-Dependent Macroautophagy Causes Autistic-like Synaptic Pruning Deficits". *Neuron* 83 (5): 1131–43.
 273. Tashiro, Ayumu, Audrey Minden, i Rafael Yuste. 2000. „Regulation of dendritic spine morphology by the Rho family of small GTPases: Antagonistic roles of Rac and Rho". *Cerebral Cortex* 10 (10): 927–38.
 274. Tavazoie, Sohail F., Veronica A. Alvarez, Dennis A. Ridenour, David J. Kwiatkowski, i Bernardo L. Sabatini. 2005. „Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2". *Nature Neuroscience* 8 (12): 1727–34.
 275. Tee, Andrew R., Brendan D. Manning, Philippe P. Roux, Lewis C. Cantley, i John Blenis. 2003. „Tuberous Sclerosis Complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb". *Current Biology* 13 (15): 1259–68.
 276. Tee, Andrew R., Julian R. Sampson, Deb K. Pal, i Joseph M. Bateman. 2016. „The role of mTOR signalling in neurogenesis, insights from tuberous sclerosis complex". *Seminars in Cell and Developmental Biology* 52 (kwiecień): 12–20.
 277. Tejada, Gonzalo S., i Margarita Díaz-Guerra. 2017. „Integral characterization of defective BDNF/TrkB signalling in neurological and psychiatric disorders leads the way to new therapies". *International Journal of Molecular Sciences*. Int J Mol Sci.

278. Tian, Chen, Yuni Kay, Anastasiia Sadybekov, Sadhna Rao, Vsevolod Katritch, i Bruce E. Herring. 2018. „An Intellectual Disability-Related Missense Mutation in Rac1 Prevents LTP Induction”. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11 (lipiec).
279. Tsai, Jeng Dau, Ming Chou Ho, Hom Yi Lee, Chao Yu Shen, Jheng Yan Li, i Jun Cheng Weng. 2021. „Disrupted white matter connectivity and organization of brain structural connectomes in tuberous sclerosis complex patients with neuropsychiatric disorders using diffusion tensor imaging”. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* 34 (2): 189–200.
280. Tsai, Peter T., Court Hull, Yunxiang Chu, Emily Greene-Colozzi, Abbey R. Sadowski, Jarrett M. Leech, Jason Steinberg, Jacqueline N. Crawley, Wade G. Regehr, i Mustafa Sahin. 2012. „Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice”. *Nature*.
281. Tsai, Victoria, Whitney E. Parker, Ksenia A. Orlova, Marianna Baybis, Anthony W.S. Chi, Benjamin D. Berg, Jacqueline F. Birnbaum, i wsp. 2014. „Fetal brain mTOR signaling activation in tuberous sclerosis complex”. *Cerebral Cortex* 24 (2): 315–27.
282. Turkdogan, Dilsad, Ayberk Turkyilmaz, Zeliha Gormez, Gunes Sager, i Gazanfer Ekinci. 2019. „A novel truncating mutation of dock7 gene with an early-onset non-encephalopathic epilepsy”. *Seizure* 66 (marzec): 12–14.
283. Tye, Charlotte, Fiona S. Mcewen, Holan Liang, Lisa Underwood, Emma Woodhouse, Edward D. Barker, Fintan Sheerin, i wsp. 2020. „Long-term cognitive outcomes in tuberous sclerosis complex”. *Developmental Medicine and Child Neurology* 62 (3): 322–29.
284. Uhlmann, Erik J., Michael Wong, Rebecca L. Baldwin, M. Livia Bajenaru, Hiroaki Onda, David J. Kwiatkowski, Kelvin Yamada, i David H. Gutmann. 2002. „Astrocyte-specific TSC1 conditional knockout mice exhibit abnormal neuronal organization and seizures”. *Annals of Neurology* 52 (3): 285–96.
285. Urbanska, Malgorzata, Magdalena Blazejczyk, i Jacek Jaworski. 2008. „Molecular Basis of Dendritic Arborization.” *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 68 (2): 264–88.
286. Uysal, Sanem Pinar, i Mustafa Şahin. 2020. „Tuberous sclerosis: A review of the past, present, and future”. *Turkish Journal of Medical Sciences*. Turk J Med Sci.
287. Varga, Máté, Dorottya Ralbovszki, Eszter Balogh, Renáta Hamar, Magdolna Keszthelyi, i Kálmán Tory. 2018. „Zebrafish Models of Rare Hereditary Pediatric Diseases”. *Diseases 2018, Vol. 6, Page 43* 6 (2): 43.
288. Vargas, Juan Pedro, Juan Carlos López, i Manuel Portavella. 2009. „What are the

- functions of fish brain pallium?" *Brain Research Bulletin* 79 (6): 436–40.
289. Vaz, Raquel, Wolfgang Hofmeister, i Anna Lindstrand. 2019. „Zebrafish models of neurodevelopmental disorders: Limitations and benefits of current tools and techniques". *International Journal of Molecular Sciences*. Int J Mol Sci.
290. Vignet, Caroline, Marie Laure Bégout, Samuel Péan, Laura Lyphout, Didier Leguay, i Xavier Cousin. 2013. „Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains". *Zebrafish* 10 (3): 365–75.
291. Vries, Petrus J. de, Elena Belousova, Mirjana P. Benedik, Tom Carter, Vincent Cottin, Paolo Curatolo, Maria Dahlin, i wsp. 2020. „Tuberous Sclerosis Complex-Associated Neuropsychiatric Disorders (TAND): New Findings on Age, Sex, and Genotype in Relation to Intellectual Phenotype". *Frontiers in Neurology* 11 (lipiec): 603.
292. Vries, Petrus J. de, i Christopher J. Howe. 2007. „The tuberous sclerosis complex proteins - a GRIPP on cognition and neurodevelopment". *Trends in Molecular Medicine* 13 (8): 319–26.
293. Vries, Petrus J. De, Ann Hunt, i Patrick F. Bolton. 2007. „The psychopathologies of children and adolescents with tuberous sclerosis complex (TSC): A postal survey of UK families". *European Child and Adolescent Psychiatry*. Eur Child Adolesc Psychiatry.
294. Vries, Petrus J. De, Vicky H. Whittemore, Loren Leclezio, Anna W. Byars, David Dunn, Kevin C. Ess, Dena Hook, Bryan H. King, Mustafa Sahin, i Anna Jansen. 2015. „Tuberous Sclerosis Associated Neuropsychiatric Disorders (TAND) and the TAND checklist". *Pediatric Neurology* 52 (1): 25–35.
295. Vries, Petrus J. de, Lucy Wilde, Magdalena C. de Vries, Romina Moavero, Deborah A. Pearson, i Paolo Curatolo. 2018. „A clinical update on tuberous sclerosis complex-associated neuropsychiatric disorders (TAND)". *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*. Blackwell Publishing Inc.
296. Waltereit, Robert, Martha Feucht, Magdalena C. De Vries, Julia Huemer, Veit Roessner, i Petrus J. De Vries. 2019. „Neuropsychiatric manifestations in Tuberous Sclerosis Complex (TSC): Diagnostic guidelines, TAND concept and therapy with mTOR inhibitors". *Zeitschrift für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie*. Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother.
297. Waltereit, Robert, Birte Japs, Miriam Schneider, Petrus J. De Vries, i Dusan Bartsch. 2011. „Epilepsy and Tsc2 haploinsufficiency lead to autistic-like social deficit behaviors in rats". *Behavior Genetics* 41 (3): 364–72.
298. Waltereit, Robert, Hans Welzl, Johannes Dichgans, Hans-Peter Peter Lipp, Werner J.

- Schmidt, i Michael Weller. 2006. „Enhanced episodic-like memory and kindling epilepsy in a rat model of tuberous sclerosis”. *Journal of Neurochemistry* 96 (2): 407–13.
299. Wang, Qing Ping, Firas Jammoul, Agnès Duboc, Jie Gong, Manuel Simonutti, Elisabeth Dubus, Cheryl M. Craft, Wen Ye, José A. Sahel, i Serge Picaud. 2008. „Treatment of epilepsy: The GABA-transaminase inhibitor, vigabatrin, induces neuronal plasticity in the mouse retina”. *European Journal of Neuroscience* 27 (8): 2177–87.
300. Wang, Xuefeng Xiaohui, Dongbin Liu, Fangzhen Wei, Yue Li, Xuefeng Xiaohui Wang, Linjie Li, Guan Wang, Shuli Zhang, i Lei Zhang. 2020. „Stress-sensitive protein Rac1 and its involvement in neurodevelopmental disorders”. *Neural Plasticity*. Hindawi Limited.
301. Watabe-Uchida, Mitsuko, Keisha A. John, Justyna A. Janas, Sarah E. Newey, i Linda Van Aelst. 2006. „The Rac Activator DOCK7 Regulates Neuronal Polarity through Local Phosphorylation of Stathmin/Op18”. *Neuron* 51 (6): 727–39.
302. Way, Sharon W., James Mckenna, Ulrike Mietzsch, R. Michelle Reith, Henry C.-j. Cheng Ju Wu, i Michael J. Gambello. 2009. „Loss of Tsc2 in radial glia models the brain pathology of tuberous sclerosis complex in the mouse”. *Human Molecular Genetics* 18 (7): 1252–65.
303. Wei, Hong Ping, Yuan Yuan Yao, Rong Wei Zhang, Xiao Feng Zhao, i Jiu Lin Du. 2012. „Activity-induced long-term potentiation of excitatory synapses in developing zebrafish retina in vivo”. *Neuron* 75 (3): 479–89.
304. White, Ricarda, Yue Hua, Bernd Scheithauer, David R. Lynch, Elizabeth Petri Henske, i Peter B. Crino. 2001. „Selective Alterations in Glutamate and GABA Receptor Subunit mRNA Expression in Dysplastic Neurons and Giant Cells of Cortical Tubers”. *Annals of Neurology* 49 (1): 67–78.
305. White, Richard Mark, Anna Sessa, Christopher Burke, Teresa Bowman, Jocelyn LeBlanc, Craig Ceol, Caitlin Bourque, i wsp. 2008. „Transparent Adult Zebrafish as a Tool for In Vivo Transplantation Analysis”. *Cell Stem Cell* 2 (2): 183–89.
306. Widjaja, Elysa, Gustavo Simao, Sina Zarei Mahmoodabadi, Ayako Ochi, O. Carter Snead, James Rutka, i Hiroshi Otsubo. 2010. „Diffusion tensor imaging identifies changes in normal-appearing white matter within the epileptogenic zone in tuberous sclerosis complex”. *Epilepsy Research* 89 (2–3): 246–53.
307. Wildonger, Jill, Lily Yeh Jan, i Yuh Nung Jan. 2008. „The Tsc1-Tsc2 complex influences neuronal polarity by modulating TORC1 activity and SAD levels”. *Genes*

- and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
308. Willemsen, Rob, Sandra Van T. Padjé, John C. Van Swieten, i Ben A. Oostra. 2011. „Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for dementia”. *Neuromethods* 48: 255–69.
 309. Willner, Paul. 1984. „The validity of animal models of depression”. *Psychopharmacology*. Psychopharmacology (Berl).
 310. Wilson, Steve W., Michael Brand, i Judith S. Eisen. 2002. „Patterning the zebrafish central nervous system.” *Results and problems in cell differentiation*.
 311. Winter, Matthew J., William S. Redfern, Amanda J. Hayfield, Stewart F. Owen, Jean Pierre Valentin, i Thomas H. Hutchinson. 2008. „Validation of a larval zebrafish locomotor assay for assessing the seizure liability of early-stage development drugs”. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*.
 312. Wong, Keith, Marco Elegante, Brett Bartels, Salem Elkhayat, David Tien, Sudipta Roy, Jason Goodspeed, i wsp. 2010. „Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*)”. *Behavioural Brain Research* 208 (2): 450–57.
 313. Wong, Michael. 2013. „A critical review of mTOR inhibitors and epilepsy: From basic science to clinical trials”. *Expert Review of Neurotherapeutics*. NIH Public Access.
 314. Wong, Michael, i Dongjun Guo. 2013. „Dendritic spine pathology in epilepsy: Cause or consequence?” *Neuroscience*. Pergamon.
 315. Woo, Doyeon, Yeji Seo, Hyunjin Jung, Sungsoo Kim, Nury Kim, Sang Min Park, Heeyoung Lee, Sangkyu Lee, Kwang Hyun Cho, i Won Do Heo. 2019. „Locally Activating TrkB Receptor Generates Actin Waves and Specifies Axonal Fate”. *Cell Chemical Biology* 26 (12): 1652-1663.e4.
 316. Woo, K., i S. E. Fraser. 1995. „Order and coherence in the fate map of the zebrafish nervous system”. *Development* 121 (8): 2595–2609.
 317. Wu, Connie, i Dandan Sun. 2015. „GABA receptors in brain development, function, and injury”. *Metabolic Brain Disease* 30 (2): 367–79.
 318. Wullimann, Mario F., i Thomas Mueller. 2004. „Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior”. *Journal of Comparative Neurology*. John Wiley & Sons, Ltd.
 319. Xiao, Yangui, Yinghui Peng, Jun Wan, Genyun Tang, Yuwen Chen, Jing Tang, Wen Cai Ye, Nancy Y. Ip, i Lei Shi. 2013. „The atypical guanine nucleotide exchange factor Dock4 regulates neurite differentiation through modulation of Rac1 GTPase and actin dynamics”. *Journal of Biological Chemistry* 288 (27): 20034–45.

320. Xu, Nan Jie, i Mark Henkemeyer. 2009. „Ephrin-B3 reverse signaling through Grb4 and cytoskeletal regulators mediates axon pruning”. *Nature Neuroscience* 12 (3): 268–76.
321. Yamanouchi, Hideo, Venita Jay, James T. Rutka, Sachio Takashima, i Laurence E. Becker. 1997. „Evidence of abnormal differentiation in giant cells of tuberous sclerosis”. *Pediatric Neurology* 17 (1): 49–53.
322. Yang, Chunlan, Yining Zhang, Min Lu, Jiechuan Ren, i Zhimei Li. 2020. „White Matter Structural Brain Connectivity of Young Healthy Individuals With High Trait Anxiety”. *Frontiers in Neurology* 10 (luty): 1421.
323. Yang, Huirong, Zishuo Yu, Xizi Chen, Jiabei Li, Ningning Li, Jiaxuan Cheng, Ning Gao, i wsp. 2021. „Structural insights into TSC complex assembly and GAP activity on Rheb”. *Nature Communications* 12 (1): 339.
324. Yang, Yu Ting, Chia Lin Wang, i Linda Van Aelst. 2012. „DOCK7 interacts with TACC3 to regulate interkinetic nuclear migration and cortical neurogenesis”. *Nature Neuroscience* 15 (9): 1201–10.
325. Yoshihara, Yoshihiro, Mathias De Roo, i Dominique Muller. 2009. „Dendritic spine formation and stabilization”. *Current Opinion in Neurobiology*. Curr Opin Neurobiol.
326. Zamboni, Valentina, Rebecca Jones, Alessandro Umbach, Alessandra Ammoni, Maria Passafaro, Emilio Hirsch, i Giorgio R. Merlo. 2018. „Rho GTPases in intellectual disability: From genetics to therapeutic opportunities”. *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
327. Zhang, Bai bing, Yuan yuan Yao, He fei Zhang, Koichi Kawakami, i Jiu lin Du. 2017. „Left Habenula Mediates Light-Preference Behavior in Zebrafish via an Asymmetrical Visual Pathway”. *Neuron* 93 (4): 914-928.e4.
328. Zhang, Bo, Sharon S. McDaniel, Nicholas R. Rensing, i Michael Wong. 2013. „Vigabatrin Inhibits Seizures and mTOR Pathway Activation in a Mouse Model of Tuberous Sclerosis Complex”. *PLoS ONE* 8 (2): 57445.
329. Zhang, Rong Wei, i Jiu Lin Du. 2016. „In vivo whole-cell patch-clamp recording in the Zebrafish brain”. W *Methods in Molecular Biology*, 1451:281–91. Humana Press, New York, NY.
330. Zhao, Jian Ping, i Akira Yoshii. 2019. „Hyperexcitability of the local cortical circuit in mouse models of tuberous sclerosis complex”. *Molecular Brain* 12 (1).
331. Zhou, Jing, Gayatri Shrikhande, Jing Xu, Renée M. Mckay, Dennis K. Burns, Jane E. Johnson, i Luis F. Parada. 2011. „Tsc1 mutant neural stem/progenitor cells exhibit migration deficits and give rise to subependymal lesions in the lateral ventricle”. *Genes*

and Development 25 (15): 1595–1600.

332. Zuber, J., D. Anglicheau, C. Elie, L. Bererhi, M. O. Timsit, M. F. Mamzer-Bruneel, M. Ciroldi, i wsp. 2008. „Sirolimus may reduce fertility in male renal transplant recipients”. *American Journal of Transplantation* 8 (7): 1471–79.
333. Zucco, Avery J., Valentina Dal Pozzo, Alina Afinogenova, Ronald P. Hart, Orrin Devinsky, i Gabriella D’Arcangelo. 2018. „Neural progenitors derived from Tuberous Sclerosis Complex patients exhibit attenuated PI3K/AKT signaling and delayed neuronal differentiation”. *Molecular and Cellular Neuroscience* 92 (październik): 149–63.

8. PUBLIKACJE DOKTORANTKI

Kędra, Magdalena, Katarzyna Banasiak, Katarzyna Kisielewska, Lidia Wolińska-Nizioł, Jacek Jaworski, i Justyna Zmorzyńska. 2020. „TrkB hyperactivity contributes to brain dysconnectivity, epileptogenesis, and anxiety in zebrafish model of Tuberous Sclerosis Complex”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (4): 2170–79.

Prentzell, Mirja Tamara, Ulrike Rehbein, Marti Cadena Sandoval, Ann Sofie De Meulemeester, Ralf Baumeister, Laura Brohée, Bianca Berdel, Mathias Bockwoldt, Bernadette Carroll, Suvagata Roy Chowdhury, Andreas von Deimling, Constantinos Demetriades, Gianluca Figlia, Genomics England Research Consortium, Mariana Eca Guimaraes de Araujo, Alexander M Heberle, Ines Heiland, Birgit Holzwarth, Lukas A Huber, Jacek Jaworski, **Magdalena Kędra** i wsp. 2021. „G3BPs tether the TSC complex to lysosomes and suppress mTORC1 signaling”. *Cell* 184 (3): 655-674.e27.