

Gabriela Olech-Kochańczyk

**Wpływ białka i ciałek jądrowych PML
na morfologię jądra komórkowego neuronów
oraz funkcje kognitywne myszy**

Praca doktorska wykonana w Pracowni
Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej
oraz w Pracowni Modeli Zwierzęcych
Instytutu Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk

PROMOTOR:

dr hab. Witold Konopka

PROMOTOR POMOCNICZY:

dr Adriana Magalska

Warszawa, 2022

Podziękowania

*Pragnę wyrazić wdzięczność **śp. Profesorowi Grzegorzowi Wilczyńskiemu** za możliwość realizacji projektu opisanego w niniejszej rozprawie doktorskiej oraz za zaufanie, pomoc i życzliwość.*

*Mojemu promotorowi **dr. hab. Witoldowi Konopce** chciałabym podziękować za przyjęcie mnie pod swoją opiekę oraz nieocenione wsparcie w planowaniu doświadczeń, na które mogłam liczyć od początku realizacji projektu doktorskiego. Doceniam to, że codzienna życzliwość, wyrozumiałość, i bezpośredniość tworzyły atmosferę sprzyjającą pracy.*

*Mojej promotor pomocniczej **dr Adrianie Magalskiej** dziękuję za serdeczne rozmowy, cenne uwagi oraz pomoc w realizacji projektu doktorskiego.*

Dziękuję również wszystkim moim Koleżankom i Kolegom z Pracowni Modeli Zwierzęcych oraz z Pracowni Neuromorfologii Molekularnej i Systemowej za pomoc, rozmowy i przyjazną atmosferę.

Projekt został zrealizowany dzięki finansowaniu Narodowemu Centrum Nauki w ramach grantu SONATA BIS 1 (2012/05/E/NZ4/02997).

Spis treści

Wykaz skrótów.....	5
Streszczenie.....	8
Abstract.....	9
1 Wstęp.....	10
1.1 Architektura jądra komórkowego.....	10
1.2 Ciałka jądrowe PML.....	12
1.3 Charakterystyka białka PML.....	12
1.3.1 Budowa białka PML.....	13
1.3.2 Modyfikacje potranslacyjne białka PML.....	14
1.4 Funkcje białka PML i ciałek jądrowych PML.....	15
1.4.1 Regulacja transkrypcji.....	15
1.4.2 Odpowiedź na stres komórkowy i uszkodzenia DNA.....	16
1.4.3 Regulacja apoptozy.....	17
1.4.4 Odpowiedź na infekcję wirusową.....	18
1.4.5 Regulacja cyklu komórkowego.....	18
1.5 Białko PML i ciałka jądrowe PML w układzie nerwowym.....	19
1.6 PML i hipokamp dorosłych myszy.....	21
1.6.1 Budowa hipokampa.....	21
1.6.2 Funkcje hipokampa.....	23
1.7 Zwierzęta transgeniczne.....	24
1.7.1 System CRISPR/Cas9.....	26
1.7.2 System Cre/lox.....	29
2 Cele pracy.....	30
3 Materiały i metody.....	31
3.1 Techniki biologii molekularnej.....	31
3.1.1 Przygotowanie bakterii chemokompetentnych <i>E. coli</i>	31
3.1.2 Transformacja bakterii chemokompetentnych.....	33
3.1.3 Izolacja i oczyszczanie plazmidowego DNA.....	34
3.1.4 Tworzenie i przechowywanie rezerwowych szczepów bakteryjnych.....	34
3.1.5 Pomiar stężenia DNA.....	35
3.1.6 Klonowanie wektorów plazmidowych.....	35

3.1.6.1	Klonowanie klasyczne.....	35
3.1.6.2	Klonowanie wektorów plazmidowych wykorzystanych w systemie CRISPR/Cas9.....	39
3.2	Procedura wytwarzania wektorów rAAV.....	41
3.2.1	Hodowla linii komórkowych HEK293.....	41
3.2.2	Transfekcja komórek HEK293.....	42
3.2.3	Izolacja wektorów wirusowych rAAV.....	43
3.2.4	Oznaczenie miana rAAV techniką qPCR.....	44
3.3	Metoda wytworzenia modelu myszy transgenicznej linii DIO-EF1 α -PML z podwyższonym poziomem białka PML.....	47
3.3.1	Przygotowanie i oczyszczanie liniowego fragmentu DNA do mikroiniekcji.....	47
3.3.2	Hodowla i utrzymywanie zwierząt wykorzystywanych do transgenezy.....	47
3.3.3	Przygotowanie hormonalne samic dawczyń zarodków.....	48
3.3.4	Izolacja jednokomórkowych zarodków od samic dawczyń zarodków.....	48
3.3.5	Mikroiniekcja liniowego fragmentu dsDNA do przedjądrzy zygot.....	49
3.3.6	Transfer zarodków do jajowodów samic bioreczny.....	49
3.3.7	Wazektomia samców.....	50
3.3.8	Genotypowanie tkanek zwierzęcych.....	50
3.3.9	Indukcja mutacji u zwierząt podwójnie transgenicznych.....	53
3.4	Operacje stereotaktyczne.....	53
3.5	System IntelliCage i przeprowadzone w nim testy behawioralne.....	54
3.6	Przygotowanie tkanek i techniki immunocytochemiczne.....	56
3.6.1	Utrwalanie mózgu metodą perfuzji.....	56
3.6.2	Mrożenie utrwalonych mózgów i krojenie tkanki na kriostacie.....	57
3.6.3	Procedura odzyskiwania antygenowości.....	57
3.6.4	Barwienia immunofluorescencyjne.....	57
3.6.5	Barwienie metodą DAB.....	60
3.7	Metody pracy z białkami.....	62
3.7.1	Przygotowanie ekstraktów białkowych z hodowli komórkowej linii HEK293.....	62
3.7.2	Elektroforeza białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).....	62
3.7.3	Detekcja białka metodą Western blot.....	63
3.8	Metody pracy z RNA.....	64
3.8.1	Przygotowanie ekstraktów RNA z pierwotnych hodowli komórek nerwowych hipokampa.....	64
3.8.2	Przygotowanie ekstraktów RNA z hipokampa.....	65

3.8.3	Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR).....	65
3.8.4	Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR).....	66
3.9	Analiza behawioralna.....	67
3.10	Analiza mikroskopowa.....	67
4	Wyniki.....	68
4.1	Wytworzenie modelu myszy z podwyższonym poziomem białka PML.....	68
4.1.1	Neurospecyficzna indukcja podwyższonego poziomu białka PML u myszy podwójnie transgenicznych DIO-EF1 α -PML ^{CaMKIIα-Cre-ERT2}	68
4.1.1.1	Otrzymanie wektora plazmidowego DIO-EF1 α -PML.....	69
4.1.1.2	Weryfikacja działania systemu Cre/loxP <i>in vitro</i>	71
4.1.1.3	Otrzymanie myszy transgenicznych linii DIO-EF1 α -PML poprzez mikroiniekcję DNA do przedjądrzy zapłodnionych oocytów.....	73
4.1.1.4	Podwyższony poziom białka PML u zwierząt podwójnie transgenicznych DIO-EF1 α -PML ^{CaMKIIα-Cre-ERT2} indukowany tamoksyfenem.....	75
4.1.2	Lokalna neurospecyficzna indukcja podwyższonego poziomu białka PML.....	78
4.1.2.1	Podwyższony poziom i cytoplazmatyczna lokalizacja białka PML u myszy linii DIO-EF1 α -PML uzyskane poprzez iniekcję wektora wirusowego rAAV-CaMKII α -Cre do struktur hipokampa.....	79
4.1.2.2	Podwyższony poziom i jądrowa lokalizacja białka PML u myszy szczepu dzikiego C57 BL/6J uzyskane poprzez iniekcję wektora wirusowego rAAV-EF1 α -PML-T2A-mCherryNLS do hipokampa.....	80
4.2	Wytworzenie modelu myszy z delecją białka PML.....	83
4.2.1	Otrzymanie wektorów plazmidowych zawierających sekwencję gRNA dla genu PML w systemie CRISPR/Cas9.....	85
4.2.2	Weryfikacja działania systemu CRISPR/Cas9 <i>in vitro</i>	86
4.2.3	Weryfikacja działania systemu CRISPR/Cas9 <i>in vivo</i>	89
4.3	Analiza zamian behawioralnych myszy z podwyższonym poziomem oraz delecją białka PML w testach prowadzonych w klatkach IntelliCage.....	90
4.3.1	Testy <i>clockwise</i> i <i>counter-clockwise</i>	91
4.3.2	Test uczenia się progresywnego.....	100
4.3.3	Test Vogla.....	103
4.4	Analiza zmian morfologii jądra komórkowego neuronów hipokampalnych u zwierząt z modyfikacją poziomu białka PML.....	108
4.4.1	Wpływ modyfikacji poziomu białka PML na białka DAXX oraz ATRX.....	108
4.4.2	Wpływ modyfikacji poziomu białka PML na potranslacyjne modyfikacje białek histonowych.....	113

4.4.3 Wpływ modyfikacji poziomu białka PML na białko spliceosomu, SRm300.....	118
5 Dyskusja.....	121
5.1 Czynniki wpływające na skuteczność procesu transgenezy.....	121
5.2 Czynniki wpływające na analizę poziomu białka PML w uzyskanym modelu myszy transgenicznym.....	123
5.3 Wektory AAV jako skuteczne narzędzie uzyskania myszy z podwyższonym poziomem białka PML w neuronach hipokampa.....	124
5.4 Skuteczność systemu CRISPR/Cas9 umożliwiająca otrzymanie modelu z delecją białka PML.....	126
5.5 Fenotyp behawioralny myszy z delecją białka PML charakteryzuje się obniżeniem zahamowań w sytuacjach lękowych i tendencją do zaburzeń pamięci operacyjnej....	126
5.6 Zmiany kondensacji i rozmieszczenia euchromatyny i heterochromatyny oraz białek współwystępujących z PML w jądrach komórkowych neuronów z podwyższonym poziomem białka PML.....	131
6 Podsumowanie i wnioski.....	134
7 Bibliografia.....	135

Wykaz skrótów

AAV (ang. *adeno-associated virus*) – wirus związany z adenowirusami

AML (ang. *acute myeloid leukemia*) – ostra białaczka szpikowa

AMPA (ang. *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) – kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izooksazolopropionowy

AMPA (ang. *AMPA receptor*) – receptor AMPA

APL (ang. *acute promyelocytic leukemia*) – ostra białaczka promielocytowa

ATP (ang. *adenosine triphosphate*) – adenozy-no-5'-trifosforan

CA1, CA2, CA3 (łac. *cornu Ammonis*) – (Róg Amona) pola formacji hipokampa

CaMKII α (ang. *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II α*) – kinaza białkowa zależna od wapnia i kalmoduliny

CRISPR (ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) – skupione, regularnie oddalone, krótkie powtórzenia palindromowe (system obrony immunologicznej bakterii przed egzogennym materiałem genetycznym)

DAB (ang. *3,3'-diaminobenzidine*) – 3,3'-diaminobendyzyna

DAPI (ang. *4',6-diamidino-2-phenylindole*) – barwnik fluorescencyjny wiążący się do DNA

DG (ang. *dentate gyrus*) – zakręt zębaty (hipokampa)

DIO (ang. *double-floxed inverted open reading frame*) – podwójnie oflankowana odwrócona otwarta ramka odczytu

DMEM (ang. *Dulbecco's modified Eagle's medium*) – pożywka hodowlana

DNA (ang. *deoxyribonucleic acid*) – kwas deoksyrybonukleinowy

dsDNA (ang. *double-stranded DNA*) – dwuniciowy DNA

EF1 α (ang. *elongation factor-1 α*) – białko odpowiedzialne za elongację łańcucha peptydowego w procesie translacji

EYFP (ang. *enhanced yellow fluorescent protein*) – żółte białko fluorescencyjne (kolejnej generacji)

FBS (ang. *fetal bovine serum*) – cielęce serum płodowe

GAPDH (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

hCG (ang. *human chorionic gonadotropin*) – ludzka gonadotropina kosmówkowa

HDR (ang. *homology-directed repair*) – homologiczna naprawa DNA

HEK293 (ang. *human embryonic kidney 293*) – linia komórkowa ludzkich komórek embrionalnych nerki

ITR (ang. *inverted terminal repeat*) – odwrócone powtórzenie końcowe

KO (ang. *knock-out*) – usunięcie/delecja (genu)

LB (ang. *Luria broth*) – pożywka płynna do hodowli bakteryjnej

mRNA (ang. *messenger RNA*) – matrycowy RNA

ND10 (ang. *nuclear dots-10*) – kropki jądrowe-10; synonim ciałek jądrowych PML

NDS (ang. *normal donkey serum*) – surowica ośła

NES (ang. *nuclear export signal*) – sygnał eksportu z jądra

NHEJ (ang. *non-homologous end joining*) – łączenie końców niehomologicznych

NHS (ang. *normal horse serum*) – surowica końska

NLS (ang. *nuclear localization signal*) – sygnał lokalizacji jądrowej

OD (ang. *optical density*) – gęstość optyczna

OE (ang. *overexpression*) – nadekspresja (genu)

PBS (ang. *phosphate-buffered saline*) – sól fizjologiczna buforowana fosforanami

PBS-TX100 (ang. *PBS – Triton X100*) – PBS z dodatkiem detergentu Triton X100

PcG proteins (ang. *polycomb-group proteins*) – rodzina kompleksów białkowych zaangażowanych w remodelowanie chromatyny

PCR (ang. *polymerase chain reaction*) – łańcuchowa reakcja polimerazy

PEI (ang. *polyethylenimine*) – polietylenoimina

PFA (ang. *paraformaldehyde*) – paraformaldehyd

PML (ang. *promyelocytic leukemia*) – białaczka promielocytowa; białko PML

PMSG (ang. *pregnant mare serum gonadotropin*) – gonadotropina surowicy źrebnych klaczy

POD (ang. *PML oncogenic domain*) – PML-owa domena onkogenna; synonim ciałek jądrowych PML

pz – para zasad

qPCR (ang. *quantitative PCR*) – ilościowa reakcja PCR

RBCC (ang. *RING–B-box–coiled coil*) – domena trzyczęściowa (RING, B-box, zwinięta cewka)

RNA (ang. *ribonucleic acid*) – kwas rybonukleinowy

rpm (ang. *revolutions per minute*) – obroty na minutę

RT-PCR (ang. *reverse transcription PCR*) – PCR z odwrotną transkrypcją

SDS (ang. *sodium dodecyl sulfate*) – dodecylosiarczan sodu

SDS-PAGE (ang. *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*) – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z użyciem SDS-u

SOB⁺⁺ (ang. *super optimal broth*) – medium SOB⁺⁺

SPF (ang. *specific-pathogen-free*) – wolne od specyficznych patogenów

SUMO (ang. *small ubiquitin-like modifier*) – małe białko modyfikujące podobne do ubikwityny

TBS (ang. *Tris-buffered saline*) – sól fizjologiczna buforowana Tris

TBS-T (ang. *Tris-buffered saline – Tween 20*) – TBS z dodatkiem detergentu Tween 20

TE – (ang. *transformation efficiency*) wydajność transformacji

TE embryo – roztwór TE z obniżonym stężeniem EDTA

TG – transgeniczny

Tris (ang. *tris(hydroxymethyl)aminomethane*) – trihydroksyaminometan

v/v (ang. *volume/volume*) – procentowe stężenie objętościowe

WB (ang. *Western blot*) – metoda służąca do wykrywania białek

WPRE (ang. *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*) – potranslacyjny element regulatorowy wirusa zapalenia wątroby świstaka

WT (ang. *wild-type*) – typu „dzikiego”

Streszczenie

W jądrze komórkowym oprócz materiału genetycznego i maszyny niezbędnej do ekspresji genów obecne są dodatkowe struktury, które pełnią różnorodne funkcje. Jedną z nich są ciała jądrowe PML (ang. *promyelocytic leukemia nuclear bodies*), które są strukturami dynamicznymi i funkcjonalnie niejednorodnymi. Głównym i niezbędnym elementem ciałek jądrowych PML jest białko PML. Ciała jądrowe PML są często zlokalizowane w miejscach aktywnych transkrypcyjnie oraz służą jako rezerwuuar wielu innych białek jądrowych. Ze względu na zróżnicowane funkcje tych białek, ciała jądrowe i białko PML są pośrednio zaangażowane w szereg procesów, które mogą mieć istotny wpływ na prawidłowe funkcjonowanie mózgu zwierząt. Dotąd nie zbadano roli białka PML dla prawidłowego funkcjonowania dojrzałego mózgu myszy. Poziom ekspresji białka PML w poszczególnych strukturach mysiego mózgu jest zróżnicowany i zależy także od wieku zwierzęcia. U dorosłych myszy relatywnie wysoki poziom białka PML występuje w hipokampie, strukturze związanej z uczeniem się i pamięcią.

Głównym celem pracy było zbadanie wpływu białka PML i ciałek jądrowych PML na morfologię jądra komórkowego neuronów hipokampa i na funkcje kognitywne dorosłych myszy. Aby osiągnąć założony cel, otrzymano i przebadano dwa modele zwierząt zmodyfikowanych genetycznie. Jeden z modeli, z podwyższonym poziomem białka PML w hipokampie, uzyskano poprzez wprowadzenie dodatkowej sekwencji PML za pomocą wektora wirusowego AAV jako nośnika genu. Drugi z modeli, z delecją białka PML w hipokampie, otrzymano z wykorzystaniem wektora wirusowego AAV dostarczającego sekwencję gRNA dla PML w Cre-zależnym systemie CRISPR/Cas9.

Przeprowadzono testy behawioralne (w systemie klatek IntelliCage) sprawdzające formowanie pamięci przestrzennej i proceduralnej, pamięci operacyjnej oraz poziom progów lękowych. Wykazano, że delecja białka PML w neuronach hipokampa pogarsza pamięć operacyjną i obniża próg lękowy zwierząt. Pokazano także, że podwyższenie lub obniżenie poziomu PML nie ma wpływu na formowanie pamięci przestrzennej i proceduralnej. Analiza mikroskopowych obrazów jąder komórkowych neuronów hipokampa wykazała znaczne zmiany ich morfologii oraz zmiany organizacji chromatyny w przypadku podwyższonego poziomu, lecz nie delecji, białka PML. Potranslacyjne zmiany histonów wykazały, że w modelu z podwyższonym poziomem białka PML chromatyna aktywna transkrypcyjnie jest bardziej upakowana. Natomiast chromatyna, która jest nieaktywna transkrypcyjnie, wykazuje zwiększony udział modyfikacji związanych z konstytutywnym wyłączeniem genów kosztem udziału modyfikacji związanych z fakultatywnym wyłączeniem genów. Modulacja poziomu PML prowadzi do współmiernego obniżenia lub zwiększenia obecności w jądrze komórkowym białka DAXX, partnera PML zaangażowanego w aktywację genów wczesnej odpowiedzi na stymulację aktywności neuronalnej.

Abstract

In addition to genetic material and molecular machinery necessary for gene expression, cell nucleus contains multiple auxiliary structures that perform diverse functions. These structures include very dynamic and functionally heterogeneous PML (promyelocytic leukemia) nuclear bodies. Their major and crucial constituent is the PML protein. PML nuclear bodies often co-localize with transcriptionally active chromatin and serve as a reservoir of multiple other nuclear proteins. Diverse functions of PML-binding partners place PML protein and PML nuclear bodies at the crossroads of multiple cellular processes, which may be essential for proper animal brain function. The role of PML protein in the adult mouse brain however remains to be elucidated. PML expression varies across mouse brain regions and also depends on animal age. In adult mice, a relatively high PML expression is observed in hippocampus, a brain structure implicated in learning and memory formation.

The main objective of the study described in this thesis was investigation of the role of PML protein and PML nuclear bodies in shaping the morphology of nuclei of hippocampal neurons and maintaining cognitive abilities of adult mice. To this end, two transgenic animal models were generated and analyzed. The first model, with hippocampal PML overexpression, was obtained by introducing an additional PML gene copy by means of injection of AAVs as a gene-carrying viral vector. The second model, with hippocampal PML ablation (knock-out), was obtained using AAVs, which deployed gRNA for PML in a Cre-dependent CRISPR/Cas9 system.

To characterize spatial and procedural memory formation, operational memory, and anxiety threshold, several behavioral tests were performed within the IntelliCage system. It was demonstrated that hippocampal PML ablation impairs operational memory and lowers the anxiety threshold. It was also shown that neither PML ablation nor its overexpression affect spatial and procedural memory formation. Confocal image analysis revealed significant morphological alteration of neurons' nuclei and disrupted chromatin organization in the case of PML overexpression, but not in the case of PML ablation. Histone post-translational modifications indicated that in the model with PML overexpression, transcriptionally active chromatin is more densely packed. Moreover, transcriptionally inactive chromatin displays an increased share of modifications associated with constitutive gene inactivation at the expense of decreased share of modifications associated with transient gene inactivation. Modulation of PML level entails commensurate reduction or increase of the nuclear presence of DAXX, a PML partner involved in transcriptional activation of neuronal immediate early genes.

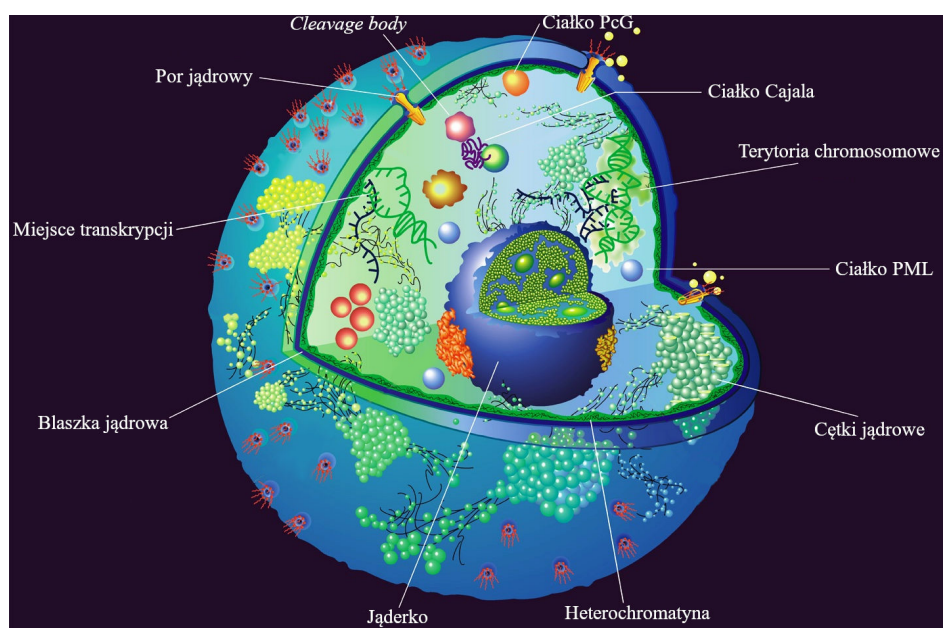
1 Wstęp

1.1 Architektura jądra komórkowego

Wyodrębnione jądro komórkowe jest główną strukturą komórki determinującą jej przynależność do komórek eukariotycznych. Oprócz jądra komórkowego typowa komórka eukariotyczna zawiera zestaw organelli, do których należą m.in.: mitochondria – miejsce powstania adenosynotryfosforanu (ATP) będącego źródłem energii komórki, siateczka śródplazmatyczna szorstka charakteryzująca się obecnością rybosomów, czyli cząsteczek złożonych z kwasów rybonukleinowych i białek zaangażowanych w proces translacji, siateczka śródplazmatyczna gładka, aparat Golgiego składający się ze spłaszczonych cystern błonowych, w których zachodzą między innymi modyfikacje potranslacyjne oraz lizosomy (Alberts i in., 2002).

Jądro komórkowe (Rycina 1) jest przedziałem zawierającym kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) oraz maszynę niezbędną do ekspresji genów w komórce eukariotycznej (Spector, 1993; Lamond & Earnshaw, 1998). Od płynu wewnątrzkomórkowego, czyli cytozolu, oddzielone jest błoną nukleoplazmatyczną. W błonie tej obecne są pory jądrowe, przez które zachodzi transport cząsteczek między jądrem a cytoplazmą (Stoffler i in., 1999). W nukleoplazmie wypełniającej wnętrze jądra komórkowego znajduje się między innymi jąderko (jedno lub kilka) zawierające kwasy nukleinowe i białka, będące miejscem syntezy rybosomalnego RNA i powstawania rybosomów (Spector, 1993). W jądrze komórkowym wyróżnić można również terytoria chromosomowe składające się z chromatyny poszczególnych chromosomów występującej w dwóch postaciach: mniej skondensowanej – euchromatyny – zawierającej głównie geny aktywne transkrypcyjnie oraz bardziej skondensowanej – heterochromatyny – której udział w procesie transkrypcji jest ograniczony (Alberts i in., 2002; Cremer i in., 2000). W regionach międzychromatynowych zlokalizowane są ciała jądrowe, które początkowo postrzegane były jako nieprawidłowe struktury występujące w jądrach komórek złośliwiejących lub hiperstymulowanych (Brasch & Ochs, 1992; Sternsdorf i in., 1997). Należą do nich ciała Cajala po raz pierwszy zaobserwowane przez Santiago Ramóna y Cajala w 1903 (Bellini, 2000). Ciała Cajala odgrywają ważną rolę w biogenezie małych jądrowych rybonukleoprotein uczestniczących w procesie wycinania intronów w trakcie dojrzewania RNA (Matera, 1999; Nizami i in., 2010). Towarzyszą im tzw. *cleavage bodies*, które pośrednio poprzez obecność czynników takich jak CstF czy CPSF zaangażowane są w proces poliadenylacji mRNA (Schul i in., 1996). W jądrze komórkowym

wyróżnić można także ciała PcG (ang. *polycomb-group proteins*) będące wielobiałkowymi kompleksami, do których należą białka RING1, BMI1 oraz hPc2 i których funkcja w komórkach ssaczych nie jest znana. U *Drosophila melanogaster* białka z grupy PcG przemodelowują chromatynę, powodując epigenetyczne wyciszenie genów (Saurin i in., 1998). W przestrzeni międzychromatynowej znajdują się także skupiska cętek (plamek) jądrowych (ang. *nuclear speckles*), które wzbogacone są w czynniki uczestniczące w składaniu (ang. *splicing*) mRNA. Cętki jądrowe są strukturami dynamicznymi, a ich składniki mogą rozpraszać się w całej nukleoplazmie bądź być rekrutowane do miejsc aktywnych transkrypcyjnie (Spector, 1993; Spector & Lamond, 2011). Istotnym komponentem jądra komórkowego są ciała jądrowe PML (ang. *promyelocytic leukemia nuclear bodies*, PML-NBs), które uczestnicząc w wielu ścieżkach sygnałowych pełnią różnorodne funkcje. Niniejsza rozprawa jest poświęcona między innymi analizie zmian morfologicznych ciałek jądrowych PML w odpowiedzi na interwencję genetyczną szczegółowo opisaną w dalszej części rozprawy.



Rycina 1. Schemat jądra komórkowego. Na schemacie zaznaczono: ciała jądrowe PML, cętki jądrowe, heterochromatynę, jąderko, blaszkę jądrową składającą się z białek klasy lamin, miejsca transkrypcji, por jądrowy, *cleavage body*, ciało PcG, ciało Cajala oraz terytoria chromosomowe. Rycina to zmodyfikowana ilustracja z artykułu Spector (2001).

1.2 Ciałka jądrowe PML

Ciałka jądrowe PML, zwane również ciałkami Kremera (ang. *Kr-bodies*), ND10 (ang. *nuclear dots-10*) lub domenami onkogennymi PML (ang. *PML oncogenic domains*, POD) (Sternsdorf i in., 1997; Hodges i in., 1998), są dynamicznymi, funkcjonalnie niejednorodnymi strukturami. Z reguły ich liczba w jądrze komórkowym waha się od 1 do 30, a ich wielkości mieści się w granicach od 0,2 do 1 μm . Analizy przeprowadzone za pomocą mikroskopii elektronicznej połączonej z barwieniem immunocytologicznym wykazały obecność ciałek jądrowych PML, które w przekroju przypominają pączek z dziurką (ang. *doughnut-shape*) (Hodges i in., 1998) bądź pierścień (ang. *ring-shape*) (Boisvert i in., 2000; Dellaire & Bazett-Jones, 2004). Wielkość, liczba oraz skład ciałek jądrowych PML zależą między innymi od fazy cyklu komórkowego (Bernardi & Pandolfi, 2007; Sternsdorf i in., 1997), stresu komórkowego (Bernardi & Pandolfi, 2007; Dellaire & Bazett-Jones, 2004), a także zmieniają się podczas infekcji wirusowych (Nisole i in., 2005). Badania z wykorzystaniem hybrydyzacji *in situ* wykazały, że ciałka jądrowe PML zlokalizowane są w rejonach genomowych bogatych w geny aktywne transkrypcyjnie (J. Wang i in., 2004).

Choć głównym i niezbędnym elementem ciałek jądrowych PML jest białko PML, ciałka te służą również jako rezerwuar dla wielu innych białek jądrowych, które rezydują w nich stale lub przejściowo (Bernardi & Pandolfi, 2007). Dotychczas w ciałkach PML zidentyfikowano około 170 rodzajów białek, nieposiadających wspólnych cech strukturalnych i pełniących różne funkcje biologiczne (Van Damme i in., 2010).

1.3 Charakterystyka białka PML

Białko PML (ang. *promyelocytic leukemia protein*; znane także jako TRIM19, PP8675, RNF71 lub MYL) zostało po raz pierwszy szczegółowo opisane, gdy odkryto, że jego mutacja, ujawniająca się u ponad 90% pacjentów, jest przyczyną ostrej białaczki promielocytowej (ang. *acute promyelocytic leukemia*, APL) (Chen i in., 1995; Melnick & Licht, 1999). Ostra białaczka promielocytowa jest jedną z postaci ostrej białaczki szpikowej (ang. *acute myeloid leukemia*, AML) i stanowi 5–10% wszystkich postaci AML. APL charakteryzuje się zahamowaniem dojrzewania promielocytów oraz ich nagromadzeniem w szpiku kostnym. Odkryto, że przyczyną APL na poziomie molekularnym jest mutacja w genie *PML* spowodowana translokacją chromosomową t(15;17)(q22;q21) (Rowley i in., 1977; Xiao i in., 1993; Kakizuka i in., 1991; Melnick i in., 1999). W jej wyniku dochodzi do

połączenia się genu *PML* z genem receptora α kwasu retinowego (ang. *retinoic acid receptor* α , RAR α) i powstania białka fuzyjnego PML/RAR α (Grimwade i in., 1997; Pandolfi i in., 1991).

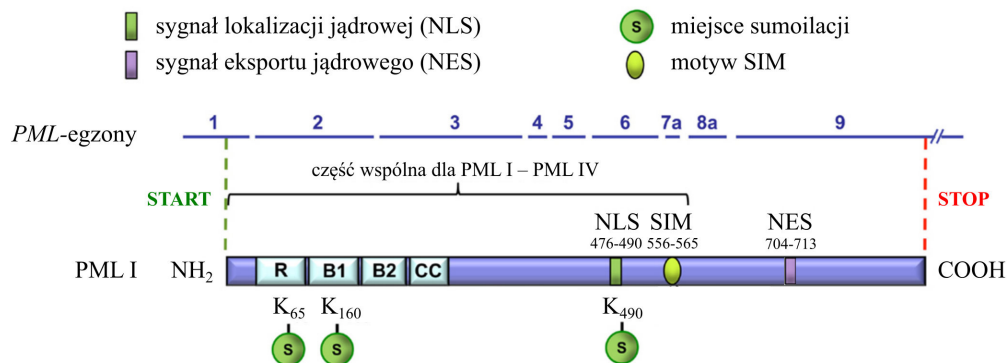
Jak wspomiano, białko PML jest niezbędnym elementem ciałek jądrowych PML. Potwierdzają to między innymi badania przeprowadzone z wykorzystaniem komórek pacjentów z ostrą białaczką promielocytową, w których zaobserwowano kluczową rolę białka PML w tworzeniu się ciałek jądrowych PML (de Thé i in., 2012). Natomiast brak innych komponentów jądrowych przejściowo magazynowanych w ciałkach jądrowych PML, takich jak Sp100 (w komórkach ND2 nieeksprymujących białka Sp100) lub BLM (u pacjentów z chorobą Blooma z mutacją w genie BLM), nie wpływa na ich destabilizację i lokalizację (Ishov i in., 1999; Zhong i in., 1999).

1.3.1 Budowa białka PML

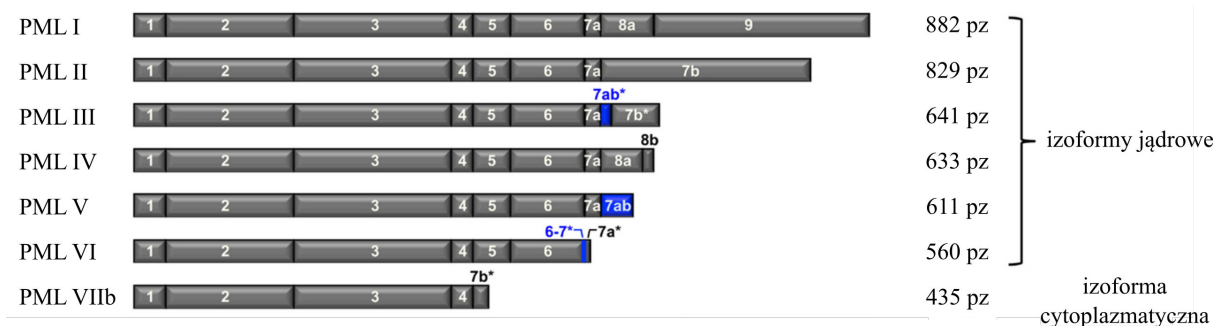
PML należy do rodziny białek z motywem trójdzielny (ang. *tripartite motif family*, TRIM), charakteryzującym się obecnością trzyczęściowej domeny RBCC (ang. *RING-B-box-coiled coil*) powstałej z mniejszych struktur. Domena ta występuje we wszystkich izoformach PML i składa się z: domeny RING (ang. *really interesting new gene*, RING), dwóch motywów typu B-box o strukturze palca cynkowego oraz domeny splecionych helis (ang. *coiled-coil*) (Jensen i in., 2001; Nisole i in., 2005; Lallemand-Breitenbach & de Thé, 2010). Co istotne, domena RING pośredniczy w interakcji białko-białko (P. Wang i in., 2018) i ma zasadnicze znaczenie dla lokalizacji PML w ciałkach jądrowych (Borden i in., 1995).

Gen *Pml* składa się z 9 egzonów (Rycina 2), z których w wyniku alternatywnego składania powstaje siedem izoform białka PML (I-VIIb; Rycina 3). Wszystkie izoformy są identyczne pod względem końca aminowego (N-końca), natomiast różnią się na końcu karboksylowym (C-końcu). Na N-końcowym odcinku obejmującym pierwsze trzy egzony występuje wspomniana domena RBCC. Różnice na C-końcu determinują oddziaływanie z innymi białkami, a tym samym wpływają na wielofunkcyjność białka PML. Izoformy I-VI mają lokalizację jądrową, natomiast izoforma VIIb jako jedyna posiada lokalizację cytoplazmatyczną. Wszystkie izoformy, oprócz VIIb, posiadają sygnał lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization signal*, NLS), natomiast sygnał eksportu jądrowego (ang. *nuclear export signal*, NES) występuje jedynie w izoformie I. Izoformy I-VI posiadają motyw SIM (ang. *SUMO-interacting motif*) o charakterze hydrofobowym oraz mogą wiązać kowalencyjnie

białko SUMO-1 na trzech resztach lizynowych (izofорма VIIb – na dwóch resztach) (Jensen i in., 2001; Nisole i in., 2005, 2013). W komórkach mysich najwyższy poziom ekspresji osiągają izoformy I oraz II (Condemine i in., 2006).



Rycina 2. Schemat przedstawiający 9 egzonów dla genu *Pml* oraz domeny i motywy dla I izoformy białka PML. Na schemacie zaznaczono miejsce sygnału lokalizacji jądrowej (NLS), sygnału eksportu jądrowego (NES), miejsca sumoilacji oraz motyw SIM. Na I izoformie białka PML widoczne jest również miejsce występowania domena RBCC, literą R oznaczono domenę RING, literami B1–B2 oznaczono dwa motywy typu B-box o strukturze palca cynkowego oraz literami CC oznaczono domenę splecionych helis. Rycina to zmodyfikowana ilustracja z artykułu Nisole’a i in. (2013).



Rycina 3. Izoformy białka PML. Schemat przedstawiający wszystkie izoformy białka PML, zawartość egzonów, ich długość wyrażoną jako liczba par zasad (pz) oraz lokalizację w komórce. Gwiazdką oznaczono miejsca, w których zachowana została tylko część sekwencji odpowiedniego egzonu. Rycina to zmodyfikowana ilustracja z artykułu Nisole’a i in. (2013).

1.3.2 Modyfikacje potranslacyjne białka PML

Białko PML ulega modyfikacjom potranslacyjnym. Najlepiej poznaną i scharakteryzowaną modyfikacją potranslacyjną białka PML jest sumoilacja, czyli przyłączenie białka SUMO (ang. *small ubiquitin-like modifier*), które odbywa się na resztach

lizynowych (K65, K160 oraz K490) (Duprez i in., 1999). Sumoilacja jest niezbędna nie tylko w procesie powstania ciałek jądrowych PML, ale także przyczynia się do zachowania ich funkcjonalności. Świadczą o tym badania przeprowadzone na mutantach białka PML nie ulegających sumoilacji, u których występował problem z rekrutacją komponentów ciałek jądrowych PML, takich jak białka Sp100 i DAXX zaangażowane w regulację transkrypcji (Ishov i in., 1999; Zhong, Salomoni, Ronchetti, i in., 2000). W ciałkach jądrowych PML sumoilacji ulegają również inne białka tam magazynowane. Dla prawidłowej sumoilacji PML kluczowa jest obecność domeny RING. Niektórzy badacze wysunęli hipotezę, według której białko PML funkcjonuje jako ligaza E3 SUMO dla samego siebie oraz dla innych białek (Quimby i in., 2006; Saitoh i in., 2006; Shen i in., 2006; S. Yang i in., 2002).

1.4 Funkcje białka PML i ciałek jądrowych PML

Zróznicowany charakter gromadzących się w ciałkach jądrowych PML białek utrudnia przypisanie tym strukturom jednej charakterystycznej funkcji. Stanowiąc rezerwuar dla wielu białek o znanych funkcjach, ciałka jądrowe PML są zaangażowane w regulację szeregu procesów biologicznych takich jak regulacja transkrypcji, odpowiedź na stres komórkowy, w tym stres związany z uszkodzeniem DNA, regulacja cyklu komórkowego i apoptozy oraz odpowiedź na infekcję wirusową. W niniejszym rozdziale przedstawiono kilka przykładów potwierdzających istotny wpływ białka PML i ciałek jądrowych na prawidłowe funkcjonowanie komórek.

1.4.1 Regulacja transkrypcji

W dotychczas przeprowadzonych badaniach potwierdzono, że jedną z ważnych funkcji białka oraz ciałek jądrowych PML jest regulacja transkrypcji genów. Wiele czynników transkrypcyjnych oraz regulatorów transkrypcji lokalizuje się właśnie w tych ciałkach jądrowych. Ciałka PML mogą wpływać na regulację transkrypcji poprzez modulowanie dostępności lub aktywności czynników transkrypcyjnych (Zhong, Salomoni, & Pandolfi, 2000) oraz pośrednio poprzez uczestniczenie w przebudowie chromatyny polegającej na zmianie dostępności miejsc aktywnych transkrypcyjnie (P. P. Kumar i in., 2007). Istnieją badania mówiące, że PML działa także jako represor transkrypcji (Bernardi & Pandolfi, 2007). Ciałka PML mogą współwystępować z niektórymi białkami represorowymi, a także lokalizować się w pobliżu centromeru, czyli fragmentu heterochromatyny będącego miejscem

wiązania białek kinetochorowych i przyczepu mikrotubul podczas podziału komórkowego. Choć zjawisko to obserwowane jest jedynie w trakcie fazy G₂ cyklu komórkowego (Everett, Earnshaw, i in., 1999; Luciani i in., 2006). PML działać może zarówno jako aktywator, jak i represor, ponieważ skład i lokalizacja ciałek zmienia się podczas trwania cyklu komórkowego oraz w trakcie stresu komórkowego (Bernardi & Pandolfi, 2007).

1.4.2 Odpowiedź na stres komórkowy i uszkodzenia DNA

Ciałka jądrowe PML w sposób dynamiczny reagują na sytuację stresu fizjologicznego w komórce. Czynnikiem stresowym, na które reaguje PML, mogą być szok cieplny bądź obecność metali ciężkich, co powoduje rozpad ciałek PML na liczne małe mikrociałka. Jednocześnie zmiany strukturalne ciałek PML wywołane stresem komórkowym związane są ze zmianą ich składu biochemicznego, powodując deficyt/zanik zarówno białka SUMO, jak i Sp100 (Eskiw i in., 2003; Maul i in., 1995). Uszkodzenie DNA przez promieniowanie ultrafioletowe (UV) również powoduje rozpad ciałek jądrowych na mniejsze (Conlan i in., 2004; Salomoni i in., 2005), a promieniowanie gamma powoduje wzrost liczby ciałek jądrowych PML (Carbone i in., 2002).

Opisano grupę białek zaangażowanych w naprawę DNA i wstrzymanie cyklu komórkowego, które współwystępują z PML zarówno przed, jak i po uszkodzeniu DNA. W pracy Dellaire'a i Bazett-Jonesa (2004) szczegółowo opisano interakcje takich białek jak: kinaza ATR, CHK2, helikaza BLM, RPA czy MRE11, które mogą lokalizować się w ciałkach PML w komórkach nieobciążonych stresem. Po uszkodzeniu DNA, białka ATR i MRE11 dysocjują z ciałek PML, a następnie ponownie z nimi asocjują; CHK2 dysocjuje i nie reasocjuje. BLM i RPA współwystępują z ciałkami zwłaszcza w fazie G₂ podziału komórkowego. Istnieje także grupa białek współwystępujących z PML w trakcie uszkodzeń DNA: ATM, białko zespołu Wernera (WRN) czy BRCA1 i ufosforylowany histon H2AX (Dellaire & Bazett-Jones, 2004). Podsumowując, ciałka jądrowe PML mogą regulować odpowiedź na uszkodzenia DNA na różne sposoby: działając jako miejsce magazynujące i uwalniające białka naprawcze (sam PML nie uczestniczy w naprawie DNA), poprzez aktywną regulację naprawy DNA oraz poprzez aktywację punktu kontrolnego w cyklu komórkowym (Bernardi & Pandolfi, 2007).

1.4.3 Regulacja apoptozy

Wyniki wielu badań sugerują, że białko PML jest ważnym czynnikiem regulującym zarówno zależny, jak i niezależny od p53 szlak apoptotyczny. Białko p53 jest kluczowym czynnikiem transkrypcyjnym, który po uszkodzeniu DNA wstrzymuje cykl komórkowy umożliwiając naprawę materiału genetycznego. Jeśli naprawa nie powiedzie się lub nie zostanie przeprowadzona w określonym czasie, p53 indukuje apoptozę. Mutacje w genie kodującym białko p53 obserwowane są w znacznym odsetku nowotworów. Białko p53 wspólnie z białkiem MDM2 tworzą pętlę ujemnego sprzężenia zwrotnego. Podstawową funkcją białka MDM2 jest utrzymanie p53 na niskim poziomie poprzez ciągłe katalizowanie jego degradacji (Haupt i in., 1997). Białko p53 natomiast reguluje dodatnio ekspresję genu *Mdm2* (Barak i in., 1993). Okazuje się, że PML jest bezpośrednio zaangażowany w regulację pętli p53–MDM2. PML aktywuje p53 poprzez rekrutację do ciałek jądrowych, promując jego acetylację i fosforylację, a także uczestniczy w wiązaniu oraz hamowaniu MDM2 (Bernardi i in., 2004; Kurki i in., 2003; Möller i in., 2003; Wei i in., 2003). Białko PML może wywoływać apoptozę również niezależną od p53 (związaną nieoczekiwanie z degradacją białka CHK2) (S. Yang i in., 2002, 2006). Konstrytuwny partner PML jakim jest białko DAXX zdaje się zarówno wzmacniać, jak i tłumić apoptozę. Potwierdzają to wyniki pokazujące, że obecność DAXX w ciałkach jądrowych PML koreluje z jego zdolnością uwrażliwiania komórek na receptor Fas stymulujący proces apoptozy (Torii i in., 1999; Zhong, Salomoni, Ronchetti, i in., 2000). Uważa się zatem, że proapoptotyczne funkcje białka DAXX zależne są od jego lokalizacji w ciałkach jądrowych PML, podczas gdy jego antyapoptotyczne funkcje widoczne są w momencie przebywania poza ciałkami jądrowymi PML (Torii i in., 1999; Zhong, Salomoni, Ronchetti, i in., 2000). Jak potwierdziły inne badania, różnice w cechach apoptotycznych białka DAXX mogą być także specyficzne dla różnego typu komórek (Meinecke i in., 2007). PML może wpływać również na proces apoptozy poprzez białko FLASH, będące pozytywnym regulatorem apoptozy indukowanej Fas. W odpowiedzi na aktywację Fas białko FLASH jest uwalniane z ciałek jądrowych i gromadzi się w mitochondriach, gdzie promuje aktywację kaspazy-8 biorącej udział w procesie apoptozy (Milovic-Holm i in., 2007). Co ważne, proapoptotyczne zdolności PML możliwe są jedynie przy nienaruszonej domenie RBCC; brak tej domeny znosi zdolności apoptotyczne PML (Borden i in., 1997; Fagioli i in., 1998).

1.4.4 Odpowiedź na infekcję wirusową

Komórki stymulowane interferonem indukują ekspresję PML oraz innych białek jądrowych, takich jak Sp100 i ISG20, co powoduje zwiększenie rozmiarów i liczby ciałek jądrowych PML. Sugeruje to, że białko i ciała jądrowe PML mogą pełnić istotną rolę w odpowiedzi na infekcję wirusową (Gaboli i in., 1998; Gongora i in., 1997; Lavau i in., 1995). Wirusy infekujące komórkę mogą zaburzać działanie ciałek jądrowych PML, przykładowo wirus opryszczki pospolitej typu 1 (ang. *herpes simplex virus type 1*, HSV-1) gromadzi się w części peryferyjnej ciałek jądrowych, a wczesne białko wirusowe HSV-1, ICP0, lokalizuje się w ciałkach jądrowych i szybko wywołuje ich rozpad (Everett, Meredith, i in., 1999). Ponadto potwierdzono, że ekspresja ICP0 powoduje spadek poziomu sumoilowanego PML, w związku z czym postawiono hipotezę, że HSV-1 indukuje degradację PML (Chelbi-Alix i in., 1998; Müller & Dejean, 1999). Białka IE1 oraz IE2 ludzkiego cytomegalowirusa gromadzą się w ciałkach jądrowych PML, również powodując ich rozpad (Ahn & Hayward, 1997). Infekcje wirusowe mogą zatem znacząco wpływać na skład i stabilność ciałek jądrowych PML. Zaburzenie funkcjonowania ciałek jądrowych PML sprzyja transformacji nowotworowej wywołanej niektórymi wirusami, umożliwia ekspresję genów wirusowych, a także replikację wirusa (Zhong, Salomoni, & Pandolfi, 2000).

1.4.5 Regulacja cyklu komórkowego

Skład biochemiczny oraz liczba ciałek jądrowych PML znacznie zmienia się w zależności od fazy cyklu komórkowego. Przeprowadzono szereg badań, w których wykazano, że w fazie G₀ ciałek jądrowych PML jest niewiele, a ich liczba rośnie, gdy komórka przechodzi kolejno przez fazy G₁, S i G₂ (Chang i in., 1995; Koken i in., 1995; Terris i in., 1995). W późniejszych badaniach potwierdzono, że we wczesnej fazie S ciała jądrowe PML ulegają zniekształceniu, a następnie fragmentacji i rozszczepieniu na mniejsze ciała. W konsekwencji, w fazie G₂ ciałek PML jest około dwa razy więcej niż w fazie G₁. Zwiększenie liczby ciałek jądrowych PML nie jest spowodowane zwiększającą się ilością białka PML, ponieważ najwyższy poziom białka PML zaobserwowano w fazie G₁. Uważa się, że to raczej ciała PML tracą swoją integralność w wyniku występujących w fazie S modyfikacji w strukturze chromatyny (Dellaire i in., 2006).

1.5 Białko PML i ciała jądrowe PML w układzie nerwowym

Choć wiadomo, że w komórkach niewystępujących w układzie nerwowym PML pełni szereg różnych funkcji, jego rola w tym układzie nie została jak dotąd dobrze poznana.

Jedno z pierwszych doniesień na temat obecności ciałek PML w komórkach układu nerwowego w warunkach patologicznych dotyczyło zarówno neuronów, jak i komórek glejowych (Grunnet, 1975). Obecność licznych i dużych ciałek PML zaobserwowano w komórkach Schwanna w zespole Guillaina-Barrégo, czyli ostrym wielokorzeniowym zapaleniu demielinizacyjnym. W klasycznym przebiegu tej choroby dochodzi do demielinizacji nerwów i uszkodzenia aksonów na skutek procesów autoimmunologicznych (Berciano i in., 1996). Inne badania wykazały obecność białka PML w chorobach poliglutaminowych prowadzących do obumierania komórek mózgu (Takahashi i in., 2003; Yamada i in., 2001). Badania te pokazały obecność PML w układzie nerwowym i wykazały istotną rolę ciałek jądrowych PML w odpowiedzi na uszkodzenia komórek nerwowych występujących w niektórych chorobach układu nerwowego. W późniejszych latach obecność ciałek jądrowych PML w zdrowych komórkach potwierdzono w neuronach zwojów rdzeniowych (Villagrà i in., 2004), a także w neuronach jądra nadwzrokowego mózgu (Villagrà i in., 2006).

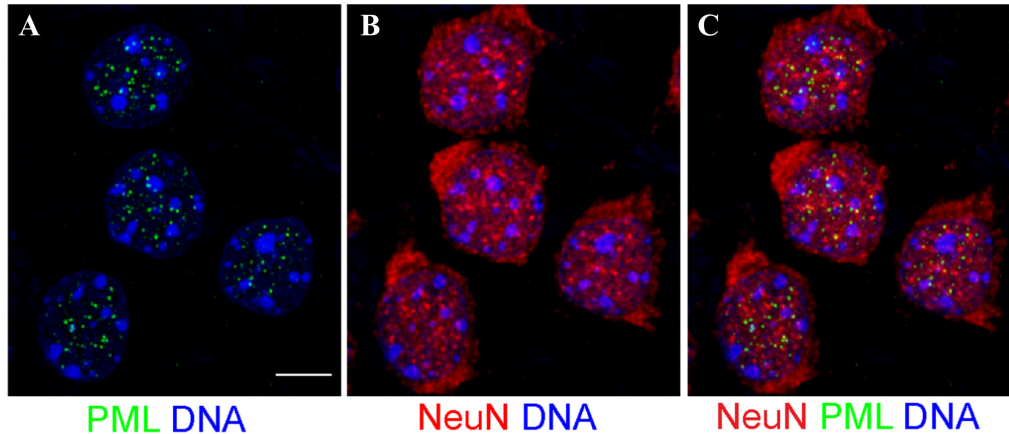
Pierwszych informacji dotyczących funkcji białka PML i ciałek jądrowych PML w mózgu dostarczyły badania przeprowadzone przez Regada i in. (2009). Badania te skupiały się na obecności i roli białka PML w proliferacji i różnicowaniu neuronalnych komórek progenitorowych w trakcie rozwoju kory nowej mózgu myszy. U embrionów w 15 dni ciąży (E15) zaobserwowano zmniejszenie liczby zróżnicowanych (MAP2-pozytywnych) neuronów w górnej warstwie korowej, a u nowo narodzonych zwierząt P0 zaobserwowano redukcję grubości kory mózgowej wynikającą z zaburzenia udziału poszczególnych podtypów neuronalnych komórek progenitorowych (Pax6-pozytywnych bądź Tbr2-pozytywnych). Mózgi myszy z pełną ablacją PML były w dniu urodzenia (P0) mniejsze niż mózgi myszy z częściową ablacją PML i mózgi myszy z grupy kontrolnej (Regad i in., 2009).

W 2012 Miki i wsp. opublikowali pracę, w której przedstawili istotną rolę białka PML w regulacji cyklu dobowego. Częścią mózgu odpowiedzialną za behawioralną oraz fizjologiczną regulację cyklu dobowego jest jądro nadskrzyżowaniowe zlokalizowane w podwzgórze. Na poziomie molekularnym rytm dobowy regulowany jest przez transkrypcyjno-translacyjną pętlę ujemnego sprzężenia zwrotnego, w której produkt końcowy,

którym jest białko, hamuje proces ekspresji własnego genu. Kompleks białkowy CLOCK–BMAL1 wiąże się do sekwencji regulatorowych (E-box) *Per* i *Cry*, będących podstawowymi genami cyklu dobowego. Powstałe białka *Per* i *Cry* wchodzi w interakcję, tworząc kompleks hamujący aktywność transkrypcyjną kompleksu CLOCK–BMAL1. Wyniki uzyskane z mysich embrionalnych fibroblastów pozbawionych PML potwierdziły, że obecność białka PML jest niezbędna do prawidłowej lokalizacji jądrowej białka *Per2*, a także, że PML pośredniczy w interakcji *Per2* z kompleksem CLOCK–BMAL1. Oznacza to, że białko PML jest istotnym czynnikiem pośrednio zaangażowanym w regulację cyklu dobowego. Co ważne, niezaburzona regulacja cyklu dobowego jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju układu nerwowego (Miki i in., 2012).

Przeprowadzono również badania z udziałem myszy z konstytutywnym usunięciem genu *Pml* (*Pml*^{-/-}), które poddano szeregowi badań behawioralnych. Wykonano między innymi testy: otwartego pola (ang. *open field*) sprawdzający spontaniczną aktywność, uniesionego labiryntu krzyżowego (ang. *elevated plus-maze*), w którym sprawdzano poziom lęku myszy przed otwartą przestrzenią, czy test warunkowania strachu (ang. *fear conditioning test*) sprawdzający zdolność do nauki i zapamiętywania. Wyniki testów wykazały, że myszy *Pml*^{-/-} wolniej się uczyły (test warunkowanego strachu), wykazywały obniżony próg lękowy (test uniesionego labiryntu krzyżowego) oraz chętniej eksplorowały nieznaną środowisko (test otwartej przestrzeni). Wyniki te wskazują, że PML wpływa na proces uczenia się, choć nie wpływa na intensywność eksplorowania habitatu (Butler i in., 2013).

Badania z ostatnich lat wskazują, że PML ulega ekspresji w różnych strukturach mózgu (Butler i in., 2013). W pracy Hall i in. (2016) przedstawiono zestawienie relatywnych poziomów ekspresji PML oraz gęstość ciałek jądrowych PML we wszystkich strukturach mózgu. Zastosowano czterostopniową skalę od 0 do ++++. Wysoki poziom ekspresji PML widoczny jest między innymi w korze mózgu – najwięcej w IV warstwie kory (+++; Rycina 4), mózdzku – najwięcej w warstwie komórek Purkinjego (+++) oraz w warstwie ziarnistej (+++), a także w hipokampie – w zakręcie zębatym (ang. *dentate gyrus*, DG) oraz w strukturze CA3 (++). Ponadto pokazano, że aktywność neuronalna wywołana podaniem pentylenotetrazolu powodującego drgawki bądź spowodowana stresem unieruchomienia moduluje liczbę i rozmiar ciałek jądrowych PML (Hall i in., 2016).



Rycina 4. Zdjęcie mikroskopowe przedstawiające ciała PML w IV warstwie kory mózgu dorosłej myszy. Zdjęcie pochodzi z pracy (Hall i in., 2016).

1.6 PML i hipokamp dorosłych myszy

Występowanie białka PML w stosunkowo dużej ilości w hipokampie (Hall i in., 2016), gdzie dochodzi zarówno do tworzenia się nowych połączeń tkanki nerwowej w trakcie uczenia się i zapamiętywania, jak i neurogenety utrzymującej się do późnego wieku (Rakic, 2002), zdaje się być związane z zaangażowaniem PML w procesy związane z neuroplastycznością (Butler i in., 2013) i neurogenezą (Regad i in., 2009). Z tego powodu w niniejszej rozprawie starano się określić, czy białko PML i ciała jądrowe PML mogą pełnić rolę w prawidłowym funkcjonowaniu hipokampa dorosłych myszy.

1.6.1 Budowa hipokampa

Hipokamp (ang. *hippocampus*; z greckiego „ἵπποκαμπος”, konik morski) jest strukturą zlokalizowaną w płacie skroniowym kory mózgu kresomózgowia i jest częścią układu limbicznego (Amaral & Lavenex, 2007). Termin hipokamp po raz pierwszy został użyty w XVI wieku przez włoskiego anatoma Giulia Cesarego Aranzia (Arantiusa). Przyrównał on kształt hipokampa również do jedwabnika, jednak nazwa ta nigdy się nie przyjęła. Hipokamp jest stosunkowo niewielką strukturą, ale odgrywającą kluczową rolę w konsolidacji informacji z pamięci krótkotrwałej do pamięci długotrwałej, a także w orientacji przestrzennej. Zarówno ludzie, jak i zwierzęta posiadają dwa hipokampy, po jednym w każdej z półkul mózgowych (Amaral & Lavenex, 2007; Anderson i in., 2007). Hipokamp składa się z dwóch głównych ząbiejących się części: hipokampa właściwego oraz zakrętu zębatego (DG). W skład

hipokampa właściwego wchodzi podstruktury CA1, CA2 oraz CA3 (łac. *cornu Ammonis*, CA; czyli róg Amona) (Pearce, 2001). Hipokamp składa się z komórek nerwowych różnego typu starannie zorganizowanych w warstwy. Hipokamp właściwy, a więc podstruktury CA1–CA3, składają się z pięciu warstw komórek: dominującej warstwy komórek piramidowych (ang. *pyramidal cell layer*, Py), warstwy *oriens* (ang. *oriens layer*, Or), warstwy *radiatum* (Rad), warstwy molekularnej *lacunosum* (Lmol), oraz warstwy *lucidum* (Slu), której brak w CA1 i CA2. Zakręt zębaty składa się z trzech warstw komórek: warstwy ziarnistej (ang. *granular layer*, GrDG), zbudowanej z drobnych, licznych oraz gęsto ułożonych neuronów, warstwy molekularnej (ang. *molecular layer*, Mol), oraz warstwy polimorficznej (ang. *polymorphic layer*, PoDG) (Amaral & Lavenex, 2007).

W hipokampie wyróżnia się trzy główne systemy połączeń neuronalnych, które tworzą obwód trójsynaptyczny, na który składają się następujące ścieżki: EC (ang. *entorhinal cortex*, kora śródwęchowa) → DG, DG → CA3, oraz CA3 → CA1 (Andersen i in., 1969). Z biegiem czasu odkryto projekcje od CA1 przez *subiculum* do kory śródwęchowej oraz projekcje z kory śródwęchowej do kory nowej. Z tego powodu obwód trójsynaptyczny uważany jest obecnie tylko za część funkcjonalnego obwodu formacji hipokampa (Amaral & Lavenex, 2007). Obwód trójsynaptyczny składa się z trzech głównych grup komórkowych: warstwy komórek ziarnistych w zakręcie zębatym, neuronów piramidowych w CA3 oraz neuronów piramidowych w CA1. Komórki ziarniste w DG odbierają informację z II i III warstwy kory śródwęchowej poprzez drogę przeszywającą (ang. *perforant pathway*), będącą głównym szlakiem doprowadzającym (aferyntnym; ścieżka EC → DG). Następnie podstruktura CA3 otrzymuje informację z włókien kiciastych (aksonów komórek ziarnistych) zakrętu zębatego oraz z komórek śródwęchowych również poprzez drogę przeszywającą (ścieżka DG → CA3). Komórki piramidalne podstruktury CA3 posiadają silnie rozgałęzione aksony (kolaterale Schaffera), z których projekcje wysyłane są do CA1 oraz CA2 i zakrętu zębatego (ścieżka CA3 → CA1). Następnie podstruktura CA1 głównym szlakiem wyprowadzającym (eferentnym) wysyła projekcje do warstwy V kory śródwęchowej mózgu (Amaral & Lavenex, 2007).

Prócz połączenia wewnętrznego (obwodu trójsynaptycznego), charakteryzującego się jednokierunkowością, tak jak wspomniano, w hipokampie istnieją również inne połączenia odgrywające istotną rolę w jego prawidłowym funkcjonowaniu. Poza głównym szlakiem eferentnym z CA1 do EC istnieją inne szlaki wyprowadzające w hipokampie, np. komórki hipokampa wysyłają projekcje do obszarów korowych, w tym kory przedczołowej. Inny szlak

wyprowadzający biegnie przez sklepienie mózgowia, przegrodę boczną aż do podwzgórza, którego sklepienie łączy się z hipokampem. Ponadto hipokamp poprzez szlaki doprowadzające otrzymuje projekcje z jądra łączącego (łac. *nucleus reuniens*) wzgórza do podstruktury CA1. Bardzo istotne projekcje pochodzą także z jądra środkowego przegrody, które wysyła kwas cholinergiczny i kwas γ -aminomasłowy (GABA), stymulujący włókna GABA-ergiczne, do wszystkich części hipokampa. Projekcje wychodzące z jądra środkowego przegrody odgrywają ważną rolę w kontrolowaniu fizjologicznego stanu hipokampa, a zniszczenie tego zaburza hipokampalny rytm fal mózgowych theta oraz upośledza niektóre typy pamięci (Purves i in., 2012; Kandel i in., 2013).

1.6.2 Funkcje hipokampa

Dwie główne funkcje przypisywane hipokampowi związane są z pamięcią oraz orientacją przestrzenną. Naukowcy są zgodni co do tego, że hipokamp odgrywa ważną rolę w tworzeniu nowych wspomnień w oparciu o przeżyte wydarzenia (pamięć epizodyczna). Hipokamp koduje również kontekst emocjonalny pochodzący z ciała migdałowatego. Częściowo właśnie z tego powodu powrót do miejsca zdarzenia, wspomnień, może wywołać towarzyszące mu emocje. Mózg z hipokampem uszkodzonym tylko w jednej z półkul może zachować prawie normalne funkcjonowanie. Rozległe obustronne uszkodzenie hipokampa powoduje poważne trudności w tworzeniu i zapamiętywaniu nowych informacji (amnezja następową) i często wpływa także na wspomnienia powstałe przed wystąpieniem uszkodzeń (amnezja wsteczna). Dzieje się tak w chorobie Alzheimera oraz w innych formach demencji, w których hipokamp jest jednym z pierwszych obszarów ulegających uszkodzeniu (Mu & Gage, 2011; Rao i in., 2022).

Badania prowadzone na zwierzętach wykazały, że hipokamp jest niezbędny do uczenia się i długotrwałego zapamiętywania zadań związanych z pamięcią przestrzenną, np. w trakcie testów polegających na znalezieniu drogi do ukrytego celu (Morris i in., 1982; Sutherland i in., 1982, 2001). Wywołana wysiłkiem fizycznym neurogeneza w hipokampie również związana jest z poprawą pamięci przestrzennej (Carvalho i in., 2014; Lees & Hopkins, 2013). Badania obrazowania mózgu dotyczące orientacji przestrzennej przeprowadzono również na ludziach. Badania dotyczyły grupy londyńskich taksówkarzy, którzy aby uzyskać licencję taksówkarza musieli poznać lokalizację ogromnej liczby miejsc, a także najszybszych tras między nimi. Uzyskane wyniki wykazały, że kierowcy taksówek mają większą tylną część hipokampa

w porównaniu do ogółu społeczeństwa oraz że istnieje pozytywna korelacja między wielkością tylnej części hipokampa, a długością pełnienia funkcji kierowcy. Dodatkowo stwierdzono, że całkowita objętość hipokampa pozostała taka sama, ponieważ wzrost widoczny w tylnej części hipokampa nastąpił kosztem części przedniej (Maguire i in., 2000).

1.7 Zwierzęta transgeniczne

Poznanie funkcji genów realizowane jest najczęściej poprzez badanie skutków ich nadekspresji (ang. *overexpression*) lub delecji (ang. *knock-out*). Zwierzęta z nadekspresją lub delecją wybranego genu są ważnymi modelami badawczymi, które – oprócz otrzymywania wyników o znaczeniu poznawczym – umożliwiają realizację badań o potencjale klinicznym.

Zwierzęta transgeniczne, czyli zmodyfikowane genetycznie, to zwierzęta noszące w swoim genomie sztuczny (egzogenny) konstrukt DNA (transgen) celowo wprowadzany przez eksperymentatora. Uzyskiwanie zwierząt transgenicznych możliwe jest dzięki znajomości fizjologii rozrodu, genetyki i biologii molekularnej oraz dzięki dostępności zaawansowanego sprzętu, jakim jest mikromanipulator umożliwiający manipulację na zarodkach bez zaburzania ich prawidłowego rozwoju. Najczęściej wykorzystywanym do transgenezy gatunkiem zwierząt laboratoryjnych są myszy. W porównaniu z innymi modelami zwierzęcymi praca z myszami okazuje się mieć najwięcej zalet. Ich genom w regionach kodujących białka jest średnio w 85% identyczny z genomem ludzkim. Dostępne narzędzia biologii molekularnej umożliwiają łatwą analizę genomu myszy (Vandamme, 2014). Mały rozmiar tych zwierząt wpływa na niskie koszty hodowli, a krótki okres trwania ciąży (3 tygodnie) umożliwia częsty rozród. Ponadto zarodki myszy są stosunkowo łatwe w hodowli poza ustrojem i dobrze znoszą mikromanipulacje w porównaniu do innych gatunków zwierząt laboratoryjnych (T. R. Kumar i in., 2009; Behringer i in., 2013). Z tego powodu mysie modele zwierząt transgenicznych są szeroko wykorzystywane do poznawania funkcji genów i białek. Poprzez badanie skutków nadekspresji bądź ablacji wybranych genów możliwe jest tworzenie mysich modeli chorób ludzkich. Modele te mają kluczowe znaczenie dla badania etiologii i przebiegu chorób oraz planowania terapii (Babinet, 1990; Hui, 1993).

Istnieje kilka metod, dzięki którym możliwe jest otrzymywanie linii zwierząt transgenicznych. Należy do nich metoda mikroiniekcji materiału genetycznego do przedjądrza oocyty (Gordon i in., 1980; Gordon & Ruddle, 1981), metoda transferu DNA z użyciem wektorów wirusowych (Lois i in., 2002; Pfeifer i in., 2002), metoda wstrzykiwania

zmodyfikowanych zarodkowych komórek macierzystych (ang. *embryonic stem cells*, ES cells) do zarodków w stadium moruli bądź blastocysty (Du i in., 2019; Larson, 2020) oraz transplantacja jąder komórkowych (Wilmut i in., 1997).

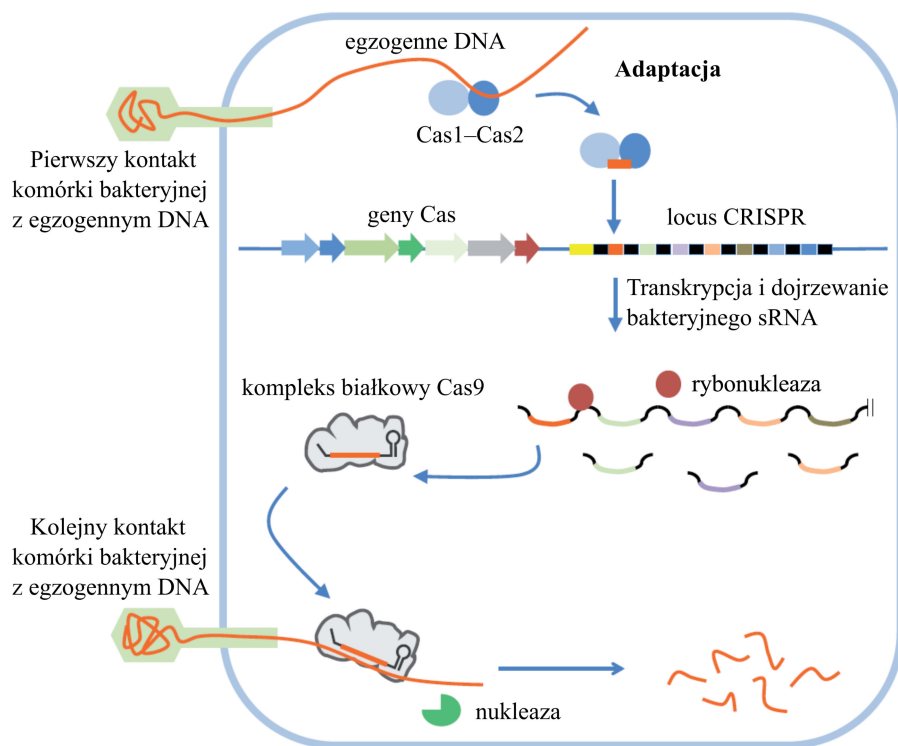
Pierwsza z wymienionych metod polega na mikroiniekcji oczyszczonego i odpowiednio przygotowanego roztworu DNA do przedjądrza (zazwyczaj męskiego, z reguły większego) zapłodnionego oocytu. Podane DNA może mieć formę liniową lub postać sztucznego chromosomu bakteryjnego (ang. *bacterial artificial chromosome*, BAC) lub drożdżowego (ang. *yeast artificial chromosome*, YAC) (Demayo i in., 2012; T. R. Kumar i in., 2009). Wstrzykiwane DNA w postaci liniowej wbudowuje się do genomu w sposób losowy jako jedna lub więcej kopii, często w układzie tandemowym. W przypadku gdy wstrzykiwane DNA (zarówno w formie liniowej, jak i w postaci BAC/YAC) wbudowuje się do genomu przed pierwszym etapem podziału zarodkowego, modyfikacja obecna jest we wszystkich komórkach ciała, a więc również w komórkach pierwotnych komórek rozrodczych (Brinster & Palmiter, 1984; Palmiter & Brinster, 1986). Zapłodnione oocyty przeznaczone do mikromanipulacji pobierane są od samic-dawczyń wcześniej stymulowanych hormonalnie w celu wyprodukowania przez jajnik większej liczby komórek jajowych (hiperowulacja) i pokrytych przez samce. Zarodki po procedurze mikroiniekcji w stadium jedno- lub dwukomórkowym transferowane są do samic-biorczyń (matek zastępczych) będących w ciąży rzekomej. Urodzone oseski niosą w swoim genomie egzogenne DNA, którego identyfikacja możliwa jest między innymi dzięki reakcji łańcuchowej polimerazy przeprowadzonej na materiale uzyskanym z ogona młodych myszy (Demayo i in., 2012; T. R. Kumar i in., 2009; Liu i in., 2013). Wydajność tej metody jest bardzo niska i sięga maksymalnie kilku procent urodzonych osobników.

Do niedawna standardową metodą uzyskiwania linii zwierząt z delecją wybranego genu było wprowadzanie zmodyfikowanych *in vitro* zarodkowych komórek macierzystych do zarodków w stadium moruli bądź blastocysty (Longenecker & Kulkarni, 2009). Metoda ta cechuje się niską wydajnością ze względu na inwazyjne manipulacje na zarodkach oraz fakt, że tylko część z nich ulega implantacji. Często pojawiającym się problemem jest chimeryzm, czyli występowanie w jednym organizmie komórek z różnym genotypem pochodzących z różnych zygot, który może skutkować brakiem wprowadzonej sekwencji genetycznej w komórkach macierzystych gamet. Ponadto procedura związana z tą metodą jest długotrwała, ponieważ wymaga kilkupokoleniowego wyprowadzania heterozygotycznej linii zwierząt (Behringer i in., 2013). Wymienione ograniczenia oraz opracowanie nowej, skuteczniejszej

metody spowodowały znaczny spadek popularności metody mikromanipulacji przy użyciu zmodyfikowanych zarodkowych komórek macierzystych.

1.7.1 System CRISPR/Cas9

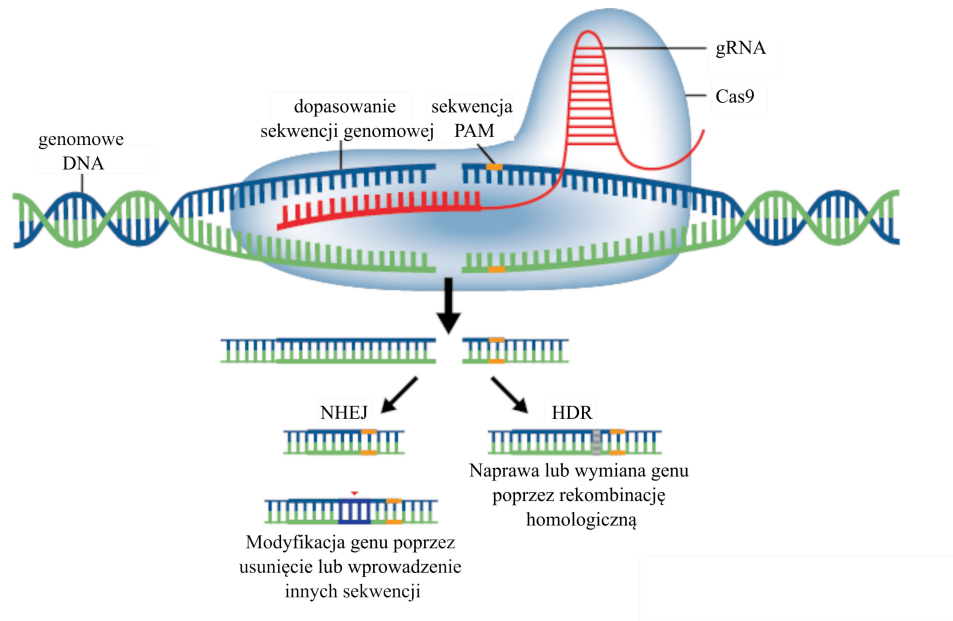
W nowej metodzie działającej w oparciu o system CRISPR/Cas9 (ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9*) edycja genomu przebiega z udziałem endonukleazy Cas9 oraz komórkowych mechanizmów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA (Mali, Esvelt, i in., 2013). Opierając się na odpowiednio zaprojektowanych sekwencjach „doprowadzających”, tzw. gRNA (ang. *guide RNA*), rozwiązanie to cechuje się wysoką specyficzną oraz wysoką wydajnością transformacji (Singh i in., 2015).



Rycina 5. Schemat przedstawiający komórkę prokariotyczną zainfekowaną egzogennym DNA. W fazie adaptacyjnej, podczas pierwszego kontaktu, kompleks Cas1-Cas2 (niebieski) wychwytuje fragment egzogennej DNA (pomarańczowy). Wychwycony fragment jest integrowany w specjalne miejsca w genomie bakteryjnym (locus CRISPR). Nowa sekwencja jest integrowana obok sekwencji liderowej zawierającej promotor (żółty). Transkrypt jest specyficznie cięty przez rybonukleazę generując małe fragmenty RNA zwane crRNA (CRISPR RNA) oraz fragmenty komplementarne do egzogennej DNA (gRNA). Przy kolejnym kontakcie komórki z tym samym egzogennym DNA, jego sekwencja rozpoznawana jest przez związaną z gRNA endonukleazę, np. Cas9. Rozpoznanie egzogennej fragmentu prowadzi do jego degradacji. Rycina to zmodyfikowana ilustracja z artykułu Rutkauskasa i in. (2017).

System CRISPR/Cas jest prokariotycznym układem odporności nabytej (Horvath & Barrangou, 2010). W układzie tym (Rycina 5) fragmenty egzogenego DNA (np. DNA fagów bakteryjnych) są inkorporowane w specjalne miejsca w genomie komórki bakteryjnej, tj. pomiędzy sekwencje CRISPR. Fragmenty te ulegają transkrypcji wraz z odcinkami CRISPR, a powstałe RNA jest cięte na krótkie fragmenty, które składają się z części komplementarnej do odcinków egzogenego DNA (guide RNA, gRNA) oraz części komplementarnej do sekwencji CRISPR, która jest rozpoznawana i wiązana przez endonukleazy, np. Cas9. W ten sposób, dzięki gRNA o odpowiedniej sekwencji, endonukleaza Cas9 może *specyficznie* ciąć egzogenne DNA, co umożliwia obronę przed wirusami i plazmidami (Jinek i in., 2012; Wiedenheft i in., 2012).

System CRISPR/Cas został podzielony na trzy typy: typ I, typ II i typ III. Podczas gdy typy I i III występują zarówno u bakterii jak i archeonów, typ II jest unikatowy dla bakterii (Rutkauskas i in., 2017). Bakteryjny system CRISPR/Cas typu II (Rycina 6) okazał się być najlepiej scharakteryzowanym i najbardziej uniwersalnym narzędziem do edycji genów organizmów wyższych (Mali, Yang, i in., 2013; Sander & Joung, 2014). Dzięki możliwości zaprojektowania krótkich (ok. 20-nukleotydowych) sekwencji „doprowadzających”, czyli gRNA, które wykorzystują prostą komplementarność zasad, możliwe jest skierowanie endonukleaz w dowolne miejsce w genomie. Endonukleazy pochodzenia prokariotycznego (np. Cas9) muszą być wprowadzone niezależnie. Przecięte genomowe DNA ulega naprawie dzięki działaniu naturalnych mechanizmów naprawy dwuniciowych pęknięć, takich jak homologiczna naprawa DNA (ang. *homology-directed repair*, HDR) albo, częściej, łączenie końców niehomologicznych (ang. *non-homologous end joining*, NHEJ) (Singh i in., 2015). Wspomniana łatwość projektowania specyficznych gRNA oraz wydajność uzyskiwania zmodyfikowanych genetycznie zwierząt (w porównaniu z innymi metodami) (Singh i in., 2015; H. Yang i in., 2014) umożliwiają edycję wielu genów jednocześnie (H. Wang i in., 2013). To główne zalety i ogromny potencjał aplikacyjny systemu CRISPR/Cas9. Należy jednak pamiętać, że stosowanie technologii CRISPR/Cas9 niesie ze sobą ryzyko pojawienia się niespecyficznych mutacji, które mogą występować poza celem w genomie (ang. *off-target mutations*) (Y. Lin i in., 2014).



Rycina 6. System edycji genomu za pomocą endonukleazy Cas9. W systemie CRISPR/Cas9, egzogenna 20-nukleotydomowa sekwencja gRNA ulega hybrydyzacji z DNA (w miejscu bezpośrednio poprzedzającym sekwencję PAM, ang. *protospacer adjacent motif*). Spowodowane tym pęknięcia dwuniciowego DNA stają się substratami dla endogennych, komórkowych mechanizmów naprawy DNA, które katalizują takie mechanizmy jak NHEJ i HDR. Rycina to zmodyfikowana ilustracja z artykułu Charpentier i Doudny (2013).

Potencjał ten może być dodatkowo wzmocniony poprzez kontrolowanie momentu włączenia systemu CRISPR/Cas9 (Gilbert i in., 2013; H. Wang i in., 2013). Może być to realizowane z wykorzystaniem indukowalnych rekombinaz, np. w ramach systemu Cre/loxP (Lakso i in., 1992). Niezależnie od kontroli czasowej możliwa jest również kontrola miejsca działania systemu CRISPR/Cas9. Odbywa się to poprzez dostarczenie sekwencji gRNA (lub Cas9) do wybranej tkanki za pomocą wektorów wirusowych. Najskuteczniejszymi wektorami, szeroko stosowanymi w badaniach neuronów, są wirusy AAV (ang. *adeno-associated virus*), w przypadku których czas trwania ekspresji wprowadzonego genu sięga kilkudziesięciu tygodni. Wirusy te cechują się małą toksycznością (Burger i in., 2005; Heidenreich & Zhang, 2016; Royo i in., 2008). W 2015 roku Swiech i in. zastosowali dwa osobne wektory AAV do dostarczenia zarówno genu endonukleazy Cas9 jak i sekwencji gRNA do mózgu dorosłej myszy (Swiech i in., 2015), a rok wcześniej Platt i in. otrzymali myszy transgeniczne z Cre-zależnym genem Cas9 (Platt i in., 2014).

1.7.2 System Cre/lox

Opisane w poprzedniej sekcji metody otrzymywania zwierząt transgenicznych z nadekspresją bądź delecją wybranego genu prowadzą do pojawienia się zmian w genomie zwierzęcia od początku jego życia. Taki rodzaj ekspresji lub usunięcia nazywany jest konstytutywnym. Wprowadzanie zmian konstytutywnych w genomie może powodować problemy z interpretacją wyników ze względu na wystąpienie między innymi efektu kompensacji braku usuniętego genu przez inne geny homologiczne lub pokrewne (von Koch i in., 1997; Nedvetzki i in., 2004; Housden i in., 2017). Korzystnym rozwiązaniem jest zatem zastosowanie indukowanej (niekonstytutywnej) nadekspresji bądź delecji w docelowych komórkach i w wybranym czasie.

System Cre/lox umożliwia miejscowo-specyficzną rekombinację i jest stosowany do ukierunkowanych manipulacji, między innymi w genomie eukariotycznym (Sauer, 1987; Sauer & Henderson, 1988). System Cre/lox składa się z rekombinazy Cre pochodzącej z bakteriofaga P1 oraz dwóch sekwencji zwanych lox. Sekwencje lox, a w zasadzie loxP (ang. *locus X-over P1*), to miejsca w genomie bakteriofaga P1 składające się z dwóch odwróconych powtórzeń o identycznej sekwencji (palindromów) i długości 13 pz odseparowanych sekwencją składającą się z 8 pz. Rekombinaza Cre rozpoznaje i specyficznie wiąże sekwencje loxP (Abremski i in., 1983; Abremski & Hoess, 1984; Hoess & Abremski, 1985). Specyficzność działania systemu Cre/loxP dla komórek danego typu jest nadawana poprzez umieszczenie rekombinazy Cre pod promotorem specyficznym dla tych komórek. Ponadto dzięki modyfikacjom pierwotnej sekwencji loxP możliwe jest nie tylko wycinanie wybranego genu, ale również jego odwracanie oraz zamiana (Missirlis i in., 2006). System Cre/loxP może być wzbogacony o indukowaną formę rekombinazy Cre, umożliwiającą kontrolę czasową wprowadzanej modyfikacji. Najszerszej stosowana wersja indukowanego systemu Cre/loxP zawiera wariant Cre połączony ze zmutowaną formą ludzkiego receptora estrogenowego (ang. *estrogen receptor*) ER^{T2}. Domena ER^{T2} hamuje działanie rekombinazy Cre poprzez zatrzymanie jej w cytoplazmie komórki. Domena ta może wiązać syntetyczny ligand receptora estrogenowego, 4-hydroksytamoksyfen (4-OHT lub tamoksyfen). Po związaniu się z tamoksyfenem Cre-ER^{T2} jest specyficznie aktywowana i transportowana do jądra komórkowego (Bockamp i in., 2008; Feil i in., 1997; Walrath i in., 2010; D.-Y. Wang i in., 2004), gdzie rozpoznaje miejsca loxP i rekombinuje sekwencję zawartą między nimi.

2 Cele pracy

Ze względu na lokalizację i zmiany strukturalne białka PML i ciałek jądrowych PML postuluje się ich zaangażowanie w szereg procesów mających istotny wpływ na prawidłowe funkcjonowanie neuronów w mózgu dorosłych zwierząt. Jednakże ich szczegółowa rola nie została jak dotąd dobrze określona. Z tego powodu celem mojej rozprawy doktorskiej było poznanie funkcji białka PML i ciałek jądrowych PML w hipokampie dorosłych myszy. Do manipulacji poziomem ekspresji białka PML wykorzystano zwierzęta modyfikowane genetycznie, umożliwiające poznanie funkcji genów *in vivo* zarówno na poziomie komórkowym (zmiany morfologiczne i molekularne), jak i na poziomie całego organizmu (zmiany behawioralne).

Szczegółowe cele niniejszej rozprawy doktorskiej to:

1. Wytworzenie zmodyfikowanych genetycznie dorosłych myszy z podwyższonym poziomem oraz z delecją białka PML w neuronach hipokampa.
2. Analiza behawioralna uzyskanych modeli zwierząt z podwyższonym poziomem oraz z delecją białka PML.
3. Analiza zmian morfologii jądra komórkowego oraz organizacji chromatyny neuronów zwierząt z podwyższonym poziomem oraz z delecją białka PML.

3 Materiały i metody

3.1 Techniki biologii molekularnej

3.1.1 Przygotowanie bakterii chemokompetentnych *E. coli*

W trakcie prowadzonych doświadczeń korzystano z dwóch rodzajów bakterii chemokompetentnych: DH5 α oraz TOP10. Przygotowanie bakterii DH5 α przebiegało następująco: komórki *E. coli* szczepu DH5 α wysiano na płytkę z podłożem stałym (LB + agar) i pozostawiono na ok. 12–14 godzin (przez noc) w temperaturze 37°C. Następnego dnia 250 ml pożywki SOB⁺⁺ medium inokulowano pojedynczą kolonią z płytki, następnie hodowano z wytrząsaniem przy prędkości 180 rpm (wytrząsarka New Brunswick Scientific) przez około 12–14 godzin (przez noc) w temperaturze 18–20°C do momentu uzyskania OD₆₀₀ = 0,4–0,6. Kolejnego dnia hodowlę schładzano przez około 10 minut na lodzie, a następnie wirowano przez 10 minut w 4°C z przyspieszeniem 5000×g. Nadsącz usuwano, a osad bakterii zawieszono w 80 ml schłodzonego roztworu TB pozostawiając przez kolejne 10 minut na lodzie. Zawiesinę ponownie wirowano przy takich samych parametrach jak powyżej. Nadsącz ponownie usuwano, a osad zawieszono w 20 ml roztworu TB z dodatkiem 1,4 ml dimetylosulfotlenku (DMSO). Uzyskaną zawiesinę porcjowano po 50–100 μ l do uprzednio zamrożonych (–80°C) probówek typu Eppendorf o objętości 1,5 ml i zamrażano w ciekłym azocie. Komórki kompetentne przechowywano w temperaturze –80°C. Skład roztworów wykorzystanych w procedurze przedstawiono poniżej.

Pożywka SOB⁺⁺ – przygotowywana dzień przed użyciem, pH = 7,0 (pH ustawiane przy użyciu NaOH), autoklawowana (przed dodaniem MgCl₂ oraz MgSO₄):

- 20% (w/v) Bacto-tryptone (Sigma-Aldrich),
- 5% (w/v) ekstrakt drożdżowy (Sigma-Aldrich),
- 0,5% (w/v) NaCl (Sigma-Aldrich),
- 0,19% (w/v) KCl (Sigma-Aldrich),
- 10 mM MgCl₂* (Chempur),
- 10 mM MgSO₄* (Chempur).

*Związek poddano sterylizacji i w warunkach jałowych dodano przed samym użyciem.

Roztwór TB – przygotowany dzień przed użyciem, pH = 6,8:

- 10 mM HEPES (pH = 6,7, Sigma-Aldrich),
- 250 mM KCl (Sigma-Aldrich),
- 15 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich),
- 55 mM MnCl₂, dodany przy użyciu filtru strzykawkowego (Chempur).

Bakterie chemokompetentne TOP10 przygotowano z wykorzystaniem metody rubinowo-wapniowej. Do tego celu, 30 ml płynnej pożywki LB (Luria Broth, Sigma-Aldrich) inokulowano bakteriami *E. coli* TOP10, a następnie hodowano z wytrząsaniem przy prędkości 220 rpm (wytrząsarka New Brunswick Scientific) przez około 12–14 godzin (przez noc) w temperaturze 37°C. Po 12 godzinach inkubacji, 2 ml zawiesiny dodawano do 120 ml LB i ponownie wytrząsano przez kolejne 1,5–2,5 godziny do momentu uzyskania OD₆₀₀ = 0,4–0,5. Kolejną hodowlę schładzano przez około 10 minut na lodzie, a następnie wirowano przez 10 minut w 4°C z przyspieszeniem 4500×g. Nadsącz usuwano, a osad bakterii zawieszano w 16,7 ml schłodzonego roztworu RF1 (skład roztworu poniżej) pozostawiając mieszaninę przez kolejną godzinę na lodzie, sporadycznie mieszając. Zawiesinę ponownie wirowano przy takich samych parametrach. Nadsącz usuwano, osad zawieszano w 4 ml schłodzonego roztworu RF2 i inkubowano na lodzie przez 10 minut. Następnie roztwór porcjowano (zmrożonymi do –80°C końcówkami) po 50–100 µl do uprzednio zmrożonych (–80°C) probówek typu Eppendorf o objętości 1,5 ml, w chłodni, na suchym lodzie. Komórki kompetentne przechowywano w temperaturze –80°C. Skład roztworów wykorzystanych w procedurze przedstawiono poniżej.

RF1 – roztwór przygotowywany bezpośrednio przed użyciem, pH = 5,8 (pH ustawiane przy użyciu 0,2 M CH₃COOH), przefiltrowany przez filtr 0,22 µm (Millipore):

- 100 mM RbCl (Serva),
- 50 mM MnCl₂ × 4H₂O (Sigma-Aldrich),
- 30 mM CH₃COOK (Sigma-Aldrich),
- 10 mM CaCl₂ × 2H₂O (Sigma-Aldrich),
- 15% (v/v) glicerol (Chempur).

RF2 – roztwór przygotowywany bezpośrednio przed użyciem, pH = 6,8 (pH ustawiane przy użyciu 1 M NaOH), przefiltrowany przez filtr 0,22 μm (Millipore):

- 10 mM RbCl (Serva),
- 10 mM MOPS (Sigma-Aldrich),
- 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich),
- 15% (v/v) glicerol (Chempur).

Uzyskane komórki bakterii chemokompetentnych zarówno DH5 α jak i TOP10 sprawdzano pod względem wydajności transformacji (ang. *transformation efficiency*, TE) mierzonej jako liczba kolonii (ang. *colony forming units*, cfu) na μg DNA (cfu/ μg). Do transformacji użyto plazmidu w różnych rozcieńczeniach (1 ng, 10 ng, 100 ng), a następnie po wysianiu i całonocnej inkubacji kolonie liczone przy wykorzystaniu wzoru: liczba kolonii/(μg DNA \times rozcieńczenie). Następnie szacowano wydajność transformacji, a bakterie o TE rzędu co najmniej 10^8 cfu/ μg DNA przeznaczano do dalszego wykorzystania.

3.1.2 Transformacja bakterii chemokompetentnych

Do przeprowadzenia transformacji wykorzystywano dwa rodzaje bakterii kompetentnych: bakterie DH5 α oraz bakterie TOP10. W obu przypadkach stosowano metodę szoku termicznego w 42°C. Bakterie kompetentne po wyjęciu z -80°C rozmrażano przez 5–10 minut na lodzie. Do rozmrożonych bakterii dodawano od 5 do 100 ng DNA i inkubowano na lodzie przez 30–40 minut. Następnie mieszaninę bakterii kompetentnych i DNA umieszczano w bloku grzewczym (Thermomixer Eppendorf) w temperaturze 42°C na 60 sekund. Mieszaninę ponownie umieszczano na lodzie na około 5 minut, po czym zawieszano w 1 ml płynnej pożywki bakteryjnej SOC (ang. *super optimal catabolite repression*, Invitrogen) i umieszczano w wytrząsarce (180 rpm) w temperaturze 37°C na 1–1,5 godziny. Po tym czasie bakterie wirowano przy prędkości obrotowej 5000 rpm (wirówka Eppendorf 5810), nadmiar pożywki usuwano, a powstały osad bakteryjny zawieszano w pozostałej ilości medium (około 100 μl). Mieszaninę wysiewano na szalki Petriego ze stałym podłożem selekcyjnym LB agar (BioShop) i antybiotykiem (w przypadku wszystkich użytych w projekcie konstruktów była to ampicylina (Sigma-Aldrich) w stężeniu końcowym 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) w celu selekcji bakterii posiadających plazmid. Płytki inkubowano przez noc w temperaturze 37°C.

3.1.3 Izolacja i oczyszczanie plazmidowego DNA

DNA plazmidowe, które w doświadczeniach używano do transfekcji komórek eukariotycznych lub produkcji wektorów wirusowych, musiał oznaczać się wysokim stopniem czystości oraz być wolnym od endotoksyn. Do izolacji i oczyszczania DNA plazmidowego wykorzystano gotowy zestaw Endofree Plasmid MAXI Kit (Syngen). Bakterie hodowano przez noc w 500 ml płynnej pożywki LB z dodatkiem antybiotyku, w temperaturze 37°C na wytrząsarce (KS 4000, firmy IKA) przy prędkości 220 rpm. Kolejnego dnia bakterie wirowano (15 min, 6000×g, 4°C, wirówka Heraeus Multifuge X3R Centrifuge; Thermo Scientific), a osad bakteryjny zawieszano w roztworze lizującym. Przy dalszych procedurach izolacji postępowano według protokołu dołączonego do zestawu. Uzyskany precypitat DNA zawieszano w 100–300 µl wody miliQ.

W prowadzonych doświadczeniach korzystano również z izolacji i oczyszczania plazmidowego DNA na małą skalę, potrzebnego między innymi do sprawdzania kolonii bakteryjnych uzyskanych na drodze klonowania. W tym celu korzystano z gotowego zestawu QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Bakterie hodowano przez noc, w 2–5 ml płynnej pożywki LB z dodatkiem antybiotyku, w temperaturze 37°C, na wytrząsarce (KS 4000; firmy IKA) przy prędkości 220 rpm. Następnego dnia bakterie wirowano (5 min, 12000×g, temperatura pokojowa, wirówka Heraeus Multifuge X3R Centrifuge, firmy Thermo Scientific), a w dalszych krokach postępowano zgodnie z protokołem załączonym do zestawu. Wyizolowany precypitat zawieszano w 30–50 µl wody miliQ.

3.1.4 Tworzenie i przechowywanie rezerwowych szczepów bakteryjnych

Celem zabezpieczenia wektorów plazmidowych, na początkowym etapie izolacji i oczyszczania DNA tworzono rezerwy szczepów bakteryjnych. W tym celu po nocnej inkubacji w temperaturze 37°C z płynnej hodowli bakteryjnej odejmowano po 2–4 ml pożywki. Następnie do 1,5 ml próbówek typu eppendorf dodawano 200 µl wcześniej wysterylizowanego glicerolu (Sigma-Aldrich) oraz 800 µl bakterii i natychmiast umieszczano w temperaturze –80°C. Tak przygotowane rezerwy bakteryjne gwarantowały możliwość skrócenia czasu przygotowań kolejnych izolacji DNA.

3.1.5 Pomiar stężenia DNA

Stężenie i czystość DNA mierzono przy użyciu spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) poprzez pomiar absorbancji przy długościach fal 260 nm i 280 nm. Czystość DNA ustalano na podstawie wyznaczenia stosunku współczynników A260 nm/A280 nm. Przy stężeniu DNA mieszczącym się w zakresie 1,8–2,0 preparat uznawano za czysty. Dla każdego preparatu pomiar powtarzano trzykrotnie, a wartością ostateczną była średnia z otrzymanych liczb.

3.1.6 Klonowanie wektorów plazmidowych

W trakcie trwania doświadczeń wielokrotnie przeprowadzono procedurę klonowania przy użyciu różnych wektorów plazmidowych oraz różnych metod. Każdy z powstałych wektorów plazmidowych był jednocześnie wektorem wykorzystywanym do produkcji wektorów wirusowych AAV.

3.1.6.1 Klonowanie klasyczne

Klonowanie klasyczne, dwustopniowe, wykorzystano do otrzymania wektora plazmidowego służącego do wytworzenia linii myszy DIO-EF1 α -PML.

Przygotowanie wstawki

Do przygotowania wstawki wykorzystano cDNA kodujący I izoformę białka PML. Aby namnożyć fragment cDNA dla białka PML, wykorzystano zaprojektowane i przedstawione poniżej startery:

PML-*EcoRI*: 5'-GCTTGAATCCATGGAAACTGAACC-3',

PML-*EcoRV*: 5'-GCTTGATATCCTAGGCCAGGCATC-3'.

Spodziewana wielkość namnożonego produktu to 2520 pz. Do przeprowadzenia reakcji namnażania cDNA wykorzystano gotowy zestaw PCR Using Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs). Ze względu na amplifikację dużego produktu (około 2520 pz) zdecydowano o wyborze polimerazy charakteryzującej się wysoką dokładnością, wydajnością oraz najniższym współczynnikiem błędów. Skład mieszaniny (Tabela 1) oraz warunki reakcji (Tabela 2) przedstawiono poniżej.

Tabela 1. Skład mieszaniny reakcyjnej do przeprowadzenia reakcji PCR (amplifikacja cDNA dla PML).

Skład mieszaniny reakcyjnej	Objętość [μl]
matryca – plazmid zawierający sekwencję cDNA dla białka PML (10 ng)	0,2
10 μM starter PML- <i>EcoRI</i>	1,25
10 μM starter PML- <i>EcoRV</i>	1,25
10 mM mieszanina deoksynukleotydów (dNTP mix)	0,5
5X Q5 Reaction Buffer	5
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	0,25
woda destylowana miliQ	16,55
Objętość końcowa mieszaniny: 25 μl	

Tabela 2. Warunki przeprowadzenia reakcji PCR dla pary starterów: PML-*EcoRI* i PML-*EcoRV*.

Etap	Temperatura [°C]	Czas trwania etapu [mm:ss]
1. Wstępna denaturacja	98	00:30
2. Denaturacja	98	00:10
3. Przyłączanie starterów	62	00:30
4. Polimeryzacja	72	00:30
5. Wydłużanie końcowe	72	02:00
6. Zatrzymanie reakcji	4	∞
Dla etapów od 2 do 4 przeprowadzono 30 cykli.		

Uzyskany produkt o wielkości 2520 pz był oczyszczany z żelu agarozowego przy użyciu QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Następnie produkt (około 5 μg) trawiono przy użyciu enzymów restrykcyjnych *EcoRI* oraz *EcoRV* (1 U enzymu/1 μg DNA, 37°C, 90 min, New England Bio Labs), otrzymując produkty o wielkościach 1984 pz (5' *EcoRI* i 3' *EcoRI*) oraz 536 pz (5' *EcoRI*, 3' *EcoRV*). Ze względu na występowanie w sekwencji wstawki miejsca restrykcyjnego dla enzymu *EcoRI* zdecydowano o klonowaniu dwustopniowym z uwzględnieniem defosforylacji wektora. Z tego powodu po trawieniu enzymatycznym

produkt ponownie nałożono na żel agarozowy, na którym po przeprowadzeniu rozdźwięku elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (EtBr, Sigma-Aldrich) uwidoczniło dwa pasy o wyżej wspomnianych wielkościach. Elektroforezę przeprowadzano w roztworze TAE stosując prąd o napięciu 100 V przez 45–50 min. Przy pomocy transiluminatora emitującego światło UV oraz za pomocą sterylnej skalpela produkty (1984 i 536 pz) wycinano oraz ponownie oczyszczano przy użyciu QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Stężenie wyizolowanych fragmentów DNA sprawdzono przy użyciu spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

Przygotowanie wektora

Wektor plazmidowy przeznaczony do dalszego etapu klonowania trawiono przy pomocy enzymów restrykcyjnych (*EcoRI* i *EcoRV*). Następnie wektor po trawieniu oczyszczano przy użyciu zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), a stężenie sprawdzano przy użyciu spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

Ligacja, defosforylacja wektora oraz analiza restrykcyjna fragmentów DNA

Zarówno I jak i II etap ligacji fragmentów DNA przeprowadzono przy użyciu zestawu Quick Ligation Kit (New England BioLabs). Reakcję przeprowadzono w temperaturze pokojowej (około 25°C) przez 5 minut. Na podstawie wielkości wektora i wstawki wyliczono objętość mieszaniny ligacyjnej, w której stosunek molowy wektora do wstawki wynosił 1:3 (odpowiednio 30 i 90 fmol na 1 µl ligazy Quick T4 DNA Ligase). W I etapie ligacji wykorzystano wstawkę o wielkości 536 pz, posiadającą lepkie końce powstałe w wyniku trawienia enzymami restrykcyjnymi *EcoRI* i *EcoRV*. Mieszaninę ligacyjną transformowano do bakterii chemokompetentnych TOP10 (opis procedury w podsekcji 3.1.2), a następnie wysiewano na szalki Petriego ze stałym podłożem selekcyjnym LB agar oraz antybiotykiem selekcyjnym (ampicylina). Kolejnego dnia z uzyskanych kolonii bakteryjnych izolowano DNA plazmidowe przy pomocy zestawu Syngen Plasmid Mini Kit (Syngen). Następnie w celu sprawdzenia efektywności ligacji, ponownie przeprowadzano analizę restrykcyjną przy użyciu tych samych enzymów restrykcyjnych. Po dokonaniu pozytywnej selekcji otrzymanych klonów rozpoczynano II etap ligacji. Wektor wraz z wklonowanym fragmentem wstawki (536 pz) ponownie poddano trawieniu, tym razem jedynie przy użyciu enzymu restrykcyjnego *EcoRI*. Reakcję enzymatyczną inaktywowano (5 min, 80°C), a następnie, aby zapobiec

religacji, wektor defosforylowano zasadową fosfatazą krewetkową (ang. *shrimp alkaline phosphatase*, Promega; warunki reakcji: 1 godz., 37°C, 1 U SAP/1 µg DNA). Uzyskany produkt oczyszczano (PCR Purification Kit, Qiagen), następnie według wcześniej przyjętej zasady wyliczano stosunek molowy wektora do wstawki, oraz sporządzano mieszaninę ligacyjną wektora (z fragmentem wstawki – 536 pz) oraz drugiej części wstawki (1984 par zasad). Mieszaninę transformowano do bakterii chemokompetentnych TOP10 (opis procedury w podsekcji 3.1.2), wysiewano na szalki Petriego, a z uzyskanych kolonii bakteryjnych izolowano DNA plazmidowe (Syngen Plasmid Mini Kit, Syngen). W celu wyselekcjonowania klonów bakteryjnych zawierających odpowiednio zmodyfikowane DNA plazmidowe poddawano je analizie za pomocą enzymów restrykcyjnych. Wielkość spodziewanych prążków w zależności od użytych enzymów to:

– *EcoRI/EcoRV*: 5597 pz, 1984 pz, 536 pz,

– *BglIII*: 4186 pz, 2942 pz, 989 pz.

Klony dające prawidłowy wzór prążków w dalszej kolejności zostały przesłane do firmy Genomed w celu sekwencjonowania. Sekwencje zaprojektowanych starterów użytych do sekwencjonowania przedstawiono poniżej:

Starter I:	5'-AAAAC TTTATCCATCTTTGCA-3'	(For1)
Starter II:	5'-AAGAAGTGCAGAGTG TACAGG-3'	(For2)
Starter III:	5'-CCTGTGGCTATGGTAAAAACA-3'	(Rev1)
Starter IV:	5'-CATAGCGTAAAAGGAGCAACA-3'	(WPRE-R)

3.1.6.2 Klonowanie wektorów plazmidowych wykorzystanych w systemie CRISPR/Cas9

Projektowanie i przygotowanie 20-nukleotydowych sekwencji „doprowadzających” (gRNA)

Specyficzne sekwencje nukleotydowe zaprojektowano w oparciu o protokół Zhanga (Massachusetts Institute of Technology, USA) z użyciem gotowych narzędzi, stworzonych i udostępnionych przez jego grupę na stronie: <http://crispr.mit.edu>. Poniżej przedstawiono sekwencję pary starterów wykorzystanych w niniejszej pracy.

Egzon I:

PML_g1_For: 5'-ACCGTGGATCTCCCTGTCGACAAC-3',

PML_g1_Rev: 5'-AACGTTGTCGACAGGGAGATCCAC-3',

PML_g6_For: 5'-ACCGTAGTCTTCGGAGGGTTCCTC-3',

PML_g6_Rev: 5'-AACGAGGAACCCTCCGAAGACTAC-3'.

Egzon II:

PML_g2_For: 5'-ACCGGCGGTGTTCCGGCAGATCG-3',

PML_g2_Rev: 5'-AACCGATCTGCCGGAACACCGCC-3'.

Seqwencje kontrolne:

SCR_For: 5'-ACCGCACTACCAGAGCTAACTCA-3',

SCR_Rev: 5'-AACTGAGTTAGCTCTGGTAGTGC-3'.

Aby namnożyć potrzebne do dalszych etapów klonowania pary odcinków oligonukleotydowych, przeprowadzono reakcję hybrydyzacji. W tym celu sporządzono mieszaninę, w skład której wchodziło: po 1 µl każdego starteru z pary, 1 µl buforu (10× T4 Ligase Buffer, Thermo Fisher Scientific) oraz 7 µl wody miliQ do końcowej objętości $V_k = 10 \mu\text{l}$. Reakcję przeprowadzono w temperaturze 95°C przez 5 minut, a następnie mieszaninę schładzano do temperatury 25°C w tempie 0,1°C na sekundę. Uzyskane pary oligonukleotydów przechowywano do tygodnia w 4°C.

Przygotowanie wstawki

Jako matrycę dla wcześniej przygotowanych wstawek wykorzystano wektor plazmidowy przeznaczony do pracy w systemie CRISPR/Cas9. Wektor wcześniej namnożono na dużą skalę używając w tym celu gotowego zestawu do izolacji i oczyszczania plazmidowego DNA NucleoBond Xtra Maxi kit for transfection-grade plasmid DNA (Macherey-Nagel). Kolejno plazmid trawiono przy pomocy enzymu *SapI* (zamiennie nazywanym *LguI*, FastDigest – ThermoFisher Scientific), gdzie na 1 U enzymu dodawano 1 µg DNA, a reakcję przeprowadzano w 37°C, ≥ 60 min. Następnie przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 0,7% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (EtBr, Sigma-Aldrich), a otrzymany produkt izolowano z żelu używając sterylnej skalpela oraz gotowego zestawu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Columns for gel extraction and PCR clean up (Macherey-Nagel). Wektor eluowano przy pomocy 30 µl buforu (5 mM Tris, pH 8.5) oraz sprawdzano uzyskane stężenie przy użyciu NanoDropa 2000 (Thermo Scientific).

Ligacja

Pary oligonukleotydów były niezależnie wprowadzane do wektora plazmidowego. Do tego celu oligonukleotydy rozcieńczono 1:50 przy użyciu buforu do elucji (5 mM Tris, pH 8.5), a następnie przeprowadzono ligację każdej z pary oligonukleotydów z wektorem plazmidowym. Skład mieszaniny ligacyjnej (Tabela 3) przedstawiony poniżej.

Tabela 3. Skład mieszaniny ligacyjnej do uzyskania plazmidu zawierającego sekwencje gRNA dla PML.

Skład mieszaniny reakcyjnej	Objętość [µl]
matryca – plazmid pX552-TOM po trawieniu <i>LguI</i> (50 ng)	3
para oligonukleotydów (1:50)	1
10× T4 Ligation Buffer	1
T4 DNA Ligase	1
woda destylowana miliQ	4
Objętość końcowa mieszaniny: 10 µl	

Tak przygotowaną mieszaninę ligacyjną pozostawiano w temperaturze pokojowej na około 30–60 min, a następnie transformowano (według protokołu przedstawionego w podsekcji 3.1.2) do bakterii chemokompetentnych Stbl3 (ThermoFisher Scientific). Mieszaninę po transformacji wysiewano na szalki Petriego ze stałym podłożem selekcyjnym LB agar (BioShop) z antybiotykiem selekcyjnym (ampicylina) oraz inkubowano przez noc w temperaturze 37°C.

Sekwencjonowanie

Kolejnego dnia z uzyskanych kolonii bakteryjnych izolowano DNA plazmidowe przy pomocy gotowego zestawu NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA (Macherey-Nagel). Otrzymane klony nie zostały wcześniej poddane analizie restrykcyjnej ze względu na brak możliwości rozpoznania różnic na żelu agarozowym dla produkt o wielkości około 20 nukleotydów. Z tego powodu losowo wybrane klony zostały przesłane do firmy zewnętrznej w celu sekwencjonowania. Sekwencję starteru użytego do sekwencjonowania przedstawiono poniżej:

U6-For: 5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATTC-3'.

3.2 Procedura wytwarzania wektorów rAAV

3.2.1 Hodowla linii komórkowych HEK293

Linia HEK293 (ang. *human embryonic kidney 293 cells*) jest to linia komórkowa wyprowadzona z embrionalnych ludzkich komórek nerek, popularnie wykorzystywana do produkcji wektorów wirusowych AAV. Komórki HEK293 bankowane w ilości 1 mln standardowo przechowywano w oparach ciekłego azotu. Komórki rozmrażano poprzez przeniesienie ich do łaźni wodnej o temperaturze 37°C na 1–2 minuty, a następnie wysiewano na butelkę o powierzchni 175 cm² w 22–25 ml pożywki. Do hodowli używano pożywki DMEM (ang. *Dulbecco's modified Eagle's medium*; Sigma-Aldrich, nr kat. 6429) wzbogaconej glukozą o stężeniu 4500 mg/L oraz z dodatkiem 10% (v/v) płodowej surowicy bydlęcej (ang. *fetal bovine serum*, FBS; Sigma-Aldrich) i 2% (v/v) L-glutaminy o stężeniu 200 mM (Gibco). Hodowlę komórek prowadzono w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO₂ (inkubator Binder) do momentu uzyskania 50% konfluencji. Następnie komórki były przesiewane. Przy użyciu 0,05% roztworu trypsyny-EDTA (Sigma-Aldrich) komórki odklejano z dna butelki, wirowano 5 minut z przyspieszeniem 120×g w temperaturze

pokojowej (Sigma-Aldrich 2-16K polyGen), a otrzymany osad zawieszano w pożywce i wysiewano na 5 butelek o powierzchni 175 cm². Kolejny etap powtarzany był według podobnego schematu. Komórki przy konfluencji 50% przesiewano na 10 szalek o średnicy 15 cm.

3.2.2 Transfekcja komórek HEK293

Komórki HEK293, wysiane wcześniej na 10 szalek o średnicy 15 cm, transfekowano przy konfluencji około 70–80% (z reguły 48 godzin po wysianiu). Przed rozpoczęciem transfekcji, pożywkę odciągano, a następnie dodawano 12,5 ml pożywki DMEM wzbogaconej glukozą o stężeniu 4500 mg/L oraz z dodatkiem 2% (v/v) FBS i 2% (v/v) L-glutaminy o stężeniu 200 mM (Gibco). Zmiana pożywki na pożywkę ze zmniejszoną ilością FBS miała na celu wydajniejszą transfekcję. Następnie przygotowywano mieszaninę transfekcyjną zawierającą: pożywkę DMEM z dodatkiem dwóch plazmidów pomocniczych pRC oraz pDP1rs, wymaganych do namnożenia i produkcji rekombinowanych wektorów wirusowych rAAV (ang. *recombinant adeno-associated virus*), plazmid ekspresyjny ze wstawką umieszczoną między sekwencjami ITR oraz odczynnik PEI (ang. *polyethylenimine*, MW ~25 000, Polysciences, Inc.) o stężeniu 1 mg/ml w stosunku 1 µg PEI na 1 µg DNA. Łączna masa plazmidów w stosunku 1:1:1 wynosiła 50 µg na jedną szalkę (500 µg na 10 szalek). Mieszaninę inkubowano przez 20 min w temperaturze 37°C, a następnie na każdą szalkę dodawano po 1 ml mieszaniny. Poniżej przedstawiono charakterystykę plazmidów pomocniczych oraz plazmidu ekspresyjnego (Tabela 4), a także sposób przeliczania plazmidów w mieszaninie transfekcyjnej (Tabela 5).

Tabela 4. Charakterystyka wektorów plazmidów do produkcji wektorów wirusowych AAV.

Plazmid	Opis
pRC (pRepCap)	plazmid zawierający białko tworzące kapsyd (Cap), różne białka kapsydu nadają specyficzny serotyp oraz białko replikacyjne (Rep); serotyp 2+2: rep2/cap2
pDP1rs	plazmid zawierający czerwone białko fluorescencyjne RFP (ang. <i>red fluorescent protein</i>); serotyp 2+1: rep2/cap1
Plazmid ekspresyjny	plazmid ekspresyjny zawierający sekwencje ITR, pomiędzy którymi wstawiona jest sekwencja docelowa

Tabela 5. Przykładowy schemat przeliczeń plazmidów potrzebnych do transfekcji.

	pRC (pRepCap)	pDP1rs	Przykładowy plazmid ekspresyjny pAAV-EF1 α - PML-T2A-mCherryNLS	Suma
Wielkość plazmidu [pz]	7,3	23,7	8,6	39,4
Stosunek plazmidów	1	1	1	
Zawartość procentowa [%]	18	60	22	100
Wartość [μ g] wyliczana na podstawie stosunku 1:1:1 oraz wielkości plazmidów przy założeniu, że na 1 szalkę przypada łącznie 50 μ g	9,2	29,9	10,9	50
Przykładowe stężenie wyjściowe plazmidu [μ g/ μ l]	3,5	3	2,8	
Ilość plazmidu potrzebna do transfekcji na 1 szalkę [μ l]	2,6	10	3,8	
Ilość plazmidu potrzebna do transfekcji 10 szalek [μ l]	26	100	38	

3.2.3 Izolacja wektorów wirusowych rAAV

W celu potwierdzenia prawidłowej produkcji rAAV po upływie około 72 godzin od transfekcji sprawdzano fluorescencję zainfekowanych komórek. Możliwe jest to dzięki obecności sekwencji RFP (ang. *red fluorescent protein*) znajdującej się w plazmidzie pDP1rs. Dodatkowo o prawidłowej produkcji rAAV świadczy zmiana morfologii komórek HEK293 na bardziej kulistą. Następnie komórki zawierające wirus rAAV zbierano wraz z pożywką. Zebrane komórki wirowano (10 min, 800 \times g, temp. pokojowa, wirówka SIGMA 2-16K) celem pozbycia się martwych komórek, a następnie po odciążeniu płynnej frakcji znad osadu czynność tę powtarzano, przepłukując komórki roztworem PBS (ang. *phosphate-buffered saline*; Gibco – nr kat. 10010023) o pH 7,4. Uzyskany osad zawieszano w roztworze nr 1, lizującym komórki (Tabela 6), następnie dodawano 10% roztwór deoksycholenu sodu (Sigma-Aldrich, nr kat. D6750) w końcowym stężeniu 1% oraz enzym benzonazę (Sigma-Aldrich) w końcowym stężeniu 50 U/ml. Mieszaninę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C

przez godzinę. Po tym czasie komórki ponownie wirowano (15 min, $3000 \times g$, temp. pokojowa, wirówka SIGMA 2-16K), celem usunięcia resztek błony komórkowej uzyskanej na drodze lizy komórkowej. Otrzymany supernatant przenoszono na wcześniej zrównoważoną roztworem lizującym kolumnę heparynową (HiTrap™ Heparin HP, nr kat. 17-0406-01, GE Healthcare), umożliwiając rozdział i oczyszczanie roztworu w oparciu o chromatografię powinowactwa. Z pomocą pompy perystaltycznej roztwór przepuszczano przez kolumnę, a następnie kolumnę oczyszczano stosując kolejno roztwory nr 2, nr 3 i nr 4 ze zwiększającą się zawartością soli NaCl (Tabela 6). Frakcję roztworu zawierającą cząsteczki wirusa eluowano za pomocą roztworów nr 5, nr 6 oraz nr 7 z wyższą zawartością soli NaCl w stosunku do roztworów służących do oczyszczania (Tabela 6). Następnie uzyskaną frakcję (około 6 ml) nanoszono na ultrafiltr (Amicon, Ultra-4 Centrifugal Filter Units), umożliwiający szybką filtrację i zagęszczenie roztworu, cechujący się wartością odcięcia masy cząsteczkowej powyżej 100 000 Da. Roztwór wirowano (2–10 min, $2000 \times g$, temp. pokojowa, wirówka SIGMA 2-16K) do momentu uzyskania 50–70 μ l wirusa. Zagęszczoną zawiesinę wirusa mrożono w porcjach 4 μ l w -80°C .

Tabela 6. Skład roztworów użytych do izolacji wektora wirusowego rAAV.

Nr roztworu	Nazwa roztworu	Skład roztworu
1	Roztwór lizujący oraz równoważący kolumnę heparynową	150 mM NaCl, 20 mM Tris
2	Roztwór do płukania kolumny heparynowej	100 mM NaCl, 20 mM Tris
3	Roztwór do płukania kolumny heparynowej	200 mM NaCl, 20 mM Tris
4	Roztwór do płukania kolumny heparynowej	300 mM NaCl, 20 mM Tris
5	Roztwór do elucji wirusa z kolumny heparynowej	400 mM NaCl, 20 mM Tris
6	Roztwór do elucji wirusa z kolumny heparynowej	450 mM NaCl, 20 mM Tris
7	Roztwór do elucji wirusa z kolumny heparynowej	500 mM NaCl, 20 mM Tris

Każdy roztwór poddano sterylizacji i ustalono pH = 8.

3.2.4 Oznaczenie miana rAAV techniką qPCR

Do określenia miana uzyskanych wektorów wirusowych rAAV zastosowano technikę ilościowej reakcji PCR (ang. *quantitative PCR*, qPCR). Metoda oparta jest na amplifikacji

liniowego, jednoniciowego fragmentu DNA przy pomocy uniwersalnej, dla każdego plazmidu wykorzystanego w niniejszej rozprawie doktorskiej, pary starterów. Krzywą wzorcową stanowił plazmid użyty do danej produkcji wirusowej. Liczbę kopii plazmidu przeliczano z pomocą dostępnych kalkulatorów on-line, w których niezbędne było podanie liczby par zasad i stężenia plazmidu (ng/μl). Dla przykładu liczba kopii plazmidu pAAV-mCherryNLS, którego liczba par zasad to 6059 (którą należy podzielić przez 2), przy stężeniu 5700 ng/μl wynosi $1,72 \times 10^{12}$. Plazmid kilkukrotnie rozcieńczano, za każdym razem o jeden rząd wielkości (1:10), a krzywą standardową stanowiły wartości mieszczące się od 10^{10} do 10^4 . Przygotowywano również serię rozcieńczeń wyizolowanego rAAV: 1:100, 1:1000 oraz 1:10 000. Tak przygotowane rozcieńczenia od otrzymania krzywej wzorcowej oraz rAAV dodawano do mieszaniny reakcyjnej w trzech powtórzeniach, każde po 1 μl na dołek 96-dółkowej płytki (Applied Biosystems). Skład mieszaniny przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do przeprowadzenia reakcji qPCR.

Skład mieszaniny reakcyjnej na jeden dołek 96-dółkowej płytki	Objętość [μl]
SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)	10
10 μM starter polyA_For*	1
10 μM starter polyA_Rev*	1
Woda destylowana miliQ	7
rAAV	1
Objętość końcowa mieszaniny: 20 μl.	

*Sekwencje użytych starterów:

polyA_For: 5'-AGTTGTTGGGATTCCAGGCATGC-3',

polyA_Rev: 5'-ACCAGCCTGGCCAATATGGTGAA-3'.

Reakcję, której warunki przedstawiono w Tabeli 8, prowadzono przy użyciu termocyklera StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Analizę wyników przeprowadzono przy pomocy oprogramowania StepOne Software wersja 2.3 (Applied Biosystems). Miano wyznaczano na podstawie krzywej wzorcowej jako średnią z trzech powtórzeń dla każdego rozcieńczenia wektora wirusowego (1:100, 1:1000 oraz 1:10 000).

Tabela 8. Warunki przeprowadzonej reakcji qPCR dla pary starterów: PML-*EcoRI* i PML-*EcoRV*.

Etap	Temperatura [°C]	Czas trwania etapu [mm:ss]
1. Wstępna denaturacja	50	02:00
2. Wstępna denaturacja	95	05:00
3. Denaturacja	95	00:20
4. Przyłączenie starterów	60	00:40
5. Polimeryzacja	72	01:00
Dla etapów od 3 do 5 przeprowadzono 40 cykli.		
6.	95	00:15
7.	60	01:00
8.	95	00:15
Etapy od 6 do 8 posłużyły do generowania krzywej topnienia.		

Miano wszystkich uzyskanych wektorów wirusowych wykorzystywanych w niniejszej pracy opisano i przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Miano wektorów wirusowych wykorzystanych w niniejszej rozprawie doktorskiej.

Nazwa wektora wirusowego	Miano [gc/μl]	Ilość wirusa wykorzystana na jedną iniekcję operacji stereotaktycznej [nl]	Zastosowane skróty	
rAAV-CaMKIIα-Cre (doświadczenia opisane w sekcji 4.1.2.1)	$2,7 \times 10^8$	250		
rAAV-EF1α-PML-T2A-mCherryNLS	$5,34 \times 10^8$	250	PML-OE	
rAAV-EF1α-mCherryNLS	$6,2 \times 10^8$	250	CTRL-PML	
rAAV-X552-sgPML1-Tom	$1,04 \times 10^{10}$	62,5*	PML-KO	
rAAV-X552-sgPML2-Tom	$9,86 \times 10^9$	62,5*		
rAAV-CaMKIIα-Cre (doświadczenia opisane w sekcji 4.2.2, 4.2.3, 4.3)	$2,33 \times 10^{11}$	125**		CTRL-KO
rAAV-X552-sgSCR-Tom	$5,4 \times 10^9$	125*		

* ilość podana po rozcieńczeniu wektora wirusowego 1:100

** ilość podana po rozcieńczeniu wektora wirusowego 1:1000

3.3 Metoda wytworzenia modelu myszy transgenicznej linii DIO-EF1 α -PML z podwyższonym poziomem białka PML

3.3.1 Przygotowanie i oczyszczanie liniowego fragmentu DNA do mikroiniekcji

Liniowe dwuniciowe DNA (ang. *double-stranded DNA*, dsDNA), wykorzystane w trakcie mikroiniekcji do mysich przedjędzy, otrzymano poprzez trawienie enzymatyczne wektora plazmidowego pAAV-DIO-EF1 α -PML. Do trawienia użyto enzymu restrykcyjnego *NotI* (ThermoFisher Scientific), używając 1 U enzymu (10 U/ μ l) na 1 μ g DNA, uzyskując produkty o wielkościach: 5230 i 2887 pz. W celu izolacji odpowiedniego fragmentu dsDNA przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (EtBr, Sigma-Aldrich). Bromek etydyny, w końcowym stężeniu 5 μ g/ml, umożliwił wizualizację DNA w świetle UV. Elektroforezę przeprowadzono w roztworze TAE stosując prąd o napięciu 100 V przez około 40 min. Przy pomocy transiluminatora emitującego światło UV, używając sterylnego skalpela wycinano produkt wielkości 5230 pz. Uzyskany produkt zawierał sekwencję promotora EF1 α , sekwencję genu dla białka PML oraz sekwencję WPRE (ang. *Woodchuck Hepatitis Virus*, WHP, *Posttranscriptional Regulatory Element*, WPRE). Liniowy fragment DNA oczyszczono korzystając z gotowego zestawu do izolacji QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) i zawieszono w roztworze TE embryo (10 mM Tris-36 HCl, pH 7,4, 0,1 mM EDTA). Stężenie wyizolowanego fragmentu DNA sprawdzono korzystając z spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Uzyskany materiał filtrowano przez filtr Millipore o średnicy 0,22 μ m, a następnie rozcieńczano do stężeń docelowych wynoszących od 0,5–2,5 ng/ μ l. Materiał DNA do mikroiniekcji przygotowywano przed każdym doświadczeniem.

3.3.2 Hodowla i utrzymywanie zwierząt wykorzystywanych do transgenezy

Wszystkie zwierzęta, którymi posłużono się do wytworzenia linii myszy transgenicznych, pozyskano ze zwierzętarni Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN i utrzymywano w pomieszczeniach Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN, prowadząc hodowlę w standardzie SPF (ang. *specific-pathogen-free*). Wykorzystane zwierzęta należały do szczepu FVB zakupionego w Charles River Laboratories lub szczepu C57 BL/6J zakupionego w The Jackson Laboratory. Zwierzęta przebywały w pojedynczych (samce) bądź grupowych (samice) klatkach na regałach indywidualnie wentylowanych (ang. *individually ventilated cages*; IVC,

GM500, Tecniplast), w warunkach kontrolowanej temperatury ($22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$) i wilgotności ($\sim 40\%$), stałego dostępu do wody i karmy oraz w ramach cyklu dzień: noc 12:12 godzin. Doświadczenia przeprowadzono w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN zgodnie z wytycznymi oraz za zgodą (nr zgody 537/2014; przedłużenie 231/2016) I Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

3.3.3 Przygotowanie hormonalne samic dawczyń zarodków

Jednokomórkowe zygoty przeznaczone do mikroiniekcji pozyskiwano od 6–10-tygodniowych samic należących do szczepu FVB. Aby uzyskać zwiększoną liczbę wyizolowanych zygot, samice stymulowano hormonalnie. W celu pobudzenia folikulogenezy, samice w formie iniekcji dootrzewnowej otrzymywały hormon gonadotropinę surowicy żrebnych klaczy (PMSG ang. *pregnant mare serum gonadotropin*, 5 IU/mysz; Folligon, Intervet). Po 46–48 godzinach od pierwszej iniekcji, celem indukcji owulacji, samice otrzymywały ludzką gonadotropinę kosmówkową (hCG ang. *human chorionic gonadotropin*, 5 IU/mysz; Chorulon, Intervet). Następnie samice były łączone z samcami szczepu C56 BL/6J. Po 20–22 godzinach po podaniu hCG sprawdzano obecność czopa kopulacyjnego, a pokryte samice kolejno poddawano eutanazji w celu wyizolowania jednokomórkowych zarodków.

Do prowadzenia mikromanipulacji wybrano zarodki uzyskane na drodze krzyżowania samic szczepu FVB i samców szczepu C57 BL/6J. Potomstwo uzyskane z takiego krzyżowania nazywane jest szczepem hybrydowym FVB/C57 BL/6J. Wybór ten podyktowany był znacząco lepszą widocznością przedjądrzy zygot, w porównaniu do zygot uzyskiwanych od myszy szczepu C57 BL/6J, co istotnie wpływało na skuteczność prowadzonych mikromanipulacji, a także przeżywalność zarodków.

3.3.4 Izolacja jednokomórkowych zarodków od samic dawczyń zarodków

Zarodki w stadium jednokomórkowym (przed połączeniem się przedjądrzy męskiego i żeńskiego) były izolowane z bańki jajowodu do roztworu hialuronidazy (0,03%; 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) celem oczyszczenia zygot z warstwy komórek folikularnych. Komórki następnie płukano, przenoszono na kroplę pożywki M2 (Sigma-Aldrich) przykrytej olejem mineralnym (ang. *mineral oil*; mouse embryo tested, Sigma-Aldrich) i do momentu mikroiniekcji hodowano w inkubatorze (Shel Lab) w 37°C , 5% CO_2 .

3.3.5 Mikroiniekcja liniowego fragmentu dsDNA do przedjądrzy zygot

Zygoty przygotowane do mikroiniekcji hodowano w inkubatorze do momentu pojawienia się widocznych przedjądrzy męskich i żeńskich (około 24 godzin po podaniu hormonu hCG). Oczyszczony i rozcieńczony fragment dsDNA wstrzykiwano przy pomocy pipety iniekcyjnej, przygotowanej wcześniej na wyciągarce pipet Sutter P-87, mikromanipulatora firmy Eppendorf i mikroskopu odwróconego Zeiss Axiovert 200 do jednego z przedjądrzy (najczęściej męskiego, większego). Komórki po mikromanipulacji hodowano w inkubatorze przez noc do momentu osiągnięcia stadium dwukomórkowego.

3.3.6 Transfer zarodków do jajowodów samic biorczyń

Zarodki w stadium dwukomórkowym transferowano do jajowodów samic-biorczyń. Jako matki zastępcze (biorczynie) wykorzystywano 2–4-miesięczne samice szczepu CD1. Dzień przed transferem zarodków do jajowodów, samice łączono z bezpłodnymi samcami (poddanymi wcześniej zabiegowi wazektomii) tego samego szczepu, w celu wywołania ciąży rzekomej. Transfer zarodków przeprowadzano w 12 godzin po pokryciu (0,5 dpc, ang. *days post coitum*) matek zastępczych, po uprzednim sprawdzeniu obecności czopa kopulacyjnego. Celem przeprowadzenia transferu, samice CD1 usypiano poprzez dootrzewnowe podanie mieszanki środków usypiających: ketaminy (dawka 60 mg/kg masy ciała; stock 100 mg/ml) i medetomidyny (dawka 1 mg/kg masy ciała; nazwa handlowa Cepetor – stock 1 mg/ml). Dodatkowo, przed rozpoczęciem operacji podawano podskórnie środki przeciwbólowe, przeciwzapalne i antybiotyki. Przeciwzapalny 4% kwas tolfenamowy (dawka 2 mg/kg masy ciała; nazwa handlowa Tolfedine 4%), enrofloksacynę (dawka 2,5 mg/kg; nazwa handlowa Baytril – stock 25 mg/ml) oraz butorfanol winianu (dawka 3,3 mg/kg masy ciała; nazwa handlowa Butomidol – 10 mg/ml). Aby zapobiec wysuszeniu rogówki, oczy zwierząt były nawilżane maścią z witaminą A (Vita-POS). Następnie po upewnieniu się, że u myszy brak czucia głębokiego, skórę dezynfekowano i razem z warstwą mięśni przecinano na grzbietowej stronie ciała, a następnie wyjmowano jajnik wraz z jajowodem i rogą macicy. Kolejno przecinano torebkę otaczającą jajnik i jajowód w celu wyeksponowania lejka jajowodu. Przy użyciu szklanej mikropipety do lejka jajowodu transferowano 12–16 embryonów wraz z pęcherzykiem powietrza blokującym wysunięcie się zarodków z jajowodu. Jajnik, jajowód i róg macicy umieszczano z powrotem w jamie brzusznej, mięśniówkę zszywano rozpuszczalnymi nićmi Vicryl 4,0, a skórę scalano sterylnymi klipsami (Becton Dickinson). Na ranę pooperacyjną rozprowadzano żel przeciwbólowy zawierający lidokainę (Lignocainum

Jelfa, 20 mg/g). Od momentu rozpoczęcia zabiegu aż do wybudzenia się, zwierzę przebywało na płytce grzejnej o temperaturze około 37–39°C. Urodzone przez matkę zastępczą, potencjalnie transgeniczne, potomstwo przebywało przy samicy około 21 dni. Oseski następnie odsadzano od matki, rozdzielano według płci i znakowano na uchu. Niewielką końcówkę ogona przeznaczono do ustalenia genotypu zwierzęcia.

Ze względu na prowadzenie mikromanipulacji na zarodkach hybrydowych pochodzących z łączenia samic szczepu FVB (kolor pokrycia biały) z samcami szczepu C57 BL/6J (kolor pokrycia czarny) urodzone potomstwo było maści brunatnej. W celu wyprowadzenia „czystej” linii C57 BL/6J, potomstwo (pokolenie F1) osobników założycielskich linii transgenicznej było krzyżowane z niezmodyfikowanymi genetycznie myszami szczepu C57 BL/6J. Schemat powtarzano dla każdego kolejnego pokolenia, aż do pokolenia F5/F6.

3.3.7 Wazektomia samców

W celu uzyskania bezpłodnych samców, które po pokryciu samic biorczyń pobudzały ciążę rzekomą, przeprowadzono zabieg wazektomii. Do zabiegu wykorzystywano samce w wieku około 8–10 tygodni. Zwierzęta usypiano poprzez dootrzewnowe podanie mieszanki środków usypiających ketaminy i medetomidyny, a następnie podawano środki przeciwbólowe, przeciwzapalne i antybiotyki (dawkowanie podano w podsekcji 3.3.6). Skórę moszny dezynfekowano, przecinano, a następnie wyjmowano kolejno każde jądro wraz z najądrzem i odchodzącym od niego nasieniowodem. Przy użyciu nożyczek mikrochirurgicznych wycinano kawałek każdego nasieniowodu w taki sposób, aby pozostałe części się nie stykały. Jądra wraz z nasieniowodami umieszczano z powrotem w mosznie, skórą zszywano rozpuszczalnymi nićmi Vicryl 4,0, a na ranę rozprowadzano żel przeciwbólowy zawierający lidokainę. Od momentu rozpoczęcia zabiegu aż do wybudzenia się, zwierzę przebywało na płytce grzejnej o temperaturze około 37–39°C. Po około 2 tygodniach rekonwalescencji samce łączono z samicami biorczyniami zarodków.

3.3.8 Genotypowanie tkanek zwierzęcych

W celu wykrycia obecności egzogenego genu u myszy transgenicznych przeprowadzono łańcuchową reakcję polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) z wykorzystaniem specyficznych sekwencji nukleotydowych rozpoznających wprowadzony

gen. Przy użyciu gotowego zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology) fragment tkanki ogona trawiono w roztworze lizującym z dodatkiem Proteiny K przez noc w temperaturze około 50°C. Kolejnego dnia, korzystając z kolumniek dołączonych do zestawu oczyszczano strawioną tkankę, a otrzymane genomowe DNA zawieszano w 100 µl buforu Tris. Stężenie uzyskanego DNA, mierzone przy użyciu spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific), mieściło się w przedziale od 60 do 180 ng/µl. Do przeprowadzenia reakcji PCR z wykorzystaniem starterów PML I, PML II i GAPDH (gen referencyjny – kontrola obecności DNA w uzyskanym materiale) użyto odczynników z zestawu Taq PCR Core Kit (Qiagen). Natomiast do przeprowadzenia reakcji PCR z wykorzystaniem starterów Cre użyto odczynników z zestawu Gold Hot Start DNA Polymerase (Syngen). Jako kontrolę pozytywną w reakcjach przyjęto DNA genomowe myszy typu dzikiego C57 BL/6J, a do kontroli negatywnej użyto mieszaniny reakcyjnej bez dodatku DNA. Sekwencje starterów wykorzystanych do przeprowadzania reakcji PCR (Tabela 10), skład mieszaniny reakcyjnej (Tabela 11) oraz warunki reakcji (Tabela 12) dla poszczególnych par starterów przedstawiono poniżej.

Tabela 10. Sekwencje starterów wykorzystanych do przeprowadzenia reakcji PCR.

Sekwencja egzogenna	Nazwa startera	Sekwencja startera [5' → 3']	Wielkość produktu [pz]
PML I	FOR-loxP_EF1α	TCTTAATAACTTCGTATAGCATAACATT A (rozpoznająca sekwencję loxP)	300
	REV-EF1α	GACGGAAAGGCCCTTTTCCTTTGTGT (rozpoznająca sekwencję EF1α)	
PML II	FOR-loxP_EF1α	TCTTAATAACTTCGTATAGCATAACATT A (rozpoznający sekwencję loxP)	1700
	REV-PML	TGGATAACGTGTTCTTCGAGAGCC (rozpoznający sekwencję PML)	
Cre	CreERT2-F	GGCTGGTGTGCCATCCCTGAA	400
	CreERT2-R	GGTCAAATCCACAAAGCCTGGCA	
GAPDH	FOR-GAPDH	AACTACATGGTCTACATGTT	340
	REV-GAPDH	GTGGTGCAGGATGCATTGCT	

Tabela 11. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do przeprowadzenia reakcji PCR na materiale z tkanki uzyskanej od zwierząt transgeniczných.

Skład mieszaniny reakcyjnej dla starterów PML I, PML II i GAPDH	Skład mieszaniny reakcyjnej dla starterów Cre	Objętość [μ l]	
		startery PML I, PML II i GAPDH	startery Cre
matryca – DNA genomowe		4	4
10 μ M starter FOR		1	1
10 μ M starter REV		1	1
10 mM mieszanina deoksynukleotydów (dNTP mix)		0,4	0,4
PCR bufor 10x		3	
polimeraza Taq		0,2	
bufor Gold Hot Start 10x			2
25 mM MgCl ₂			2
Gold Hot Start 5 U/ μ l			0,2
woda destylowana miliQ		20,4	11,4
Objętość końcowa mieszaniny		30	22

Tabela 12. Warunki przeprowadzonych reakcji PCR dla poszczególnych par starterów.

Etap	Temperatura [$^{\circ}$ C]			Czas trwania etapu [mm:ss]		
	PML	GAPDH	Cre	PML	GAPDH	Cre
1. Wstępna denaturacja	95	94	95	03:00	03:00	03:00
2. Denaturacja	95	94	95	00:30	00:30	00:30
3. Przyłączanie starterów	58	54	60	00:60	00:45	01:00
4. Polimeryzacja	72	72	72	01:30	01:00	01:30
5. Wydłużanie końcowe	72	72	72	05:00	10:00	05:00
6. Zatrzymanie reakcji	4	4	4	∞	∞	∞
Liczba cykli dla etapów 2–4	35	25	35			

3.3.9 Indukcja mutacji u zwierząt podwójnie transgenicznych

W celu indukcji wprowadzonej mutacji, myszy (podwójnie transgeniczne) otrzymywały w formie iniekcji dootrzewnowej roztwór 4-hydroksytamoksyfenu (Sigma-Aldrich). Mieszaninę sporządzano według schematu: 100 mg tamoksyfenu/1 ml EtOH/9 ml oleju słonecznikowego. Roztwór tamoksyfenu w stężeniu końcowym 10 mg/ml podawano przez 5 dni, dwa razy dziennie co 12 godzin.

3.4 Operacje stereotaktyczne

W celu uzyskania podwyższonego poziomu bądź delecji białka PML myszy były poddawane operacjom stereotaktycznym. Zmiany genetyczne uzyskano dostarczając do hipokampa wektory wirusowe rAAV. Zwierzę w stan narkozy wprowadzono poprzez dootrzewnowe podanie mieszanki środków usypiających: ketaminy (dawka 60 mg/kg masy ciała; stock 100 mg/ml) i medetomidyny (dawka 1 mg/kg masy ciała; nazwa handlowa Cepetor – stock 1 mg/ml). Dodatkowo, przed rozpoczęciem operacji podawano podskórnymi środkami przeciwbólowe, przeciwzapalne i antybiotyki. Przeciwzapalny 4% kwas tolfenamowy (dawka 2 mg/kg masy ciała; nazwa handlowa Tolfedine 4%), antybiotyk–enrofloksacyne (dawka 2,5 mg/kg; nazwa handlowa Baytril – stock 25 mg/ml) oraz butorfanol winianu (dawka 3,3 mg/kg masy ciała; nazwa handlowa Butomidol – 10 mg/ml). Aby zapobiec wysuszeniu rogówki, w trakcie operacji oczy zwierząt były nawilżane maścią z witaminą A (Vita-POS). Następnie po upewnieniu się, że zwierzę jest głęboko znieczulone (uszczypnięcie paliczek), mysz była umieszczana w aparacie stereotaktycznym (firmy Stoelting) poprzez włożenie do zewnętrznego otworu kanału słuchowego kołków (ang. *ear bars*) unieruchamiających czaszkę. Skórę głowy dezynfekowano roztworem jodiny, miejscowo znieczulano lidokainą w formie żelu oraz przecinano sterylnymi nożyczkami. Po wyznaczeniu miejsca zgodnego z przyjętymi koordynatami (pozwalającymi na wprowadzenie i prawidłowe rozejście się wirusa w całej strukturze hipokampa) w czaszce wywiercano otwory. Do otworów w czaszce obu półkul mózgu wprowadzano szklaną mikrokapilarę (firmy Blaubrand intraMark, nr kat. 7087-07) zawierającą wirus rAAV, przygotowaną wcześniej za pomocą wyciągarki pipet Sutter P-87. Po wprowadzeniu wirusa, w celu jego prawidłowego rozejścia się w strukturze mózgu, przed wysunięciem mikrokapilary każdorazowo odczekiwano około 10 minut. Po zakończeniu iniekcji, skórę na głowie myszy zaszywano rozpuszczalnymi nićmi Vicryl 4,0 i ponownie nakładano żel przeciwbólowy zawierający roztwór lidokainy. W celu

wybudzenia zwierzęcia po operacji podawano dootrzewnowo roztwór chlorowodoru atipamezolu, będący selektywnym α -2-antagonistą przeznaczonym do odwracania usypiającego działania chlorowodoru medetomidyny (1 mg/kg; nazwa handlowa Revertor, 5 mg/ml). Do momentu wybudzenia się zwierzę przebywało na płytce grzejnej o temperaturze około 37–39°C.

3.5 System IntelliCage i przeprowadzone w nim testy behawioralne

System IntelliCage jest systemem umożliwiającym testowanie zwierząt pod kątem ich umiejętności uczenia się, zapamiętywania, a także sprawdzania ich podstawowych parametrów aktywności. Klatki IntelliCage są całkowicie zautomatyzowane, dzięki czemu możliwe jest przeprowadzanie doświadczeń, ich kontrola i analiza wyników praktycznie bez kontaktu zwierzęcia z osobą przeprowadzającą doświadczenie. Jednocześnie klatki IntelliCage służą jako przestrzeń dla grupy do 16 osobników, żyjących w warunkach maksymalnie przybliżonych do tych panujących w klatce domowej. Klatka w systemie IntelliCage wyposażona jest w 4 rogi, w obrębie których znajdują się dwie butelki z wodą (umieszczone, do wyboru zwierzęcia, po prawej lub lewej stronie), do których dostęp ma nie więcej niż jedna mysz jednocześnie. Mysz wchodząc do rogu mija odbiornik (umieszczony w specjalnej rurze) umożliwiający odczytanie kodu z nadajnika radiowego (ang. *radio-frequency identification*, RFID) wszczepionego pod skórę na karku. Dodatkowo w każdym z rogów dostęp do wody może być zamykany przez małe bramki, a dzięki identyfikacji zwierząt poprzez wszczepiony nadajnik RFID, eksperymentator ma możliwość dostosowywania lub wyznaczania indywidualnych schematów doświadczalnych dla każdej myszy (np. poprzez regulację dostępu do wody). Co więcej, system wyposażony jest w możliwość generowania bodźca awersyjnego w postaci podmuchu powietrza w nos w trakcie przybliżenia lub chęci napięcia się wody przez mysz. Myszy w klatce mają nieograniczony dostęp do pokarmu oraz możliwość schronienia się zapewnioną dzięki trójkątnym domkom umieszczonym w klatce.

W trakcie trwających doświadczeń stosowano różne testy behawioralne służące do zebrania informacji zarówno na temat podstawowych parametrów zachowania się zwierząt, np. aktywności dobowej, jak i tych bardziej zaawansowanych informacji dotyczących procesu uczenia się i zapamiętywania. Wszystkie doświadczenia behawioralne przeprowadzane były w pomieszczeniach, w których faza aktywna (faza ciemna) trwała w godzinach od 9:00 do 21:00, natomiast faza nieaktywna (faza jasna) włączana była od godziny 21:00 do 9:00, kiedy

zwierzęta nie były narażone na dźwięki z otoczenia. Dzięki temu zabiegowi utrzymano naturalny rytm okołodobowy zwierząt.

W pierwszej kolejności zwierzęta umieszczano w klatce IntelliCage i rozpoczynano swobodną adaptację (ang. *free adaptation*), w trakcie której myszy miały Nielimitowany dostęp do wszystkich rogów z butelkami z wodą. Następnie uruchamiano program wstępny mający na celu przyuczenie zwierząt do picia wody poprzedzonego przybliżeniem nosa do poidła z wodą (ang. *nosepoke adaptation*, NPA). Kolejno uruchamiano testy właściwe, których szczegółowy opis przedstawiono poniżej.

Odbywanie wizyt zgodnie z kierunkiem ruchu wskazówek zegara (ang. *clockwise*): test polegał na uczeniu zwierząt wizytowania rogów z wodą poruszając się zgodnie z kierunkiem ruchu wskazówek zegara. Po uruchomieniu programu każda z myszy rozpoczyna swoją indywidualną ścieżkę poprzez wizytę w pierwszym, dowolnym rogu z wodą. Od tego momentu system uruchamia program, w którym mysz, aby napić się wody, musi odwiedzać rogi klatki zgodnie z kierunkiem ruchu wskazówek zegara. Po zakończeniu wizyty w danym rogu, ponowna wizyta w tym samym rogu (tylko jeśli w międzyczasie inny z rogów nie został odwiedzony), ze względu na naturalną chęć eksploatacji zwierzęcia, jest liczona jako wizyta neutralna. Po zakończeniu wizyty w poprawnym rogu, kolejnym poprawnym rogiem jest róg znajdujący się najbliżej prawej strony poprzedniego rogu; wizyty w innych rogach były liczone jako niepoprawne (lub neutralne). Wynik testu, trwającego 9 dni, przedstawiono jako procent poprawnych wizyt.

Odbywanie wizyt w kierunku przeciwnym do kierunku ruchu wskazówek zegara (ang. *counter-clockwise*): test polegał na sprawdzeniu umiejętności „przeuczania się” zwierząt, które w tym wypadku miały dostęp do wody, gdy poruszały się w kierunku przeciwnym do kierunku ruchu wskazówek zegara. Wynik testu, trwającego 6 dni, przedstawiono jako procent poprawnych wizyt.

Test uczenia się progresywnego (ang. *progressive ratio test*): test polegał na nauce wykonywania odpowiedniej ilości puknięć nosem w poidło z wodą w celu napicia się. Zastosowano 13 poziomów trudności (modułów), w których liczba puknięć nosem, wymagana do tego, aby zwierzę mogło napić się wody wynosiła: 1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 – 7 – 8 – 10 – 12 – 16 – 20 – 24. Wynik testu, trwającego od 1 do 5 dni, przedstawiono jako średnią liczbę pokonanych modułów na grupę.

Test Vogla: test polegał na wprowadzeniu bodźca awersyjnego. Po uruchomieniu testu myszy podczas pierwszej próby napicia się wody w dowolnym rogu otrzymywały podmuch sprężonego powietrza pod ciśnieniem 0,25 bara w czasie 1 sekundy. Test powtarzano czterokrotnie w odstępach 24 godzin. Wynik testu przedstawiano jako średni czas (dla każdej grupy) powrotu do któregośkolwiek rogu z wodą.

W trakcie trwania każdego z testów monitorowano aktywność przedstawianą jako liczba puknięć nosem zakończonych napięciem się wody.

3.6 Przygotowanie tkanek i techniki immunocytochemiczne

3.6.1 Utrwalanie mózgu metodą perfuzji

W celu utrwalenia tkanki mózgu na potrzeby barwień immunofluorescencyjnych oraz barwień metodą DAB (3,3'-diaminobenzydyny), a także analiz i wizualizacji mikroskopowych, przeprowadzono eutanazję myszy metodą perfuzji.

W pierwszej kolejności celem złagodzenia działania środka uśmiercającego, Morbitalu (Biowet), zwierzętom podawano w formie dootrzewnowej mieszanę środków usypiających (podsekcja 3.3.6). Po uprzednim upewnieniu się, że zwierzę głęboko zostało zniesione, myszom podawano dootrzewnowo Morbital w dawce 100 mg/kg. Zwierzę unieruchamiano, rozcinano klatkę piersiową, uwidaczniano serce i wkłuwano w jego lewą komorę igłę w celu wypłukania, za pomocą pompy perystaltycznej oraz buforu PBS, krwi z układu krwionośnego. Jednocześnie przecinano prawy przedsionek serca przerywając ciągłość naczyń krwionośnych, a tym samym ułatwiając wypływ krwi ze wszystkich tkanek ciała. Po wypłukaniu całej krwi z organizmu zwierzęcia, wtłaczano 4% roztwór paraformaldehydu (ang. *paraformaldehyde*, PFA; Sigma-Aldrich) przygotowanego w PBS (pH roztworu 7,4), w ilości około 100 ml na 100 g masy ciała myszy. Po tym czasie mózgi wypreparowywano z czaszki i umieszczano w 4% roztworze PFA oraz inkubowano w 4°C przez całą noc. Kolejnego dnia mózgi przenoszono do 30% roztworu sacharozy przygotowanego w buforze PBS i inkubowano w 4°C przez kolejne 48 godzin w celu przesycenia tkanki i uzyskania efektu krioprotekcji. Tak przygotowaną tkankę przechowywano do dalszych analiz.

3.6.2 Mrożenie utrwalonych mózgow i krojenie tkanki na kriostacie

Tkanke przeznaczoną do krojenia w kriostacie (firmy Leica), utrzymującym temperaturę -20°C , umieszczano na specjalnym stoliku, zalewano medium Tissue Freezing Medium (Jung, Leica) i pozostawiano na 15–20 min. Po tym czasie stolik wraz z mózgiem mocowano do ruchomej głowicy kriostatu i krojono na skrawki grubości 40–50 μm w płaszczyźnie czołowo-strzałkowej. Skrawki przenoszono na płytki 24-dołkowe (około 8–10 skrawków na dołek), zanurzano w buforze PBS z dodatkiem 0,01% azydku sodu i przechowywano w 4°C .

3.6.3 Procedura odzyskiwania antygenowości

Celem przygotowania tkanki do barwień immunofluorescencyjnych skrawki każdorazowo inkubowano w roztworze cytrynianowym. Roztwór ten miał za zadanie odsłonięcie epitopów i odzyskanie antygenowości tkanki. Przed rozpoczęciem inkubacji roztwór cytrynianowy należało rozgrzać do 80°C , a następnie zanurzyć w nim skrawki i inkubować około 30 min. w 80°C . Po 30 minutach płytkę wyciągano z inkubatora i pozostawiano na około 1 godzinę do stopniowego wystudzenia. Po tym czasie skrawki przepłukiwano 3 razy po 10 minut w buforze PBS. Skład roztworu cytrynianowego: 10 mM kwas cytrynowy, 0,05% Tween 20, pH = 6. Inkubacji w roztworze cytrynianowym poddawano przede wszystkim skrawki mózgu pochodzące od zwierząt transgenicznym posiadających w genomie białko fluorescencyjne lub białko fluorescencyjne dostarczane w postaci wektora wirusowego AAV.

3.6.4 Barwienia immunofluorescencyjne

Barwienia immunofluorescencyjne przeprowadzano w celu detekcji białka PML w hipokampie oraz sprawdzenia obecności znaczników białkowych pozwalających na określeniu morfologii jądra komórkowego zwierząt z nadekspresją lub usunięciem genu *Pml*. Procedurę barwienia krok po kroku przedstawiono poniżej:

1. Płukanie skrawków mózgu (skrawki przechowywano w PBS z dodatkiem 0,01% azydku sodu) poprzez powolne bujanie szalek na kołysce laboratoryjnej w buforze PBS przez 5–10 minut.
2. Inkubacja skrawków w buforze PBS z 0,1% Tritonem X100 (PBS-TX100), z dodatkiem 5% surowicy oślej (ang. *normal donkey serum*, NDS) lub 5% BSA (ang. *bovine serum albumin*,

BSA) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Redukcja niespecyficznego wiązania dla przeciwciała pierwszorzędowego.

3. Inkubacja skrawków w buforze PBS-TX100 z dodatkiem 5% NDS z dodatkiem przeciwciała pierwszorzędowego (lista przeciwciał – Tabela 13) przez całą noc w temperaturze 4°C.

4. Trzykrotne płukanie skrawków w buforze PBS-TX100 przez 5–10 minut. Od tego momentu barwienia, skrawki należało chronić przed światłem (owijanie szalki folią aluminiową).

5. Ponowna inkubacja skrawków w buforze PBS-TX100 z 5% BSA z dodatkiem przeciwciała drugorzędowego (lista przeciwciał – Tabela 13) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Przeciwciało drugorzędowe wybierano w zależności od użytego przeciwciała pierwszorzędowego, a dokładniej od gatunku zwierzęcia, z którego zostało uzyskane.

6. Trzykrotne płukanie skrawków w buforze PBS-TX100 z 5% BSA przez 5–10 minut.

7. Inkubacja skrawków w buforze PBS-TX100 z dodatkiem odczynnika Hoechst 33342 (Invitrogen, H3579) w rozcieńczeniu 1:5000, przez 10 min w temperaturze pokojowej. Hoechst – barwnik fluorescencyjny, umożliwiający wybarwienia jąder komórkowych poprzez interkalację do DNA.

8. Trzykrotne płukanie skrawków w buforze PBS przez 5–10 minut.

Następnie skrawki nakładano na szkiełka podstawowe (Thermo Scientific, SuperFrost Plus) oraz pozostawiano na kilka minut do wysuszenia. Po odparowaniu buforu skrawki zatapiano w medium Vectashield (Vector Laboratories, H-1000), a następnie zamykano szkiełkiem nakrywkowym (Thermo Scientific). W ten sposób przygotowane szkiełka przechowywano w temperaturze 4°C, chroniąc przed działaniem światła powodującego wyświecanie (ang. *photobleaching*) preparatu.

Tabela 13. Przeciwciała pierwszo- i drugorzędowych użyte do barwień immunofluorescencyjnych.

Antygen specyficzny dla przeciwciała (α -)	Rodzaj przeciwciała	Rozcieńczenie	Firma, numer katalogowy
Przeciwciała pierwszorzędowe			
PML (immunofluorescencja i barwienie DAB)	Mysie monoklonalne	1:200	Merck Millipore, nr kat. 5718
NeuN	Kurze poliklonalne	1:400	Merck Millipore, nr kat. ABN91
ATRX	Królicze monoklonalne	1:500	Santa-Cruz, nr kat. SC-154013
DAXX	Mysie monoklonalne	1:200	Santa-Cruz, nr kat. SC-8043
SRm300	Królicze poliklonalne	1:100	Santa-Cruz, nr kat. SC-292291
H3K9Ac	Mysie monoklonalne	1:1000	Abcam, nr kat. ab12179
H3K9me3	Królicze poliklonalne	1:500	Merck Millipore, nr kat.07-442
H3K4me2	Królicze poliklonalne	1:500	Active Motif, nr kat. 39159
H3K20me2/3	Mysie monoklonalne	1:500	Abcam, nr kat. ab78517
Przeciwciała drugorzędowe			
Ośle przeciwciało, barwnik CY3	Mysie IgG	1:250	Jackson ImmunoResearch, nr kat. 715-166-151
Ośle przeciwciało, barwnik 647 nm	Kurze IgG	1:250	
Ośle przeciwciało, barwnik 488 nm	Królicze IgG	1:500	Jackson ImmunoResearch nr kat. 711-546-152
Ośle przeciwciało, barwnik 488 nm	Mysie IgG	1:500	Jackson ImmunoResearch nr kat. 715-546-151

3.6.5 Barwienie metodą DAB

W trakcie trwających doświadczeń barwienie metodą DAB wykorzystywano jako metodę alternatywną (w stosunku do WB) umożliwiającą sprawdzenie poziomu białka w różnych strukturach mózgu u zwierząt z nadekspresją genu *Pml*. Szczegółowy opis barwienia przedstawiono poniżej:

Dzień I

1. Płukanie skrawków mózgu (skrawki przechowywano w PBS z dodatkiem 0,01% azydku sodu) poprzez powolne bujanie szalek na kołysce laboratoryjnej w buforze PBS przez 5–10 minut.
2. Inkubacja skrawków w buforze PBS z 1% borowodorkiem sodu (Sigma-Aldrich) przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Blokowanie grup aldehydowych.
3. Trzykrotne płukanie w buforze PBS przez 10 minut.
4. Inkubacja skrawków w buforze PBS z 70% metanolem (POCH) oraz 3% nadtlakiem wodoru (CHEMPUR) przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Blokowanie endogennej peroksydazy.
5. Trzykrotne płukanie w buforze PBS przez 10 minut.
6. Inkubacja skrawków w buforze PBS-TX100 (PBS z 0,3% Tritonem X100) z dodatkiem 5% surowicy końskiej (*ang. normal horse serum*, NHS; Jackson Immunoresearch) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej.
7. Blokowanie endogennej biotyny*: dodanie 4 kropli roztworu na każdy skrawek oraz inkubacja 15 minut w temperaturze pokojowej. Trzykrotnie płukanie w buforze PBS przez 5 minut.
8. Blokowanie endogennej awidyny*: dodanie 4 kropli roztworu na każdy skrawek oraz inkubacja 15 minut w temperaturze pokojowej. Ponowne płukanie w buforze PBS przez 5 minut.
9. Inkubacja skrawków w buforze PBS-TX100 z 5% NHS z dodatkiem przeciwciała pierwszorzędowego skierowanego przeciwko białku PML (Tabela 13) w rozcieńczeniu 1:1000, przez całą noc w temperaturze 4°C.

*Do przeprowadzenia punktu 7 oraz 8 punktu wykorzystano gotowy zestaw ABC Kit (kompleks awidyny i biotyny z peroksydazą) firmy Vector Laboratories PK-4000.

Dzień II

10. Trzykrotne płukanie niezwiązanego przeciwciała pierwszorzędowego buforem PBS-TX100 z 5% NHS przez 10 minut w temperaturze pokojowej.
11. Płukanie skrawków w buforze PBS-TX100 z 2% NHS przez 5 minut w temperaturze pokojowej.
12. Inkubacja w buforze PBS-TX100 z 2% NHS i przeciwciałem drugorzędowym (końskie biotynylowane anty-mysie; Vector Laboratories BA-2001) w rozcieńczeniu 1:200 przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej.
13. Trzykrotne płukanie w buforze PBS-TX100 przez 10 minut.
14. Inkubacja skrawków z wykorzystaniem gotowych odczynników z zestawu ABC Kit w celu wzmocnienia sygnału pochodzącego z przeciwciała drugorzędowego; 30 minut w temperaturze pokojowej.
15. Trzykrotne płukanie skrawków w buforze PBS-TX100 przez 10 minut.
16. Sześciokrotne płukanie skrawków w buforze TBS (*ang. Tris-buffered saline*; sól fizjologiczna buforowana Tris).
17. Wywołanie reakcji barwnej przy użyciu 3'3-diaminobenzydyny (Sigma-Aldrich, D-5637), siarczanu niklu (Sigma-Aldrich), oraz nadtlenu wodoru (końcowe stężenie 0,003%) w ilości odpowiednio 10 mg oraz 40 mg na 10 ml buforu TBS.
18. Inkubacja, w zależności od szybkości reakcji barwnej od 30 sekund do kilku minut.
19. Zatrzymanie reakcji poprzez natychmiastowe dodanie TBS, a następnie buforu PBS.
20. Kilkukrotne płukanie skrawków w buforze PBS.

Po zakończeniu barwienia skrawki nakładano na szkiełka mikroskopowe, wcześniej pokryte żelatyną, oraz pozostawiano do wyschnięcia na całą noc. Następnie wysuszone skrawki odwadniano, zanurzając szkiełka mikroskopowe w roztworach o zwiększającym się stężeniu alkoholu etylowego (99%, 100%). Kolejno w celu oczyszczenia skrawków zanurzano je w roztworze ksylenu i zatapiano w syntetycznej żywicy DPX (firmy Merck Millipore).

3.7 Metody pracy z białkami

3.7.1 Przygotowanie ekstraktów białkowych z hodowli komórkowej linii HEK293

W celu uzyskania ekstraktów białkowych z hodowli komórkowej linii HEK293, komórki rozmrożono, wysiano na szalki 6-dołkowe oraz przeprowadzono transfekcje. Mieszanina transfekcyjna zawierała: pożywkę DMEM, 1 μg plazmidu bądź plazmidów ekspresyjnych oraz odczynnik PEI o stężeniu 1 mg/ml w stosunku 3 μl PEI na 1 μg DNA. Do każdego dołka dodawano po 100 μl przygotowanej mieszaniny, delikatnie mieszano i hodowano w inkubatorze w 37°C, 5% CO₂.

Białko z komórek linii HEK293 izolowano po 48 lub 72 godzinach po transfekcji. Pożywkę odsączano, a komórki lizowano poprzez dodanie na każdy dołek po 500 μl 1% SDS (Sigma-Aldrich) powodując denaturację białek. Komórki, z których powstawała gęsta zawiesina, ściągano przy pomocy sterylnego tipsa do probówek typu eppendorf o objętości 1,5 ml, a następnie inkubowano (Eppendorf ThermoMixer) w 95°C przez 10 minut. W kolejnym kroku próbki wirowano (~10 000 rpm, 5 min, wirówka Heraeus Multifuge X3R Centrifuge; Thermo Scientific), a powstały supernatant zbierano i zamrażano w temperaturze -80°C.

3.7.2 Elektroforeza białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Przygotowane wcześniej lizaty białkowe rozmrażano na lodzie. W celu pomiaru stężenia białka pobierano niewielką objętość materiału. Pomiaru dokonywano z wykorzystaniem metody fluorymetrycznej przy pomocy gotowych odczynników, protokołu oraz fluorometru Qubit 2.0 firmy Life Technologies. Do pozostałej ilości próbek białkowych, przed ich nałożeniem na żel, dodawano 4× stężonego buforu denaturującego: 0,25 M Tris-HCl (pH 6,8), 20% glicerol, 4% SDS, 0,04% błękit bromofenolowy oraz 5% β -merkaptoetanolu (v/v), a następnie próbki inkubowano (Eppendorf ThermoMixer) w 95°C przez 5 minut. Żele poliakrylamidowe (żel rozdzielający oraz zagęszczający) do elektroforetycznego rozdzielania białek przygotowywano według Tabeli 14. Procentowość żelu rozdzielającego uzależniona była od masy cząsteczkowej białka (kDa).

Tabela 14. Skład żelu rozdzielającego oraz zagęszczającego.

Własność żelu	Żel rozdzielający [ml]			Żel zagęszczający [ml]
Masa cząsteczkowa białka (kDa)	80-200	35-100	25-60	-
Procentowość żelu	8%	10%	12%	4%
Woda podwójnie destylowana (ddH ₂ O)	4,6	4	3,3	4,3
30% akrylamid	2,7	3,3	4	0,8
1× roztwór rozdzielający	2,5	2,5	2,5	-
1× roztwór zagęszczający	-	-	-	0,8
10% APS	0,1	0,1	0,1	0,6
TEMED	0,01	0,01	0,01	0,06
Objętość końcowa mieszaniny	10	10	10	6

Roztwór rozdzielający oraz zagęszczający zawierały 0,4% SDS oraz odpowiednio: 1,5 M Tris HCl (pH 8,8) lub 1 M Tris HCl (pH 6,8). Na każdą studzienkę żelu poliakrylamidowego nakładano od 10 do 20 µg białka, a jako marker wielkości, służący do wyznaczenia ciężaru cząsteczkowego analizowanych białek, stosowano Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (10–250 kDa, Thermo Scientific). Elektroforezę prowadzono w temperaturze pokojowej, w buforze do elektroforezy białek (25 mM Tris base, 192 mM glicyna, 0,1% SDS), przy napięciu 80 V w żelu zagęszczającym oraz 100–120 V w żelu rozdzielającym. Rozdziału białek dokonywano przy pomocy aparatu BioRad TetraCell.

3.7.3 Detekcja białka metodą Western blot

Po zakończeniu rozdziału elektroforetycznego w celu przeprowadzenia późniejszej reakcji z przeciwciałami, białka z żelu poliakrylamidowego przenoszono na membranę z polifluorku winylidenu (PVDF, Millipore) techniką transferu półmokrego w aparacie Trans-Blot SD Semi-Dry (BioRad). Przed rozpoczęciem tej procedury, celem aktywacji, membranę PVDF zanurzano w metanolu, a następnie w buforze do transferu półmokrego (48 mM Tris, 39 mM glicyna, 0,0375% SDS, 20% metonal). Tej samej procedurze, zanurzenia w roztworze do transferu półmokrego, poddawano żel poliakrylamidowy oraz 3 mm bibuły (Whatman). W kolejnym etapie przystępowano do złożenia „kanapki”. W tym celu w aparacie do transferu

układano: dwie bibuły, następnie membranę PVDF, żel poliakrylamidowy oraz kolejne dwie bibuły. Transfer prowadzono stosując prąd o stałym natężeniu 200 mA przez 1,5 godziny.

Po zakończeniu transferu, aby zapobiec niespecyficznemu adsorpcji przeciwciał, wolne miejsca wiązania białek na membranie blokowano w 5% mleku zawieszonym w buforze TBS-T (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 0,2% Tween-20) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie membranę inkubowano w 5% mleku w buforze TBS-T z dodatkiem przeciwciała pierwszorzędowego (GFP królicze poliklonalne 1:200, Abcam, nr kat. ab290; GAPDH mysie monoklonalne 1:5000; Millipore, nr kat. CB1001) w 4°C przez całą noc. Kolejnego dnia membranę płukano w buforze TBS-T (3×10 minut) oraz inkubowano przez jedną godzinę w temperaturze pokojowej z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową (HRP anti-GFP 1:5000, Jackson ImmunoResearch, nr kat. ab6663; HRP anti-GAPDH 1:5000, Abcam nr kat. Ab204481). Następnie powtarzano płukanie w roztworze TBS-T (3×10 minut). Wizualizację białek na membranie przeprowadzano za pomocą gotowego zestawu do reakcji chemiluminescencyjnej, ECL Western Blotting Detection Reagent (Amersham), wywoływanej na kliszy fotograficznej (Kodak) na aparaturze G-BOX (TK-Biotech).

3.8 Metody pracy z RNA

3.8.1 Przygotowanie ekstraktów RNA z pierwotnych hodowli komórek nerwowych hipokampa

Pierwotne hodowle komórek nerwowych hipokampa *in vitro* zakładano z nowonarodzonych osesków P0 (ang. *postnatal day 0*). Komórki wysiewano z gęstością od 160 do 200 tysięcy na dołek 12-dołkowej płytki, a następnie w 5–7 dniu hodowli *in vitro* (ang. *days in vitro*, DIV) neurony infekowano mieszaniną wektorów wirusowych.

Ekstrakty RNA z pierwotnych hodowli komórek hipokampalnych izolowano w 12–14 DIV. RNA izolowano zgodnie z protokołem dołączonym do gotowego zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen). Tak uzyskane ekstrakty RNA umieszczano w próbkach i przetrzymywano w temperaturze –80°C, jednocześnie pozostawiając około 3–4 µl RNA potrzebnego do pomiaru stężenia. Stężenie wyizolowanego i oczyszczonego RNA sprawdzono spektrofotometrem NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

3.8.2 Przygotowanie ekstraktów RNA z hipokampa

W celu przygotowania ekstraktów RNA z tkanki bezpośrednio po uśmierceniu zwierzęcia, izolowano hipokampy, umieszczano je w roztworze stabilizującym (RNAlater, Life Technologies), a następnie do momentu dalszej izolacji przechowywano w temperaturze 4°C. Wyizolowane hipokampy homogenizowano poprzez mechaniczne rozcieranie tkanki mikrohomogenizatorem ręcznym, a RNA izolowano zgodnie z protokołem dołączonym do gotowego zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen). Tak uzyskane ekstrakty RNA umieszczano w próbkówkach i przetrzymywano w temperaturze –80°C, jednocześnie pozostawiając około 3–4 µl RNA potrzebnego do pomiaru stężenia. Stężenie wyizolowanego i oczyszczonego RNA sprawdzono spektrofotometrem NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

3.8.3 Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR)

W celu przepisania RNA na cDNA przeprowadzano reakcja odwrotnej transkrypcji RT-PCR (*ang. reverse transcription polymerase chain reaction*) przy użyciu gotowego zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Skład mieszaniny (Tabela 15) oraz warunki reakcji przedstawiono (Tabela 16) poniżej. Stężenie cDNA mierzono spektrofotometrem NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Próbkę do momentu kolejnych analiz przechowywano w –80°C.

Tabela 15. Skład mieszaniny reakcyjnej prowadzącej do przepisania RNA na cDNA.

Skład mieszaniny reakcyjnej	Objętość [µl]
10 × RT buffer	2
25 × dNTP MIX (100 mM)	0,8
10 × RT Random Primers	2
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1
RNase inhibitor	1
RNA (do 2 µg)	10
Nuclease free water	3,2
Objętość końcowa mieszaniny: 20 µl	

Tabela 16. Warunki reakcji przepisania RNA na cDNA.

Warunki	Krok 1	Krok 2	Krok 3	Krok 4
Temperatura [°C]	25	37	85	4
Czas trwania etapu [mm:ss]	10:00	120:00	05:00	∞

3.8.4 Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)

Reakcja qPCR (ang. *quantitative polymerase chain reaction*) oznacza ilościowy PCR w czasie rzeczywistym umożliwiający monitorowanie ilości produktu reakcji w trakcie jej trwania. Kontrolowanie ilości produktu w każdym cyklu możliwe jest dzięki obecności sond oligonukleotydowych zawierających na końcu 5' znacznik fluorescencyjny FAM (ang. *fluorescein*), a na końcu 3' cząsteczkę wygaszającą fluorescencję MGB-NFQ (ang. *minor groove binder – nonfluorescent quencher*). Sonda po związaniu się z sekwencją komplementarną na etapie wydłużania degradowana jest przez polimerazę Taq, wskutek czego fluorofor FAM odłącza się od wygaszacza MGB-NFQ. Do przeprowadzenia reakcji qPCR wykorzystano gotowy zestaw TaqMan Gene Expression Master Mix (ThermoFisher Scientific), a także gotowe sondy tej samej firmy: mysią PML (ID Mm00476969_m1, ThermoFisher Scientific) oraz mysią HPRT (ang. *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*; ID Mm00446968_m1, ThermoFisher Scientific) jako endogenną kontrolę umożliwiającą ocenę zmian w ekspresji genów. Skład mieszaniny przedstawiono w Tabeli 17.

Tabela 17. Skład mieszaniny do wykonania reakcji qPCR.

Skład mieszaniny reakcyjnej	Objętość [μl]
20 × TaqMan Gene Expression Assay PML/HPRT	1
2 × TaqMan Gene Expression Master MIX	10
cDNA (1–100 ng)	4
RNase-free water	5
Objętość końcowa mieszaniny: 20 μl	

Reakcję, której warunki przedstawiono w Tabeli 18, prowadzono przy użyciu termocyklera StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Analizę wyników przeprowadzono w programie StepOne wersja 2.3 (Applied Biosystems). Celem uzyskania względnego poziomu ekspresji mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) w pierwszej kolejności wyznaczano średnią Ct z dwóch powtórzeń dla każdej z prób oznaczonych sondą PML i HPRT. ΔCt wyznaczano odejmując średnie HPRT od średnich PML dla każdej próby. Kolejno wyznaczano średnią ΔCt dla HPRT. Wartość $\Delta\Delta Ct$ obliczano poprzez odjęcie od wartości ΔCt dla każdej próbki średniej wartości ΔCt dla HPRT. Następnie wyznaczano względnym poziom mRNA $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dla każdej próby, a wartość tę uśredniano dla grupy PML i HPRT.

Tabela 18. Warunki reakcji qPCR.

Etap	Temperatura [°C]	Czas trwania etapu [mm:ss]
1.	50	02:00
2.	95	10:00
3.	95	00:15
4.	60	01:00
Dla etapu od 3 do 4 przeprowadzono 40 cykli.		

3.9 Analiza behawioralna

Do przeprowadzenia analizy danych z testu uczenia się progresywnego oraz testu Vogla użyto programu *Analyzer* dostarczanego wraz z oprogramowaniem klatek IntelliCage oraz Microsoft Excel, natomiast do analizy wyników testów *clockwise* oraz *counter-clockwise* użyto skryptu w języku Python przygotowanego wraz z dr. M. Kochańczykiem (IPPT PAN).

3.10 Analiza mikroskopowa

Obrazy tkanek poddanych barwieniom immunofluorescencyjnym zostały zarejestrowane przy użyciu mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 800. Zdjęcia DAB oraz niektóre barwienia immunofluorescencyjne zostały zobrazowane z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego Olympus Fluoview FV3000. Złożenia i pseudokolory obrazów w poszczególnych kanałach zostały uzyskane w programie ImageJ.

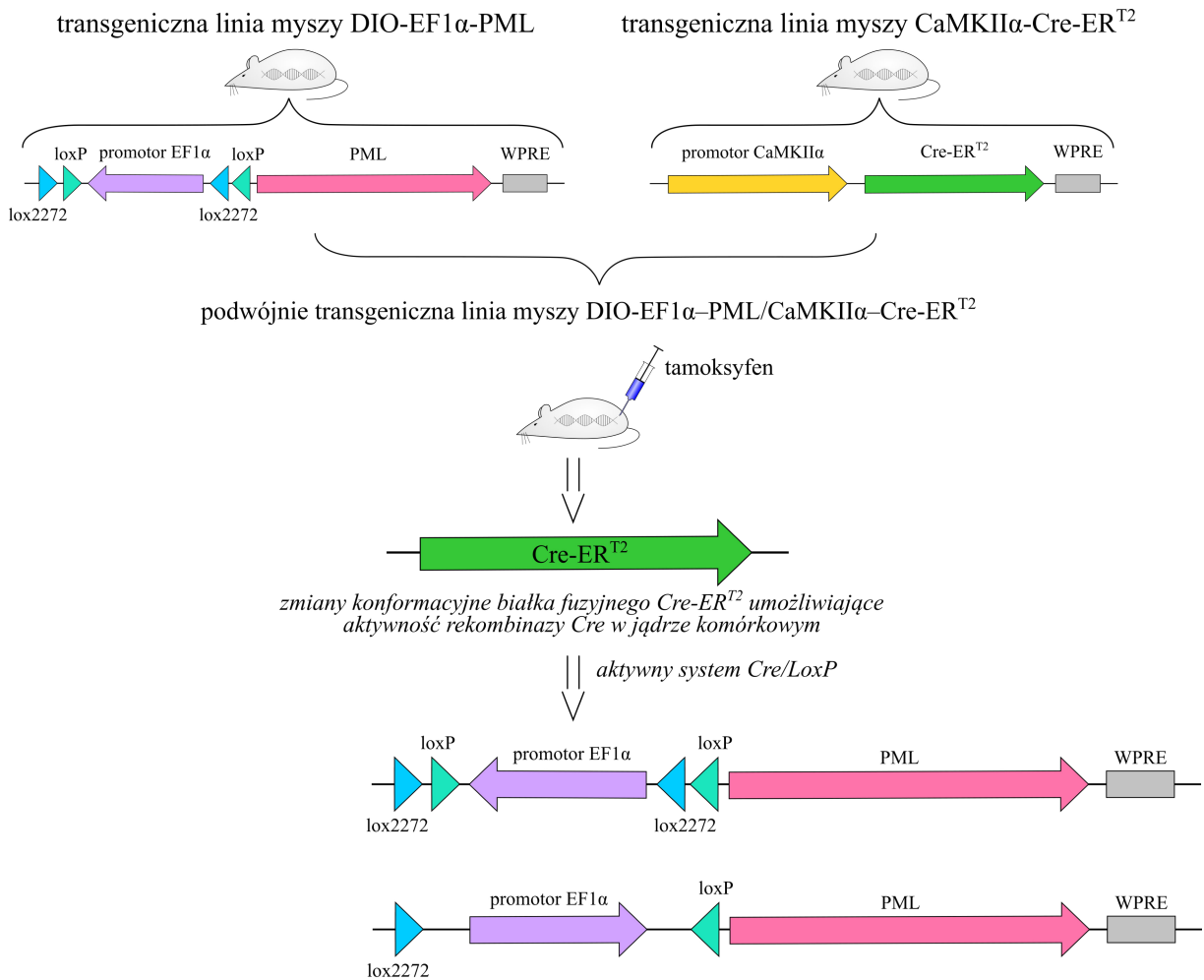
4 Wyniki

4.1 Wytworzenie modelu myszy z podwyższonym poziomem białka PML

Funkcja białka PML w komórkach ciała dorosłych gryzoni, w szczególności w komórkach nerwowych, jest słabo poznana. Z tego powodu głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie funkcji białka PML i ciałek jądrowych PML w mózgu myszy. W tym celu otrzymano dwa modele zwierzęce. W jednym z tych modeli uzyskano podwyższony poziom białka PML w hipokampie dorosłych myszy.

4.1.1 Neurospecyficzna indukcja podwyższonego poziomu białka PML u myszy podwójnie transgenicznych DIO-EF1 α -PML^{CaMKII α -Cre-ERT2}

Pierwszym podejściem do uzyskania podwyższonego poziomu białka PML było wytworzenie linii myszy podwójnie transgenicznej z globalną neurospecyficzną indukcją ekspresji PML w mózgu. W tym celu wykorzystano system Cre/loxP indukowany tamoksyfenem. W systemie tym rekombinaza Cre-ER^{T2}, będąca pod nadającym neurospecyficzność promotorem α podjednostki CaMKII, obecna jest w genomie osobnika, który krzyżowany jest z osobnikiem posiadającym w swoim genomie sekwencje loxP i lox2272 (zmodyfikowane loxP). Pomiędzy tymi sekwencjami znajduje się sekwencja, której ekspresja zostaje uruchomiona poprzez jej odwrócenie, w związku z czym jej nazwa poprzedzana jest przedrostkiem DIO (ang. *double-floxed inverted open reading frame*). W przypadku omawianej linii myszy była to sekwencja promotora DIO-EF1 α (promotor czynnika elongacji EF1 α wykazuje również pewien stopień neurospecyficzności), za którą znajdowała się sekwencja cDNA dla PML. Część potomstwa (podwójnie transgeniczna) posiadała w swoim genomie zarówno sekwencję Cre-ER^{T2}, jak i sekwencję DIO-EF1 α . Indukcja mutacji następowała w ciągu 2 tygodni od podania, w formie iniekcji dootrzewnowej, tamoksyfenu. Dzięki obecności domeny receptora estrogenowego (ER^{T2}) utrzymującej białko fuzyjne Cre-ER^{T2} w cytoplazmie i w ten sposób powstrzymującej działanie rekombinazy Cre, w systemie tym możliwa była indukcja ekspresji białka PML w dowolnie wybranym momencie życia zwierzęcia. Szczegółowy schemat działania systemu wykorzystanego do uzyskania linii myszy podwójnie transgenicznej przedstawiono i opisano na Rycinie 7.



Rycina 7. Schemat działania systemu Cre/loxP indukowanego tamoksyfenem. Schemat przedstawia krzyżowanie zwierząt z dwóch linii transgenicznych: linii myszy DIO-EF1α-PML oraz linii myszy CaMKIIα-Cre-ER^{T2}. W wyniku krzyżowania powstaje m.in. potomstwo podwójnie transgeniczne DIO-EF1α-PML^{CaMKIIα-Cre-ER^{T2}}. System Cre/loxP jest nieaktywny, gdyż domena receptora estrogeny ER^{T2} hamuje rekombinazę Cre. Dootrzewnowe podanie tamoksyfenu uwalnia rekombinazę Cre z kompleksu z ER^{T2}, co prowadzi do jej aktywacji. Dzięki obecności promotora CaMKIIα ekspresja Cre zachodzi wyłącznie w neuronach. Aktywna Cre rozpoznaje sekwencje lox2272 oraz loxP, a następnie odwraca sekwencję promotora EF1α tym samym umożliwiając jego działanie.

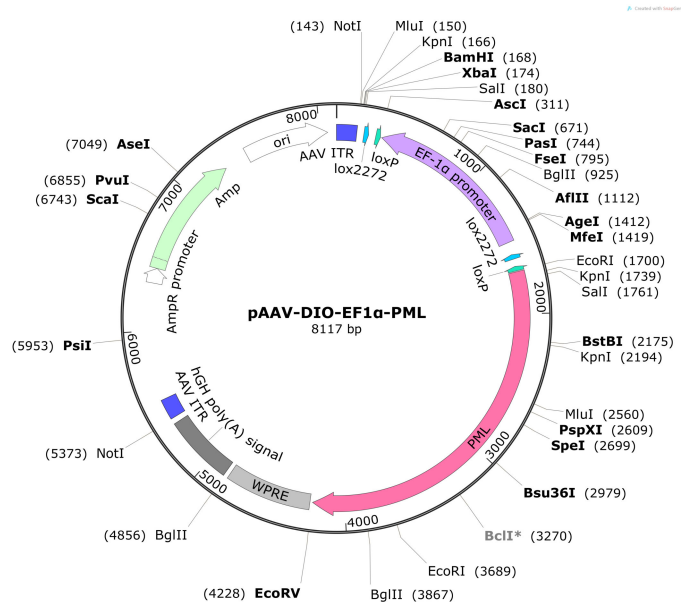
4.1.1.1 Otrzymanie wektora plazmidowego DIO-EF1α-PML

W niniejszej sekcji opisano otrzymanie wektora plazmidowego pAAV-DIO-EF1α-PML, który w dalszej części pracy wykorzystano do wytworzenia myszy transgenicznych linii DIO-EF1α-PML metodą mikroiniekcji DNA do przedjądrzy zapłodnionych oocytów.

W opisanych doświadczeniach do przygotowania wstawki wykorzystano plazmid pCMV6-Entry (OriGene) niosący cDNA kodujący I izofর্মę białka PML. Fragment

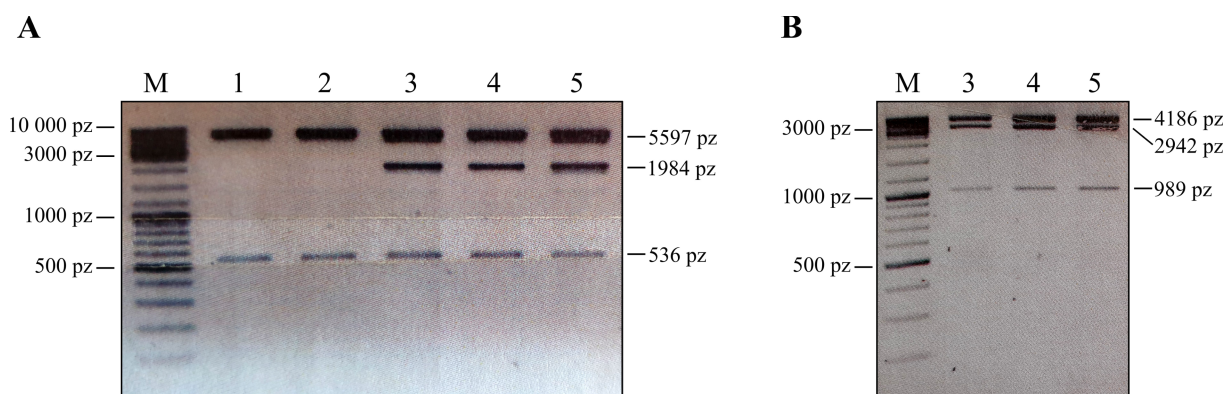
zawierający sekwencję cDNA dla białka PML amplifikowano przy użyciu odpowiednio zaprojektowanych starterów (PML-For i PML-Rev) zawierających na końcach 5' dodatkową sekwencję nukleotydową rozpoznawaną przez specyficzne endonukleazy: *EcoRI* oraz *EcoRV*. W dalszych etapach obecność tych sekwencji pozwalała na przeprowadzenie trawienia restrykcyjnego, dzięki któremu na wstawce powstawały lepkie końce, umożliwiające wprowadzenie jej do plazmidu docelowego. Jako matrycę (plazmid docelowy) wykorzystano pAAV-DIO-EF1 α (otrzymany od Günthera Schütza, DKFZ, Heidelberg), a otrzymaną wstawkę (2520 pz) klonowano z uwzględnieniem etapu defosforylacji (materiały i metody – podsekcja 3.1.6.1).

Uzyskany plazmid, oprócz sekwencji PML, zawierał sekwencję promotora EF1 α w orientacji przeciwnej do kierunku transkrypcji, oflankowanego sekwencjami loxP i lox2272. Sekwencje loxP i lox2272 umożliwiły wycięcie, a następnie umieszczenie w prawidłowej orientacji sekwencji promotora EF1 α . Dodatkowo plazmid zawierał sekwencje ITR niezbędne do produkcji wektora wirusowego AAV wykorzystanego w dalszej części pracy doktorskiej. W celu sprawdzenia funkcjonalności systemu Cre/loxP *in vitro* wykorzystano równorzędny plazmid kontrolny pAAV-DIO-EF1 α -EYFP (otrzymany od Günthera Schütza, DKFZ, Heidelberg), który w miejscu sekwencji dla białka PML zawierał sekwencję dla genu białka fluorescencyjnego EYFP (ang. *enhanced yellow fluorescent protein*). Poniżej przedstawiono mapę otrzymanego wektora plazmidowego pAAV-DIO-EF1 α -PML.



Rycina 8. Mapa wektora plazmidowego pAAV-DIO-EF1 α -PML. Zaznaczone kolorami fragmenty: promotor EF1 α (kolor liliowy), sekwencja kodująca gen – PML (kolor różowy), sekwencje ITR (kolor indygo), sekwencje loxP i lox2272 (kolory jasnoniebieski i morski) oraz sekwencja WPRE (kolor szary) stabilizująca transkrypt.

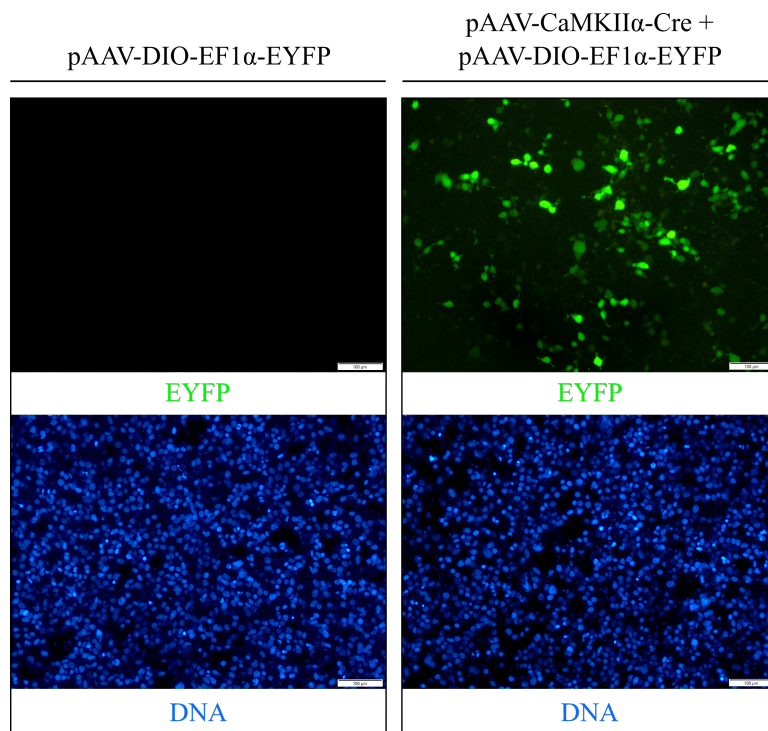
Obecność wstawki PML weryfikowano poprzez analizę pozycji prążków (w żelu agarozowym) zawierających produkty enzymatycznego trawienia uzyskanego plazmidu. W pierwszej kolejności do wyselekcjonowania pozytywnych klonów bakterii wykorzystano enzymy *EcoRI* i *EcoRV*, dające prążki o wielkości 5597 pz, 1984 pz i 536 pz. Następnie wybrano pozytywne klony i poddano je kontrolnej analizie z użyciem enzymu *BglII* dającego prążki o wielkości 4186 pz, 2942 pz i 989 pz. Klony zawierające prawidłowy wzorec prążków (Rycina 9) sekwencjonowano. Na podstawie otrzymanych wyników wybrano klony niezawierające żadnych mutacji nukleotydowych, które następnie wykorzystano do dalszych procedur.



Rycina 9. (A) Zdjęcie żelu agarozowego przedstawiające produkty trawienia wybranych klonów (1-5) enzymami restrykcyjnymi *EcoRI* i *EcoRV*; M – marker wielkości [pz]. (B) Zdjęcie żelu agarozowego przedstawiające produkty trawienia wybranych klonów (3-5) enzymem restrykcyjnym *BglII*; M – marker wielkości [pz].

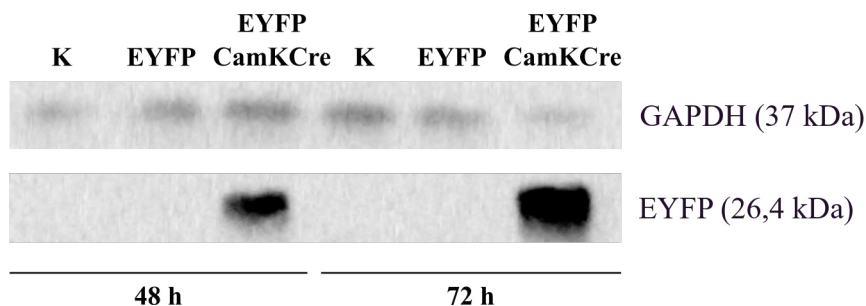
4.1.1.2 Weryfikacja działania systemu Cre/loxP *in vitro*

Do weryfikacji działania systemu Cre/loxP *in vitro* wykorzystano wcześniej otrzymany plazmid kontrolny zawierający białko fluorescencyjne pAAV-DIO-EF1 α -EYFP. Dodatkowo, jako niezbędny element systemu Cre/loxP, użyto namnożony plazmid pAAV-CaMKII α -Cre (otrzymany od dr hab. Katarzyny Kaliny, IBD PAN) zawierający: promotor genu α podjednostki CaMKII wykazujący specyficzność do neuronów pobudzających przodomózgowia, oraz sekwencję dla enzymu rekombinazy Cre. W pierwszej kolejności weryfikację działania systemu rozpoczęto od transfekcji linii komórkowej HEK293. Przygotowane hodowle transfekowano mieszaniną plazmidów ekspresyjnych pAAV-DIO-EF1 α -EYFP i pAAV-CaMKII α -Cre. Mieszanina kontrolna nie zawierała plazmidu pAAV-CaMKII α -Cre. Na Rycinie 10 przedstawiono zdjęcie mikroskopowe obrazujące wynik transfekcji.



Rycina 10. Weryfikacja systemu Cre/loxP *in vitro*: transfekcja linii komórkowej HEK293. W komórkach zainfekowanych plazmidem kontrolnym pAAV-DIO-EF1α-EYFP brak fluorescencji pochodzącej od białka reporterowego EYFP (panel lewy). W komórkach HEK293 zainfekowanych mieszaniną pAAV-DIO-EF1α-EYFP i pAAV-CaMKIIα-Cre (panel prawy) zarejestrowano fluorescencję pochodzącą od białka reporterowego EYFP. EYFP – kolor zielony, DNA (barwnik Hoechst) – kolor niebieski. Zdjęcie wykonano 72 godziny po transfekcji.

Białko z komórek HEK293 izolowano po 48 lub 72 godzinach po transfekcji. Uzyskany materiał poddano analizie w celu określenia poziomu białka reporterowego EYFP w obecności lub braku enzymu rekombinazy Cre. Poniżej przedstawiono wyniki otrzymane metodą Western blot z wykorzystaniem przeciwciała rozpoznającego EYFP. Zaobserwowano obecność prążków, których wielkość wskazuje na obecność białka EYFP.



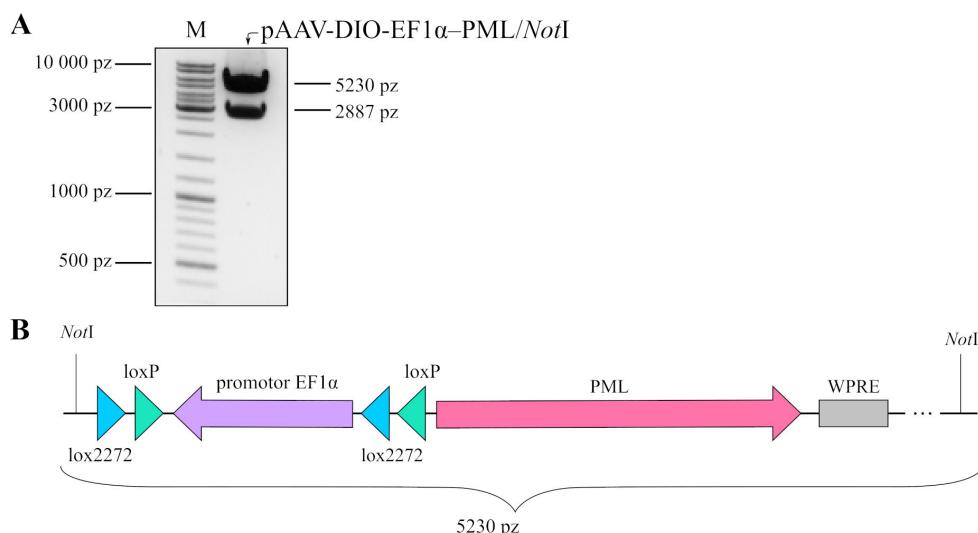
Rycina 11. Analiza Western blot z wykorzystaniem przeciwciała skierowanego przeciwko EYFP w ekstraktach białkowych wyizolowanych z komórek HEK293. Kontrola: GAPDH; jako dodatkową kontrolę (K) wykorzystano białko wyizolowane z komórek HEK293 nietransfekowanych.

Przedstawiony wynik rozdziału białek po wyznakowaniu przeciwciałem na EYFP wskazuje, że komórki transfekowane jedynie plazmidem pAAV-DIO-EF1 α -EYFP, w którym orientacja promotora EF1 α jest nieprawidłowa, nie posiadają białka EYFP. W obecności plazmidu pAAV-CaMKII α -Cre, rekombinaza Cre odblokowuje ekspresję genu białka reporterowego EYFP. Powyższe wyniki potwierdziły prawidłowe działanie system Cre/loxP *in vitro*.

4.1.1.3 Otrzymanie myszy transgeniczných linii DIO-EF1 α -PML poprzez mikroiniekcję DNA do przedjądrzy zapłodnionych oocytów

W niniejszej sekcji opisano otrzymanie myszy transgeniczných linii DIO-EF1 α -PML metodą mikroiniekcji DNA do przedjądrzy zapłodnionych oocytów z wykorzystaniem uzyskanego wektora plazmidowego pAAV-DIO-EF1 α -PML.

Przed rozpoczęciem procedury mikroiniekcji z uzyskanego plazmidu pAAV-DIO-EF1 α -PML wyizolowano odpowiedni fragment DNA. W wyniku trawienia plazmidu enzymem restrykcyjnym *NotI* otrzymano produkty o wielkości 5230 oraz 2887 pz. Liniowy fragment dsDNA zawierający sekwencję PML (5230 pz) oczyszczono, przygotowano w różnych rozcieńczeniach (2,5 ng/ μ l, 2 ng/ μ l, 1,5 ng/ μ l, 1 ng/ μ l oraz 0,5 ng/ μ l), a następnie wykorzystywano do dalszych doświadczeń. Zdjęcie żelu agarozowego oraz schemat liniowego fragmentu dsDNA zawierającego promotor EF1 α , mysie cDNA dla I izoformy PML oraz sekwencje loxP, lox2272 i WPRE przedstawiono na Rycinie 12.

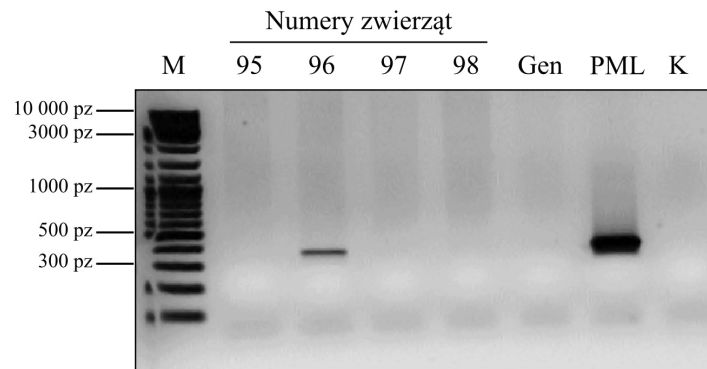
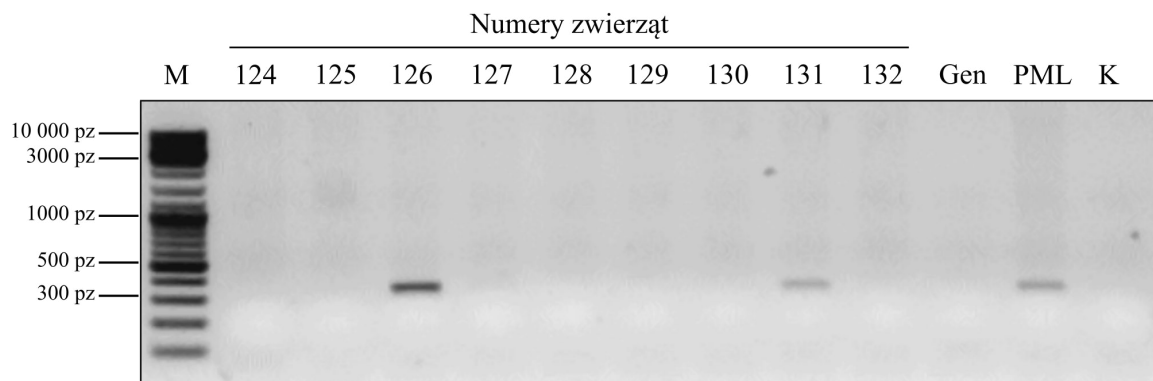
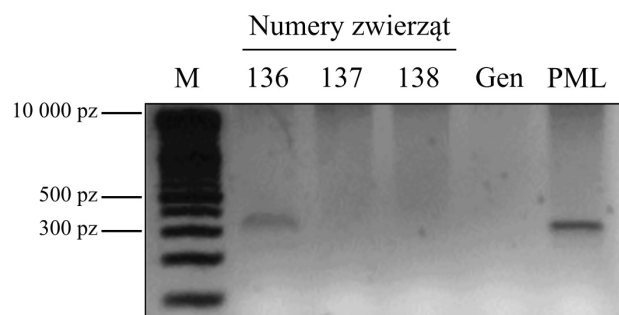


Rycina 12. (A) Zdjęcie żelu agarozowego przedstawiające produkty trawienia plazmidu pAAV-DIO-EF1 α -PML enzymem restrykcyjnym *NotI*; M – marker wielkości [pz]. (B) Schemat liniowego fragmentu dsDNA zawierający I izoformę białka PML wykorzystany do mikroiniekcji.

Mikroiniekcja DNA do przedjądrzy polega na wprowadzeniu liniowego fragmentu dsDNA do jednego z przedjądrzy zarodka w stadium jednokomórkowym. Prawidłowe wprowadzenie DNA (niepowodujące uszkodzenia zarodka) obserwowane było pod mikroskopem jako delikatne powiększenie się nastrzykiwanego przedjądrza. W trakcie 31 doświadczeń wykorzystano 153 stymulowane hormonalnie samice szczepu FVB. Liczba wyizolowanych oocytów (potencjalnie zapłodnionych) od samic dawczyń wyniosła 3535, z czego do doświadczeń wykorzystano 2272 oocytów wybranych pod względem prawidłowej budowy morfologicznej oraz obecności i widoczności przedjądrzy. Liczba zarodków, u której nie doszło do uszkodzeń w trakcie mikroiniekcji, a także nie doszło do zatrzymania podziału komórkowego wyniosła 824. Zarodki przetransferowano łącznie do 46 biorczyń wcześniej skojarzonych z bezpłodnym samcem (poddanym wcześniej zabiegowi wazektomii) w celu uruchomienia hormonalnej kaskady przygotowującej samice do ciąży rzekomej. Liczba wszystkich urodzonych zwierząt wyniosła 138 oseków (najwięcej po zastosowaniu do mikroiniekcji stężeń 1 lub 0,5 ng/ μ l), z czego u 4 potwierdzono obecność transgenu. Z grupy 4 osobników transgeniczných pokolenia F0, uzyskane wyniki genotypowania potwierdziły przekazanie (pokoleniu F1) wprowadzonego genu przez 3 osobniki założycielskie. Wszystkie urodzone zwierzęta były zwierzętami hybrydowymi tzn. powstałymi poprzez skrzyżowanie linii FVB (dawczynie zarodków) z linią C57 BL/6J (samce kryjące samice dawczynie zarodków). Poniżej przedstawiono tabelę podsumowującą przeprowadzone doświadczenia (Tabela 19) oraz zdjęcia żeli agarozowych uwidaczniających obecność transgenu u urodzonych myszy (Rycina 13).

Tabela 19. Zestawienie skuteczności poszczególnych etapów otrzymania zwierząt transgeniczných.

		Skuteczność [%]
Liczba przeprowadzonych doświadczeń	31	
Liczba dawczyń oocytów	153	
Suma wyizolowanych zarodków	3535	
Suma nastrzykniętych zarodków	2271	64 % (z 3535)
Liczba przetransferowanych zarodków do samic biorczyń	824	36,3% (z 2271)
Liczba urodzonych zwierząt	138	16,7% (z 824)
Liczba zwierząt transgeniczných	4	2,9% (z 138)
Liczba zwierząt transgeniczných przekazujących transgen	3	2,2% (z 138)

A**B****C**

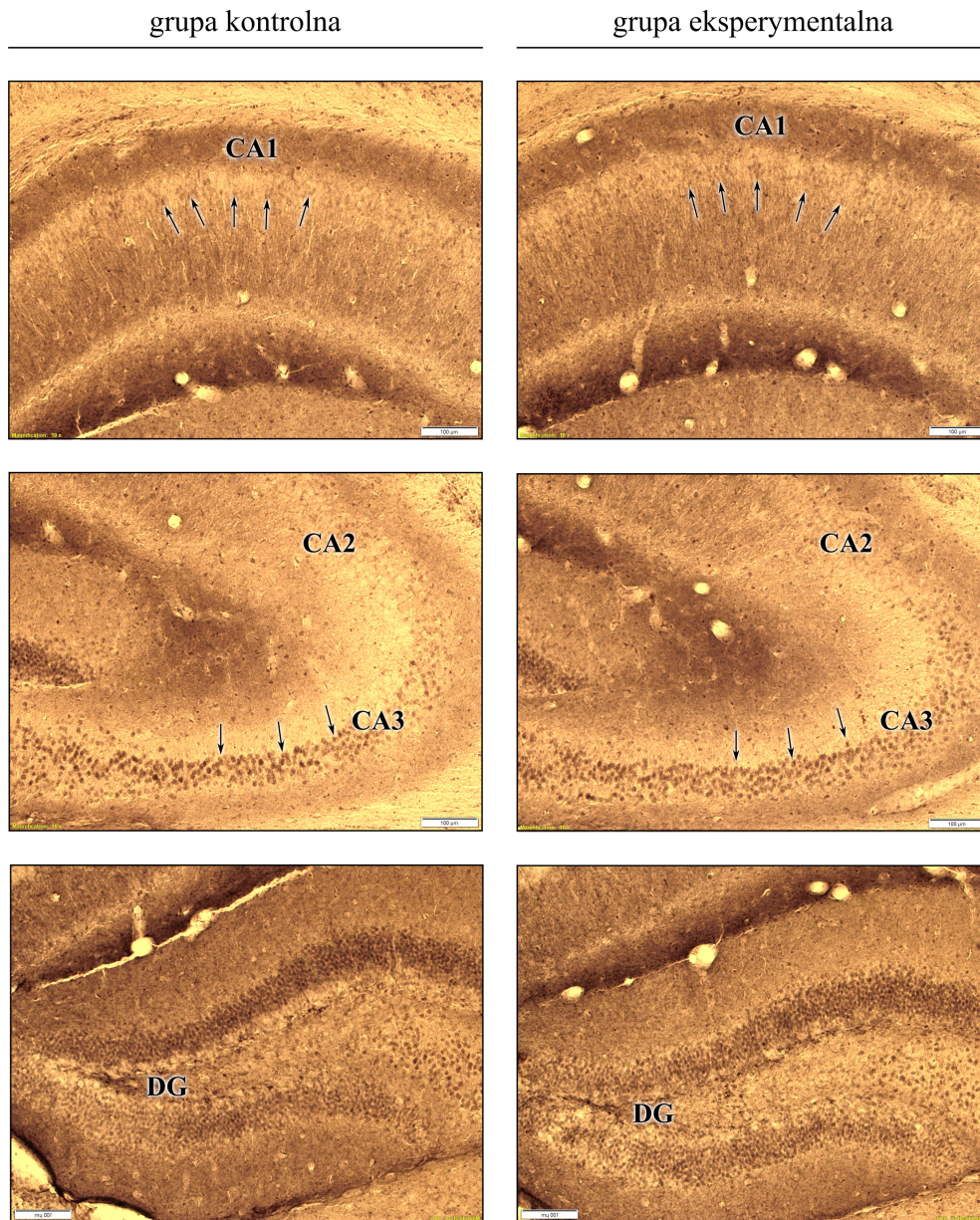
Rycina 13. Zdjęcia żeli agarozowych przedstawiające produkty reakcji PCR przeprowadzonej na DNA genomowym myszy z użyciem specyficznych dla egzogennych sekwencji loxP oraz sekwencji EF1 α starterów. Osobniki 96 (A), 126, 131 (B) oraz 136 (C) posiadają transgen w swoim genomie; pozostałe osobniki nie posiadają transgenu. Oznaczenia: Gen – DNA genomowe dzikiej myszy C57 BL/6J, PML – plazmid pAAV-DIO-EF1 α -PML (kontrola pozytywna), K – kontrola negatywna.

4.1.1.4 Podwyższony poziom białka PML u zwierząt podwójnie transgenicznych DIO-EF1 α -PML^{CaMKII α -Cre-ERT2} indukowany tamoksyfenem

W dalszych etapach każda z otrzymanych linii DIO-EF1 α -PML prowadzona była niezależnie i oznaczana jako DIO-EF1 α -PML^I, DIO-EF1 α -PML^{II} oraz DIO-EF1 α -PML^{III}. Zdecydowano o niezależnym prowadzeniu linii ze względu na losową integrację transgeny do genomu, a tym samym prawdopodobieństwo jego obecności w różnych miejscach w genomie.

W celu wyprowadzenia linii o jednorodnym podłożu genetycznym C57 BL/6J potomstwo transgeniczne F1 każdej z linii krzyżowano z niezmodyfikowanymi genetycznie myszami C57 BL/6J aż do pokolenia F5/F6. W dalszej kolejności przystąpiono do krzyżowania osobników każdej z linii DIO-EF1 α -PML z osobnikami linii CaMKII α -Cre-ERT². Potomstwo podwójnie transgeniczne DIO-EF1 α -PML^{CaMKII α -Cre-ERT2} genotypowano i w wieku około 3 miesięcy wyznaczono do doświadczeń. Zwierzęta te były heterozygotyczne pod względem każdego z transgenów. Wszystkie przedstawione w niniejszej pracy doświadczenia przeprowadzono na samicach. Wybór podyktowany był zaplanowanymi doświadczeniami behawioralnymi z wykorzystaniem klatek w systemie IntelliCage, w których preferowaną płcią, ze względu na grupy zwierząt o dużej liczebności, biorących udział w doświadczeniu we wspólnej klatce, są samice. Rywalizacja oraz dominacja samców przebywających w dużych kohortach mogłaby znacząco wpłynąć na przebieg doświadczeń.

Ze względu na niską rozrodczość i problemy z uzyskaniem odpowiednio licznych grup pochodzących od założyciela linii PML^{III}, doświadczenia prowadzono na grupach samic pochodzących od założycieli PML^I oraz PML^{II}. Efekt podwyższonego poziomu białka PML sprawdzono w dwóch grupach zwierząt: eksperymentalnej – myszy podwójnie transgeniczne DIO-EF1 α -PML^{CaMKII α -Cre-ERT2} indukowane tamoksyfenem oraz kontrolnej – myszy podwójnie transgeniczne DIO-EF1 α -PML^{CaMKII α -Cre-ERT2} traktowane olejem słonecznikowym (będącym rozpuszczalnikiem dla tamoksyfenu). Po 2–3 tygodniach od indukcji zwierzęta poddawano perfuzji, mózgi izolowano oraz przy użyciu kriostatu cięto na skrawki o grubości 40 μ m. Następnie w celu analizy ekspresji transgeny PML, na skrawkach mózgu wykonano barwienie metodą DAB. Doświadczenia przeprowadzono na grupach od 5 do 8 osobników. Poniżej przedstawiono wyniki uzyskane z potomka pochodzącego od założyciela PML^I (Rycina 14).



Rycina 14. Ekspresja białka PML w hipokampie 3-miesięcznych myszy samic linii podwójnie transgenicznym DIO-EF1 α -PML^{CaMKII α -Cre-ERT2}. Na lewym panelu widoczne są zdjęcia mikroskopowe skrawków hipokampa uzyskanych od samicy z grupy kontrolnej, na prawym z grupy doświadczalnej. Na widocznych zdjęciach hipokampu oznaczono obszary CA1, CA2, CA3 oraz DG, a także strzałkami wskazano wybarwione metodą DAB jądra komórkowe neuronów.

Jak wspomniano we wstępie, dotychczas poziom białka PML w różnych strukturach mózgu dorosłych myszy, niezmodyfikowanych genetycznie, opisano i szczegółowo przedstawiono w pracy Hall i in. (2016). Z dostępnych danych wiadomo, że poziom białka PML w hipokampie jest stosunkowo wysoki. Struktura CA1 = +, struktura CA2 = 0, struktura CA3 = ++, oraz zakręt zębaty (DG) = ++. Na podstawie otrzymanych wyników można

zauważyć, że poziom PML u myszy podwójnie transgenicznych DIO-EF1 α -PML^{CaMKII α -Cre-ERT2} indukowanych tamoksyfenem nie różni się istotnie od poziomu PML u myszy kontrolnych. Efekt ten widoczny jest zarówno w strukturach CA3 oraz DG gdzie poziom ten jest stosunkowo wysoki, jak i w strukturach CA1 oraz CA2, w których poziom PML jest bardzo niski lub nie ma go wcale. Tak jak w przypadku struktur DG i CA3 efekt ten mógł być na tyle subtelny, że prawie niezauważalny, tak w przypadku struktur CA1 i CA2 różnice powinny być możliwe do oceny, że względu na dużą aktywność Cre-ER^{T2} w linii CaMKII α -Cre-ER^{T2}. Analizie poddano w szczególności strukturę hipokampa, ale, jako że indukcja podwyższonego poziomu białka PML powinna wywoływać efekt w wielu częściach mózgu, sprawdzono również pozostałe struktury, między innymi IV warstwę kory baryłkowej, gdzie poziom ekspresji PML między grupą doświadczalną a kontrolną był również porównywalny i nie zauważono istotnych różnic (wyników nie przedstawiono w pracy). Z tych powodów w dalszej części pracy przedstawiono alternatywne doświadczenia prowadzące do uzyskania neurospecyficznego, lokalnie podwyższonego poziomu PML w mysim hipokampie z użyciem wektorów wirusowych rAAV.

4.1.2 Lokalna neurospecyficzna indukcja podwyższonego poziomu białka PML

W drugim z podejść, prowadzącym do uzyskania neurospecyficznego, lokalnie podwyższonego poziomu białka PML w hipokampie, posłużono się dwoma modelami mysimi. W pierwszym z modeli wykorzystano otrzymaną wcześniej linię zwierząt transgenicznych DIO-EF1 α -PML. Myszy tej linii poddano operacjom stereotaktycznym z wykorzystaniem wektora wirusowego rAAV-CaMKII α -Cre wprowadzonego do hipokampa zwierząt. W przeciwieństwie do linii transgenicznej CaMKII α -Cre-ER^{T2}, obecna w wektorze wirusowym rAAV-CaMKII α -Cre rekombinaza Cre nie była hamowana obecnością domeny ER^{T2}. Oznaczało to brak konieczności indukcji rekombinazy przy użyciu tamoksyfenu. W otrzymanym modelu zaobserwowano **cytoplazmatyczną lokalizację białka PML** w mysim hipokampie. W drugim modelu zdecydowano się na pracę ze zwierzętami typu dzikiego linii C57 BL/6J, które poddano operacjom stereotaktycznym z wykorzystaniem wektora wirusowego rAAV-EF1 α -PML-T2A-mCherryNLS. W wyniku przeprowadzonych operacji otrzymano **jądrową lokalizację białka PML** w mysim hipokampie. W kolejnych sekcjach szczegółowo opisano i przedstawiono wyniki otrzymane w przypadku obu modeli.

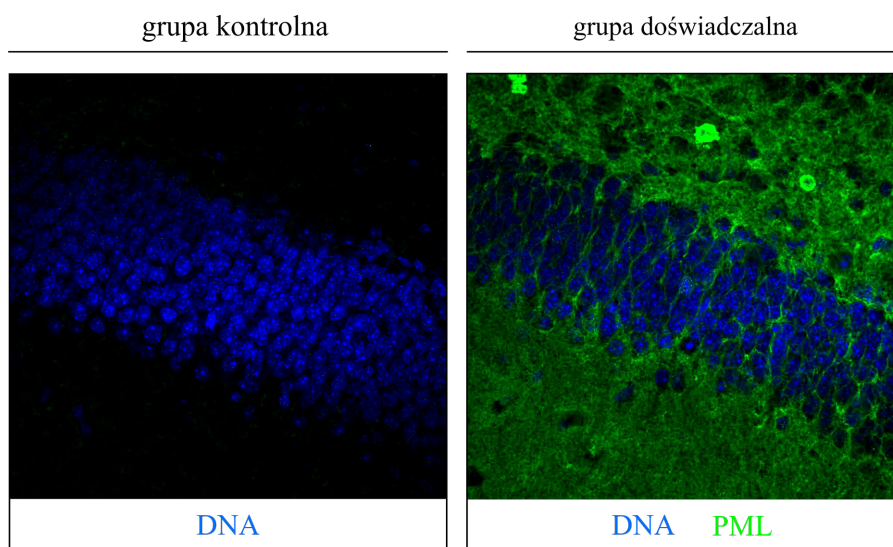
4.1.2.1 Podwyższony poziom i cytoplazmatyczna lokalizacja białka PML u myszy linii DIO-EF1 α -PML uzyskane poprzez iniekcję wektora wirusowego rAAV-CaMKII α -Cre do struktur hipokampa

Pierwszy model lokalnej indukcji podwyższonego poziomu białka PML w hipokampie oparty był na linii DIO-EF1 α -PML. Do doświadczeń przeznaczano samice z linii PML^I oraz PML^{II} w wieku 6–8 tygodni. Przeprowadzono operacje stereotaktyczne, w trakcie których wektor wirusowy rAAV-CaMKII α -Cre dostarczano do hipokampa. W celu skutecznego rozprowadzenia wektora wirusowego w całym hipokampie, podano po 250 nl wektora (miano wirusa – Tabela 9) do każdego z trzech miejsc określonych przez koordynaty podane w Tabeli 20. Dla każdego wektora wirusowego koordynaty wybierane były indywidualnie i wynikały z wcześniejszych optymalizacji.

Tabela 20. Koordynaty stosowane w trakcie operacji stereotaktycznych w celu zainfekowania wektorem wirusowym rAAV-CaMKII α -Cre hipokampa samic z linii DIO-EF1 α -PML.

AP	L	H
-2.0	+/- 1.4	-1.5
-2.8	+/- 2.7	-1.6
-2.8	+/- 2.7	-3.7

Operacje stereotaktyczne przeprowadzono na liczących od 4 do 8 samic czterech grupach, spośród których dwie pochodziły od założyciela PML^I (grupa doświadczalna, grupa kontrolna) oraz dwie od założyciela PML^{II} (grupa doświadczalna, grupa kontrolna). Grupy kontrolne stanowiły myszy transgeniczne linii DIO-EF1 α -PML, którym wstrzyknięto do mózgu roztwór NaCl. Po 4 tygodniach od operacji samice poddawano procedurze perfuzji, izolowano mózgi oraz za pomocą kriostatu cięto na skrawki. W celu analizy poziomu ekspresji białka PML przeprowadzono barwienie immunohistochemiczne z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko białku PML. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń otrzymano cytoplazmatyczną lokalizację białka PML (Rycina 15).



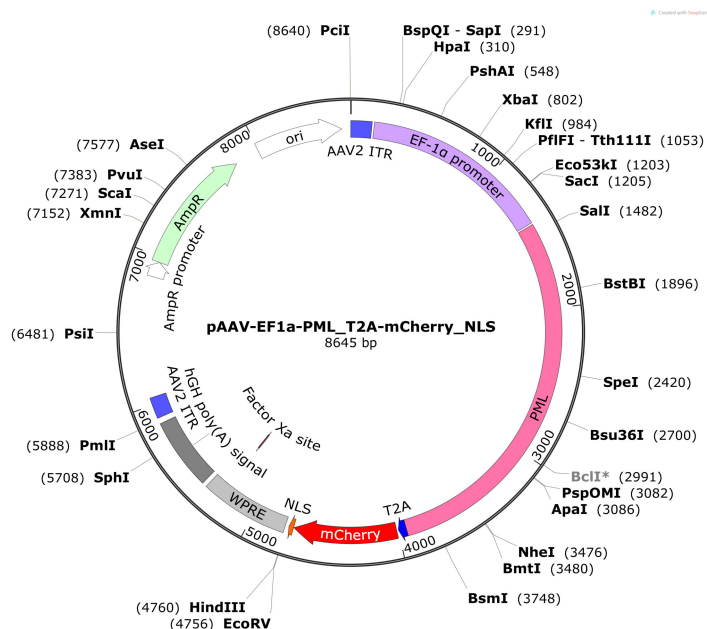
Rycina 15. Cytoplazmatyczny podwyższony poziom białka PML w hipokampie samic linii transgenicznej DIO-EF1 α -PML 4 tygodnie po domózgowej iniekcji wektora wirusowego rAAV-CaMKII α -Cre. Lewy panel przedstawia zdjęcie mikroskopowe zakrętu zębatego hipokampa uzyskane od samicy linii DIO-EF1 α -PML, której podano roztwór NaCl (grupa kontrolna). Panel prawy przedstawia zdjęcie mikroskopowe zakrętu zębatego hipokampa samicy linii DIO-EF1 α -PML, której podano wektor wirusowy rAAV-CaMKII α -Cre (grupa doświadczalna). Fluorescencję pochodzącą od białka PML oznaczono kolorem zielonym. DNA (barwnik Hoechst) oznaczono kolorem niebieskim.

Z uwagi na uzyskanie cytoplazmatycznej lokalizacji białka PML, która zważywszy na użycie jądrowej izoformy białka PML, była nieoczekiwana, a także ze względu na kierunek badań niniejszego doktoratu, którego celem było zbadanie między innymi zmian morfologicznych jądra komórkowego u zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML, podjęto decyzję o dalszych doświadczeniach prowadzących do uzyskania linii myszy z podwyższonym poziomem białka PML o jądrowej lokalizacji.

4.1.2.2 Podwyższony poziom i jądrowa lokalizacja białka PML u myszy szczepu dzikiego C57 BL/6J uzyskane poprzez iniekcję wektora wirusowego rAAV-EF1 α -PML-T2A-mCherryNLS do hipokampa

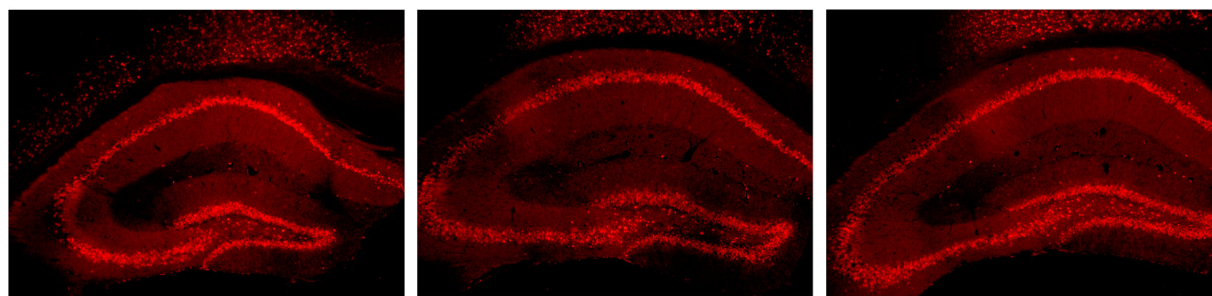
Drugi model lokalnej indukcji podwyższonego poziomu białka PML w hipokampie oparty był na pracy z linią myszy typu dzikiego C57 BL/6J. Do tego celu wykorzystano nowo zaprojektowany wektor plazmidowy zawierający sekwencję PML, T2A oraz mCherryNLS. Sekwencja dla białka T2A jako jedna z czterech należy do rodziny peptydów 2A. Obecność sekwencji T2A umieszczonej pomiędzy sekwencją dla białka PML a sekwencją dla znacznika białkowego mCherryNLS umożliwiła powstanie dwóch niezależnych białek, a nie białka

fuzyjnego. Zarówno sekwencja dla białka PML jak i znacznika białkowego mCherryNLS znajdowały się pod promotorem EF1 α . Wektor plazmidowy zawierał również sekwencje ITR. Klonowanie zaprojektowanego plazmidu wykonała firma świadcząca usługi w zakresie inżynierii genetycznej A&A Biotechnology. Poniżej przedstawiono schematyczną mapę otrzymanego wektora plazmidowego (Rycina 16).



Rycina 16. Mapa wektora plazmidowego pAAV-EF1 α -PML-T2A-mCherryNLS. Zaznaczone kolorami fragmenty: promotor EF1 α (kolor liliowy), sekwencja kodująca transgen – PML (kolor różowy), sekwencja genu reporterowego – mCherry (kolor czerwony), sekwencja NLS (kolor granatowy), sekwencje ITR (kolor indygo) oraz sekwencja WPRE (kolor biały).

Po otrzymaniu plazmidu pAAV-EF1 α -PML-T2A-mCherryNLS przystąpiono do produkcji wektora wirusowego rAAV. Przed rozpoczęciem docelowych doświadczeń mających na celu analizę zmian behawioralnych oraz zmian morfologii jądra komórkowego przeprowadzono doświadczenia pilotażowe umożliwiające potwierdzenie prawidłowego działania uzyskanego wektora wirusowego. Ponadto, celem tych doświadczeń był wybór koordynatów, stężenia, a także objętości podawanego wektora wirusowego, które umożliwiają jego prawidłowe i efektywne rozejście się w całej strukturze hipokampa. Analogiczne doświadczenia przeprowadzono przy użyciu kontrolnego wektora wirusowego pAAV-EF1 α -mCherryNLS, również wykonanego przez firmę A&A Biotechnology. Poniżej przedstawiono zdjęcia skrawków z doświadczeń pilotażowych (Rycina 17) oraz optymalne koordynaty (Tabela 21). Ze względu na obecność białka fluorescencyjnego wstępna analiza skrawków nie wymagała barwienia immunohistochemicznego.

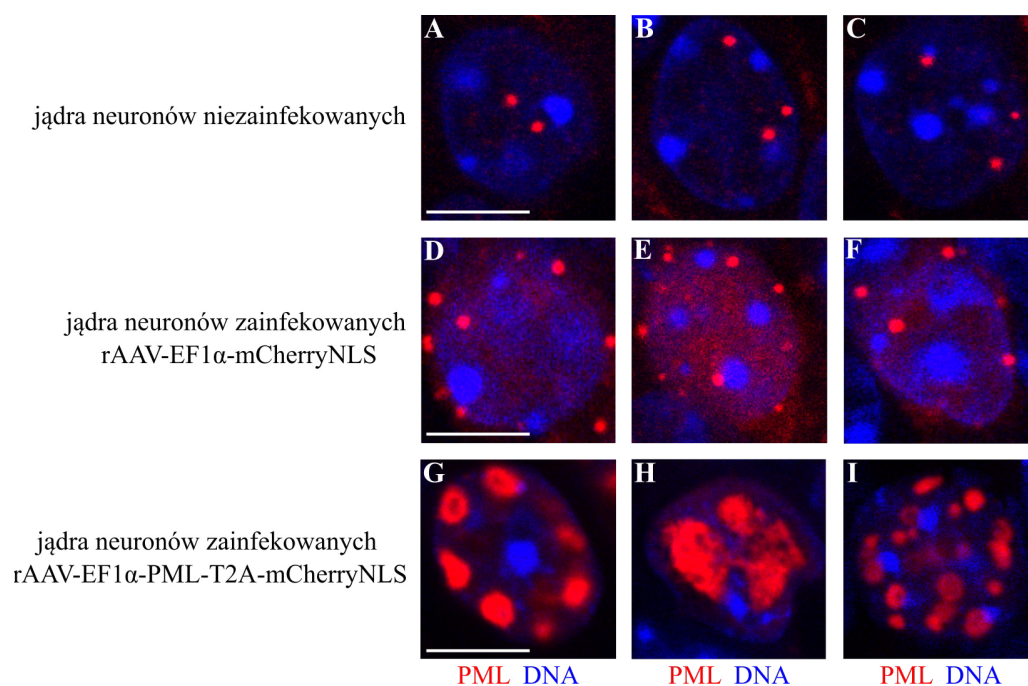


Rycina 17. Zdjęcia mikroskopowe hipokampa (trzy przekroje) obrazujące rozchodzenie się wirusa rAAV-EF1 α -PML-T2A-mCherryNLS w strukturze hipokampa. Fluorescencja pochodząca od znacznika białkowego mCherryNLS.

Tabela 21. Koordynaty stosowane w trakcie operacji stereotaktycznych w celu zainfekowania wektorem wirusowym rAAV-EF1 α -PML-T2A-mCherryNLS hipokampa myszy C57 BL/6J.

AP	L	H
-1.46	+/- 0.56	-1.9
-1.46	+/- 0.56	-1.55
-2.06	+/- 2.25	-1.58
-2.80	+/- 2.7	-1.6

Aby wstępnie przyjrzeć się zmianom morfologii jądra komórkowego, przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko białku PML. Wybarwione skrawki przeanalizowano przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Wyniki obrazowania wykazały wpływ podwyższonego poziomu białka PML, który prowadzi do powstania większej liczby niezależnych, bardziej regularnych oraz znacznie większych ciałek jądrowych PML (zdjęcia G i I, Rycina 18) lub do powstania jednego, bardzo dużego ciała PML powstałego z połączenia się mniejszych ciałek jądrowych PML i obejmującego całą przestrzeń pozachromatynową w jądrze komórkowym (zdjęcie H, Rycina 18). Prócz kontrolnych jąder komórkowych, zainfekowanych wektorem wirusowym rAAV-EF1 α -mCherryNLS (zdjęcia D–F, Rycina), przedstawiono również jądra komórkowe neuronów hipokampa, które nie zostały zainfekowane żadnym z wektorów wirusowych (zdjęcia A–C, Rycina 18).



Rycina 18. Zdjęcie mikroskopowe obrazujące różnicę wielkości ciałek jądrowych PML. W pierwszym rzędzie widoczne zdjęcia przedstawiające jądra neuronów niezainfekowanych, w drugim rzędzie widoczne są jądra neuronów zainfekowanych kontrolnym wektorem wirusowym rAAV-EF1 α -mCherryNLS, a w trzecim rzędzie widoczne są jądra neuronów zainfekowane doświadczalnym wektorem wirusowym rAAV-EF1 α -PML-T2A-mCherryNLS. Fluorescencja pochodząca od białka PML – czerwony, DNA (barwnik Hoechst) – niebieski. Znacznik skali to 5 μ m

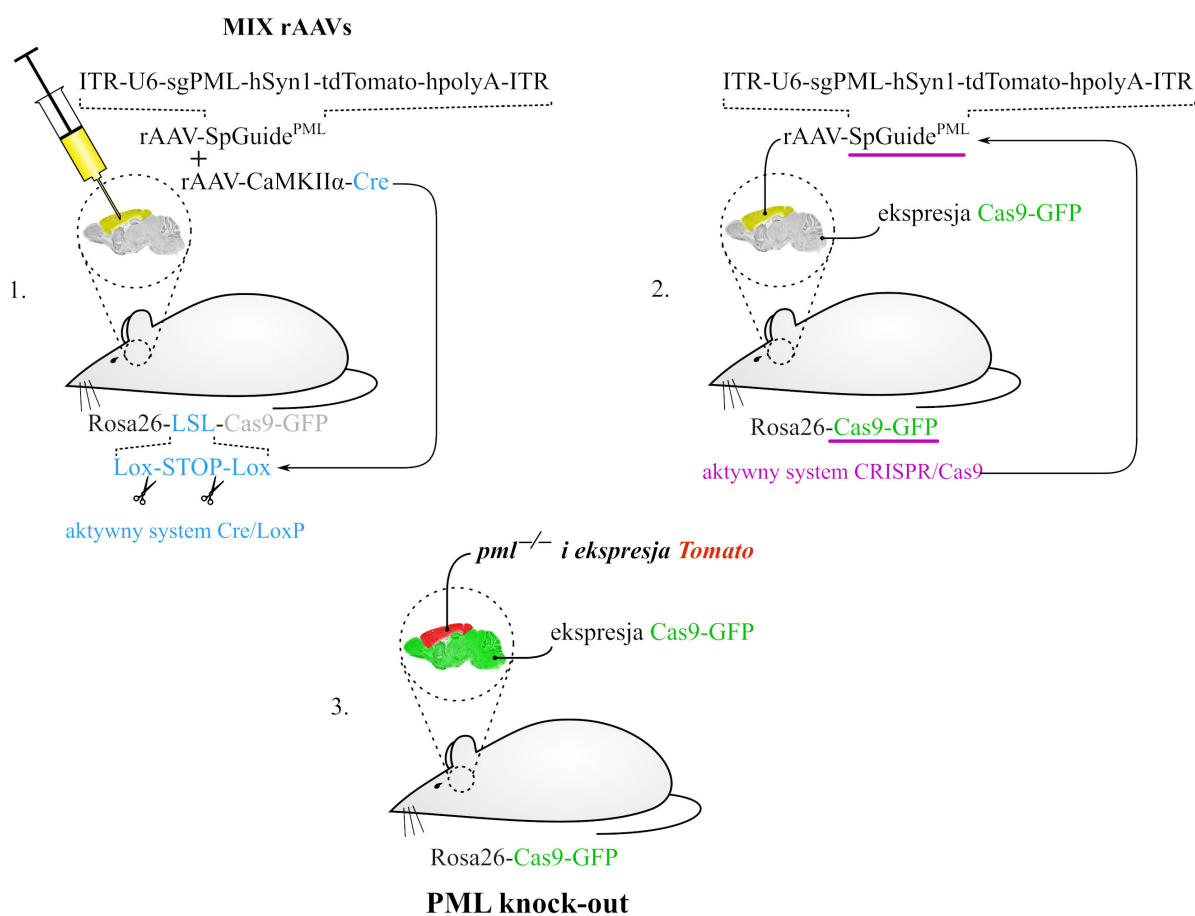
Powyższe wyniki doświadczeń pilotażowych potwierdziły funkcjonalność uzyskanego modelu myszy z lokalnie podwyższonym poziomem białka PML w hipokampie. Pozwoliło to na kontynuację badań z wykorzystaniem wyżej opisanego modelu zwierzęcego w celu analizy zmian behawioralnych oraz zmian molekularnych jądra komórkowego (opisanych w dalszej części rozprawy). Dla uproszczenia w dalszej części opisu wyników grupę doświadczalną **rAAV-EF1 α -PML-T2A-mCherryNLS** nazwano **PML-OE** (od ang. *overexpression*), a grupę kontrolną **rAAV-EF1 α -mCherryNLS** nazwano **CTRL-OE** (od ang. *control*).

4.2 Wytworzenie modelu myszy z delecją białka PML

Drugi z modeli zwierzęcych wykorzystany w niniejszej pracy pozwolił na scharakteryzowanie efektu delecji („knock-out”) białka PML w hipokampie dorosłych myszy. Dotychczas badania opisane w literaturze dotyczące efektu usunięcia białka PML w mózgu przeprowadzono na modelu myszy z jego konstytutywnym brakiem. W przedstawionej pracy uzyskano model myszy z indukowaną, neurospecyficzną delecją genu PML w hipokampie dorosłych zwierząt. Indukcja mutacji dawała możliwość aktywacji wprowadzanych zmian

w kontrolowanych warunkach, poprzez wybór momentu dostarczenia wektora wirusowego do mózgu. W tym celu wykorzystano system CRISPR/Cas9 zawierający Cre-zależną ekspresję endonukleazy Cas9 (wstęp – podsekcje 1.7.1 i 1.7.2).

Doświadczenia prowadzono na myszach linii transgenicznej Rosa26-Lox-STOP-Lox-Cas9-GFP (The Jackson Laboratory) (Platt i in., 2014). Myszom z grupy doświadczalnej w trakcie operacji stereotaktycznych podawano w formie iniekcji domózgowej mieszankę wirusów: rAAV-SpGuide^{PML1}, rAAV-SpGuide^{PML2} oraz rAAV-CaMKII α -Cre. Myszy z grupy kontrolnej otrzymywały mieszankę wirusów: rAAV-SpGuide^{SCR} i rAAV-CaMKII α -Cre. Szczegółowy schemat aktywacji systemu CRISPR/Cas9 przedstawiono na Rycinie 19.

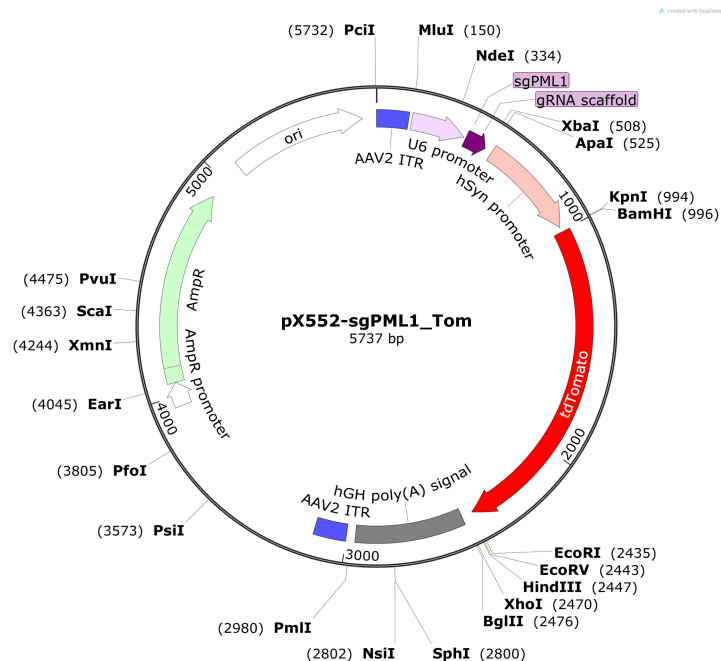


Rycina 19. Schemat działania modelu myszy z delecją białka PML w hipokampie. (1) Mikroiniekcja mieszanki trzech wektorów wirusowych AAV: rAAV-SpGuide^{PML1}, rAAV-SpGuide^{PML2} oraz rAAV-CaMKII α -Cre do hipokampa (kontrola rAAV-SpGuide^{SCR} i rAAV-CaMKII α -Cre). W aktywowanym systemie Cre-loxP rekombinaza Cre rozpoznaje sekwencje loxP flankujące kasetę STOP i ją wycina. Dzięki użyciu promotora CaMKII α ekspresja Cre zachodzi wyłącznie w neuronach. (2) Delecja kasety STOP pozwala na ekspresję endonukleazy Cas9 w fuzji ze znacznikiem białkowym GFP. Obecność Cas9 oraz gRNA dla PML (eksymowanych z sekwencji wprowadzonych do wektora AAV) umożliwia działanie systemu CRISPR/Cas9. (3) Działający system CRISPR/Cas9 dokonuje ablacji genu PML w neuronach hipokampa.

W kolejnych sekcjach opisano etapy otrzymania wektorów plazmidowych, a następnie wektorów wirusowych zawierających sekwencję gRNA dla genu PML oraz sekwencję kontrolną SCR (ang. *scrambled*) wykorzystanych do weryfikacji działania systemu CRISPR/Cas9 *in vitro* oraz do przeprowadzenia operacji stereotaktycznych prowadzących do uzyskania myszy z delecją PML.

4.2.1 Otrzymanie wektorów plazmidowych zawierających sekwencję gRNA dla genu PML w systemie CRISPR/Cas9

Początkowym etapem prowadzącym do wytworzenia myszy z delecją PML było zaprojektowanie i otrzymanie wektorów plazmidowych zawierających około 20-nukleotydową sekwencję „doprowadzającą”, czyli gRNA, dla dwóch pierwszych egzonów genu *Pml*. Decyzja ta podyktowana była faktem, że zarówno egzon I, jak i II obecne są we wszystkich izoformach białka PML, a także znajdują się na jego początku, co zwiększa prawdopodobieństwo upośledzenia procesu translacji na jego wczesnych etapach, a tym samym uniemożliwia prawidłowe powstanie białka PML. Każda z sekwencji kodujących gRNA dla PML została niezależnie wprowadzona do wektora plazmidowego pX552-sgRNA-Tom (pX552-U6-sgRNA-hSyn1-tdTomato, otrzymanego w ramach współpracy z dr. Andriem Domanskyi'm z Uniwersytetu Helsińskiego). Wektor ten zawiera promotor U6 umożliwiający ekspresję gRNA, sekwencję dla białka fluorescencyjnego tdTomato (ang. *tandem dimer Tomato*), które umożliwia identyfikację zainfekowanych komórek, a także sekwencje ITR. Neurospecyficzność tdTomato została zapewniona dzięki obecności promotora genu synapsyny-1 (*hSyn1*). Specyficzne dla PML sekwencje gRNA zostały zaprojektowane w oparciu o protokół grupy Zhanga (MIT, Boston USA). Na Rycinie 20 przedstawiono mapę wektora plazmidowego dla sgPML1 (sgPML2 różni się od niego jedynie 20-nukleotydową sekwencją „doprowadzającą” gRNA). Sekwencję SCR służącą jako kontrola doświadczeń wprowadzono do takiego samego wektora plazmidowego pX552-sgRNA-Tom.



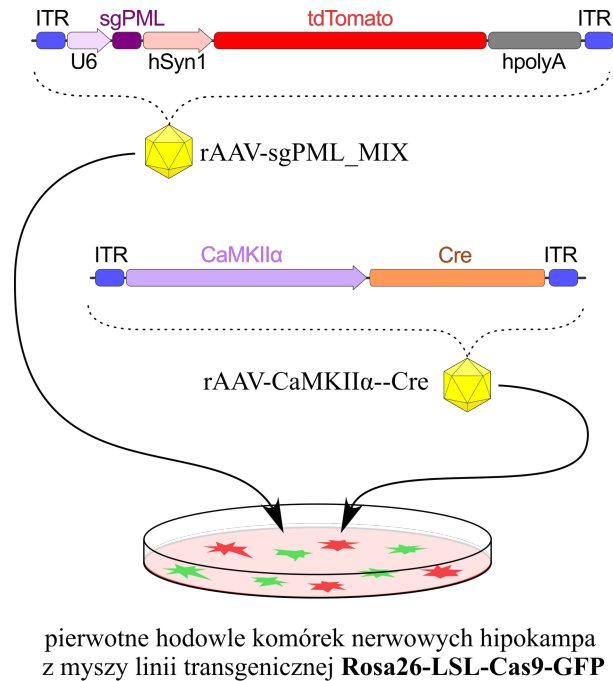
Rycina 20. Mapa wektora plazmidowego pX552-sgPML1-TOM. Zaznaczone kolorami fragmenty: promotor U6 (kolor jasnoróżowy), sekwencja kodująca gRNA dla PML (kolor fioletowy), promotor hSyn (kolor lososiowy), sekwencja genu reporterowego – tdTomato (kolor czerwony), sekwencje ITR (kolor indygo).

4.2.2 Weryfikacja działania systemu CRISPR/Cas9 *in vitro*

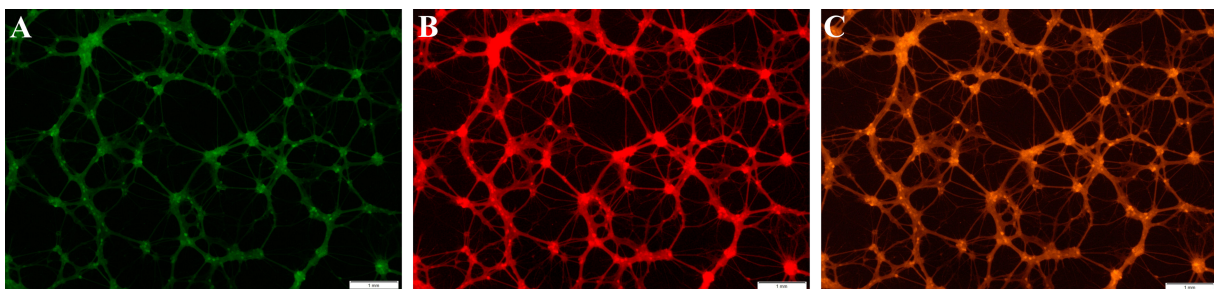
Kolejnym etapem była weryfikacja działania systemu CRISPR/Cas9 *in vitro*. W tym celu wykorzystano reakcję łańcuchową polimerazy z odwrotną transkrypcją – RT-PCR w połączeniu z ilościową reakcją łańcuchową polimerazy – qPCR. Materiałem, który posłużył do przeprowadzenia reakcji RT-qPCR, było całkowite RNA wyizolowane z pierwotnych hodowli komórek nerwowych hipokampa otrzymanych z osesków myszy linii transgenicznej Rosa26-Lox-STOP-Lox-Cas9-GFP, a wynikiem był względny poziom mRNA dla białka PML.

W celu otrzymania wektorów wirusowych rAAV (rAAV-X552-sgPML1-Tom i rAAV-X552-sgPML2-Tom) namnożono dwa wektory plazmidowe zawierające sekwencje gRNA dla białka PML. Dodatkowo do badań *in vitro* wykorzystano wcześniej uzyskany wektor wirusowy rAAV-CaMKII α -Cre. Mieszaniną wektorów wirusowych rAAV-X552-sgPML1-Tom, rAAV-X552-sgPML2-Tom w połączeniu z rAAV-CaMKII α -Cre infekowano pierwotne hodowle komórek nerwowych hipokampa uzyskane z osesków linii transgenicznej Rosa26-Lox-STOP-Lox-Cas9-GFP. Jako kontrolę wykorzystano wektor wirusowy rAAV-X552-sgSCR-Tom, w połączeniu z rAAV-CaMKII α -Cre. Obecność rekombinazy Cre z wektora wirusowego rAAV-CaMKII α -Cre uruchamiała ekspresję endonukleazy Cas9 w fuzji z białkiem reporterowym GFP. Aktywna endonukleaza Cas9 doprowadzała do usunięcia genu

PML. Schemat przebiegu doświadczeń przedstawiono na Rycinie 21, a jego wynik po analizie mikroskopowej przedstawiono na Rycinie 22. Po przeprowadzeniu analizy mikroskopowej potwierdzającej, że komórki zostały skutecznie zainfekowane, z neuronów hipokampalnych 7 dni po infekcji wyizolowano RNA.

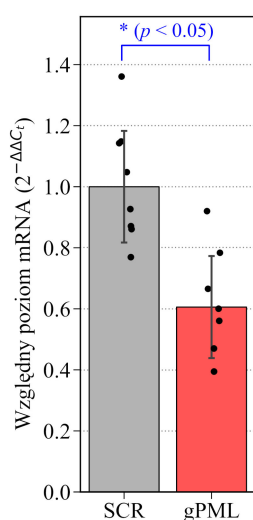


Rycina 21. Schemat doświadczenia umożliwiające weryfikację działania systemu CRISPR/Cas9 *in vitro*. Użyto pierwotnych hodowli komórek nerwowych hipokampa otrzymanych z mysich oseków linii transgenicznej ROSA26-LSL-Cas9-GFP. Hodowlę zainfekowano mieszanką wektorów wirusowych AAV: rAAV-CaMKIIα-Cre (zielona fluorescencja, GFP – ekspresja endonukleazy Cas9) i rAAV-X552-sgPML-Tom (czerwona fluorescencja, dtTomato – potwierdzenie dostarczenia sgPML).



Rycina 22. Sprawdzenie zdolności infekcyjnej wektorów wirusowych AAV. Zdjęcie mikroskopowe z hodowli neuronów hipokampalnych otrzymanych z myszy linii Rosa26-LSL-Cas9-GFP zainfekowanych mieszanką wektorów wirusowych rAAV-X552-sgPML2-Tom i rAAV-CaMKIIα-Cre. Zdjęcia przedstawiają ekspresję: (A) endonukleazy Cas9 – zielona fluorescencja, (B) barwnika tdTomato wynikającą z dostarczenia sgPML – czerwona fluorescencja, (C) Współwystępowanie Cas9 i tdTomato – kolor pomarańczowy.

Kolejno przeprowadzano reakcję RT-PCR, służącą w pierwszym etapie przepisaniu informacji genetycznej z RNA, będącego matrycą reakcji, na cDNA (ang. *complementary DNA*). Uzyskane cDNA posłużył do wykonania ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy, qPCR, z wykorzystaniem sondy TaqMan dla genu PML. W odróżnieniu od klasycznej reakcji łańcuchowej polimerazy, dużą zaletą metody qPCR jest możliwość monitorowania ilości powstającego produktu w każdym cyklu reakcji. Istotnym etapem analizy qPCR było wyznaczenie progowej liczby cykli reakcji (ang. *threshold cycle*, Ct). Surowe wartości ekspresji genów otrzymane w wyniku analizy qPCR przedstawiono jako wartość Ct. Ct definiuje się jako liczbę cykli wymaganych do przekroczenia progu przez sygnał fluorescencyjny. W trakcie analizy wartość Ct próby badanej porównywano do wartości próby referencyjnej, zwanej kalibratorem. Z tego powodu w celu przeprowadzenia standaryzacji, oprócz genu badanego te same reakcje przeprowadzono na genie kontrolnym (referencyjnym), który ulega ekspresji na podobnym poziomie we wszystkich komórkach organizmu (zarówno w normalnych, jak i w patologicznych warunkach). Takimi cechami odznaczają się tzw. *housekeeping genes*, do których należy między innymi wykorzystany w poniższych doświadczeniach gen *Hprt* występujący we wszystkich komórkach somatycznych.



Rycina 23. Względny poziom mRNA genu PML otrzymany z pierwotnych hodowli komórek nerwowych hipokampa. Na wykresie przedstawiono wyniki uzyskane po infekcji neuronów hipokampalnych mieszkanką wektorów wirusowych. SCR: rAAV-X552-sgSCR-Tom + rAAV-CaMKII α -Cre (kolor jasnoszary), oraz gPML: rAAV-X552-sgPML1+2-Tom + rAAV-CaMKII α -Cre (kolor czerwony), $n = 7$.

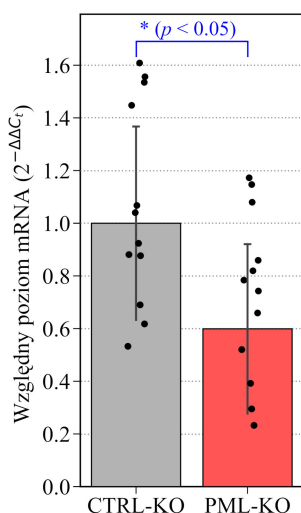
Warunki i parametry przeprowadzonej reakcji RT-qPCR opisano w podsekcjach 3.8.3 i 3.8.4. Na Rycinie 23 przedstawiono w formie wykresu słupkowego wynik opisanego doświadczenia. Uzyskane wyniki potwierdziły funkcjonalność systemu CRISPR/Cas9 *in vitro*. Spadek względnego poziomu mRNA dla genu PML usuniętego przy użyciu wektorów wirusowych zawierających sekwencję gRNA dla I i II egzonu białka PML wyniósł około 40% w stosunku do grupy kontrolnej SCR.

W dalszej części opisu wyników grupę doświadczalną, której podano mieszankę wirusów **rAAV-X552-sgPML1-Tom**, **rAAV-X552-sgPML2-Tom** i **rAAV-CaMKII α -Cre**, dla uproszczenia nazwano **PML-KO**, a grupę kontrolną, której podano mieszankę wirusów **rAAV-X552-sgSCR-Tom** i **rAAV-CaMKII α -Cre**, nazwano **CTRL-KO**.

4.2.3 Weryfikacja działania systemu CRISPR/Cas9 *in vivo*

Weryfikację działania systemu CRISPR/Cas9 *in vivo* rozpoczęto od przeprowadzenia wstępnych operacji stereotaktycznych na czterech osobnikach linii Rosa26-LSL-Cas9-GFP. W trakcie operacji potwierdzono wybór koordynatów (Tabela 21) najskuteczniej rozprowadzających zawiesinę wirusową po całym hipokampie, oraz stężenie wektorów wirusowych (Tabela 9). Ograniczenie do minimum wstępnych doświadczeń podyktowane było chęcią oszczędnego wykorzystywania osobników transgenicznych, które dzięki temu można było wykorzystać do doświadczeń docelowych.

Następnie w celu analizy względnego poziomu ekspresji mRNA z ekstraktów uzyskanych z mysich hipokampów, przeprowadzono operacje stereotaktyczne. Operacje wykonano na grupie myszy PML-KO ($n = 13$) oraz grupie myszy CTRL-KO ($n = 12$). Dostarczoną ilość i rozcieńczenia wektorów wirusowych podano w Tabeli 9. Po około 2 tygodniach od zakończenia operacji, bezpośrednio po uśmierceniu zwierząt, w celu przygotowania ekstraktów RNA z mózgów myszy izolowano hipokampy (opisano w podsekcji 3.8.2). Uzyskany RNA posłużył jako materiał do przeprowadzenia reakcji RT-qPCR (opisano w podsekcjach 3.8.3 i 3.8.4), której wyniki w formie wykresu słupkowego przedstawiono na Rycinie 24. Uzyskane wyniki wskazują, że w otrzymanym modelu zwierzęcym uzyskano istotną redukcję ekspresji PML.



Rycina 24. Względny poziom mRNA genu PML.

Na wykresie przedstawiono wyniki uzyskane z RNA wyizolowanego z hipokampa myszy po operacjach stereotaktycznych. Na wykresie widoczny jest względny poziom mRNA dla grupy kontrolnej CTRL-KO ($n = 12$) oznaczonej kolorem szarym oraz grupy doświadczalnej PML-KO ($n = 13$) oznaczonej kolorem czerwonym. Analizę statystyczną wykonano testem t-Studenta, w którym $p = 0.015$ (*).

4.3 Analiza zmian behawioralnych myszy z podwyższonym poziomem oraz delecją białka PML w testach prowadzonych w klatkach IntelliCage

W celu scharakteryzowania skutków wprowadzonych modyfikacji genetycznych, powodujących podwyższenie bądź obniżenie poziomu białka PML w hipokampie dorosłych myszy, zwierzęta poddano testom behawioralnym w klatkach IntelliCage. System IntelliCage umożliwił ocenę myszy pod kątem ich zdolności do uczenia się, zapamiętywania, a także ich ogólnej aktywności w czasie trwania testów. Szczegółowy opis systemu klatek IntelliCage przedstawiono w rozdziale Materiały i metody – podsekcja 3.5.

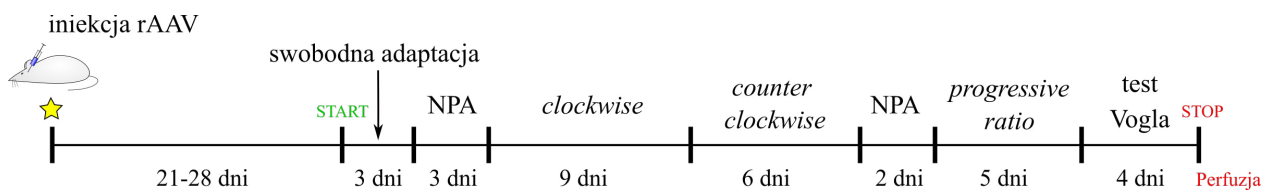
Zanim przystąpiono do przeprowadzenia testów behawioralnych, myszy poddano operacjom stereotaktycznym w celu wprowadzenia opisanych powyżej modyfikacji genetycznych. W przypadku obu modeli doświadczalnych wykorzystano około 4-miesięczne samice. W doświadczeniach mających na celu wywołanie podwyższonego poziomu białka PML w hipokampie, wykorzystano linię myszy typu dzikiego C57BL/6J. Operacje stereotaktyczne przeprowadzono na dwóch grupach zwierząt: doświadczalnej PML-OE ($n = 15$) i kontrolnej CTRL-OE ($n = 15$). W doświadczeniach prowadzących do usunięcia białka PML w hipokampie wykorzystano linię myszy Rosa26-Lox-STOP-Lox-Cas9-GFP. Operacje stereotaktyczne przeprowadzono na dwóch grupach zwierząt: doświadczalnej PML-KO ($n = 9$) i kontrolnej CTRL-KO ($n = 8$). Miano, ilość oraz rozcieńczenia podanych wektorów wirusowych dla obu schematów doświadczalnych przedstawiono w Tabeli 9.

Po zakończeniu operacji stereotaktycznych zwierzęta przebywały w osobnych klatkach przez 5 dni, co umożliwiała zagojenie się ran pooperacyjnych i rekonwalescencję. Następnie w celu adaptacji myszy połączono w grupy docelowe, a także przenoszono do pomieszczeń, gdzie przeprowadzano wszystkie testy behawioralne. Ze względu na to, że zmiany ekspresji genów są efektywne po 2–4 tygodniach od dostarczenia wektorów wirusowych AAV do hipokampa, testy behawioralne rozpoczęto po 3–4 tygodniach od przeprowadzenia operacji.

Zwierzęta umieszczono w klatkach IntelliCage. W doświadczeniu z modelem myszy z podwyższonym poziomem białka PML w jednej klatce przebywało 15 osobników z grupy doświadczalnej PML-OE, a w drugiej klatce 15 osobników z grupy kontrolnej CTRL-OE. W doświadczeniu z modelem myszy z delecją białka PML w jednej klatce przebywało 9 osobników z grupy doświadczalnej PML-KO, a w drugiej klatce 8 osobników z grupy kontrolnej CTRL-KO. Co istotne, w obu modelach badawczych, doświadczenia na grupie kontrolnej oraz doświadczalnej prowadzone były jednocześnie. Dzięki temu możliwe było

uzyskanie maksymalnie zbliżonych warunków doświadczalnych. Ponadto w obu modelach badawczych doświadczenia rozpoczynały się o tej samej porze (dnia i roku), były wykonywane analogicznie, w tym samym pomieszczeniu i przez tego samego eksperymentatora.

Testy rozpoczynano uruchomieniem 3-dniowej swobodnej adaptacji (ang. *free adaptation*), podczas której myszy miały nieograniczony dostęp do wszystkich rogów klatki oraz do wszystkich butelek z wodą w klatce. Następnie na 3 dni uruchomiono program mający na celu uczenie się zwierząt do picia wody poprzedzonego puknięciem nosa w poidło (ang. *nosepoke adaptation*, NPA). Po łącznie 6 dniach adaptacji do warunków panujących w klatce rozpoczynano testy uczenia. Pierwszym przeprowadzanym testem był test *clockwise*, a kolejnym test *counter-clockwise*. Następnie w klatkach przywracano wyjściowe ustawienia włączając na 3 dni program NPA, w trakcie którego zrobiono 30-minutową przerwę potrzebną na wymianę ściółki i podanie zwierzętom świeżej wody. Kolejnymi testami był test uczenia się progresywnego (ang. *progressive ratio*) oraz test Vogla (Rycina 25).



Rycina 25. Oś czasu doświadczeń behawioralnych. Począwszy od lewej strony, na osi widoczny jest punkt (oznaczony gwiazdka), w trakcie którego odbyły się operacje stereotaktyczne. Czas rekonwalescencji i adaptacji wynosił 21–28 dni. Następnie w klatkach IntelliCage przeprowadzono swobodną adaptację, adaptację z wykonywaniem puknięć nosem w poidło z wodą oraz testy uczenia: *clockwise*, *counter-clockwise*, *progressive ratio* oraz test Vogla.

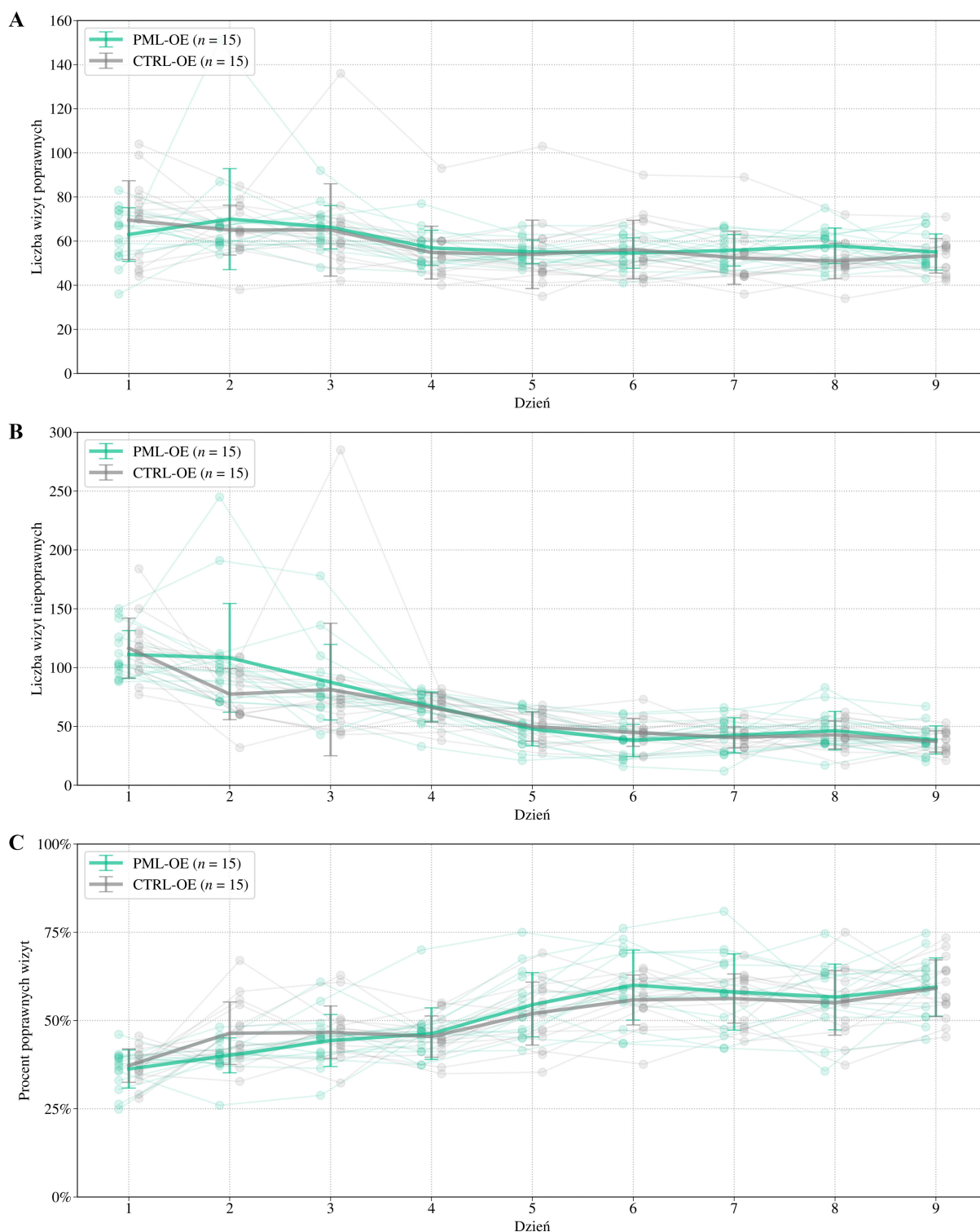
4.3.1 Testy *clockwise* i *counter-clockwise*

Umiejętność zwierząt do uczenia się i zapamiętania poprawnej kolejności patrolowania rogów (w celu napicia się wody) w kierunku zgodnym z kierunkiem ruchu wskazówek zegara oraz przeciwnie do tego kierunku sprawdzano stosując odpowiednio 9-dniowy test *clockwise* oraz 6-dniowy test *counter-clockwise*. Uzyskane wyniki przedstawiono jako: liczbę wizyt poprawnych, liczbę wizyt niepoprawnych oraz średni procent prawidłowych (tj. wykonywanych zgodnie z kierunkiem ruchu wskazówek zegara lub przeciwnie do tego kierunku) wizyt zakończonych napiciem się wody dla każdej grupy. Podczas wszystkich

przeprowadzonych testów sprawdzono również aktywność, którą w przypadku wyżej opisanych testów przedstawiano jako liczbę wszystkich puknięć nosem.

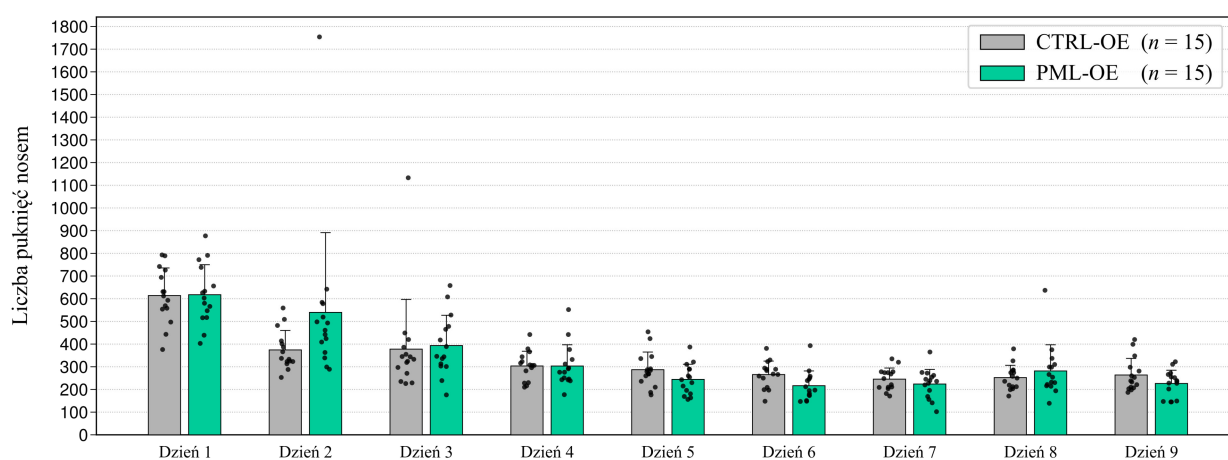
Test *clockwise* (wykres C, Rycina 26) dla myszy z podwyższonym poziomem białka PML w hipokampie wykazał, że zwierzęta z grupy doświadczalnej PML-OE wykonywały zbliżony średni procent poprawnych wizyt w porównaniu do myszy z grupy kontrolnej CTRL-OE, u których białko PML było na poziomie endogennym. W dniach od 1. do 5. średni procent poprawnych wizyt wzrósł od 35% do ponad 50% dla obu grup. W kolejnych dniach zwierzęta z obu grup w sposób prawidłowy uczyły się wyznaczonego im zadania, w związku z czym w dniach od 4. do 9. średni procent poprawnych wizyt wzrósł do ponad 60%. Dla obu grup wzrost procenta poprawnych wizyt między pierwszym a ostatnim dniem eksperymentu był statystycznie istotny ($p < 10^{-3}$ w jednostronnym teście t-Studenta).

Uzyskane wyniki wskazują na brak zaburzeń poznawczych oraz deficytów w procesie formowania różnego rodzaju pamięci w tym przestrzennej i proceduralnej u zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML w hipokampie. Oznacza to, że zwierzęta w sposób prawidłowym nauczyły się wyznaczonego im zadania. Potwierdzenie tego widoczne jest również na wykresach A i B (Rycina 26), na których liczba poprawnych wizyt (wykres A) przez cały czas trwania testu utrzymywała się na jednakowym poziomie (średnio 55–65 wizyt), podczas gdy liczba niepoprawnych wizyt (wykres B) malała, od ponad średnio 110 do średnio poniżej 40 wizyt dziennie, co wyznacza **krzywą uczenia się** zwierząt.



Rycina 26. Wykresy przedstawiające wyniki testu *clockwise* dla myszy z podwyższonym poziomem białka PML. Myszy z grupy doświadczalnej PML-OE ($n = 15$) oznaczono kolorem zielonym, a myszy z grupy kontrolnej CTRL-OE ($n = 15$) oznaczono kolorem szarym. (A) Wykres przedstawia liczbę wizyt **poprawnych** w każdej grupie. (B) Wykres przedstawia liczbę wizyt **niepoprawnych** w każdej grupie (C) Wykres przedstawia **średni procent** poprawnych wizyt w każdej grupie. Dla każdego z wykresów średnią grupy przedstawiono jako pogrubioną linię; średnie poszczególnych osobników przedstawiono jako cienkie linie łączące punkty. Słupek błędów dla wszystkich wykresów – odchylenie standardowe. Analiza wariancji z powtarzаныmi pomiarami nie wykazała różnic istotnych statystycznie między grupami.

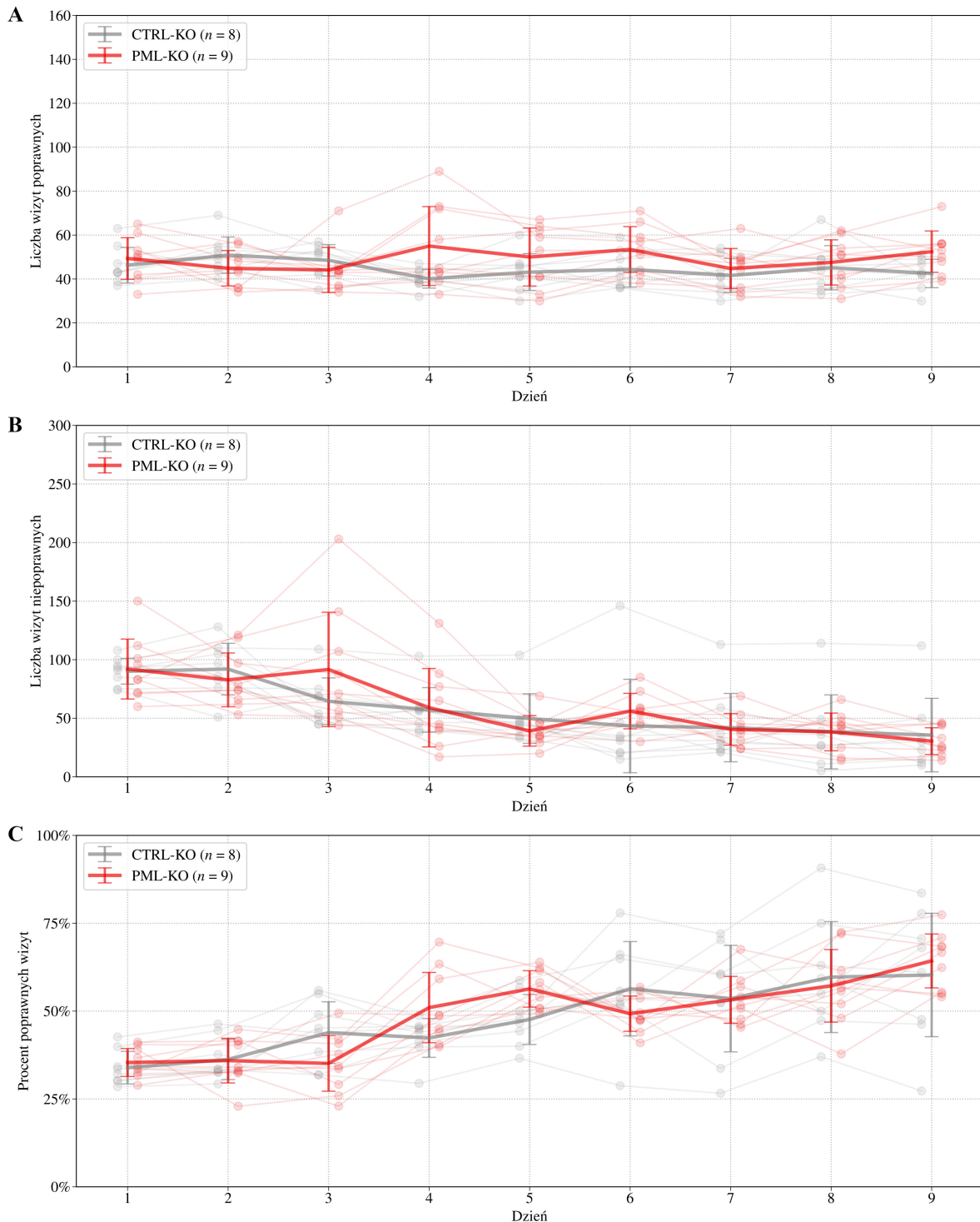
Aktywność myszy została oceniona liczbą wszystkich puknięć nosem w poidło wykonanych w każdej dobie testu. Początkowo, zarówno w grupie doświadczalnej PML-OE (1 i 2 doba), jak i kontrolnej CTRL-OE (1 doba) obserwowano wysoką liczbę puknięć nosem, która w kolejnych dniach malała (Rycina 27), co było związane ze wzrostem liczby poprawnych wizyt (Rycina 26). Wskazuje to na niezaburzoną aktywność zwierząt, które w pierwszych dniach testu eksplorują nowe warunki, a następnie w sposób naturalny aktywność spada z każdym kolejnym dniem testu. Aktywność w obu grupach wykazała podobną dynamikę utrzymującą się na poziomie średnio 600 puknięć nosem od 1. dnia testu do około 300 w 9. dniu testu. Wynik w formie wykresu przedstawiono na Rycinie 27.



Rycina 27. Średnia dzienna liczba wszystkich puknięć nosem w teście *clockwise*. Myszy z grupy doświadczalnej PML-OE ($n = 15$) oznaczono kolorem niebieskim, a myszy z grupy kontrolnej CTRL-OE ($n = 15$) oznaczono kolorem szarym. Wyniki przedstawiono jako liczbę puknięć nosem w każdej grupie. Czarne, pojedyncze punkty odpowiadają poszczególnym osobnikom. Słupek błędów – odchylenie standardowe w grupie. Analiza wariancji z powtarzaniem pomiarów nie wykazała różnic istotnych statystycznie.

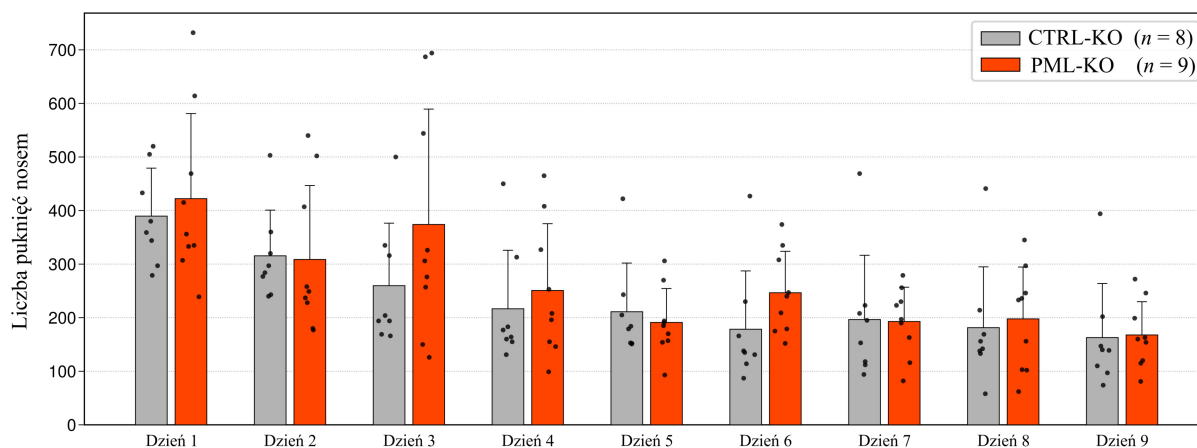
Test *clockwise* – wykres C (Rycina 28) – dla myszy z delecją białka PML w hipokampie pokazał, że zwierzęta z grupy doświadczalnej PML-KO wykazały zbliżony średni procent poprawnych wizyt w porównaniu do myszy z grupy kontrolnej CTRL-KO, u których białko PML było na poziomie endogennym. W dniach od 1. do 5. średni procent poprawnych wizyt wyniósł od 35–38% do 48–55% dla obu grup. W kolejnych dniach zwierzęta z obu grup w sposób prawidłowy uczyły się wyznaczonego im zadania; w dniach od 4. do 9. średni procent poprawnych wizyt wzrósł do ponad 60%. Dla obu grup wzrost procenta poprawnych wizyt między pierwszym a ostatnim dniem eksperymentu był statystycznie istotny ($p < 10^{-3}$ w jednostronnym teście t-Studenta).

Uzyskane wyniki wskazują na brak zaburzeń poznawczych oraz deficytów w procesie formowania różnego rodzaju pamięci w tym przestrzennej i proceduralnej u zwierząt z usuniętym białkiem PML w hipokampie. Podobnie jak w przypadku zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML oznacza to, że zwierzęta w sposób prawidłowym nauczyły się wyznaczonego im zadania. Potwierdzenie tego widoczne jest na wykresach A i B (Rycina 28), na których liczba poprawnych wizyt (wykres A) przez cały czas trwania testu utrzymywała się na jednakowym poziomie (średnio około 50 wizyt), podczas gdy liczba niepoprawnych wizyt (wykres B) malała, od średnio 90 do średnio poniżej 25 wizyt dziennie, co wyznacza **krzywą uczenia się** zwierząt.



Rycina 28. Wykresy przedstawiające wyniki testu *clockwise* dla myszy z delecją białka PML. Myszy z grupy doświadczalnej PML-KO ($n = 9$) oznaczono kolorem czerwonym, a myszy z grupy kontrolnej CTRL-KO ($n = 8$) oznaczono kolorem jasnoszarym. **(A)** Wykres przedstawia liczbę wizyt **poprawnych** w każdej grupie. **(B)** Wykres przedstawia liczbę wizyt **niepoprawnych** w każdej grupie **(C)** Wykres przedstawia **średni procent** poprawnych wizyt w każdej grupie. Dla każdego z wykresów średnią grupy przedstawiono jako pogrubioną linię; średnie poszczególnych osobników przedstawiono jako cienkie linie łączące punkty. Słupek błędów dla wszystkich wykresów – odchylenie standardowe. Analiza wariancji z powtarzającymi pomiarami nie wykazała różnic istotnych statystycznie między grupami.

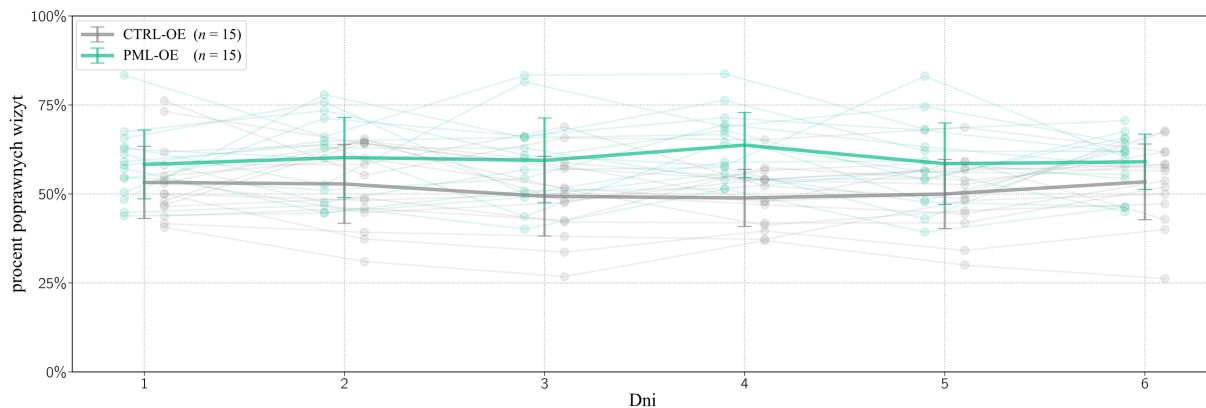
Podobnie jak w przypadku myszy z podwyższonym poziomem białka PML, w trakcie trwania testu sprawdzono aktywność myszy z delecją białka PML poprzez ocenę liczby wszystkich puknięć nosem w poidło wykonanych w każdej dobie testu. Zarówno w grupie doświadczalnej PML-KO, jak i kontrolnej CTRL-KO, nie zanotowano zaburzeń aktywności. W pierwszych trzech dobach zwierzęta wykonywały wykazała podobną dynamikę utrzymującą się na poziomie średnio ponad 400 puknięć nosem od 1. dnia testu do około 150 w 9. dniu testu. Wynik w formie wykresu przedstawiono na Rycinie 29.



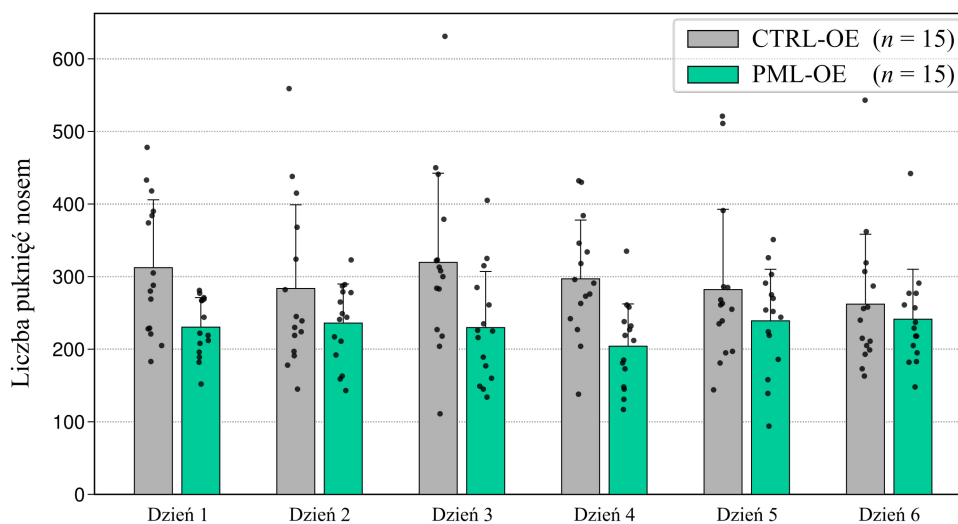
Rycina 29. Średnia dzienna liczba puknięć nosem w teście *clockwise*. Myszy z grupy doświadczalnej PML-KO ($n = 9$) oznaczono kolorem czerwonym, a myszy z grupy kontrolnej CTRL-KO ($n = 8$) oznaczono kolorem szarym. Wyniki przedstawiono jako liczbę puknięć nosem w każdej grupie. Czarne, pojedyncze punkty odpowiadają poszczególnym osobnikom. Słupek błędów – odchylenie standardowe w grupie. Analiza wariancji z powtarzającymi pomiarami nie wykazała różnic istotnych statystycznie.

Kolejnym przeprowadzonym testem był test *counter-clockwise*, który następował bezpośrednio po teście *clockwise*. Test trwający 6 dni miał na celu sprawdzenie zdolności zwierząt do oduczenia poruszania się zgodnie z kierunkiem ruchu wskazówek zegara i nauczenia poruszania się w kierunku przeciwnym. Wyniki przedstawiono jako średni procent poprawnych wizyt (tak jak w przypadku testu *clockwise* zakończonych napięciem się wody). Test *counter-clockwise* wykazał, że zwierzęta z podwyższonym poziomem białka PML z grupy doświadczalnej PML-OE utrzymywały podobny średni procent poprawnych wizyt w stosunku do myszy z grupy kontrolnej CTRL-OE (Rycina 30). Od 1. do 6. dnia testu poziom ten utrzymywał się w okolicach 50–52% dla grupy doświadczalnej i 55–57% dla grupy kontrolnej. Uzyskane wyniki nie wskazują na zaburzenia procesu „przeuczania się” u zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML. Jednocześnie oznacza to, że zwierzęta w trakcie trwania poprzedniego testu *clockwise* skutecznie i trwale nauczyły się reguły zmiany rogu po

każdym napiciu się. Znając tę regułę szybko zastosowały ją w teście *counter-clockwise*, dlatego już od pierwszej doby testu poziom poprawnych odpowiedzi wynosił ponad 50% dla obu grup. Niezaburzona pamięć proceduralna pozwoliła na bardzo szybkie dostosowanie pamięci przestrzennej do innego kierunku poruszania się narzuconego w tym teście.



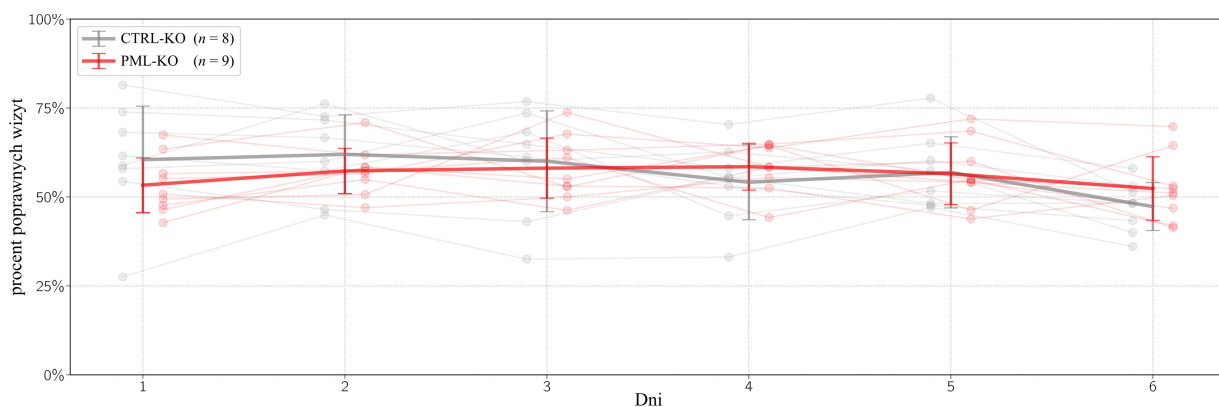
Rycina 30. Procent poprawnych wizyt w teście *counter-clockwise*. Myszy z grupy doświadczalnej PML-OE ($n = 15$) oznaczonej kolorem zielonym i grupy kontrolnej CTRL-OE ($n = 15$) oznaczonej kolorem jasnoszarym w trakcie trwania testu *counter-clockwise* (6 dni). Wyniki przedstawiono jako średni procent poprawnych wizyt w każdej grupie (pogrubiona linia; średnie poszczególnych osobników przedstawiono jako cienkie linie łączące punkty). Słupek błędów – odchylenie standardowe. Analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami nie wykazała różnic istotnych statystycznie.



Rycina 31. Średnia dzienna liczba puknięć nosem w teście *counter-clockwise*. Myszy z grupy doświadczalnej PML-OE ($n = 15$) oznaczone kolorem zielonym, a myszy z grupy kontrolnej CTRL-OE ($n = 15$) oznaczone kolorem szarym. Wyniki przedstawiono jako liczbę puknięć nosem w każdej grupie. Czarna, pojedyncze punkty odpowiadają poszczególnym osobnikom. Słupki błędów – odchylenie standardowe w grupie. Jednoczynnikowa analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami wykazała istotne statystycznie różnice aktywności między grupami, $p = 0.015$ (*).

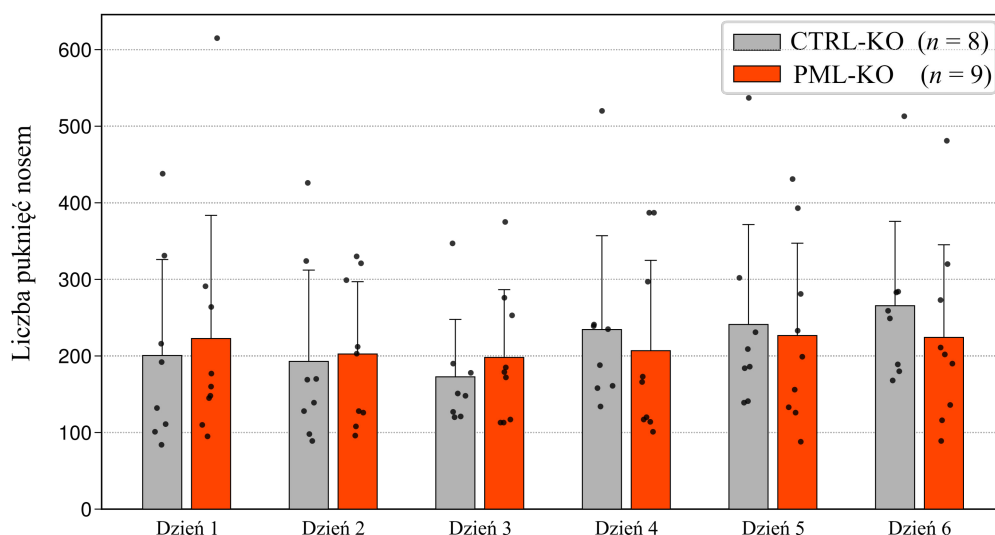
Aktywność myszy z podwyższonym poziomem białka PML w teście *counter-clockwise* oceniono liczbą wszystkich puknięć nosem w poidło wykonanych w każdej dobie testu (Rycina 31). W grupie doświadczalnej PML-OE liczba przybliżeń nosa do bramek prowadzących do butelek z wodą utrzymywała się średnio na poziomie ponad 200, a dla grupy kontrolnej CTRL-OE około 300 (różnica istotna statystycznie $p = 0.015$ *). Myszy z podwyższonym poziomem białka PML wykazywały zatem mniejszą aktywność niż myszy z grupy kontrolnej (Rycina 31).

Wynik testu *counter-clockwise* dla zwierzęta z delecją białka PML wykazał, że zarówno zwierzęta z grupy doświadczalnej PML-KO jak i z grupy kontrolnej CTRL-KO utrzymywały podobny średni procent poprawnych wizyt, który od 1. do 6. dnia testu wyniósł od 55–60%. Uzyskane wyniki dla zwierząt typu „knock-out” podobnie jak w przypadku zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML sugerują brak zaburzeń pamięci proceduralnej i łatwość w dostosowaniu pamięci przestrzennej do innego kierunku poruszania się (Rycina 32).



Rycina 32. Procent poprawnych wizyt w teście *counter-clockwise*. Myszy z grupy doświadczalnej PML-KO ($n = 9$) oznaczonej kolorem czerwonym i grupy kontrolnej CTRL-KO ($n = 8$) oznaczonej kolorem jasnoszarym w trakcie trwania testu *counter-clockwise*. Wyniki przedstawiono jako średni procent poprawnych wizyt w każdej grupie (pogrubiona linia; średnie poszczególnych osobników przedstawiono jako cienkie linie łączące punkty). Słupki błędów – odchylenie standardowe. Analiza wariancji z powtarzaniem pomiarów nie wykazała różnic istotnych statystycznie.

Aktywność myszy z delecją białka PML w teście *counter-clockwise* oceniono liczbą wszystkich puknięć nosem w poidło wykonanych w każdej dobie testu (Rycina 33). Aktywność zarówno dla grupy kontrolnej CTRL-KO, jak i doświadczalnej PML-KO utrzymywała się na zbliżonym poziomie, średnio od 200 do 250 puknięć nosem każdego dnia w trakcie trwania całego testu.

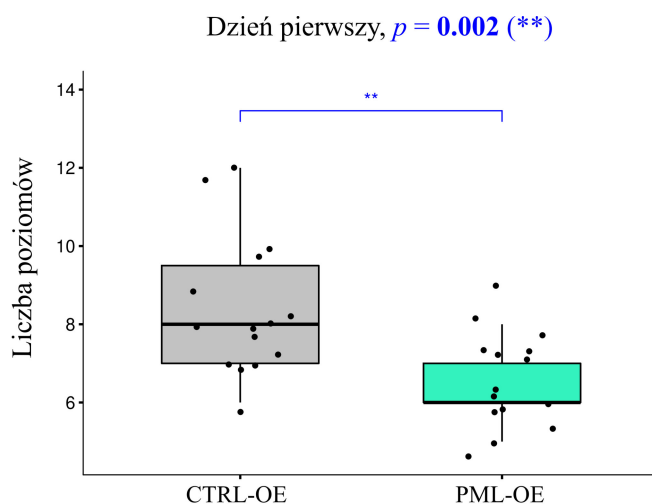


Rycina 33. Średnia dzienna liczba puknięć nosem w teście *counter-clockwise*. Myszy z grupy doświadczalnej PML-KO ($n=9$) oznaczono kolorem czerwonym, a myszy z grupy kontrolnej CTRL-KO ($n=8$) oznaczono kolorem szarym. Wyniki przedstawiono jako liczbę puknięć nosem w każdej grupie. Czarne, pojedyncze punkty odpowiadają poszczególnym osobnikom. Słupek błędów – odchylenie standardowe w grupie. Analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami nie wykazała różnic istotnych statystycznie.

4.3.2 Test uczenia się progresywnego

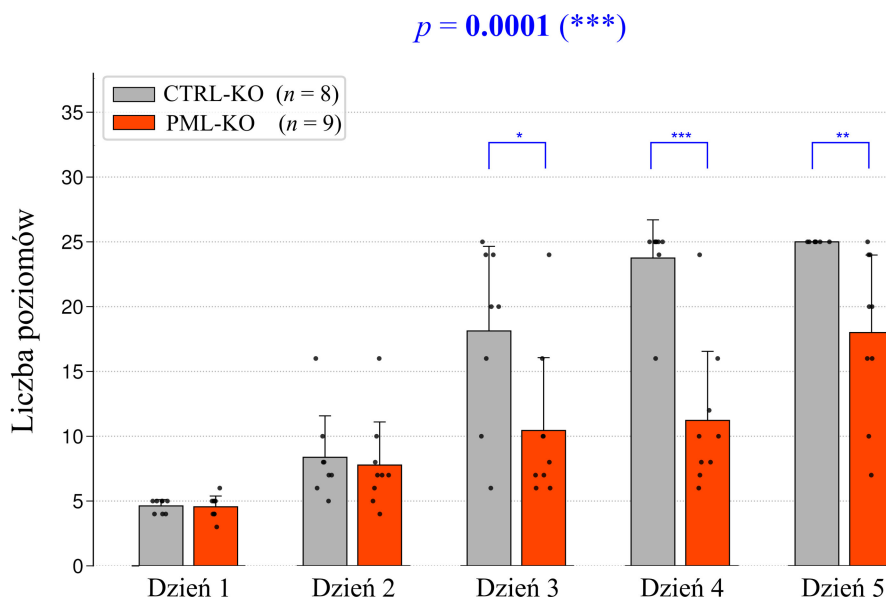
Kolejnym przeprowadzonym testem był test uczenia się progresywnego polegający na wykonaniu odpowiedniej, zwiększającej się na każdym kolejnym poziomie testu, liczby puknięć nosem umożliwiających napięcie się wody. Poziom testu był zawsze bezpośrednio powiązany z liczbą puknięć nosem; np. 10. poziom oznaczał 10 puknięć nosem zakończonych napięciem się wody.

Uzyskane dla zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML wyniki (Rycina 34) przedstawiono jako liczbę poziomów pokonanych w ciągu pierwszej doby (z powodu problemów technicznych, niezależnych od eksperymentatora, nie udało się uzyskać danych z pozostałych 4 dób trwającego 5 dni testu). Wyniki dla pierwszej doby pokazały, że zwierzęta PML-OE średnio osiągnęły niższy poziom niż zwierzęta kontrolne CTRL-OE. Analizę przeprowadzono stosując statystyczny test t-Studenta, w którym $p = 0.002$ (**). Ze względu na utratę danych, dla zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML nie przeprowadzono analizy aktywności w trakcie trwania testu uczenia się progresywnego.



Rycina 34. Średnia dzienna liczba pokonanych poziomów w teście uczenia się progresywnego (pierwsza doba). Zwierzęta z grupy PML-OE ($n = 15$) oznaczonej kolorem zielonym średnio osiągnęły niższy poziom poprawnych odpowiedzi niż zwierzęta z grupy kontrolnej CTRL-OE ($n = 15$) oznaczonej kolorem jasnoszarym. Analizę statystyczną wykonano testem t-Studenta, w której $p = 0.002 (**)$.

Wyniki testu uczenia się progresywnego dla zwierząt z delecją białka PML (Rycina 35) wykazały, że w pierwszych dwóch dniach testu zarówno myszy PML-KO jak i CTRL-KO osiągnęły średnio odpowiednio 7 i 8 poziom testu. W kolejnym trzecim dniu zwierzęta PML-KO średnio dotarły do poziomu 10 lub 12, a grupa CTRL-KO średnio do poziomu 16 lub 20. W czwartym dniu zwierzęta PML-KO pozostały na poziomie 10 lub 12, natomiast grupa CTRL-KO średnio dotarła na 24 poziom. W piątym, ostatnim dniu testu, myszy PML-KO uzyskały średnio poziom 16 lub 20, podczas gdy wszystkie myszy CTRL-KO ukończyły test. Analiza, przeprowadzona testem ANOVA dwuczynnikowa z powtarzanymi pomiarami, wykazała w testach *post-hoc* różnice statystycznie istotne dla 3. ($p = 0.027, *$), 4. ($p = 0.000057, ***$) oraz 5. ($p = 0.0072, **$) dnia testu.

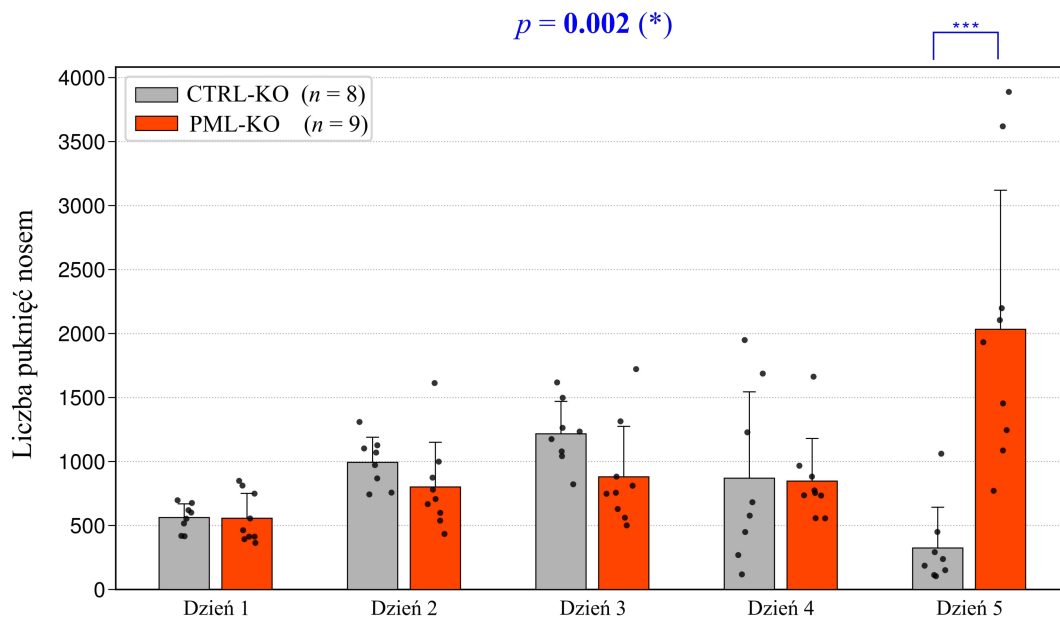


Rycina 35. Średnia dzienna liczba pokonanych poziomów w teście uczenia się progresywnego (5 dni). Test przedstawia średnią liczbę pokonanych poziomów dla każdej grupy przez 5 dni trwania testu. Grupa PML-KO ($n = 9$) oznaczona kolorem czerwonym, grupa kontrolna CTRL-KO ($n = 8$) oznaczona kolorem jasnoszarym. Analizę statystyczną wykonano dwuczynnikową analizą wariancji (ANOVA) dla powtarzanych pomiarów, gdzie $p = 0.0001 (***)$. Przeprowadzono również *post-hoc* test t-Studenta, który wykazał istotność statystyczną – w 3. dniu testu $p = 0.027 (*)$, 4. dniu testu, $p = 0.000057 (***)$, i 5. dniu testu $p = 0.0072 (**)$.

Analizę aktywności myszy z delecją białka PML podczas testu uczenia się progresywnego oceniono na podstawie sumarycznej, niezakończonych napięciem się wody, liczby puknięć nosem w każdej dobie testu (Rycina 36). Aktywność w pierwszej dobie testu zarówno dla grupy CTRL-KO jak i PML-KO utrzymywała się na zbliżonym poziomie i wynosiła około 500 przybliżeń nosa do bramek prowadzących do butelek z wodą. Kolejno w drugiej i trzeciej dobie testu aktywność myszy kontrolnych była nieco wyższa od myszy doświadczalnych i wyniosła odpowiednio 1000–1250 oraz około 800 puknięć nosem. W czwartej dobie aktywność myszy kontrolnych i doświadczalnych utrzymywała się na jednakowym poziomie aż do doby piątej, w której aktywność myszy kontrolnych spadła do 250 puknięć nosem, a doświadczalnych wzrosła ponad dwukrotnie w stosunku do dnia poprzedniego i wyniosła około 2000 puknięć nosem (różnica statystycznie istotna, $p = 0.00067 (***)$).

Uzyskane wyniki aktywności przedstawione w postaci średniej dziennej liczby wszystkich puknięć nosem, czyli niekoniecznie zakończonych napięciem się wody, korelują z wynikami przedstawionymi na Rycinie 35. Aktywność myszy z grupy kontrolnej od 3. dnia

testu, w którym to nauczyły się wykonywania odpowiedniej liczby puknięć nosem w celu napicia się wody zaczęła maleć. Przeciwny wynik uzyskały zwierzęta z delecją białka PML, u których mogło dojść do zaburzeń w procesie uczenia się progresywnego co zmusiło je do wykonywania co raz większej liczby puknięć nosem w celu napicia się wody. Pomimo wykonywania przez myszy doświadczalne w 5. dniu testu średnio ponad 2000 przybliżeń nosa do bramek prowadzących do butelek z wodą zwierzęta nie pokonywały kolejnych poziomów testu. Brak skupienia na zadaniu oraz niewystarczająca ciągłość i chaotyczne wykonywania puknięć nosem wskazują na zaburzenie pamięci operacyjnej.

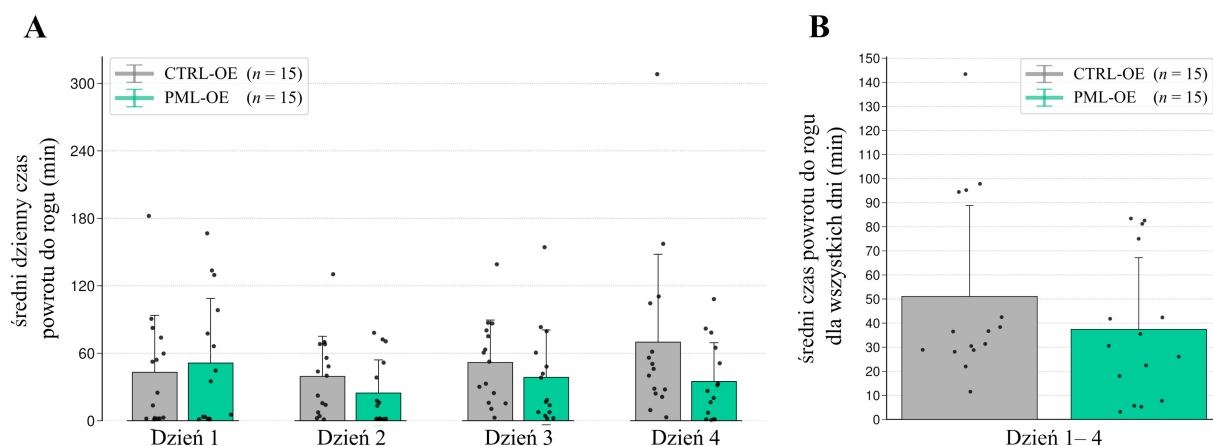


Rycina 36. Aktywność myszy poddanych testowi uczenia się progresywnego (5 dni). Myszy z grupy doświadczalnej PML-KO ($n = 9$) oznaczono kolorem czerwonym, a myszy z grupy kontrolnej CTRL-KO ($n = 8$) oznaczono kolorem szarym. Wyniki przedstawiono jako liczbę puknięć nosem zakończonych napiciem się wody dla każdej grupy. Czarne, pojedyncze punkty odpowiadają poszczególnym osobnikom. Słupek błędów – odchylenie standardowe w grupie. Analizę statystyczną wykonano dwuczynnikową analizą wariancji (ANOVA) dla powtarzanych pomiarów, gdzie $p = 0.002$ (*). Przeprowadzono również *post-hoc* test t-Studenta, który wykazał istotność statystyczną w 5. dniu testu $p = 0.00067$ (***)

4.3.3 Test Vogla

Ostatnim przeprowadzonym testem behawioralnym było test Vogla. Każdego dnia trwającego 4 dni testu, mysz przy pierwszej próbie napicia się wody (z dowolnego rogu) była karana stymulacją w postaci podmuchu powietrza w nos (bodziec awersyjny). Następnie mogła swobodnie wrócić i napić się wody z któregoś z rogów. Test polegał na

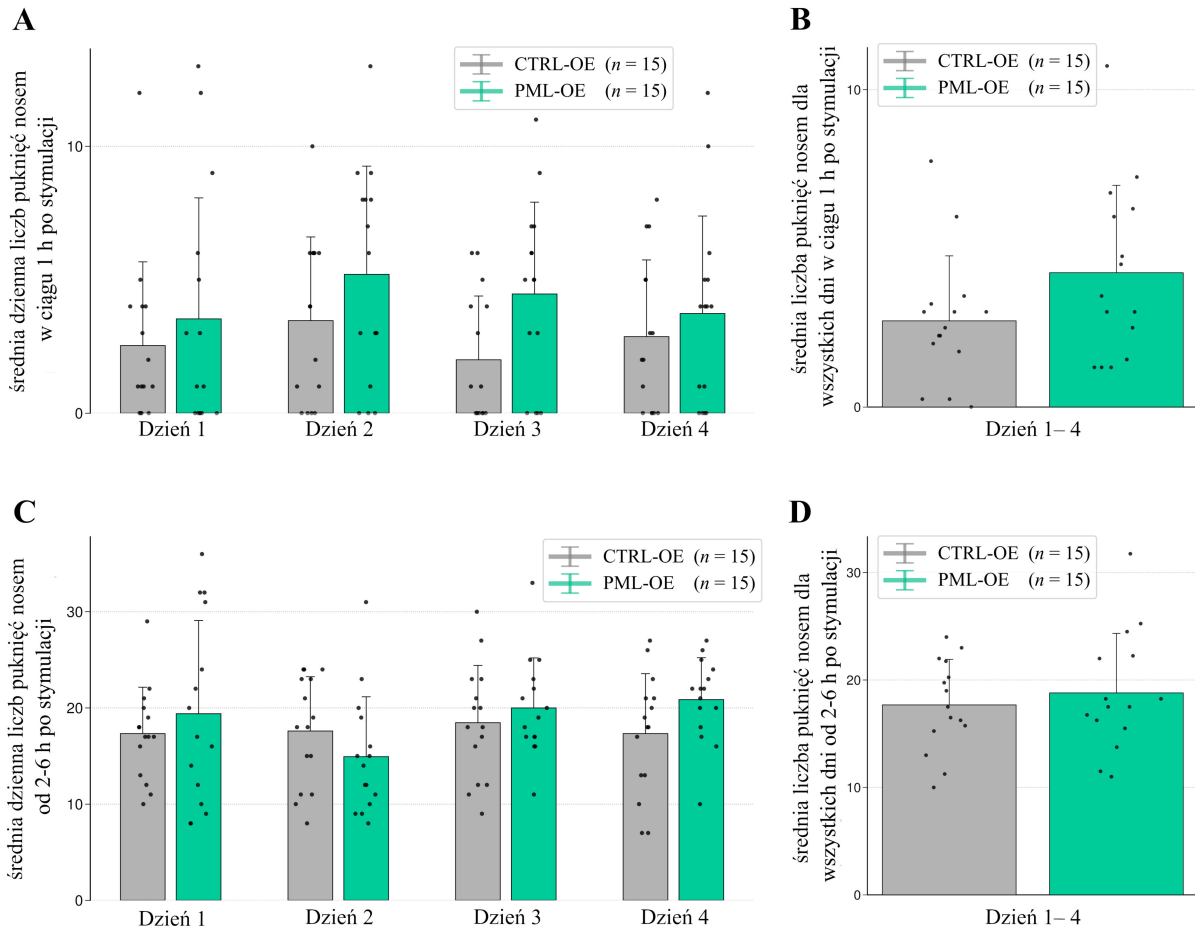
określeniu, po jakim czasie od otrzymania bodźca awersyjnego mysz podejmie kolejną próbę napicia się. Czas powrotu do rogu z wodą liczone jako: **(A)** średni dzienny czas powrotu do **któregokolwiek z rogów** oraz **(B)** średni czas powrotu **do któregokolwiek z rogów** dla wszystkich dni testu. Uzyskane wyniki wykazały, że średni dzienny czas powrotu do rogu wynosił od 30 do 50 minut dla zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML i od 40 do 70 minut dla zwierząt kontrolnych, wykresie A (Rycina 37). Średni czas powrotu do rogu dla wszystkich czterech dni testu dla grupy PML-OE wyniósł około 38 minut, a dla grupy CTRL-OE około 50 minut, wykres B (Rycina 37). W obu przypadkach różnice okazały się nie być istotne statystycznie.



Rycina 37. Czas powrotu do rogu z wodą w teście Vogla. **(A)** średni dzienny czas powrotu do któregokolwiek rogu z wodą. **(B)** średni czas powrotu do któregokolwiek rogu dla wszystkich dni testu. Kolorem zielonym oznaczono grupę PML-OE, a kolorem jasnoszarym grupę CTRL-OE. Słupki błędów – odchylenie standardowe w grupie. Wykonana testem t - Studenta analiza statystyczna wyników uśrednionych po wszystkich dniach testu behawioralnego nie wykazała różnic istotnych statystycznie.

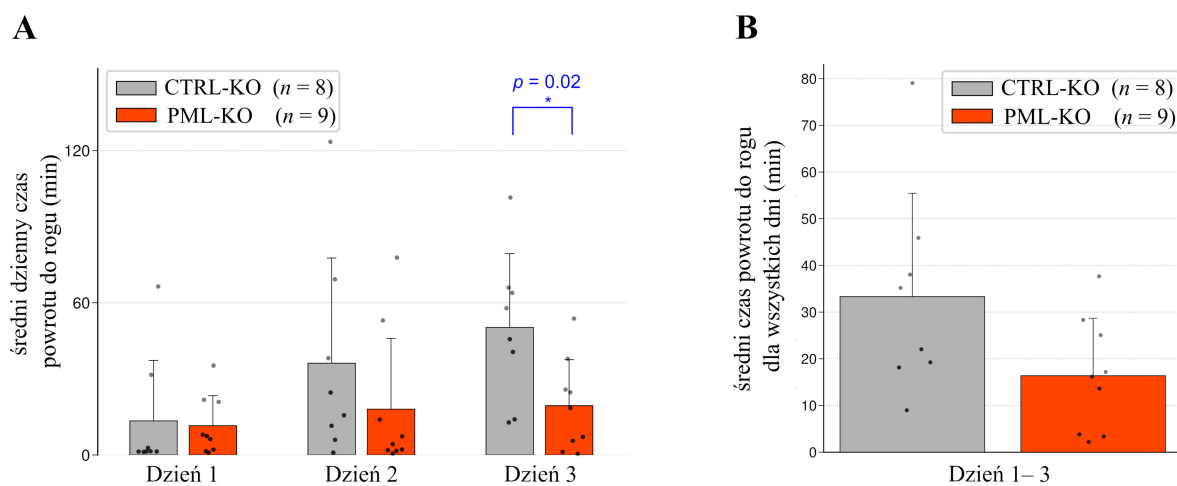
Dodatkowo w teście Vogla przeprowadzono analizę aktywności zwierząt po otrzymaniu stymulacji. Sprawdzono **(A)** średnią dzienną liczbę puknięć nosem zakończonych napiciem się wody każdego dnia **w ciągu godziny** po stymulacji i **(B)** średnią liczbę puknięć nosem zakończonych napiciem się wody dla wszystkich dni **w ciągu godziny** po stymulacji, a także **(C)** średnią dzienną liczbę puknięć nosem zakończonych napiciem się wody każdego dnia **od 2. do 6. godziny** po stymulacji i **(D)** średnią liczbę puknięć nosem zakończonych napiciem się wody dla wszystkich dni **od 2. do 6. godziny** po stymulacji (Rycina 38). Przedstawione wyniki nie wykazały różnic istotnych statystycznie między grupą doświadczalną PML-OE

a grupą kontrolną CTRL-OE. Pomimo tego, na wykresach A i B (Rycina 38) w ciągu godziny po stymulacji zwierzęta z podwyższonym poziomem białka PML wykazywały tendencję do większej aktywności. Różnice te z upływem czasu wyrównały się, co można zaobserwować na wykresach C i D (Rycina 38), gdzie aktywność myszy z grupy doświadczalnej jest zbliżona do aktywności zwierząt z grupy kontrolnej.



Rycina 38. Analiza aktywności w trakcie trwania testu Vogla. Wyniki aktywności przedstawiono jako (A) średnia dzienna liczba puknięć nosem zakończonych napięciem się wody każdego dnia w ciągu godziny po stymulacji. (B) średnią liczbę puknięć nosem zakończonych napięciem się wody dla wszystkich dni w ciągu godziny po stymulacji. (C) średnią dzienną liczbę puknięć nosem zakończonych napięciem się wody każdego dnia od 2. do 6. godziny po stymulacji. (D) średnią liczbę puknięć nosem zakończonych napięciem się wody dla wszystkich dni od 2. do 6. godziny po stymulacji. Kolorem zielonym oznaczono grupę doświadczalną PML-OE, a kolorem jasnoszarym grupę kontrolną CTRL-OE. Analizę statystyczną średnich dziennych liczb puknięć nosem wykonano testem t-Studenta, który nie wykazał różnic istotnych statystycznie.

Wyniki uzyskane dla zwierząt z delecją białka PML, w trakcie trwającego 3 dni testu Vogla (dane z ostatniego dnia testu, z przyczyn niezależnych od eksperymentatora, zostały utracone) wykazały, że myszom z grupy doświadczalnej PML-KO średni dzienny czas powrotu do rogu po otrzymaniu bodźca zajmował mniej niż 30 minut. W przypadku myszy z grupy kontrolnej CTRL-KO średni dzienny czas powrotu do rogu wydłużał się każdego dnia. Pierwszego dnia testu wyniósł około 12 minut, drugiego dnia testu około 30 minut, a trzeciego dnia testu wyniósł 50 minut, wykres A (Rycina 39). Średni czas powrotu do rogu dla wszystkich trzech dni testu wyniósł około 15 minut dla zwierząt z grupy doświadczalnej, a ponad 30 minut dla zwierząt z grupy kontrolnej, wykres B (Rycina 39). Analiza przeprowadzona z wykorzystaniem testu t-Studenta wykazała różnice statystycznie istotne między grupą PML-KO a CTRL-KO w trzecim dniu testu, $p = 0.02$ (*).

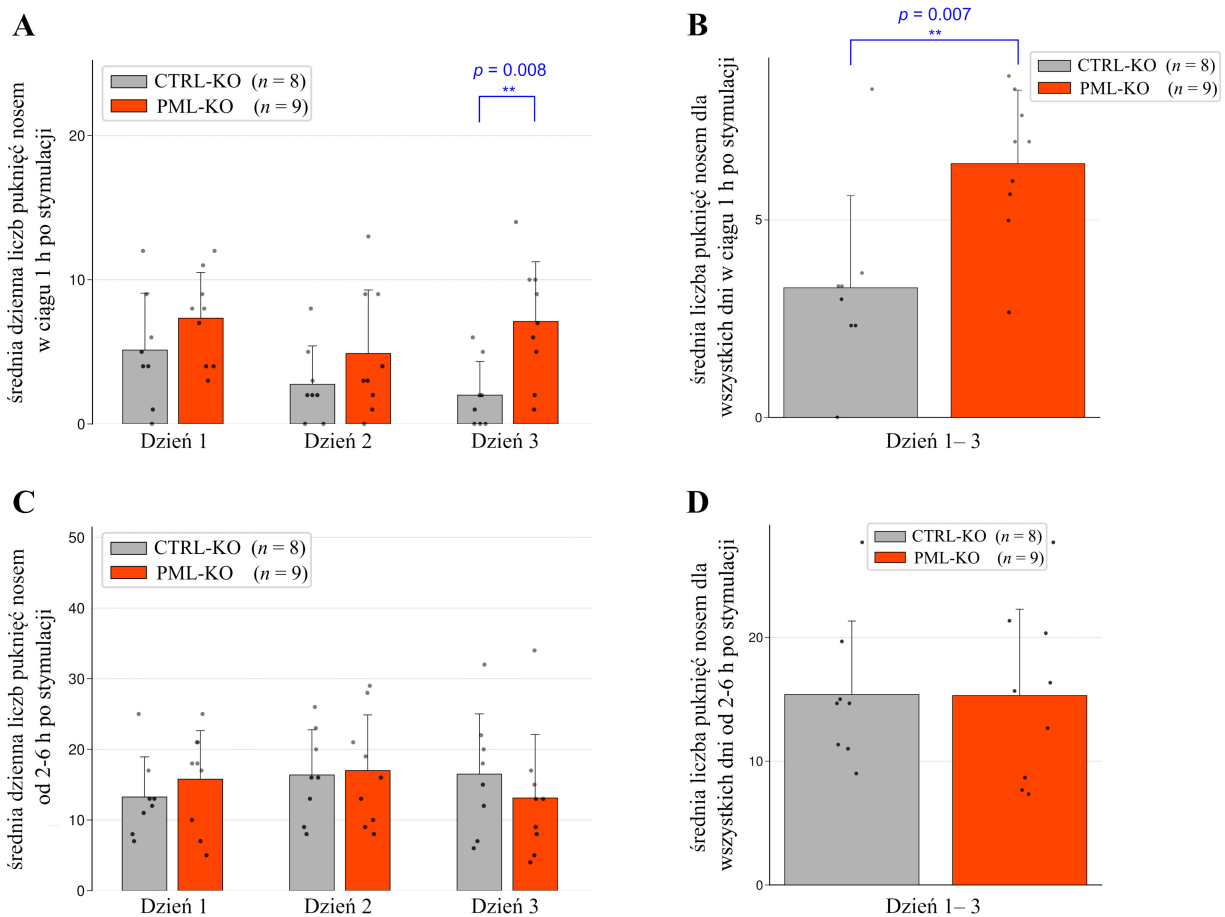


Rycina 39. Czas powrotu do rogu z wodą w teście Vogla. (A) średni dzienny czas powrotu do któregośkolwiek rogu z wodą. (B) średni czas powrotu do któregośkolwiek rogu dla wszystkich dni testu. Kolorem czerwonym oznaczono grupę PML-KO, a kolorem jasnoszarym grupę CTRL-KO. Analizę statystyczną wykonano testem t-Studenta, w którym w 3. dniu $p = 0.02$ (*).

Ostatnią przeprowadzoną analizą było określenie aktywności zwierząt po otrzymaniu stymulacji w postaci podmuchu powietrza w nos. Wyniki wykazały, że trzeciego dnia testu w ciągu godziny po otrzymaniu bodźca myszy z grupy doświadczalnej PML-KO średnio wykonały większą liczbę puknięć nosem niż myszy z grupy kontrolnej CTRL-KO, co widoczne jest na wykresie A (Rycina 40). Analizę wykonano testem t-Studenta, w którym $p = 0.008$ (**). Różnica statystycznie istotna widoczna były również dla średniej liczby puknięć nosem ze wszystkich dni w ciągu godziny po stymulacji, $p = 0.007$ (**), co widoczne jest na wykresie B (Rycina 40). Podobnie jak w przypadku zwierząt z podwyższonym

poziomem białka PML, z upływem czasu zarówno średnia dzienna liczba puknięć nosem, jak i średnia liczba puknięć nosem dla wszystkich dni między grupami wyrównały się, co widać na wykresach C i D (Rycina 40).

Uzyskane wyniki przedstawione na Rycinie 39 i 40 świadczą o tym, że w przeciwieństwie do zwierząt z grupy kontrolnej, które zareagowały w oczekiwany sposób i ich aktywność była mniejsza, myszy z delecją białka PML wykazały niższy próg lękowy, który z dużym prawdopodobieństwem był efektem zaburzeń w formowaniu pamięci, w tym wypadku pamięci warunkowanej strachem (bodźcem awersyjnym).



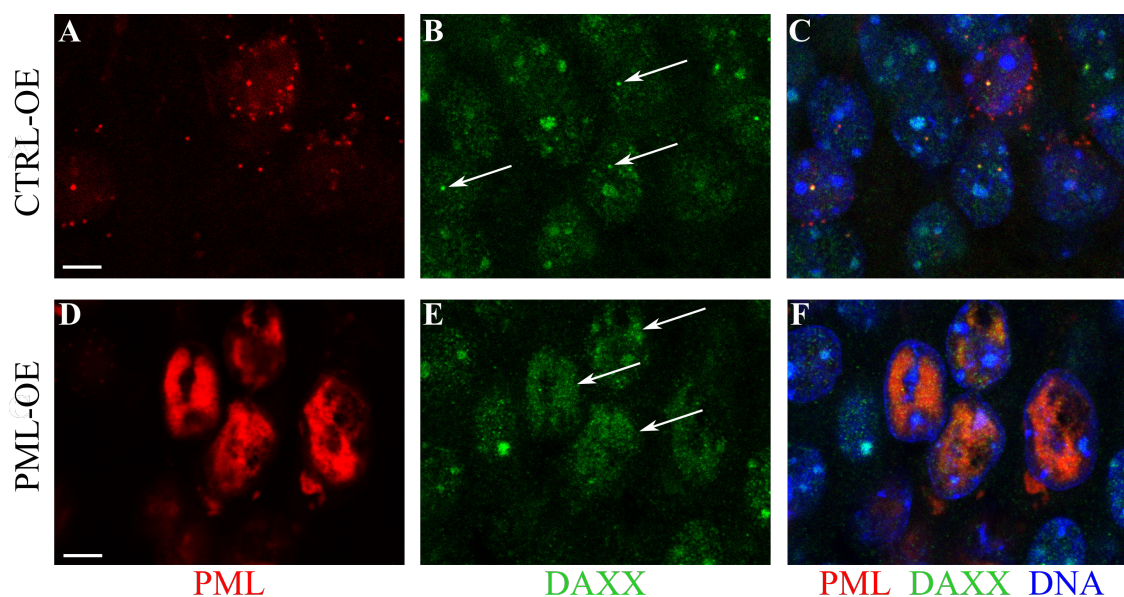
Rycina 40. Analiza aktywności w trakcie trwania testu Vogla. Wyniki aktywności przedstawiono jako (A) średnia dzienna liczba puknięć nosem zakończonych napięciem się wody każdego dnia w ciągu godziny po stymulacji. (B) średnią liczbę puknięć nosem zakończonych napięciem się wody dla wszystkich dni w ciągu godziny po stymulacji. (C) średnią dzienną liczbę puknięć nosem zakończonych napięciem się wody każdego dnia od 2. do 6. godziny po stymulacji. (D) średnią liczbę puknięć nosem zakończonych napięciem się wody dla wszystkich dni od 2. do 6. godziny po stymulacji. Kolorem czerwonym oznaczono grupę doświadczalną PML-KO, a kolorem jasnoszarym grupę kontrolną CTRL-KO. Analizę statystyczną wykonano testem t - Studenta, który w 3. dniu testu sprawdzającym liczbę puknięć nosem w ciągu godziny po stymulacji wykazał $p = 0.008$ (**), a w przypadku średniej dziennej liczbie puknięć nosem w ciągu godziny po stymulacji wykazał $p = 0.007$ (**).

4.4 Analiza zmian morfologii jądra komórkowego neuronów hipokampalnych u zwierząt z modyfikacją poziomu białka PML

W celu analizy zmian morfologii jądra komórkowego, po zakończeniu testów behawioralnych zarówno myszy z podwyższonym poziomem, jak i myszy z delecją białka PML poddano procedurze perfuzji oraz izolacji i cięciu mózgow na skrawki. W kolejnym etapie na wybranych skrawkach mózgu zawierających hipokamp przeprowadzono szereg barwień immunofluorescencyjnych (opis procedury w podsekcji 3.6.4) umożliwiających ocenę zachodzących zmian. Do większości barwień wykorzystywano: (1) przeciwciało skierowane przeciwko białku PML, które na wszystkich omawianych zdjęciach mikroskopowych uwidocznione jest w kolorze czerwonym; w zależności od barwienia wykorzystywano: (2) przeciwciała skierowane przeciwko partnerom białkowym PML, modyfikacjom potranslacyjnym białek histonowych lub białku będącemu składnikiem spliceosomu, uwidocznione w kolorze zielonym oraz (3) fluorescencyjny barwnik DNA Hoechst, który uwidoczniono w kolorze niebieskim. Ponadto w trakcie wszystkich barwień immunofluorescencyjnych wykorzystano przeciwciało skierowane przeciwko białku NeuN będącym neuronalnym białkiem jądrowym wykorzystywanym jako znacznik neuronów postmitotycznych (nie przedstawiono na omawianych obrazach mikroskopowych). Listę wykorzystanych przeciwciał oraz ich rozcieńczenia przedstawiono w Tabeli 13.

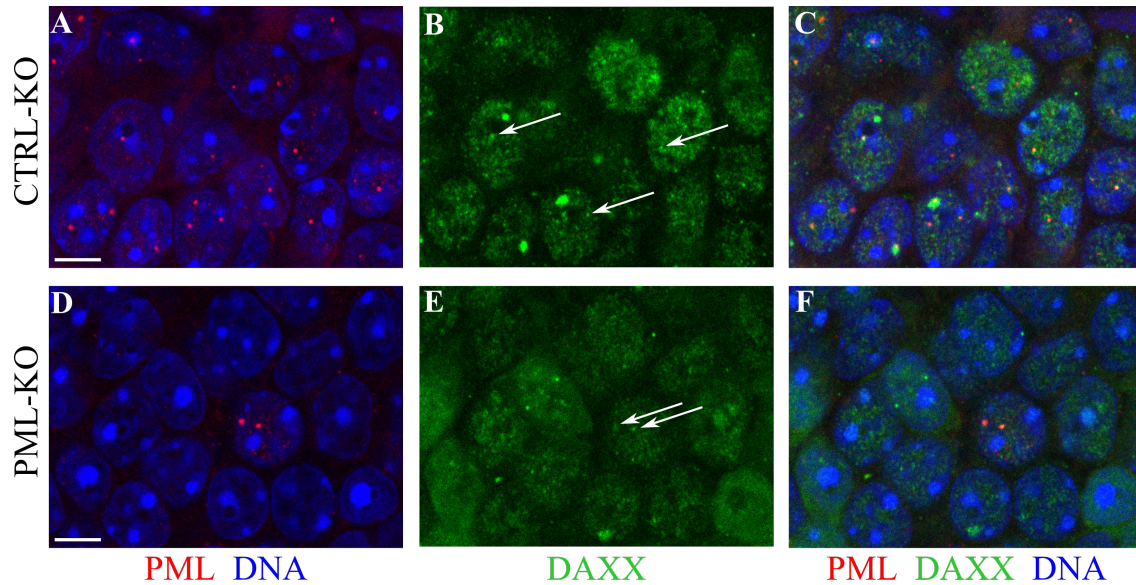
4.4.1 Wpływ modyfikacji poziomu białka PML na białka DAXX oraz ATRX.

W pierwszej kolejności ocenie poddano wpływ podwyższonego poziomu bądź delecji białka PML na ważnych partnerów białkowych PML, będących stałymi komponentami ciałek jądrowych PML – białko DAXX oraz białko ATRX. Poniżej przedstawiono zdjęcia jąder komórkowych neuronów zakrętu zębatego, wybarwionych przeciwciałem skierowanym przeciwko białku DAXX, uzyskane w wyniku barwienia skrawków mózgu zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML (Rycina 41) oraz delecją białka PML (Rycina 42).



Rycina 41. Analiza zmian lokalizacji oraz względnej ilości białka DAXX u zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML. Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający jądra komórkowe neuronów zakrętu zębatego myszy z grupy kontrolnej CTRL-OE (zdjęcia A–C) oraz doświadczalnej PML-OE (zdjęcia D–F). Białko PML i mCherry – kolor czerwony, białko DAXX – kolor zielony, DNA (barwnik Hoechst) – kolor niebieski. Strzałki wskazują skupiska białka DAXX. Znacznik skali to 5 μ m.

Analizując uzyskane wyniki, w pierwszej kolejności na uwagę zasługuje fakt, że w jądrach komórkowych zwierząt doświadczalnych widać wyraźnie większą ilość białka PML tworzącego silnie wybarwiony obszar w przestrzeni interchromatynowej. Należy również zauważyć, że w przypadku kontrolnego wektora wirusowego widoczny jest niespecyficzny, rozproszony sygnał pochodzący od znacznika mCherry występujący w okolicy jądra komórkowego i jego wnętrzu (widoczne na zdjęciu A, Rycina 41), co nie przeszkadza jednak w odróżnieniu go od sygnału pochodzącego z ciałek jądrowych PML. Kontrolne jądra komórkowe (zarówno zainfekowane, jak i niezainfekowane) widoczne na zdjęciu A, B i C (Rycina 41) w porównaniu do jąder komórkowych z podwyższonym poziomem białka PML widocznych na zdjęciu D, E i F (Rycina 41) znacznie różnią się względną ilością białka DAXX. Co więcej, w jądrach komórkowych z podwyższonym poziomem białka PML, PML częściowo współwystępuje z białkiem DAXX, co można zaobserwować na zdjęciach E i F (Rycina 41), gdzie kolor czerwony oraz zielony miejscami się pokrywają, dając kolor pomarańczowy.

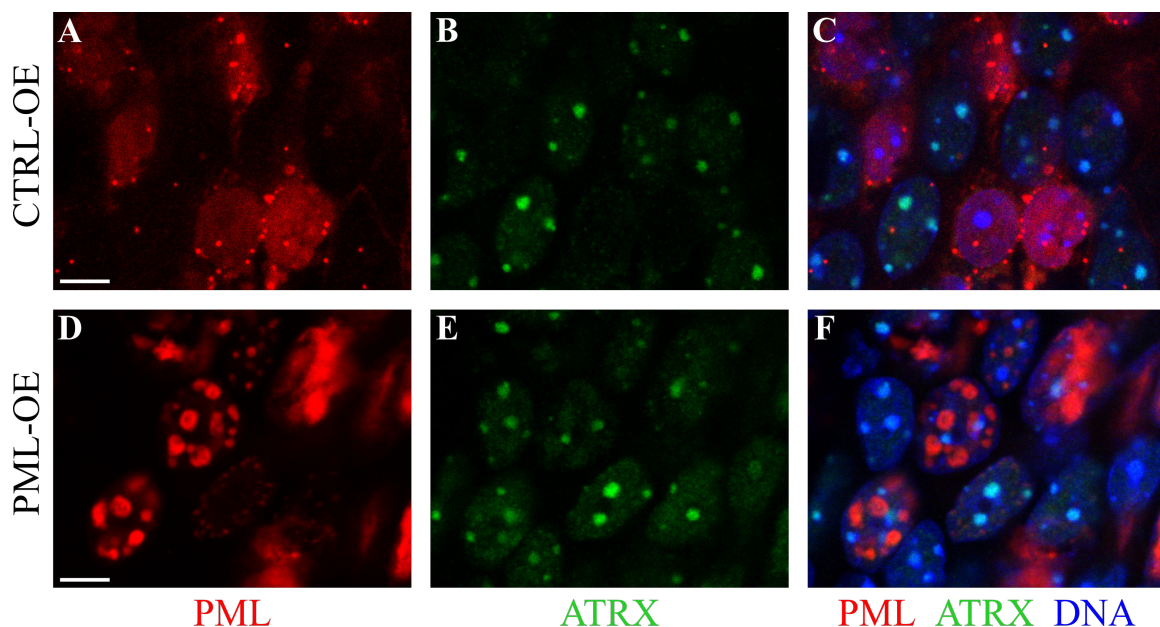


Rycina 42. Analiza zmian lokalizacji oraz względnej ilości białka DAXX u zwierząt z delecją białka PML. Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający jądra komórkowe neuronów zakrętu zębatego myszy z grupy kontrolnej CTRL-KO (zdjęcia A–C) oraz doświadczalnej PML-KO (zdjęcia D–F). Białko PML – kolor czerwony, białko DAXX (przykładowo oznaczone strzałkami na zdjęciu B i E) – kolor zielony, DNA (barwnik Hoechst) – kolor niebieski. Znacznik skali to 5 µm.

Na zdjęciach D–F (Rycina 42) pochodzących od zwierzęcia z delecją białka PML w porównaniu do zdjęć A–C (Rycina 42) pochodzących od zwierząt kontrolnych, widać znaczny spadek liczby, a niektórych komórkach całkowity brak ciałek jądrowych PML. Różnica ta najlepiej widoczna jest porównując zdjęcia A oraz D. Zestawiając zdjęcia B i E, pokazujące lokalizację białka DAXX i jego współwystępowanie z białkiem PML, widoczny jest również spadek względnej ilości białka DAXX w jądrach komórkowych pozbawionych białka PML. Na przedstawionych obrazach, w szczególności na zdjęciach B i C oraz E i F, dostrzec można niespecyficzny zielony sygnał. Taki obraz zaobserwowano na wszystkich skrawkach mózgu pochodzących od zwierząt z delecją białka PML. Efekt ten spowodowany jest konstytutywną ekspresją fluorescencyjnego białka fuzyjnego Cas9-GFP obecnego w genomie zwierząt transgenicznym linii Rosa26-Lox-STOP-Lox-Cas9-GFP, na których prowadzono doświadczenia. W przypadku omawianego barwienia (Rycina 42) niespecyficzny zielony sygnał można z łatwością odróżnić od barwienia przeciwciałem skierowanym przeciwko białku DAXX uwidocznionym również w zielonym kolorze ze względu na skupiskową lokalizację DAXX (strzałki na zdjęciu B i E). Niestety, nie we wszystkich przeprowadzonych barwieniach odróżnienie to było możliwe. Wykonana dodatkowo procedura odzyskiwania antygenowości nie doprowadziła do relatywnego osłabienia

fluorescencji pochodzącej od GFP (a także mCherry obecnego w sekwencjach „doprowadzających” gRNA) i wzmocnienia sygnału specyficznego dla DAXX. Dodatkowe barwienia kontrolne wykonane jedynie przeciwciałami II-rzędowymi (nie pokazane na zdjęciach) nie sugerowały niespecyficznego sygnału pochodzącego od tych przeciwciał.

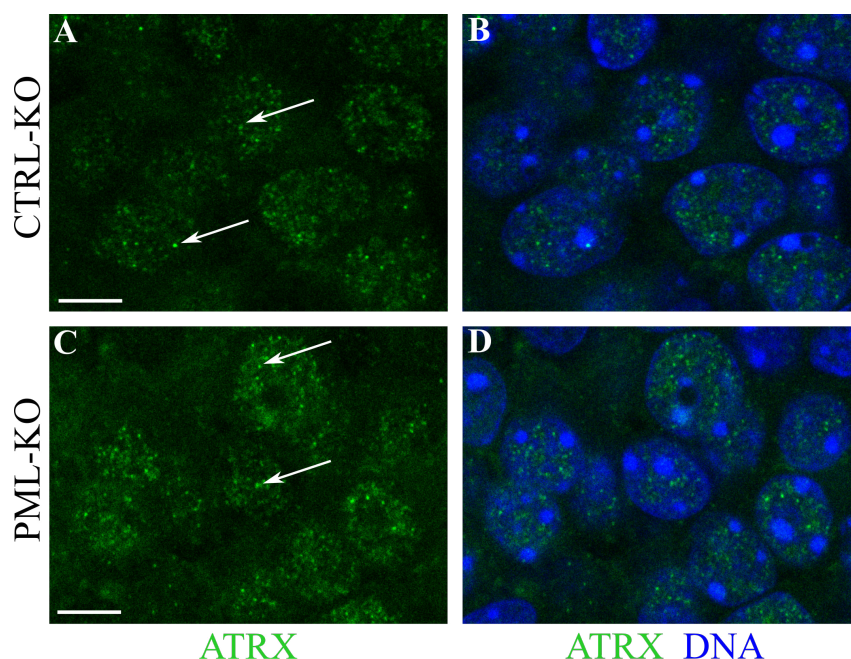
Kolejne obrazy mikroskopowe przedstawiają jądra komórkowe neuronów zakrętu zębatego wybarwione przeciwciałem skierowanym przeciwko białku ATRX, uzyskane w wyniku barwienia skrawków mózgu zwierząt z podwyższonym poziomem (Rycina 43) bądź delecją białka PML (Rycina 44).



Rycina 43. Analiza zmian lokalizacji oraz względnej ilości białka ATRX u zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML. Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający jądra komórkowe neuronów zakrętu zębatego myszy z grupy kontrolnej CTRL-OE (zdjęcia A–C) oraz doświadczalnej PML-OE (zdjęcia D–F). Białko PML i mCherry – kolor czerwony, białko DAXX – kolor zielony, DNA (barwnik Hoechst) – kolor niebieski. Strzałki wskazują skupiska białka DAXX. Znacznik skali to 5 μ m.

Tak jak wspomniano we wcześniejszym rozdziale (4.1.2.2) i przedstawiono na Rycinie 18, podwyższony poziom białka PML może wywoływać dwojaki efekt prowadzący do powstania większej liczby niezależnych, bardziej regularnych oraz znacznie większych ciałek jądrowych PML (Rycina 43, zdjęcia D i F) lub prowadzący do powstania jednego, bardzo dużego ciała PML powstałego z połączenia się mniejszych ciałek jądrowych PML i obejmującego całą przestrzeń interchromatynową w jądrze komórkowych (widoczne na Rycinie 41, zdjęcia D i F) Analiza powyższych zdjęć mikroskopowych pokazuje, że

podwyższony poziom białka PML nie wpływa na zmianę lokalizacji oraz względną ilość białka ATRX. Zarówno u myszy kontrolnych, jak i wykazujących podwyższony poziom PML, białko ATRX jest zlokalizowane w obszarze silnie skondensowanej chromatyny tworzącej chromocentra i nie współwystępuje z białkiem PML. Co ciekawe, neurony zainfekowane kontrolnym wektorem wirusowym wykazują w jądrze komórkowym znacznie mniej białka ATRX w porównaniu do jąder z nimi sąsiadujących, które nie zostały skutecznie zainfekowane, co widać porównując zdjęcie A ze zdjęciem B (Rycina 43).



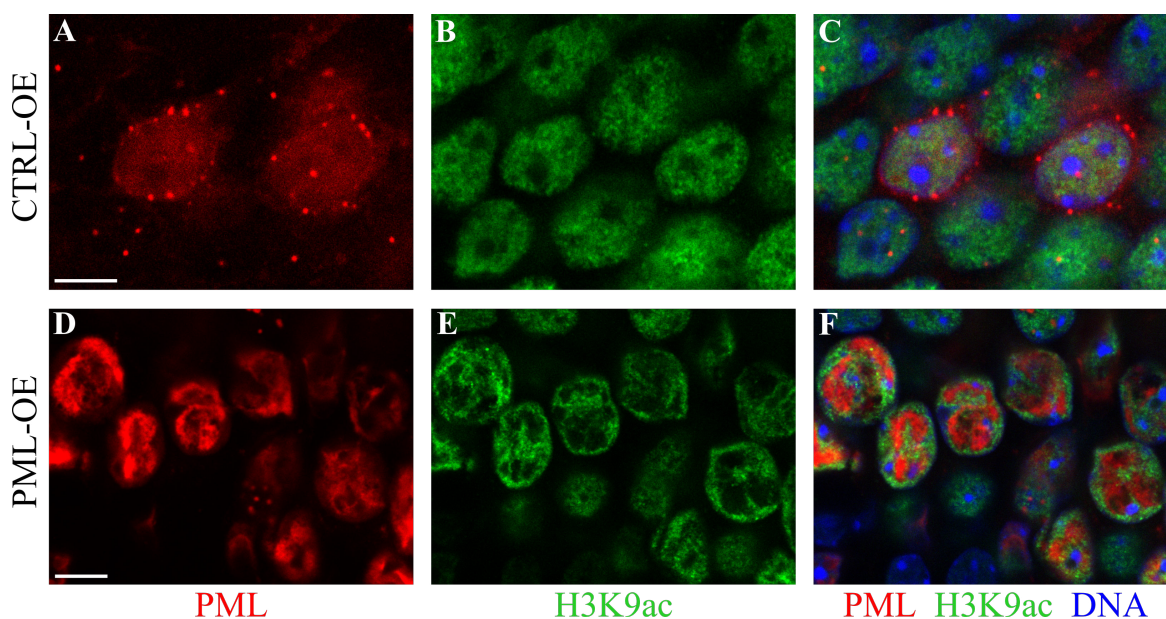
Rycina 44. Analiza zmian lokalizacji oraz względnej ilości białka ATRX u zwierząt z delecją białka PML. Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający jądra komórkowe neuronów zakrętu zębatego myszy z grupy kontrolnej CTRL-KO (zdjęcia A i B) oraz doświadczalnej PML-KO (zdjęcia C i D). Białko ATRX – kolor zielony, DNA (barwnik Hoechst) – kolor niebieski. Znacznik skali to 5 µm.

W przypadku barwień skrawków pochodzących od zwierząt z delecją białka PML (zdjęcia A i B, Rycina 44) nie zauważono różnic w ilości i organizacji przestrzennej białka ATRX między jądrami komórkowymi PML-KO a CTRL-KO. Co ciekawe, organizacja przestrzenna ATRX w kontrolach CTRL-OE i CTRL-KO wygląda odmiennie (Rycina 43 *versus* Rycina 44): skupiska ATRX w CTRL-KO są bardziej liczne i mniejsze niż w CTRL-OE. Różnica ta może wynikać z odmiennych przeciwciał zastosowanych do barwienia białka ATRX.

4.4.2 Wpływ modyfikacji poziomu białka PML na potranslacyjne modyfikacje białek histonowych

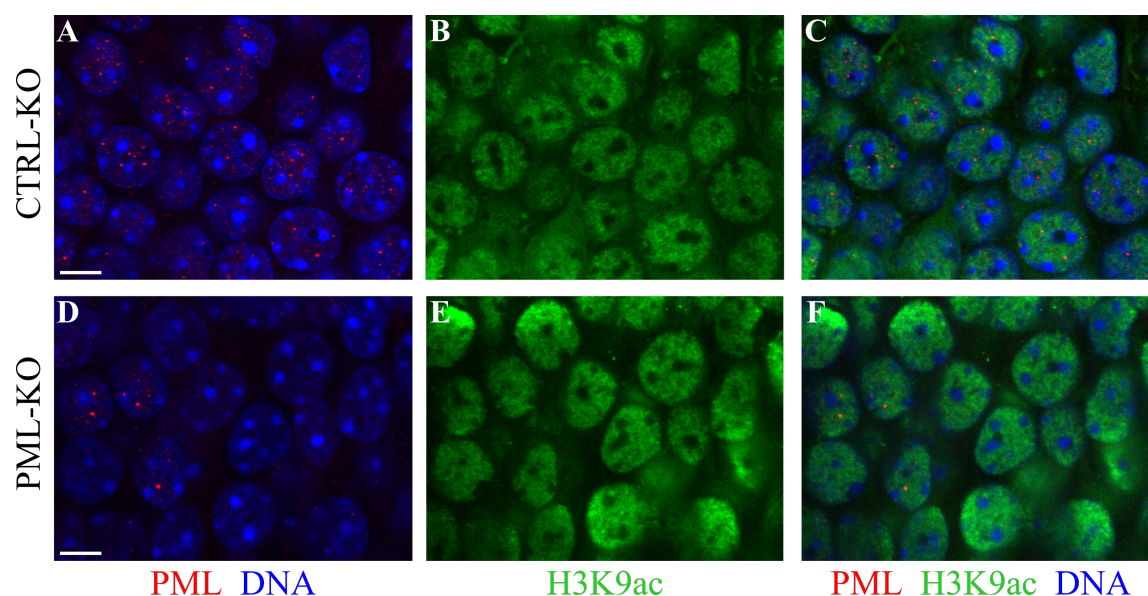
Następnie przeprowadzono analizę potranslacyjnych modyfikacji białek histonowych wchodzących w skład chromatyny aktywnej transkrypcyjnie (euchromatyny) oraz chromatyny nieaktywnej transkrypcyjnie (heterochromatyny). Barwienia te miały na celu określenie, czy wprowadzone modyfikacje ekspresji białka PML mają wpływ na przebudowę chromatyny, a tym samym pośrednio na proces transkrypcji.

Analizę rozpoczęto od skrawków mózgu barwionych przeciwciałem rozpoznającym znacznik euchromatyny, acetylację lizyny 9 histonu H3 (H3K9ac). Poniżej przedstawiono zdjęcia jąder komórkowych neuronów zakrętu zębatego, wybarwionych przeciwciałem skierowanym przeciwko modyfikacji H3K9ac, uzyskane w wyniku barwienia skrawków mózgu zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML (Rycina 45) oraz zwierząt z delecją białka PML (Rycina 46).



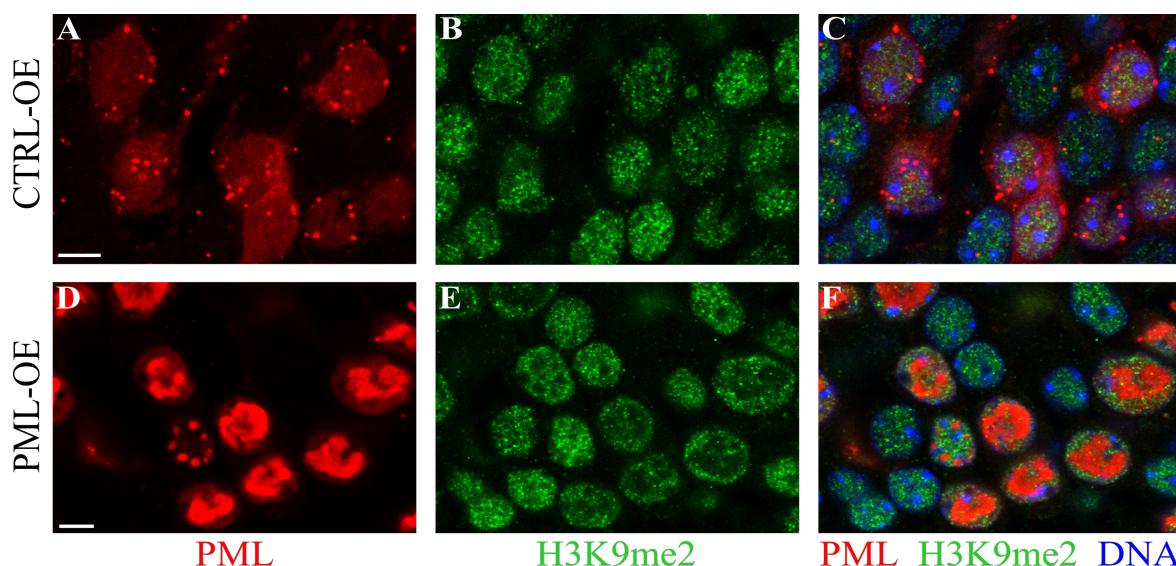
Rycina 45. Analiza zmian lokalizacji oraz względnej ilości H3K9ac u zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML. Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający jądra komórkowe neuronów zakrętu zębatego myszy z grupy kontrolnej CTRL-OE (zdjęcia A–C) oraz doświadczalnej PML-OE (zdjęcia D–E). Białko PML i mCherry – kolor czerwony, modyfikacja H3K9ac – kolor zielony, DNA (barwnik Hoechst) – kolor niebieski. Znacznik skali to 5 μ m.

Analiza zdjęć mikroskopowych wskazuje, że w przypadku podwyższonego poziomu białko PML wypełnia znaczną część jądra komórkowego, co widoczne jest na zdjęciu D i F (Rycina 45) i w tym wypadku nie tworzy wyraźnych niezależnych skupisk. PML zlokalizowany jest wokół centralnych obszarów jądra, a euchromatyna jest spychana na peryferie jądra komórkowego (co dobrze widoczne było również na skanie jąder w osi Z). Ze względu na wypełnienie przestrzeni jądra komórkowego białkiem PML, w jądrach komórkowych PML-OE euchromatyna zdaje się być bardziej upakowana (przez co może potencjalnie być gorzej dostępna dla czynników transkrypcyjnych niż w przypadku CTRL-OE).



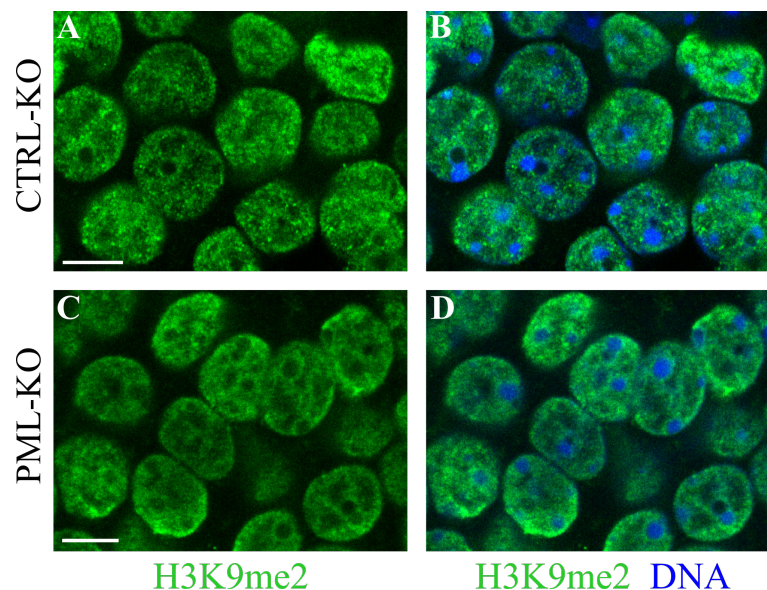
Rycina 46. Analiza zmian lokalizacji oraz względnej ilości H3K9ac u zwierząt z delecją białka PML. Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający jądra komórkowe neuronów zakrętu zębatego myszy z grupy kontrolnej CTRL-KO (zdjęcia A–C) oraz doświadczalnej PML-KO (zdjęcia D–F). Białko PML – kolor czerwony, białko H3K9ac – kolor zielony, DNA (barwnik Hoechst) – kolor niebieski. Znacznik skali to 5 μm .

Na podstawie zdjęć pochodzących od zwierzęcia z delecją białka PML zdjęcia D–F (Rycina 46) oraz zwierzęcia kontrolnego zdjęcia A–C (Rycina 45) nie stwierdzono istotnych różnic w względnej ilości bądź organizacji przestrzennej euchromatyny (H3K9ac). Ocena ta jest problematyczna ze względu na niespecyficzny sygnał pochodzący od białka fuzyjnego Cas9-GFP.



Rycina 47. Analiza zmian lokalizacji oraz względnej ilości H3K9me2 u zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML. Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający jądra komórkowe neuronów zakrętu zębatego myszy z grupy kontrolnej CTRL-OE (zdjęcia A–C) oraz doświadczalnej PML-OE (zdjęcia D–E). Białko PML i mCherry – kolor czerwony, modyfikacja H3K9me2 – kolor zielony, DNA (barwnik Hoechst) – kolor niebieski. Znacznik skali to 5 μm .

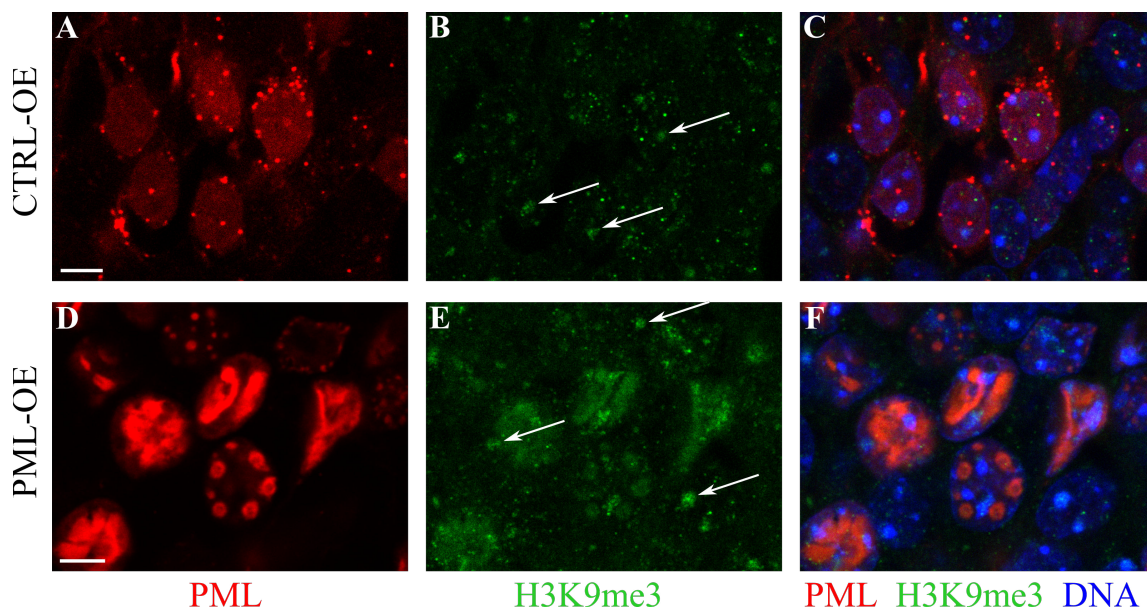
Następnie analizie poddano skrawki mózgu barwione przeciwciałem rozpoznającym znacznik heterochromatyny fakultatywnej, dimetylację lizyny 9 histonu H3 (H3K9me2). Powyżej przedstawiono zdjęcia jąder komórkowych zakrętu zębatego uzyskane w wyniku barwienia skrawków mózgu z podwyższonym poziomem i delecją białka PML (Rycina 47). Zdjęcia D i F (Rycina 46) pochodzące od zwierząt z grupy doświadczalnej PML-OE przedstawiają jądra komórkowe, które są w większości zainfekowane przez wektor wirusowy i w dużej mierze wypełnione przez białko PML. W tym wypadku ulegające „nadekspresji” białko PML zdaje się spychać wyznakowaną chromatynę na obrzeża jądra powodując jej silniejsze upakowanie w ograniczonej przestrzeni. W jądrach komórkowych z podwyższonym poziomem białka PML jest jej istotnie mniej, co widoczne jest na zdjęciu E (Rycina 47), zarówno w porównaniu do jąder kontrolnych widocznych na zdjęciach B i C (Rycina 47), jak i sąsiadujących z nimi jąder, które nie zostały zainfekowane przez wektor wirusowy.



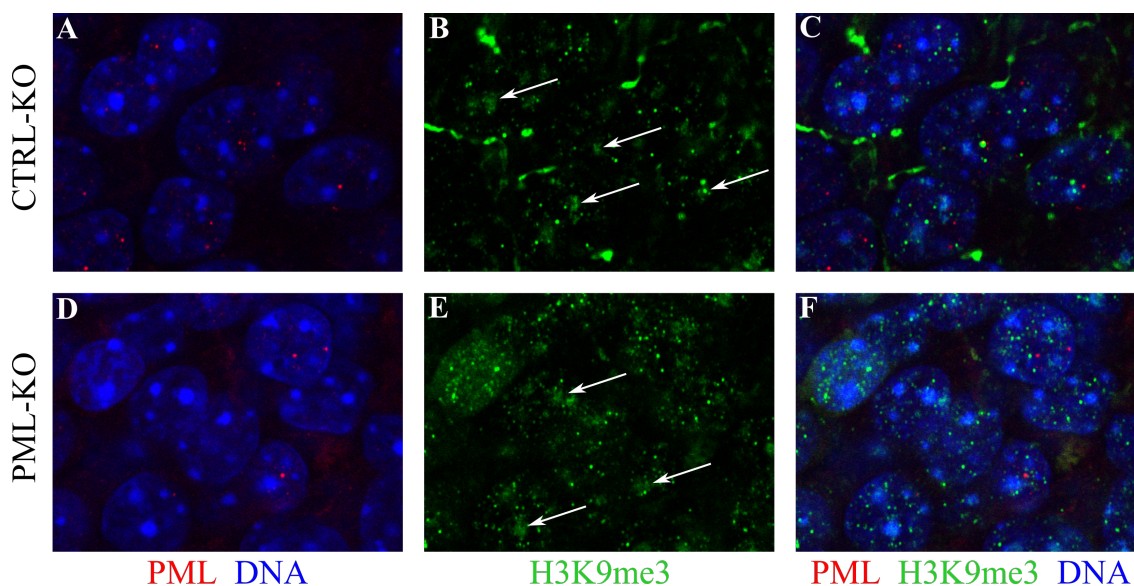
Rycina 48. Analiza zmian lokalizacji oraz względnej ilości H3K9me2 u zwierząt z delecją białka PML. Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający jądra komórkowe neuronów zakrętu zębatego myszy z grupy kontrolnej CTRL-KO (zdjęcia **A** i **B**) oraz doświadczalnej CTRL-KO (zdjęcia **C** i **D**). Modyfikacja H3K9me2 – kolor zielony, DNA (barwnik Hoechst) – kolor niebieski. Znacznik skali to 5 μ m.

To samo barwienie wykonano na skrawkach mózgu pochodzących od zwierząt z delecją białka PML (Rycina 48). Nie stwierdzono wpływu delecji PML na organizację przestrzenną heterochromatyny fakultatywnej.

Kolejno wykonano barwienia skrawków mózgu z użyciem przeciwciała rozpoznającego znacznik heterochromatyny konstytutywnej, trimetylowanej lizyny 9 histonu H3 (H3K9me3). Poniżej przedstawiono wyniki barwień jąder komórkowych neuronów zakrętu zębatego uzyskane od zwierząt z podwyższonym poziomem (Rycina 49) bądź delecją białka PML (Rycina 50).



Rycina 49. Analiza zmian lokalizacji oraz względnej ilości H3K9me3 u zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML. Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający jądra komórkowe neuronów zakrętu zębatego myszy z grupy kontrolnej CTRL-OE (zdjęcia A–C) oraz doświadczalnej PML-OE (zdjęcia D–E). Białko PML i mCherry – kolor czerwony, modyfikacja H3K9me3 (przykładowo oznaczone strzałkami na zdjęciu B) – kolor zielony, DNA (barwnik Hoechst) – kolor niebieski. Znacznik skali to 5 μ m.



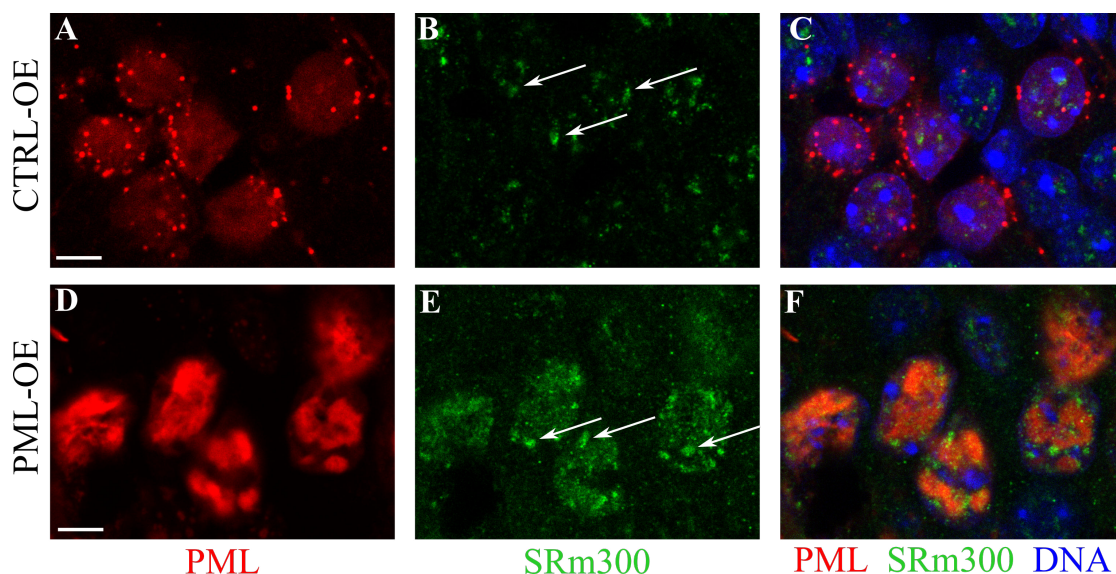
Rycina 50. Analiza zmian lokalizacji oraz względnej ilości H3K9me3 u zwierząt z delecją białka PML. Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający jądra komórkowe neuronów zakrętu zębatego myszy z grupy kontrolnej CTRL-KO (zdjęcia A–C) oraz doświadczalnej PML-KO (zdjęcia D–E). Białko PML – kolor czerwony, modyfikacja H3K9me3 – kolor zielony, DNA (barwnik Hoechst) – kolor niebieski. Znacznik skali to 5 μ m.

Uzyskane wyniki wskazują, że podwyższonym poziom białka PML może wpływać na zwiększenie względnej ilości heterochromatyny konstytutywnej. Można zauważyć to na zdjęciu E (Rycina 49), gdzie w jądrach komórkowych modyfikacji H3K9me3 uwidocznionej w kolorze zielonym jest więcej niż w jądrach komórek zainfekowanych kontrolnym wektorem wirusowym, widocznych na zdjęciu B (Rycina 49).

To samo barwienie wykonane na skrawkach mózgu uzyskanych od zwierząt z delecją białka PML wskazuje, że brak białka PML nie wpływa na zmiany względnej ilości i lokalizacji modyfikacji H3K9me3 w jądrach komórkowych neuronów zakrętu zębatego (Rycina 50).

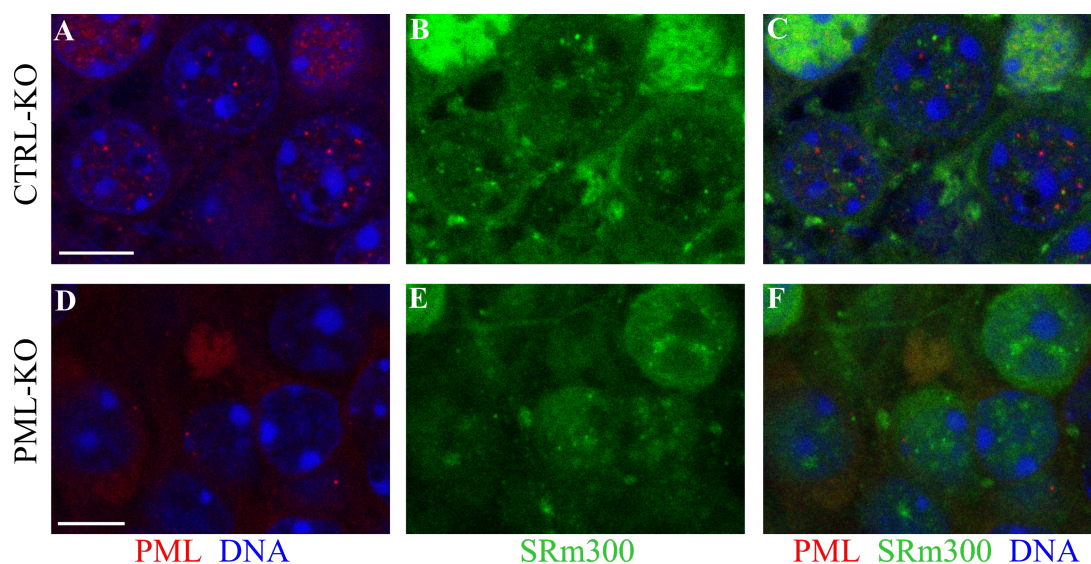
4.4.3 Wpływ modyfikacji poziomu białka PML na białko spliceosomu, SRm300

Ostatnim przeprowadzonym barwieniem immunofluorescencyjnym było barwienie z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko białku SRm300. Białko SRm300 jest jednym z białek wchodzących w skład spliceosomu – kompleksu białek i RNA biorącego udział w wycinaniu intronów z pre-mRNA w procesie redagowania mRNA. Białko to jest jednym ze znaczników cętek jądrowych – ciał jądrowych zlokalizowanych w przestrzeni interchromatynowej zaangażowanych w metabolizm i dojrzewanie RNA oraz regulację transkrypcji genów. Skrawki mózgu pochodzące od zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML są przedstawione na Rycinie 51, a z delecją białka PML na Rycinie 52.



Rycina 51. Analiza zmian lokalizacji oraz względnej ilości białka SRm300 u zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML. Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający jądra komórkowe neuronów zakrętu zębatego myszy z grupy kontrolnej CTRL-OE (zdjęcia A–C) oraz doświadczalnej PML-OE (zdjęcia D–E). Białko PML i m Cherry – kolor czerwony, białko SRm300 – kolor zielony, DNA (barwnik Hoechst) – kolor niebieski. Strzałkami zaznaczono skupiska białka SRm300. Znacznik skali to 5 μ m.

W jądrach komórkowych zwierząt kontrolnych pokazanych na zdjęciach B i C (Rycina 51) widocznych jest kilka cętek jądrowych zlokalizowanych centralnie w jądrach komórkowych. Natomiast u zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML pokazanych na zdjęciach E i F (Rycina 51) cętki umieszczone są pomiędzy strukturami utworzonymi przez białko PML i chromatynę. Co ciekawe, barwienie białka SRm300 występuje również na terenie anormalnych ciałek PML, jednakże z dużo mniejszą intensywnością. Może to być efektem niespecyficznego sygnału, nie pochodzącego jednak z przeciwciała drugorzędowego.



Rycina 52. Analiza zmian lokalizacji oraz względnej ilości białka SRm300 u zwierząt z delecją białka PML. Obraz z mikroskopu konfokalnego przedstawiający jądra komórkowe neuronów zakrętu zębatego myszy z grupy kontrolnej CTRL-KO (zdjęcia A–C) oraz doświadczalnej PML-KO (zdjęcia D–E). Białko PML – kolor czerwony, białko SRm300 – kolor zielony, DNA (barwnik Hoechst) – kolor niebieski. Znacznik skali to 5 μ m.

W przypadku barwień skrawków mózgu pochodzących od zwierząt z delecją białka PML uzyskane wyniki nie wykazały zmian względnej ilości i lokalizację białka SRm300 w jądrze komórkowym w porównaniu do kontrolnych jąder komórkowych (Rycina 52). Widoczna zielona fluorescencja spowodowana jest konstytutywną ekspresją fluorescencyjnego białka fuzyjnego Cas9-GFP obecnego w genomie zwierząt transgenicznym linii Rosa26-Lox-STOP-Lox-Cas9-GFP.

5 Dyskusja

Aktualne rozumienie roli białka PML i ciałek jądrowych PML w układzie nerwowym jest oparte na zaledwie kilku publikacjach. Z dotychczasowych badań wynika, że białko PML pełni ważną rolę w **rozwoju układu nerwowego** młodych myszy, kontrolując proliferację komórek progenitorowych (Regad i in., 2009). Inne doniesienia wskazują na rolę białka PML w procesach uczenia się, w tym również w formowaniu się pamięci przestrzennej, co sprawdzono u dorosłych myszy **konstytutywnie** pozbawionych białka PML (Butler i in., 2013). Wiadomo również, że **PML jest pośrednio zaangażowany** w regulację cyklu dobowego w jądrze nadskrzyżowaniowym mózgu, gdzie jego obecność jest niezbędna dla prawidłowej lokalizacji jądrowej białka Per2 (Miki i in., 2012). Z pracy Hall i in. (2016) wynika, że jedną ze struktur, w których poziom **ekspresji PML** utrzymuje się na stosunkowo wysokim poziomie jest **hipokamp**. Z tego powodu oraz ze względu na nieliczne doniesienia dotyczące funkcji białka PML i ciałek jądrowych PML w **dojrzałym układzie nerwowym**, w niniejszej pracy podjęto próbę wyjaśnienia ich roli w neuronach hipokampa dorosłych myszy. Aby uzyskać zamierzony cel, wytworzono dwa modele zwierząt transgeniczných, z których jeden opierał się na podwyższonym poziomie, a drugi na usunięciu białka PML w hipokampie. W przypadku obu modeli modyfikacje „uruchamiano” u dorosłych zwierząt, nie ingerując w prawidłowy rozwój układu nerwowego. Spodziewano się, że zaburzenie działania PML doprowadzi do zmian na poziomie behawioralnym wynikających ze zmiany ekspresji genów, w którą PML może być pośrednio zaangażowany. Aby zaproponować mechanizmy molekularne związane z odmiennymi wzorcami ekspresji genów, przeanalizowano ultrastrukturę jąder komórkowych neuronów hipokampa i współwystępowanie z PML jego kanonicznych partnerów białkowych. W poniższej dyskusji poddano ocenie i rozważaniom każdy z etapów przedstawiony w wynikach rozprawy.

5.1 Czynniki wpływające na skuteczność procesu transgenezy

W niniejszej rozprawie metodą wyjściową mającą na celu otrzymanie linii myszy transgeniczných z indukowaną „nadekspresją” białka PML w hipokampie była mikroiniekcja DNA kodującego dodatkową kopię genu *Pml* do przedjądra zapłodnionej komórki jajowej. W trakcie trwających kilka miesięcy doświadczeń uzyskano 4 osobniki, które w swoim genomie posiadały wprowadzony gen, a 3 z nich przekazały go kolejnemu pokoleniu myszy. Powodem, dla którego jeden z osobników założycielskich nie przekazał dalej egzogennej sekwencji PML, mógł być czas integracji genu do genomu myszy. Pomimo mikroiniekcji DNA do

przedjądrza, czyli przed pierwszym podziałem komórkowym, istnieje możliwość, że wprowadzona sekwencja mogła wbudować się do genomu na późniejszym etapie podziału komórkowego. W takim przypadku dochodzi do powstania osobnika chimerycznego, u którego wprowadzony gen nie jest obecny we wszystkich komórkach ciała, w związku z czym może być nieobecny w komórkach rozrodczych. Tego typu zjawisko jest często obserwowane podczas transgenezy i może tłumaczyć nieprzekazanie wprowadzonej zmiany kolejnemu pokoleniu myszy (Behringer i in., 2013; Pinkert, 2014).

Innym wytłumaczeniem jest wykorzystana do wytworzenia modelu z podwyższonym poziomem białka PML transgeneza losowa. Brak możliwości kontrolowania miejsca integracji w tej metodzie może generować osobniki bezpłodne. Wobec tego istnieje możliwość braku międzypokoleniowej transmisji zmiany genetycznej. Ostatecznie istnieje również ryzyko otrzymania nieprawidłowych wyników genotypowania, spowodowanych kontaminacją próbki w trakcie przycinania końcówki ogona potrzebnego do izolacji DNA lub w trakcie reakcji PCR (pomimo kontroli negatywnej). Jest to jednak mało prawdopodobne, ponieważ każde zwierzę transgeniczne ponownie genotypowano, a w przypadku wątpliwości czynność tę przeprowadzano trzeci raz na materiale ze świeżo pobranej tkanki.

W trakcie doświadczeń prowadzących do uzyskania zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML w mózgu korzystano z różnych rozcieńczeń liniowego fragmentu egzogennej sekwencji DNA. Wydajność i czas, w którym dojdzie do uzyskania osobników transgenicznych, ściśle koreluje ze stężeniem cząsteczek DNA dostarczanych do przedjądrza jednokomórkowego zarodka. Wyższe stężenia DNA mogą pomóc w szybszym osiągnięciu zamierzonego celu. Z tego powodu doświadczenia rozpoczęto od wstrzykiwania DNA o wyższym stężeniu, co skutkowało jednak zwiększeniem lepkości zawiesiny (powodując zatykanie mikrokapilary), częstszym obumieraniem zarodków, a myszy urodzone z tych doświadczeń nie posiadały w swoim genomie wprowadzonego genu. Niższe stężenia DNA zapobiegały obumieraniu zarodków i doprowadziły do otrzymania zwierząt transgenicznych, choć – ze względu na niewielką ilość DNA – w dłuższej doświadczalnej perspektywie czasowej. Takie postępowanie jest standardową optymalizacją w procedurze mikroiniekcji do przedjądrzy (Behringer i in., 2013; Pinkert, 2014).

Należy również wspomnieć, że metoda mikroiniekcji do przedjądrzy jest metodą mało wydajną. Z reguły około 70% wyizolowanych zarodków spełnia warunki umożliwiające poddanie ich mikromanipulacjom. Składa się na to widoczność przedjądrzy, a także ogólna kondycja i prawidłowy obraz mikroskopowy zarodka. Przeżywalność zarodków poddanych

mikroiniekcji wynosi około 60%, a wydajność implantacji w drogach rodnych matek zastępczych około 30% (Gordon, 1997). Finalnie, według statystyk doświadczeń przeprowadzanych w Pracowni Modeli Zwierzęcych Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, liczba zwierząt transgeniczných wśród wszystkich urodzonych sięga około 2–5%. Biorąc pod uwagę czas poświęcony na naukę samodzielnego wykonywania wszystkich procedur potrzebnych do otrzymania myszy zmodyfikowanych genetycznie, liczba zwierząt transgeniczných uzyskana podczas realizacji niniejszego projektu doktorskiego nie odbiegała od liczby zwierząt oczekiwanej na podstawie skuteczności tej procedury.

5.2 Czynniki wpływające na analizę poziomu białka PML w uzyskanym modelu myszy transgeniczných

Ze względu na losową integrację egzogennege genu PML do genomu, każdego z otrzymanych osobników transgeniczných krzyżowano niezależnie. W przypadku transgenezy losowej każdy z założycieli i jego potomstwo są unikatowe pod względem liczby kopii, poziomu ekspresji i lokalizacji w genomie. Zatem wielu założycieli może posiadać różny poziom zmian w genomie (Lanigan i in., 2020).

System Cre/loxP, wykorzystany do wytworzenia zwierząt transgeniczných, sprawdzono wcześniej *in vivo* metodą Western blot przy użyciu plazmidu kontrolnego zawierającego białko fluorescencyjne EYFP. Wyniki te potwierdziły skuteczność systemu Cre/loxP. Decyzję dotyczące pracy z plazmidem kontrolnym podjęto ze względu na problemy z uzyskaniem specyficzności przeciwciała przeciwko białku PML. Zarówno plazmid zawierający sekwencję PML, jak i plazmid zawierający sekwencję białka EYFP klonowano w ten sam sposób, a wyniki uzyskanego sekwencjonowania potwierdziły 100% poprawność nukleotydową obu wektorów plazmidowych. Nie było zatem podstaw, aby sądzić, że plazmid zawierający sekwencję PML jest niefunkcjonalny.

W dalszej części wyników opisano barwienie metodą DAB. Miało ono na celu sprawdzenie i potwierdzenie działania indukowalnego modelu myszy podwójnie transgeniczných. Skuteczność detekcji białka PML metodą DAB w mózgu dojrzałych zwierząt potwierdziła praca Hall i in. (2016). Z tego powodu w niniejszej rozprawie zdecydowano o detekcji białka PML u zwierząt podwójnie transgeniczných DIO-EF1 α -PML^{CaMKII α -Cre-ERT2} korzystając z przeciwciała i protokołu przedstawionego w tejże pracy.

Pomimo otrzymania modelu myszy podwójnie transgenicznej, uzyskanie podwyższonego poziomu białka PML w mózgu nie powiodło się. Głównym powodem jest

fakt, że skuteczność działania wprowadzonej sekwencji egzogennej zależy może od miejsca jej lokalizacji w genomie. Oznacza to, że integracja genu może nastąpić w rejonie lub rejonach genomowych mniej aktywnych transkrypcyjnie, gdzie ekspresja jest na bardzo niskim poziomie lub rejonach genomu o niskiej dostępności dla rekombinazy Cre. Ponadto integracja losowa bywa niestabilna w czasie, co prowadzi do zmian ekspresji z pokolenia na pokolenie oraz zmian w liczbie kopii genu (Lanigan i in., 2020). Zważając na konieczność wyprowadzenia linii transgenicznej do pokolenia F5/F6, taki scenariusz był prawdopodobny. Wyniki genotypowania jednak nie wskazywały na utratę egzogennej sekwencji. Z powodu wyżej wymienionych trudności, a także z powodu braku widocznego efektu, zrezygnowano z pracy na zwierzętach podwójnie transgenicznych i rozpoczęto pracę nad kolejnym modelem umożliwiającym otrzymanie podwyższonego poziomu białka PML w hipokampie.

5.3 Wektory AAV jako skuteczne narzędzie uzyskania myszy z podwyższonym poziomem białka PML w neuronach hipokampa

Gotowe narzędzie jakim jest transgeniczna linia myszy DIO-EF1 α -PML wykorzystano jako element nowego modelu indukcji podwyższonego poziomu białka PML w hipokampie. W nowym modelu sekwencja CaMKII α -Cre uruchamiająca „nadekspresję” białka PML dostarczana była w formie wektora wirusowego podawanego bezpośrednio do hipokampa myszy transgenicznych DIO-EF1 α -PML.

Wektory wirusowe są skutecznym narzędziem pozwalającym na dostarczanie interesującej nas sekwencji do mózgu zwierząt w łatwy i szybki sposób. Najczęściej używanymi wektorami wirusowymi są retrowirusy (ang. *retroviruses*), lentiwirusy (ang. *lentiviruses*) oraz wirusy związane z adenowirusami (AAV). Te ostatnie, wykorzystane w niniejszej rozprawie, są małymi jednociowymi wirusami DNA, które zawierają dwie otwarte ramki odczytu Rep i Cap, otoczone dwoma odwróconymi powtórzeniami końcowymi (ITR). Sekwencje ITR, pomiędzy którymi znajduje się sekwencja interesującego nas genu wraz z promotorem, pomagają w tworzeniu wirusowych konkatamerów w jądrze komórki gospodarza. W komórkach dzielących się konkatamery te pozostają nienaruszone przez całe życie komórki gospodarza (Daya & Berns, 2008). Wektory AAV oprócz sekwencji Rep i Cap do replikacji wymagają plazmidu pomocniczego zawierającego geny adenowirusa. Zaletami pracy z wektorami AAV są: niska immunogenność i patogenność oraz, jak wspomniano wcześniej, zapewnienie długotrwałej ekspresji w komórkach dzielących się

(AAV infekują również komórki dzielące się) (Kotin i in., 1990). Wektory wirusowe wyróżniają się również możliwością efektywnej pracy zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*.

Pomimo obecności NLS w sekwencji białka PML uzyskany model myszy transgenicznym charakteryzował się cytoplazmatyczną lokalizacją białka PML. Hipotetycznym wytłumaczeniem tego nieoczekiwanego rezultatu może być fakt, że PML tworzy struktury wyższego rzędu, dimery, tetramery, oraz multimery (Li i in., 2019; P. Wang i in., 2018). Uzyskana „nadekspresja” mogła doprowadzić do powstania w cytoplazmie agregatów białka PML, które ze względu na swoje rozmiary, a także na prawdopodobieństwo zasłonięcia sekwencji NLS, uniemożliwiły transport białka do jądra. W otrzymanym modelu niemożliwa jest regulacja ilości powstającego białka. Uzyskany wynik jest bardzo ciekawy (oligomeryzacja PML często bywa związana z immortalizacją komórek nowotworowych (Li i in., 2019)), jednak ze względu na kierunek badań niniejszego doktoratu, którego celem było między innymi zbadanie morfologii jądra komórkowego, nie kontynuowano pracy z uzyskanym modelem zwierzęcym z cytoplazmatyczną lokalizacją białka PML. Biorąc pod uwagę, że jedna z izoform białka PML posiada lokalizację cytoplazmatyczną, w przyszłości należy rozważyć pracę z takim modelem, tym bardziej, że dostępne dane sugerują wpływ cytoplazmatycznej izoformy białka PML na sygnalizację cytokin (H.-K. Lin i in., 2004), apoptozę badaną na mysich embrionalnych fibroblastach (ang. *mouse embryonic fibroblasts*) (Giorgi i in., 2010) oraz obronę przeciwwirusową potwierdzoną w pracy na komórkach zainfekowanych wirusem HSV-1 (McNally i in., 2008).

Skutecznym narzędziem umożliwiającym uzyskanie zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML w hipokampie okazał się być wektor wirusowy rAAV-EF1 α -PML-T2A-mCherry. W modelu tym jądra komórek neuronalnych hipokampa posiadały ciała jądrowe PML znacznie większych rozmiarów oraz ciała te były liczniejsze niż w kontrolnych jądrach komórkowych (Rycina 18). W niniejszej pracy jako kontrolę zastosowano wektor wirusowy posiadający białko fluorescencyjne mCherry, które nie wpłynęło na wielkość i liczbę ciałek jądrowych PML. Porównując kontrolę mCherry do niezainfekowanych żadnym wektorem wirusowym jąder neuronów, samo białko mCherry lokalizuje się na obrzeżach jądra komórkowego neuronów. Spowodowane może być to faktem, że mCherry choć jest stosunkowo niedużym białkiem w dużych ilościach tworzy agregaty (Costantini i in., 2012). Na podstawie dostępnej literatury wiadomo jednak, że białko to jest rutynowo wykorzystywane jako kontrola do wielu doświadczeń i zwykle nie wywołuje efektów

niepożądanych w komórkach neuronalnych (Chavoshinezhad i in., 2021; DeRosa i in., 2015; Zhao i in., 2021).

5.4 Skuteczność systemu CRISPR/Cas9 umożliwiająca otrzymanie modelu z delecją białka PML

Pojawienie się w ostatnich latach techniki CRISPR/Cas9 zrewolucjonizowało nie tylko badania nad ludzkimi nowotworami czy chorobami neurodegeneracyjnymi, ale również ułatwiło uzyskiwanie modeli transgenicznych służących do badań podstawowych funkcji genów i białek *in vivo*. Technika CRISPR/Cas9 daje szansę na projektowanie zwierząt transgenicznych stanowiących modele o szerokim spektrum mutacji, występujących np. w ludzkich nowotworach, umożliwiając wielowątkowe prowadzenie badań (Lamprecht Tratar i in., 2018).

W modelu myszy z delecją białka PML wykorzystano Cre-zależny system CRISPR/Cas9. Zgodnie z przyjętą praktyką, aby zmaksymalizować prawdopodobieństwo skutecznego usunięcia i zminimalizować ryzyko powstania niepełnej formy białka, gRNA zaprojektowano dla początkowej sekwencji genu, a konkretnie dla dwóch pierwszych egzonów *Pml*, które, co istotne, są obecne we wszystkich izoformach białka PML. Skuteczność takiego postępowania (dla innego białka) potwierdzili w swojej pracy między innymi Mohr i in. (2016). Ponadto wybór miejsca, w które zostały skierowane sekwencje gRNA, podyktowany był również tym, że wszystkie izoformy genu PML posiadają identyczną sekwencję na N-końcu.

W kolejnych etapach pracy poddano weryfikacji funkcjonalność systemu CRISPR/Cas9 *in vitro*. Uzyskane wyniki potwierdziły spadek względnego poziomu mRNA dla genu PML. Należy pamiętać, że przy zastosowaniu wektorów wirusowych, stopień infekcji komórek, których naturalną reakcją jest obrona przed obcym materiałem, w tym wypadku materiałem wirusowym (aktywacja odpowiedzi przeciwwirusowej), nie jest stuprocentowy (Halbert i in., 1995; Laredj & Beard, 2011). Z tego powodu uznano, że skuteczność jest wystarczająca do kontynuacji pracy z uzyskanym modelem myszy.

5.5 Fenotyp behawioralny myszy z delecją białka PML charakteryzuje się obniżeniem zahamowań w sytuacjach lękowych i tendencją do zaburzeń pamięci operacyjnej

System klatek IntelliCage jest wydajnym, w pełni zautomatyzowanym systemem używanym do behawioralnych badań i szczegółowych analiz złożonych zachowań u myszy

żyjących w grupach (Kiryk i in., 2020), takich jak: aktywność (Ramboz i in., 1998), lęk (Heisler i in., 1998), agresja (Saudou i in., 1994) oraz uczenie się i pamięć (Bach i in., 1995; Büeler i in., 1992). W niniejszej pracy zadania, którym poddano zwierzęta w systemie klatek IntelliCage, dotyczyły przede wszystkim procesów związanych z uczeniem się i pamięcią (w jednym z testów gdzie zastosowano bodziec awersyjny). Szczegółowej ocenie poddano również aktywność zwierząt. Niniejsza praca dostarcza pierwszych informacji, jak podwyższony poziom bądź delecja białka PML wpływa na procesy uczenia się i pamięci u dorosłych myszy.

Ocenę zmian w zachowaniu zwierząt poddanych modyfikacjom rozpoczęto od analizy wyników uzyskanych w teście *clockwise* i *counter-clockwise*. Oba testy rozpoczynały się dla każdej myszy indywidualnie od dowolnego rogu, po odwiedzeniu którego w celu uzyskania dostępu do wody konieczna była kontynuacja poruszania się w klatce zgodnie z kierunkiem ruchu wskazówek zegara lub w kierunku przeciwnym. Zadania te pozwoliły na monitorowanie zmian w formowaniu zarówno pamięci przestrzennej, jak i proceduralnej (Albuquerque i in., 2013; Endo i in., 2011). Myszy z obu grup doświadczalnych w porównaniu do obu grup kontrolnych wykazały podobne, przedstawione jako procent poprawnych wizyt, i prawidłowe tempo nauki wyznaczonego im zadania. Wzrost proporcji poprawnych wizyt wynika ze spadku liczby wizyt niepoprawnych przy nie zmieniającej się liczbie wizyt poprawnych. W trakcie trwających testów oceniono również aktywność zwierząt poprzez sprawdzenie liczby wszystkich puknięć nosem w poidło z wodą. W pierwszych dniach zwierzęta, wykazując naturalny mechanizm poszukiwania rogu z dostępem do wody, wykazały wyższą aktywność, która malała wraz z nabywaniem umiejętności prawidłowego wyboru rogu z wodą w kolejnych dniach testu; różnice te jednak nie były istotne pomiędzy poszczególnymi grupami. U myszy z podwyższonym poziomem białka PML w hipokampie w teście *counter-clockwise* zauważono jedynie tendencję do udzielania większej liczby poprawnych odpowiedzi przy mniejszej aktywności.

Z wielu dotychczas przeprowadzonych badań wiadomo, że zmiany w hipokampie wiążą się z upośledzeniem zdolności uczenia się w testach *clockwise* oraz *counter-clockwise* (Voikar i in., 2018). Mysi model zwierzęcy z mutacją w genie *Rsk2*, u ludzi powodującą zespół Coffina-Lowry'ego charakteryzujący się między innymi niepełnosprawnością intelektualną, wykazał znaczne deficyty w uczeniu się i pamięci w testach *clockwise* i *counter-clockwise* w systemie IntelliCage (Fischer i in., 2017). Wspomniany przykład dotyczy jednak poznanej

i dobrze scharakteryzowanej jednostki chorobowej. Nie jest znana jednostka chorobowa związana z mutacją (dezaktywacją) genu *Pml*.

Testy *clockwise* i *counter-clockwise* są jednymi z bardziej neutralnych i wyjątkowo czułych testów. W trakcie trwania wyznaczonych zadań zwierzęta nie otrzymują dodatkowej stymulacji w postaci np. słodzonej wody lub bodźca awersyjnego, co mogłoby powodować ewentualne zmiany w zachowaniu myszy. Sprawia to jednak, że modyfikacje, których efekty nie są wyraźnie zaznaczone, bywają niedostrzeżone lub nie do wychycenia. Rozpoczynając analizę behawioralną od tych testów spodziewano się, że ich wynik dostarczy odpowiedzi na pytanie dotyczące intensywności wprowadzonych modyfikacji. Uzyskane wyniki dostarczyły zatem informacji o tym, że wprowadzone modyfikacje zarówno w przypadku myszy z podwyższonym poziomem, jak i delecją białka PML są na tyle subtelne, że nie wpływają na zaburzenia w prawidłowym formowaniu się pamięci przestrzennej i proceduralnej w testach *clockwise* i *counter-clockwise*. Brak różnic może wynikać również z heterogennością zmiany genetycznej w tkance nerwowej, związanej z nierównomierną dystrybucją wektora wirusowego.

Kolejno przeprowadzono analizę wyników uzyskanych w teście uczenia się progresywnego. Z reguły test ten wykonywany jest na mysich lub szczurzych modelach depresji (Jastrzębska i in., 2016; Poggini i in., 2019), modelach uzależnień, np. od opioidów (morfina) (Skupio i in., 2017), a także odpowiedzi na różnego typu uzależniające używki, np. amfetaminę, kokainę (Thomsen & Caine, 2006) czy alkohol (Radwanska & Kaczmarek, 2012). Różne formy testu uczenia się progresywnego wykorzystywano zarówno na modelach z indukcją ekspresji badanych genów, jak i ich upośledzeniem w hipokampie. Do przykładów można zaliczyć badania przedstawione w pracy Serchowa i in. (2020), w których stosując test uczenia się progresywnego sprawdzano funkcjonalność indukowanej ekspresji receptora adenyliny A1R w hipokampie, promującego działanie przeciwdepresyjne i przeciwłękowe wywołane stresem (jako model chronicznej depresji). W innym badaniu na mysim modelu z uszkodzonym hipokampem Voikar i in. (2018) przedstawili zaburzenia aktywności w teście z dostępem do wody w określonych przedziałach czasowych.

W niniejszej rozprawie test uczenia się progresywnego miał na celu sprawdzenie rozwoju reakcji instrumentalnej polegającej na wykonywaniu przez zwierzę odpowiedniej, zwiększającej się na każdym kolejnym poziomie, liczby puknięć nosem umożliwiającej uzyskanie dostępu do wody. W przeprowadzonych doświadczeniach podawano wodę bez dodatków, ponieważ, tak jak w przypadku poprzednich przeprowadzonych testów *clockwise*

i *counter-clockwise*, wybrano jego możliwie najbardziej neutralną formę. Uważano, że sama chęć napicia się powinna być wystarczającą motywacją dla zwierząt, umożliwiającą sprawdzenie, czy wprowadzone modyfikacje mają wpływ na prawidłowe funkcjonowanie pamięci operacyjnej.

Wyniki testu uczenia się progresywnego wykazały, że myszy z podwyższonym poziomem białka PML w hipokampie w pierwszym dniu testu pokonały istotnie mniejszą liczbę poziomów w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Niestety ze względu na utratę danych z pozostałych dni testu analiza możliwa była jedynie dla pierwszej doby. Przerwanie testu nastąpiło pod jego koniec (w piątej dobie) i nie zdecydowano się na jego powtórzenie, ponieważ po tym jak zwierzęta już raz przeszły wyznaczony cykl testu prawdopodobne było otrzymanie niemiernodajnych wyników. Ze względu na niekompletność danych dla myszy z podwyższonym poziomem białka PML nie przeprowadzono analizy aktywności, ponieważ na podstawie jednego dnia nie należy wysnuwać jakichkolwiek wniosków.

Wyniki uzyskane dla myszy z delecją białka PML w hipokampie dla całego testu uczenia się progresywnego wykazały istotną statystycznie różnicę między grupą doświadczalną i kontrolną. Zwierzęta z delecją białka PML pokonywały kolejne poziomy testu wolniej od zwierząt z grupy kontrolnej. Ze względu na brak pomyślnego pokonywania kolejnych poziomów testu, po tym jak zwierzęta kontrolne zakończyły swoje zadanie, test został zakończony również dla zwierząt doświadczalnych ze względu na ich dobrostan i konieczność uzyskania dostępu do wody. Otrzymane rezultaty wskazują, że manipulacje poziomem białka PML (zarówno w przypadku podwyższonego poziomu, jak i delecji) prowadzą do **zaburzenia pamięci operacyjnej** uniemożliwiającej nawet przy znacznie większej aktywności (w przypadku zwierząt z delecją) wykonanie prawidłowej i ciągłej ilości puknięć nosem w celu napicia się wody.

Test Vogla, a w zasadzie test konfliktu Vogla, jest testem stosowanym głównie w farmakologii i w większości przypadków służy do określenia właściwości przeciwlękowych leków, a tym samym umożliwia przewidywanie, które leki mogą nasilać lub zapobiegać zaburzeniom lub ostrym stanom lękowym (Witkin, 2011). Test polega na tłumieniu zachowań poprzez karanie zwierzęcia, z reguły poprzez rażenie go prądem (bodziec awersyjny), w trakcie próby zdobycia pożywienia lub wody. Przykładowo, zastosowanie tego testu pomogło wykazać, że myszy, którym podano lek przeciwlękowy, częściej wracały do miejsca, w którym otrzymały karę, co potwierdziło skuteczność działania leków mających na celu obniżenie poziomu lęku (Millan, 2003).

W niniejszej rozprawie zastosowano zmodyfikowaną i łagodniejszą wersję tego testu. Myszy przy próbie napicia się wody otrzymywały bodziec awersyjny w postaci podmuchu powietrza w nos powtarzany raz na dobę przez 4 dni. Przeprowadzony test oceniał, czy wprowadzone modyfikacje wpłyną na poziom lęku mierzony jako czas powrotu do rogu po otrzymaniu bodźca awersyjnego, tak u zwierząt z podwyższonym poziomem, jak i u zwierząt z delecją białka PML (w porównaniu do zwierząt z grup kontrolnych). Wyniki dla myszy z podwyższonym poziomem białka PML w hipokampie nie wykazały różnic w czasie powrotu do rogu z wodą po otrzymaniu bodźca awersyjnego.

Myszy z usuniętym białkiem PML w teście Vogla w trzecim dniu testu wykazały istotną statystycznie różnicę w czasie powrotu do rogu po otrzymaniu bodźca awersyjnego w porównaniu do zwierząt kontrolnych, u których czas ten był dłuższy. Ponadto, w ciągu wszystkich trzech dni testu, zwierzęta z delecją wykazały istotnie większą aktywność mierzoną w ciągu 1 godziny po otrzymaniu bodźca. Uzyskane wyniki potwierdziły, że myszy z delecją białka PML wykazują zaburzenia w formowaniu pamięci związanej ze strachem. Podobne wyniki na mysim modelu z konstytutywną delecją białka PML otrzymali Butler i in. (2013), którzy wykonali między innymi test uniesionego labiryntu krzyżowego, w trakcie którego myszy typu „knock-out” spędzały więcej czasu i dużo chętniej eksplorowały otwarte ramiona labiryntu (w porównaniu do grupy kontrolnej). Innym testem był test otwartego pola, który wykazał, że te same myszy spędzają mniej czasu przy ścianach klatki przy jednoczesnym braku różnic (między grupami) w całkowitym pokonanym dystansie.

Przeprowadzone testy behawioralne pokazały, że zaburzenia ekspresji białka PML mają wpływ na funkcje kognitywne myszy. Choć wykazano, że podwyższenie lub obniżenie poziomu PML nie ma wpływu na formowanie pamięci przestrzennej i proceduralnej (testy *clockwise* oraz *counter-clockwise*), zaburzenia ekspresji mają znaczenie dla pamięci operacyjnej oraz dla progu lękowego. Zarówno „nadekspresja”, jak i „knock-out” PML doprowadziły do pogorszenia pamięci operacyjnej (test uczenia się progresywnego), co zwierzęta z delecją PML próbowały kompensować wyższą aktywnością ze względu na brak dostępu do wody. Zwierzęta z delecją PML wykazywały niższy próg lękowy (test Vogla) w połączeniu z wyższą aktywnością w czasie godziny od otrzymania bodźca awersyjnego.

Brak wpływu podwyższonego bądź obniżonego poziomu PML na formowanie pamięci przestrzennej i proceduralnej (testy *clockwise* oraz *counter-clockwise*) jest zaskakujący w świetle wyraźnej zmienionej liczby i wielkości ciałek jądrowych PML bądź ich zupełnego braku w jądrach komórkowych neuronów hipokampa. Z drugiej strony należy pamiętać, że

w uzyskanych modelach poziom białka PML uległ podwyższeniu lub delecji tylko w tych komórkach, które zostały pomyślnie zainfekowane wektorem wirusowym. Sama infekcja wektorem wirusowym może wywoływać odpowiedź antywirusową, która potencjalnie ogranicza efektywność modyfikacji genetycznych w tkance. Wszystkie testy behawioralne przeprowadzono na grupach zwierząt składających się wyłącznie z samic; istnieją doniesienia, że samice w testach prowadzonych w klatkach IntelliCage uczą się szybciej niż samce (Mifflin i in., 2021), a estrogen i progesteron wpływają na uczenie się i pamięć (Rapp i in., 2021). Nie da się zatem wykluczyć, że uzyskany fenotyp może być zależny od płci.

5.6 Zmiany kondensacji i rozmieszczenia euchromatyny i heterochromatyny oraz białek współwystępujących z PML w jądrach komórkowych neuronów z podwyższonym poziomem białka PML

Choć istnieje wiele doniesień potwierdzających istotną rolę białka PML i ciałek jądrowych PML w regulacji kondensacji chromatyny, brak jest szczegółowych informacji dotyczących zmian w jądrze komórkowym neuronów, które wynikałyby z podwyższonego poziomu bądź delecji białka PML. Ciałka PML są przede wszystkim miejscem rekrutacji oraz magazynowania licznych białek będących czynnikami modyfikującymi dostępność chromatyny, np. białka CREB (CBP), acetylotransferazy histonów (HAT) zaangażowanej w regulację transkrypcji, czy białka HP1 (Doucas i in., 1999; von Mikecz i in., 2000; J. Wang i in., 2004). Co ważne, jednym z konstytutywnych składników ciałek jądrowych PML jest białko DAXX (Everett, Earnshaw, i in., 1999; Ishov i in., 1999) będące białkiem opiekuńczym histonu H3.3 powiązanego z regulacją transkrypcji (Drané i in., 2010). DAXX jest białkiem wchodzącym w interakcję z białkiem ATRX, które również jest komponentem ciałek jądrowych PML i białkiem opiekuńczym histonu H3.3 (Goldberg i in., 2010; Lewis i in., 2010). Inne badanie wskazuje na obecność w ciałkach jądrowych innych wariantów histonów (których rekrutacja zależna jest od białka DAXX), sugerując rolę ciałek jądrowych PML w sortowaniu poszczególnych wariantów histonów i ich włączaniu do chromatyny przez różne białka obecne w ciałkach jądrowych (Corpet i in., 2014; Delbarre i in., 2013). Co ważne, ciałka jądrowe PML magazynują konstytutywnie również białko SETDB1 będące metylotransferazą specyficzną dla lizyny 9 histonu H3 (Cho i in., 2011). W świetle wyżej opisanych informacji w niniejszej pracy podjęto się próby wyjaśnienia, czy uzyskane modyfikacje mogą mieć wpływ na partnerów białkowych PML związanych ze zmianą struktury i aktywności chromatyny (ang. *chromatin remodeling*; DAXX i ATRX) oraz na

zmiany zachodzące w chromatynie zarówno aktywnej (modyfikacja H3K9ac), jak i nieaktywnej (modyfikacje H3K9me2 i H3K9me3) transkrypcyjnie.

Wpływ zmian spowodowanych modyfikacjami genetycznymi jest zgodny ze sposobem interakcji przypisywanym badanym parterom białkowym PML. Poziom DAXX – białka obecnego w ciałkach jądrowych PML konstytutywnie i współwystępującego z białkiem PML – zwiększa się lub zmniejsza współmiernie do zwiększonej bądź zmniejszonej ekspresji białka PML w jądrach komórkowych neuronów. Wiadomo, że w stymulowanych neuronach aktywowane przez kalcyneurynę białko DAXX jest potrzebne do deponowania niekanonicznego histonu H3.3 w miejscach aktywnych transkrypcyjnie, wspomagając ekspresję niektórych genów wczesnej odpowiedzi (ang. *immediate early genes*): *c-Fos*, *Egr2*, *Dusp6*, *Bdnf* (egzon IV) (Michod i in., 2012). Wobec tego zależna od poziomu PML obecność DAXX w jądrze może mieć znaczenie dla uruchamiania bądź podtrzymywania transkrypcji genów zaangażowanych w plastyczność synaptyczną i synaptogenezę, czyli molekularne mechanizmy tworzenia pamięci. Jako że DAXX (wraz z ATRX) jest potrzebny do deponowania histonu H3.3 również w telomerach (Lewis i in., 2010), modulacja jego poziomu w jądrze uzyskana pośrednio przez zmiany poziomu PML może wpływać na utrzymanie struktury telomerów. Efekt ten może jednak nie mieć znaczenia w wytworzonych modelach zwierzęcych, ponieważ modyfikacjom genetycznym ulegały dojrzałe (nieproliferujące) neurony hipokampa. Natomiast ATRX – białko fakultatywnie rezydujące w ciałkach jądrowych PML w komórkach dzielących się (Xue i in., 2003) – nie lokalizuje się w ciałkach PML neuronów hipokampa i jest obecne w jądrach tych komórek niezależnie od poziomu białka PML.

W przypadku zmian związanych z modyfikacjami potranslacyjnymi histonów różnice widoczne są wyłącznie w modelu z podwyższonym poziomem białka PML w neuronach hipokampa. Zwiększona ilość białka PML w widoczny sposób ogranicza w jądrze komórkowym przestrzeń dla chromatyny. Wpływa to na organizację przestrzenną chromatyny aktywnej transkrypcyjnie (H3K9ac), która jest bardziej upakowana. Z kolei chromatyna, która jest nieaktywna transkrypcyjnie, wykazuje zwiększony udział modyfikacji związanej z konstytutywnym wyłączeniem genów (H3K9me3) kosztem udziału modyfikacji związanej z fakultatywnym wyłączeniem genów (H3K9me2). Wszystkie te zmiany mogą potencjalnie zmniejszać dostępność chromatyny dla czynników transkrypcyjnych. Duża ilość białka PML zdaje się sekwestrować białko SRm300, utrudniając jego prawidłową lokalizację w cętkach

jądrowych zaangażowanych w metabolizm mRNA i w ten sposób potencjalnie hamując dojrzewanie transkryptów.

Wobec znaczących zmian na poziomie komórkowym, które widoczne są jedynie dla modelu z podwyższonym poziomem białka PML, zaskakujący jest fakt, że w modelu tym nie stwierdzono zmian fenotypu behawioralnego (poza pierwszym dniem nieukończonego testu uczenia się progresywnego). Z kolei w modelu z delecją białka PML, mimo braku zmian w strukturze chromatyny, zaobserwowano efekt behawioralny związany z pogorszeniem pamięci operacyjnej i zmniejszeniem progu lękowego zwierząt. Czynnikiem, który umożliwia wy tłumaczenie na poziomie molekularnym efektu behawioralnego w modelu z delecją białka PML, jest upośledzenie aktywacji genów wczesnej odpowiedzi zależnej od DAXX. U zwierząt z podwyższonym poziomem białka PML potencjalne wzmocnienie aktywacji genów odpowiedzi wczesnej związane ze zwiększoną obecnością DAXX w jądrach neuronów hipokampa nie prowadzi do poprawienia funkcji kognitywnych tych zwierząt.

Innym istotnym dla prawidłowej funkcji neuronów partnerem białka PML jest białko wczesnej odpowiedzi Arc, które lokalizuje się w ciałkach jądrowych PML i promuje ich powstawanie w jądrach stymulowanych neuronów (Bloomer i in., 2007). Jądrowa lokalizacja Arc jest konieczna do obniżenia ekspresji GluA1, czyli podjednostki receptora AMPA (AMPA) (Korb i in., 2013). Redukowanie poziomu AMPAR, obniżające pobudliwość neuronów, jest procesem homeostatycznym niezbędnym do prawidłowego formowania pamięci. Dynamika lokalizacji Arc w jądrach neuronów wytworzonych modeli zwierzęcych może stanowić przedmiot przyszłych badań zmierzających do zaproponowania molekularnego podłoża zaobserwowanych efektów behawioralnych.

6 Podsumowanie i wnioski

Podsumowując, w niniejszej pracy:

1. Otrzymano dwa modele genetycznie zmodyfikowanych myszy: model z podwyższonym poziomem białka PML oraz model z delecją białka PML. W obu modelach modyfikacja genetyczna była indukowana w neuronach hipokampa w wybranym momencie życia dorosłego zwierzęcia.
2. Testy behawioralne wykazały, że delecja białka PML w neuronach hipokampa pogorszyła pamięć operacyjną i obniżyła próg lękowy zwierząt. Testy behawioralne wykazały również, że wprowadzone modyfikacje genetyczne jednocześnie nie zaburzyły formowania pamięci przestrzennej i proceduralnej.
3. Morfologia jąder komórkowych neuronów hipokampa oraz organizacja zawartej w nich chromatyny wykazały znaczne zmiany u zwierząt z podwyższonym poziomem, lecz nie u zwierząt z delecją białka PML. W modelu z podwyższonym poziomem białka PML chromatyna aktywna transkrypcyjnie była bardziej upakowana, a nieaktywna transkrypcyjnie chromatyna charakteryzowała się zwiększonym udziałem modyfikacji związanych z konstytutywnym wyłączeniem genów kosztem udziału modyfikacji związanych z fakultatywnym wyłączeniem genów.

7 Bibliografia

1. Abremski, K., & Hoess, R. (1984). Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(3), 1509–1514.
2. Abremski, K., Hoess, R., & Sternberg, N. (1983). Studies on the properties of P1 site-specific recombination: Evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell*, 32(4), 1301–1311. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90311-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90311-2)
3. Ahn, J. H., & Hayward, G. S. (1997). The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *Journal of Virology*, 71(6), 4599–4613. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.6.4599-4613.1997>
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (wydanie 4). Garland Science.
5. Albuquerque, B., Häussler, A., Vannoni, E., Wolfer, D. P., & Tegeder, I. (2013). Learning and memory with neuropathic pain: Impact of old age and progranulin deficiency. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7, 174. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00174>
6. Amaral, D., & Lavenex, P. (2007). *The Hippocampus Book, chapter 3. Hippocampal Neuroanatomy* (Oxford University Press).
7. Andersen, P., Bliss, T. V., Lomo, T., Olsen, L. I., & Skrede, K. K. (1969). Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiologica Scandinavica*, 76(1), 4A-5A. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1969.tb04499.x>
8. Anderson, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2007). *The Hippocampus Book, chapter 1. The Hippocampal Formation* (Oxford University Press).
9. Babinet, C. (1990). [Transgenic mice as models for human diseases]. *La Revue Du Praticien*, 40(20), 1859–1862.
10. Bach, M. E., Hawkins, R. D., Osman, M., Kandel, E. R., & Mayford, M. (1995). Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. *Cell*, 81(6), 905–915. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90010-1)
11. Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., & Oren, M. (1993). Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *The EMBO Journal*, 12(2), 461–468.
12. Behringer, R., Gertsenstein, M., Vintersten Nagy, K., & Nagy, A. (2013). *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.
13. Bellini, M. (2000). Coilin, more than a molecular marker of the cajal (coiled) body. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*,

- 22(9), 861–867. [https://doi.org/10.1002/1521-1878\(200009\)22:9<861::AID-BIES12>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1521-1878(200009)22:9<861::AID-BIES12>3.0.CO;2-Y)
14. Berciano, M. T., Calle, E., Andres, M. A., Berciano, J., & Lafarga, M. (1996). Schwann cell nuclear remodelling and formation of nuclear and coiled bodies in Guillain-Barré syndrome. *Acta Neuropathologica*, 92(4), 386–394. <https://doi.org/10.1007/s004010050534>
 15. Bernardi, R., & Pandolfi, P. P. (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(12), 1006–1016. <https://doi.org/10.1038/nrm2277>
 16. Bernardi, R., Scaglioni, P. P., Bergmann, S., Horn, H. F., Vousden, K. H., & Pandolfi, P. P. (2004). PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nature Cell Biology*, 6(7), 665–672. <https://doi.org/10.1038/ncb1147>
 17. Bloomer, W. A. C., VanDongen, H. M. A., & VanDongen, A. M. J. (2007). Activity-regulated cytoskeleton-associated protein Arc/Arg3.1 binds to spectrin and associates with nuclear promyelocytic leukemia (PML) bodies. *Brain Research*, 1153, 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.03.079>
 18. Bockamp, E., Sprengel, R., Eshkind, L., Lehmann, T., Braun, J. M., Emmrich, F., & Hengstler, J. G. (2008). Conditional transgenic mouse models: From the basics to genome-wide sets of knockouts and current studies of tissue regeneration. *Regenerative Medicine*, 3(2), 217–235. <https://doi.org/10.2217/17460751.3.2.217>
 19. Boisvert, F. M., Hendzel, M. J., & Bazett-Jones, D. P. (2000). Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *The Journal of Cell Biology*, 148(2), 283–292. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.2.283>
 20. Borden, K. L., Boddy, M. N., Lally, J., O'Reilly, N. J., Martin, S., Howe, K., Solomon, E., & Freemont, P. S. (1995). The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML. *The EMBO Journal*, 14(7), 1532–1541.
 21. Borden, K. L., CampbellDwyer, E. J., & Salvato, M. S. (1997). The promyelocytic leukemia protein PML has a pro-apoptotic activity mediated through its RING domain. *FEBS Letters*, 418(1–2), 30–34. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)01344-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)01344-6)
 22. Brasch, K., & Ochs, R. L. (1992). Nuclear bodies (NBs): A newly „rediscovered” organelle. *Experimental Cell Research*, 202(2), 211–223. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(92\)90068-j](https://doi.org/10.1016/0014-4827(92)90068-j)
 23. Brinster, R. L., & Palmiter, R. D. (1984). Introduction of genes into the germ line of animals. *Harvey Lectures*, 80, 1–38.
 24. Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M., & Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, 356(6370), 577–582. <https://doi.org/10.1038/356577a0>

25. Burger, C., Nash, K., & Mandel, R. J. (2005). Recombinant adeno-associated viral vectors in the nervous system. *Human Gene Therapy*, *16*(7), 781–791. <https://doi.org/10.1089/hum.2005.16.781>
26. Butler, K., Martinez, L. A., & Tejada-Simon, M. V. (2013). Impaired cognitive function and reduced anxiety-related behavior in a promyelocytic leukemia (PML) tumor suppressor protein-deficient mouse: Impaired cognitive function and reduced anxiety-related behavior in a PML knockout mouse. *Genes, Brain and Behavior*, *12*(2), 189–202. <https://doi.org/10.1111/gbb.12014>
27. Carbone, R., Pearson, M., Minucci, S., & Pelicci, P. G. (2002). PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. *Oncogene*, *21*(11), 1633–1640. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205227>
28. Carvalho, A., Rea, I. M., Parimon, T., & Cusack, B. J. (2014). Physical activity and cognitive function in individuals over 60 years of age: A systematic review. *Clinical Interventions in Aging*, *9*, 661–682. <https://doi.org/10.2147/CIA.S55520>
29. Chang, K. S., Fan, Y. H., Andreeff, M., Liu, J., & Mu, Z. M. (1995). The PML gene encodes a phosphoprotein associated with the nuclear matrix. *Blood*, *85*(12), 3646–3653.
30. Charpentier, E., & Doudna, J. A. (2013). Biotechnology: Rewriting a genome. *Nature*, *495*(7439), 50–51. <https://doi.org/10.1038/495050a>
31. Chavoshinezhad, S., Zibaii, M. I., Seyed Nazari, M. H., Ronaghi, A., Asgari Taei, A., Ghorbani, A., Pandamooz, S., Salehi, M. S., Valian, N., Motamedi, F., Haghparast, A., & Dargahi, L. (2021). Optogenetic stimulation of entorhinal cortex reveals the implication of insulin signaling in adult rat's hippocampal neurogenesis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *111*, 110344. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110344>
32. Chelbi-Alix, M. K., Quignon, F., Pelicano, L., Koken, M. H., & de Thé, H. (1998). Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukemia protein. *Journal of Virology*, *72*(2), 1043–1051. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.2.1043-1051.1998>
33. Chen, S., Wang, Z., & Chen, Z. (1995). Acute promyelocytic leukemia: From clinic to molecular biology. *Stem Cells*, *13*(1), 22–31. <https://doi.org/10.1002/stem.5530130104>
34. Cho, S., Park, J. S., & Kang, Y.-K. (2011). Dual functions of histone-lysine N-methyltransferase Setdb1 protein at promyelocytic leukemia-nuclear body (PML-NB): Maintaining PML-NB structure and regulating the expression of its associated genes. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(47), 41115–41124. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.248534>
35. Condemine, W., Takahashi, Y., Zhu, J., Puvion-Dutilleul, F., Guegan, S., Janin, A., & de Thé, H. (2006). Characterization of endogenous human promyelocytic leukemia isoforms. *Cancer Research*, *66*(12), 6192–6198. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3792>

36. Conlan, L. A., McNees, C. J., & Heierhorst, J. (2004). Proteasome-dependent dispersal of PML nuclear bodies in response to alkylating DNA damage. *Oncogene*, *23*(1), 307–310. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207119>
37. Corpet, A., Olbrich, T., Gwerder, M., Fink, D., & Stucki, M. (2014). Dynamics of histone H3.3 deposition in proliferating and senescent cells reveals a DAXX-dependent targeting to PML-NBs important for pericentromeric heterochromatin organization. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *13*(2), 249–267. <https://doi.org/10.4161/cc.26988>
38. Costantini, L. M., Fossati, M., Francolini, M., & Snapp, E. L. (2012). Assessing the tendency of fluorescent proteins to oligomerize under physiologic conditions. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *13*(5), 643–649. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01336.x>
39. Cremer, T., Kreth, G., Koester, H., Fink, R. H., Heintzmann, R., Cremer, M., Solovei, I., Zink, D., & Cremer, C. (2000). Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: An integrated view of the functional nuclear architecture. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, *10*(2), 179–212.
40. Daya, S., & Berns, K. I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical Microbiology Reviews*, *21*(4), 583–593. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-08>
41. de Thé, H., Le Bras, M., & Lallemand-Breitenbach, V. (2012). The cell biology of disease: Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies. *The Journal of Cell Biology*, *198*(1), 11–21. <https://doi.org/10.1083/jcb.201112044>
42. Delbarre, E., Ivanauskiene, K., Küntziger, T., & Collas, P. (2013). DAXX-dependent supply of soluble (H3.3-H4) dimers to PML bodies pending deposition into chromatin. *Genome Research*, *23*(3), 440–451. <https://doi.org/10.1101/gr.142703.112>
43. Dellaire, G., & Bazett-Jones, D. P. (2004). PML nuclear bodies: Dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *26*(9), 963–977. <https://doi.org/10.1002/bies.20089>
44. Dellaire, G., Ching, R. W., Dehghani, H., Ren, Y., & Bazett-Jones, D. P. (2006). The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism. *Journal of Cell Science*, *119*(Pt 6), 1026–1033. <https://doi.org/10.1242/jcs.02816>
45. Demayo, J. L., Wang, J., Liang, D., Zhang, R., & Demayo, F. J. (2012). Genetically Engineered Mice by Pronuclear DNA microinjection. *Current Protocols in Mouse Biology*, *2*, 245–262. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo110168>
46. DeRosa, B. A., Belle, K. C., Thomas, B. J., Cukier, H. N., Pericak-Vance, M. A., Vance, J. M., & Dykxhoorn, D. M. (2015). hVGAT-mCherry: A novel molecular tool for analysis of GABAergic neurons derived from human pluripotent stem cells. *Molecular and cellular neurosciences*, *68*, 244–257. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.08.007>
47. Doucas, V., Tini, M., Egan, D. A., & Evans, R. M. (1999). Modulation of CREB binding protein function by the promyelocytic (PML) oncoprotein suggests a role for nuclear

- bodies in hormone signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), 2627–2632. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.2627>
48. Drané, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., & Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes & Development*, 24(12), 1253–1265. <https://doi.org/10.1101/gad.566910>
 49. Du, Y., Xie, W., Zhang, F., & Liu, C. (2019). Chimeric Mouse Generation by ES Cell Blastocyst Microinjection and Uterine Transfer. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1874, 99–114. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8831-0_6
 50. Duprez, E., Saurin, A. J., Desterro, J. M., Lallemand-Breitenbach, V., Howe, K., Boddy, M. N., Solomon, E., de Thé, H., Hay, R. T., & Freemont, P. S. (1999). SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: Implications for nuclear localisation. *Journal of Cell Science*, 112 (Pt 3), 381–393.
 51. Endo, T., Maekawa, F., Vöikar, V., Haijima, A., Uemura, Y., Zhang, Y., Miyazaki, W., Suyama, S., Shimazaki, K., Wolfer, D. P., Yada, T., Tohyama, C., Lipp, H.-P., & Kakeyama, M. (2011). Automated test of behavioral flexibility in mice using a behavioral sequencing task in IntelliCage. *Behavioural Brain Research*, 221(1), 172–181. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.037>
 52. Eskiw, C. H., Dellaire, G., Mymryk, J. S., & Bazett-Jones, D. P. (2003). Size, position and dynamic behavior of PML nuclear bodies following cell stress as a paradigm for supramolecular trafficking and assembly. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 21), 4455–4466. <https://doi.org/10.1242/jcs.00758>
 53. Everett, R. D., Earnshaw, W. C., Pluta, A. F., Sternsdorf, T., Ainsztein, A. M., Carmena, M., Ruchaud, S., Hsu, W. L., & Orr, A. (1999). A dynamic connection between centromeres and ND10 proteins. *Journal of Cell Science*, 112 (Pt 20), 3443–3454.
 54. Everett, R. D., Meredith, M., & Orr, A. (1999). The ability of herpes simplex virus type 1 immediate-early protein Vmw110 to bind to a ubiquitin-specific protease contributes to its roles in the activation of gene expression and stimulation of virus replication. *Journal of Virology*, 73(1), 417–426. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.1.417-426.1999>
 55. Fagioli, M., Alcalay, M., Tomassoni, L., Ferrucci, P. F., Mencarelli, A., Riganelli, D., Grignani, F., Pozzan, T., Nicoletti, I., Grignani, F., & Pelicci, P. G. (1998). Cooperation between the RING + B1-B2 and coiled-coil domains of PML is necessary for its effects on cell survival. *Oncogene*, 16(22), 2905–2913. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201811>
 56. Feil, R., Wagner, J., Metzger, D., & Chambon, P. (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(3), 752–757. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7124>
 57. Fischer, M., Cabello, V., Popp, S., Krackow, S., Hommers, L., Deckert, J., Lesch, K.-P., & Schmitt-Böhrer, A. G. (2017). Rsk2 Knockout Affects Emotional Behavior in the

- IntelliCage. *Behavior Genetics*, 47(4), 434–448. <https://doi.org/10.1007/s10519-017-9853-3>
58. Gaboli, M., Gandini, D., Delva, L., Wang, Z. G., & Pandolfi, P. P. (1998). Acute promyelocytic leukemia as a model for cross-talk between interferon and retinoic acid pathways: From molecular biology to clinical applications. *Leukemia & Lymphoma*, 30(1–2), 11–22. <https://doi.org/10.3109/10428199809050925>
 59. Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>
 60. Giorgi, C., Ito, K., Lin, H.-K., Santangelo, C., Wieckowski, M. R., Lebiedzinska, M., Bononi, A., Bonora, M., Duszynski, J., Bernardi, R., Rizzuto, R., Tacchetti, C., Pinton, P., & Pandolfi, P. P. (2010). PML regulates apoptosis at endoplasmic reticulum by modulating calcium release. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6008), 1247–1251. <https://doi.org/10.1126/science.1189157>
 61. Goldberg, A. D., Banaszynski, L. A., Noh, K.-M., Lewis, P. W., Elsaesser, S. J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., Wen, D., Chapgier, A., DeKever, R. C., Miller, J. C., Lee, Y.-L., Boydston, E. A., Holmes, M. C., Gregory, P. D., Grealley, J. M., ... Allis, C. D. (2010). Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell*, 140(5), 678–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.003>
 62. Gongora, C., David, G., Pintard, L., Tissot, C., Hua, T. D., Dejean, A., & Mechetti, N. (1997). Molecular cloning of a new interferon-induced PML nuclear body-associated protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(31), 19457–19463. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.31.19457>
 63. Gordon, J.W. (1997). Transgenic Technology and Laboratory Animal Science. *ILAR J*, 38(1), 32–41. <https://doi.org/10.1093/ilar.38.1.32>
 64. Gordon, J. W., & Ruddle, F. H. (1981). Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science (New York, N.Y.)*, 214(4526), 1244–1246. <https://doi.org/10.1126/science.6272397>
 65. Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., & Ruddle, F. H. (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(12), 7380–7384. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7380>
 66. Grimwade, D., Gorman, P., Duprez, E., Howe, K., Langabeer, S., Oliver, F., Walker, H., Culligan, D., Waters, J., Pomfret, M., Goldstone, A., Burnett, A., Freemont, P., Sheer, D., & Solomon, E. (1997). Characterization of cryptic rearrangements and variant translocations in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 90(12), 4876–4885.
 67. Grunnet, M. L. (1975). Nuclear bodies in Creutzfeldt-Jakob and Alzheimer's diseases. *Neurology*, 25(11), 1091–1093. <https://doi.org/10.1212/wnl.25.11.1091>

68. Halbert, C. L., Alexander, I. E., Wolgamot, G. M., & Miller, A. D. (1995). Adeno-associated virus vectors transduce primary cells much less efficiently than immortalized cells. *Journal of Virology*, *69*(3), 1473–1479. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.3.1473-1479.1995>
69. Hall, M. H., Magalska, A., Malinowska, M., Ruszczycki, B., Czaban, I., Patel, S., Ambrożek-Latecka, M., Zołocińska, E., Broszkiewicz, H., Parobczak, K., Nair, R. R., Rylski, M., Pawlak, R., Bramham, C. R., & Wilczyński, G. M. (2016). Localization and regulation of PML bodies in the adult mouse brain. *Brain Structure and Function*, *221*(5), 2511–2525. <https://doi.org/10.1007/s00429-015-1053-4>
70. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., & Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, *387*(6630), 296–299. <https://doi.org/10.1038/387296a0>
71. Heidenreich, M., & Zhang, F. (2016). Applications of CRISPR-Cas systems in neuroscience. *Nature Reviews. Neuroscience*, *17*(1), 36–44. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.2>
72. Heisler, L. K., Chu, H. M., Brennan, T. J., Danao, J. A., Bajwa, P., Parsons, L. H., & Tecott, L. H. (1998). Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(25), 15049–15054. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.15049>
73. Hodges, M., Tissot, C., Howe, K., Grimwade, D., & Freemont, P. S. (1998). Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *American Journal of Human Genetics*, *63*(2), 297–304. <https://doi.org/10.1086/301991>
74. Hoess, R. H., & Abremski, K. (1985). Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *Journal of Molecular Biology*, *181*(3), 351–362. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)90224-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90224-4)
75. Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science (New York, N.Y.)*, *327*(5962), 167–170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>
76. Housden, B. E., Muhar, M., Gemberling, M., Gersbach, C. A., Stainier, D. Y. R., Seydoux, G., Mohr, S. E., Zuber, J., & Perrimon, N. (2017). Loss-of-function genetic tools for animal models: Cross-species and cross-platform differences. *Nature Reviews. Genetics*, *18*(1), 24–40. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.118>
77. Hui, K. M. (1993). Transgenic animals and the study of the immune system. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *18*, 37–52. <https://doi.org/10.1385/0-89603-245-0:37>
78. Ishov, A. M., Sotnikov, A. G., Negorev, D., Vladimirova, O. V., Neff, N., Kamitani, T., Yeh, E. T. H., Strauss, J. F., & Maul, G. G. (1999). Pml Is Critical for Nd10 Formation and Recruits the Pml-Interacting Protein Daxx to This Nuclear Structure When Modified by Sumo-1. *The Journal of Cell Biology*, *147*(2), 221–234. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.2.221>

79. Jastrzębska, K., Walczak, M., Cieślak, P. E., Szumiec, Ł., Turbasa, M., Engblom, D., Błasiak, T., & Parkitna, J. R. (2016). Loss of NMDA receptors in dopamine neurons leads to the development of affective disorder-like symptoms in mice. *Scientific Reports*, 6, 37171. <https://doi.org/10.1038/srep37171>
80. Jensen, K., Shiels, C., & Freemont, P. S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene*, 20(49), 7223–7233. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204765>
81. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
82. Kakizuka, A., Miller, W. H., Umesono, K., Warrell, R. P., Frankel, S. R., Murty, V. V., Dmitrovsky, E., & Evans, R. M. (1991). Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell*, 66(4), 663–674. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90112-c](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90112-c)
83. Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S., Hudspeth, A. J., & Mack, S. (2013). *Principles of neural science* (McGraw-Hill).
84. Kiryk, A., Janusz, A., Zglinicki, B., Turkes, E., Knapska, E., Konopka, W., Lipp, H.-P., & Kaczmarek, L. (2020). IntelliCage as a tool for measuring mouse behavior—20 years perspective. *Behavioural Brain Research*, 388, 112620. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112620>
85. Koken, M. H., Linares-Cruz, G., Quignon, F., Viron, A., Chelbi-Alix, M. K., Sobczak-Thépot, J., Juhlin, L., Degos, L., Calvo, F., & de Thé, H. (1995). The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene*, 10(7), 1315–1324.
86. Korb, E., Wilkinson, C. L., Delgado, R. N., Lovero, K. L., & Finkbeiner, S. (2013). Arc in the nucleus regulates PML-dependent GluA1 transcription and homeostatic plasticity. *Nature Neuroscience*, 16(7), 874–883. <https://doi.org/10.1038/nn.3429>
87. Kotin, R. M., Siniscalco, M., Samulski, R. J., Zhu, X. D., Hunter, L., Laughlin, C. A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., & Berns, K. I. (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(6), 2211–2215. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.6.2211>
88. Kumar, P. P., Bischof, O., Purbey, P. K., Notani, D., Urlaub, H., Dejean, A., & Galande, S. (2007). Functional interaction between PML and SATB1 regulates chromatin-loop architecture and transcription of the MHC class I locus. *Nature Cell Biology*, 9(1), 45–56. <https://doi.org/10.1038/ncb1516>
89. Kumar, T. R., Larson, M., Wang, H., McDermott, J., & Bronshteyn, I. (2009). Transgenic mouse technology: Principles and methods. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 590, 335–362. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-378-7_22

90. Kurki, S., Latonen, L., & Laiho, M. (2003). Cellular stress and DNA damage invoke temporally distinct Mdm2, p53 and PML complexes and damage-specific nuclear relocalization. *Journal of Cell Science*, *116*(Pt 19), 3917–3925. <https://doi.org/10.1242/jcs.00714>
91. Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Lee, E. J., Manning, R. W., Yu, S. H., Mulder, K. L., & Westphal, H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(14), 6232–6236. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.14.6232>
92. Lallemand-Breitenbach, V., & de Thé, H. (2010). PML nuclear bodies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(5), a000661. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000661>
93. Lamond, A. I., & Earnshaw, W. C. (1998). Structure and function in the nucleus. *Science (New York, N.Y.)*, *280*(5363), 547–553. <https://doi.org/10.1126/science.280.5363.547>
94. Lamprecht Tratar, U., Horvat, S., & Cemazar, M. (2018). Transgenic Mouse Models in Cancer Research. *Frontiers in Oncology*, *8*, 268. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00268>
95. Lanigan, T. M., Kopera, H. C., & Saunders, T. L. (2020). Principles of Genetic Engineering. *Genes*, *11*(3), E291. <https://doi.org/10.3390/genes11030291>
96. Laredj, L. N., & Beard, P. (2011). Adeno-Associated Virus Activates an Innate Immune Response in Normal Human Cells but Not in Osteosarcoma Cells. *Journal of Virology*, *85*(24), 13133–13143. <https://doi.org/10.1128/JVI.05407-11>
97. Larson, M. A. (2020). Blastocyst Microinjection with Embryonic Stem Cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2066*, 83–88. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9837-1_6
98. Lavau, C., Marchio, A., Fagioli, M., Jansen, J., Falini, B., Lebon, P., Grosveld, F., Pandolfi, P. P., Pelicci, P. G., & Dejean, A. (1995). The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon. *Oncogene*, *11*(5), 871–876.
99. Lees, C., & Hopkins, J. (2013). Effect of aerobic exercise on cognition, academic achievement, and psychosocial function in children: A systematic review of randomized control trials. *Preventing Chronic Disease*, *10*, E174. <https://doi.org/10.5888/pcd10.130010>
100. Lewis, P. W., Elsaesser, S. J., Noh, K.-M., Stadler, S. C., & Allis, C. D. (2010). Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(32), 14075–14080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008850107>
101. Li, Y., Ma, X., Chen, Z., Wu, H., Wang, P., Wu, W., Cheng, N., Zeng, L., Zhang, H., Cai, X., Chen, S.-J., Chen, Z., & Meng, G. (2019). B1 oligomerization regulates PML

- nuclear body biogenesis and leukemogenesis. *Nature Communications*, 10(1), 3789. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11746-0>
102. Lin, H.-K., Bergmann, S., & Pandolfi, P. P. (2004). Cytoplasmic PML function in TGF-beta signalling. *Nature*, 431(7005), 205–211. <https://doi.org/10.1038/nature02783>
 103. Lin, Y., Cradick, T. J., Brown, M. T., Deshmukh, H., Ranjan, P., Sarode, N., Wile, B. M., Vertino, P. M., Stewart, F. J., & Bao, G. (2014). CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 42(11), 7473–7485. <https://doi.org/10.1093/nar/gku402>
 104. Liu, C., Xie, W., Gui, C., & Du, Y. (2013). Pronuclear microinjection and oviduct transfer procedures for transgenic mouse production. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1027, 217–232. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-369-5_10
 105. Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J., & Baltimore, D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5556), 868–872. <https://doi.org/10.1126/science.1067081>
 106. Longenecker, G., & Kulkarni, A. B. (2009). Generation of gene knockout mice by ES cell microinjection. *Current Protocols in Cell Biology, Chapter 19*, Unit 19.14 19.14.1-36. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1914s44>
 107. Luciani, J. J., Depetris, D., Usson, Y., Metzler-Guillemain, C., Mignon-Ravix, C., Mitchell, M. J., Megarbane, A., Sarda, P., Sirma, H., Moncla, A., Feunteun, J., & Mattei, M.-G. (2006). PML nuclear bodies are highly organised DNA-protein structures with a function in heterochromatin remodelling at the G2 phase. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 12), 2518–2531. <https://doi.org/10.1242/jcs.02965>
 108. Maguire, E. A., Gadian, D. G., Johnsrude, I. S., Good, C. D., Ashburner, J., Frackowiak, R. S., & Frith, C. D. (2000). Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 4398–4403. <https://doi.org/10.1073/pnas.070039597>
 109. Mali, P., Esvelt, K. M., & Church, G. M. (2013). Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature Methods*, 10(10), 957–963. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2649>
 110. Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
 111. Matera, A. G. (1999). Nuclear bodies: Multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends in Cell Biology*, 9(8), 302–309. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(99\)01606-2](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(99)01606-2)
 112. Maul, G. G., Yu, E., Ishov, A. M., & Epstein, A. L. (1995). Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in nuclear bodies and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress. *Journal of Cellular Biochemistry*, 59(4), 498–513. <https://doi.org/10.1002/jcb.240590410>

113. McNally, B. A., Trgovcich, J., Maul, G. G., Liu, Y., & Zheng, P. (2008). A role for cytoplasmic PML in cellular resistance to viral infection. *PLoS One*, 3(5), e2277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002277>
114. Meinecke, I., Cinski, A., Baier, A., Peters, M. A., Dankbar, B., Wille, A., Drynda, A., Mendoza, H., Gay, R. E., Hay, R. T., Ink, B., Gay, S., & Pap, T. (2007). Modification of nuclear PML protein by SUMO-1 regulates Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(12), 5073–5078. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608773104>
115. Melnick, A., Fruchtman, S., Zelent, A., Liu, M., Huang, Q., Boczkowska, B., Calasanz, M., Fernandez, A., Licht, J. D., & Najfeld, V. (1999). Identification of novel chromosomal rearrangements in acute myelogenous leukemia involving loci on chromosome 2p23, 15q22 and 17q21. *Leukemia*, 13(10), 1534–1538. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401513>
116. Melnick, A., & Licht, J. D. (1999). Deconstructing a Disease: RAR α , Its Fusion Partners, and Their Roles in the Pathogenesis of Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood*, 93(10), 3167–3215. https://doi.org/10.1182/blood.V93.10.3167.410k44_3167_3215
117. Michod, D., Bartesaghi, S., Khelifi, A., Bellodi, C., Berliocchi, L., Nicotera, P., & Salomoni, P. (2012). Calcium-dependent dephosphorylation of the histone chaperone DAXX regulates H3.3 loading and transcription upon neuronal activation. *Neuron*, 74(1), 122–135. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.021>
118. Mifflin, M. A., Winslow, W., Surendra, L., Tallino, S., Vural, A., & Velazquez, R. (2021). Sex differences in the IntelliCage and the Morris water maze in the APP/PS1 mouse model of amyloidosis. *Neurobiology of Aging*, 101, 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.01.018>
119. Miki, T., Xu, Z., Chen-Goodspeed, M., Liu, M., Van Oort-Jansen, A., Rea, M. A., Zhao, Z., Lee, C. C., & Chang, K.-S. (2012). PML regulates PER2 nuclear localization and circadian function: PML in circadian clock. *The EMBO Journal*, 31(6), 1427–1439. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.1>
120. Millan, M. J. (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology*, 70(2), 83–244. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(03\)00087-x](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(03)00087-x)
121. Milovic-Holm, K., Kriehoff, E., Jensen, K., Will, H., & Hofmann, T. G. (2007). FLASH links the CD95 signaling pathway to the cell nucleus and nuclear bodies. *The EMBO Journal*, 26(2), 391–401. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601504>
122. Missirlis, P. I., Smailus, D. E., & Holt, R. A. (2006). A high-throughput screen identifying sequence and promiscuity characteristics of the loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *BMC Genomics*, 7, 73. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-73>

123. Mohr, S. E., Hu, Y., Ewen-Campen, B., Housden, B. E., Viswanatha, R., & Perrimon, N. (2016). CRISPR guide RNA design for research applications. *The FEBS Journal*, 283(17), 3232–3238. <https://doi.org/10.1111/febs.13777>
124. Möller, A., Sirma, H., Hofmann, T. G., Rueffer, S., Klimczak, E., Dröge, W., Will, H., & Schmitz, M. L. (2003). PML is required for homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2)-mediated p53 phosphorylation and cell cycle arrest but is dispensable for the formation of HIPK domains. *Cancer Research*, 63(15), 4310–4314.
125. Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., & O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297(5868), 681–683. <https://doi.org/10.1038/297681a0>
126. Mu, Y., & Gage, F. H. (2011). Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 6, 85. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-85>
127. Müller, S., & Dejean, A. (1999). Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *Journal of Virology*, 73(6), 5137–5143. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.6.5137-5143.1999>
128. Nedvetzki, S., Gonen, E., Assayag, N., Reich, R., Williams, R. O., Thurmond, R. L., Huang, J.-F., Neudecker, B. A., Wang, F.-S., Wang, F.-S., Turley, E. A., & Naor, D. (2004). RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: A different interpretation of redundancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(52), 18081–18086. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407378102>
129. Nisole, S., Maroui, M. A., Mascle, X. H., Aubry, M., & Chelbi-Alix, M. K. (2013). Differential Roles of PML Isoforms. *Frontiers in Oncology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00125>
130. Nisole, S., Stoye, J. P., & Saïb, A. (2005). TRIM family proteins: Retroviral restriction and antiviral defence. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(10), 799–808. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1248>
131. Nizami, Z., Deryusheva, S., & Gall, J. G. (2010). The Cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(7), a000653. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000653>
132. Palmiter, R. D., & Brinster, R. L. (1986). Germ-Line Transformation of Mice. *Annual review of genetics*, 20, 465–499. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.20.120186.002341>
133. Pandolfi, P. P., Grignani, F., Alcalay, M., Mencarelli, A., Biondi, A., LoCoco, F., Grignani, F., & Pelicci, P. G. (1991). Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR alpha cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. *Oncogene*, 6(7), 1285–1292.

134. Pearce, J. M. (2001). Ammon's horn and the hippocampus. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *71*(3), 351. <https://doi.org/10.1136/jnnp.71.3.351>
135. Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y., & Verma, I. M. (2002). Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(4), 2140–2145. <https://doi.org/10.1073/pnas.251682798>
136. Pinkert, C. A. (2014). *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook* (wydanie 3). Elsevier.
137. Platt, R. J., Chen, S., Zhou, Y., Yim, M. J., Swiech, L., Kempton, H. R., Dahlman, J. E., Parnas, O., Eisenhaure, T. M., Jovanovic, M., Graham, D. B., Jhunjhunwala, S., Heidenreich, M., Xavier, R. J., Langer, R., Anderson, D. G., Hacohen, N., Regev, A., Feng, G., ... Zhang, F. (2014). CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, *159*(2), 440–455. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.014>
138. Poggini, S., Golia, M. T., Alboni, S., Milior, G., Sciarria, L. P., Viglione, A., Matte Bon, G., Brunello, N., Puglisi-Allegra, S., Limatola, C., Maggi, L., & Branchi, I. (2019). Combined Fluoxetine and Metformin Treatment Potentiates Antidepressant Efficacy Increasing IGF2 Expression in the Dorsal Hippocampus. *Neural Plasticity*, *2019*, 4651031. <https://doi.org/10.1155/2019/4651031>
139. Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., Lamantia, A.-S., & White, L. (2012). *Neuroscience*. (wydanie 5).
140. Quimby, B. B., Yong-Gonzalez, V., Anan, T., Strunnikov, A. V., & Dasso, M. (2006). The promyelocytic leukemia protein stimulates SUMO conjugation in yeast. *Oncogene*, *25*(21), 2999–3005. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209335>
141. Radwanska, K., & Kaczmarek, L. (2012). Characterization of an alcohol addiction-prone phenotype in mice. *Addiction Biology*, *17*(3), 601–612. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00394.x>
142. Rakic, P. (2002). Neurogenesis in adult primate neocortex: An evaluation of the evidence. *Nature Reviews. Neuroscience*, *3*(1), 65–71. <https://doi.org/10.1038/nrn700>
143. Ramboz, S., Oosting, R., Amara, D. A., Kung, H. F., Blier, P., Mendelsohn, M., Mann, J. J., Brunner, D., & Hen, R. (1998). Serotonin receptor 1A knockout: An animal model of anxiety-related disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(24), 14476–14481. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14476>
144. Rao, Y. L., Ganaraja, B., Murlimanju, B. V., Joy, T., Krishnamurthy, A., & Agrawal, A. (2022). Hippocampus and its involvement in Alzheimer's disease: A review. *3 Biotech*, *12*(2), 55. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03123-4>
145. Rapp, A. P., Weiss, C., Oh, M. M., & Disterhoft, J. F. (2021). Intact Female Mice Acquire Trace Eyeblink Conditioning Faster than Male and Ovariectomized Female Mice. *ENeuro*, *8*(2), ENEURO.0199-20.2021. <https://doi.org/10.1523/ENeuro.0199-20.2021>

146. Regad, T., Bellodi, C., Nicotera, P., & Salomoni, P. (2009). The tumor suppressor Pml regulates cell fate in the developing neocortex. *Nature Neuroscience*, *12*(2), 132–140. <https://doi.org/10.1038/nn.2251>
147. Rowley, J. D., Golomb, H. M., & Dougherty, C. (1977). 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet (London, England)*, *1*(8010), 549–550. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(77\)91415-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(77)91415-5)
148. Royo, N. C., Vandenberghe, L. H., Ma, J.-Y., Hauspurg, A., Yu, L., Maronski, M., Johnston, J., Dichter, M. A., Wilson, J. M., & Watson, D. J. (2008). Specific AAV serotypes stably transduce primary hippocampal and cortical cultures with high efficiency and low toxicity. *Brain Research*, *1190*, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.11.015>
149. Rutkauskas, M., Krivoy, A., Szczelkun, M. D., Rouillon, C., & Seidel, R. (2017). Single-Molecule Insight Into Target Recognition by CRISPR-Cas Complexes. *Methods in Enzymology*, *582*, 239–273. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.10.001>
150. Saitoh, N., Uchimura, Y., Tachibana, T., Sugahara, S., Saitoh, H., & Nakao, M. (2006). In situ SUMOylation analysis reveals a modulatory role of RanBP2 in the nuclear rim and PML bodies. *Experimental Cell Research*, *312*(8), 1418–1430. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.01.013>
151. Salomoni, P., Bernardi, R., Bergmann, S., Changou, A., Tuttle, S., & Pandolfi, P. P. (2005). The promyelocytic leukemia protein PML regulates c-Jun function in response to DNA damage. *Blood*, *105*(9), 3686–3690. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3782>
152. Sander, J. D., & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, *32*(4), 347–355. <https://doi.org/10.1038/nbt.2842>
153. Saudou, F., Amara, D. A., Dierich, A., LeMeur, M., Ramboz, S., Segu, L., Buhot, M. C., & Hen, R. (1994). Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor. *Science (New York)*, *265*(5180), 1875–1878. <https://doi.org/10.1126/science.8091214>
154. Sauer, B. (1987). Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *7*(6), 2087–2096.
155. Sauer, B., & Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(14), 5166–5170.
156. Saurin, A. J., Shiels, C., Williamson, J., Satijn, D. P., Otte, A. P., Sheer, D., & Freemont, P. S. (1998). The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain. *The Journal of Cell Biology*, *142*(4), 887–898. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.4.887>

157. Schul, W., Groenhout, B., Koberna, K., Takagaki, Y., Jenny, A., Manders, E. M., Raska, I., van Driel, R., & de Jong, L. (1996). The RNA 3' cleavage factors CstF 64 kDa and CPSF 100 kDa are concentrated in nuclear domains closely associated with coiled bodies and newly synthesized RNA. *The EMBO Journal*, *15*(11), 2883–2892.
158. Serchov, T., Schwarz, I., Theiss, A., Sun, L., Holz, A., Döbrössy, M. D., Schwarz, M. K., Normann, C., Biber, K., & van Calker, D. (2020). Enhanced adenosine A1 receptor and Homer1a expression in hippocampus modulates the resilience to stress-induced depression-like behavior. *Neuropharmacology*, *162*, 107834. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107834>
159. Shen, T. H., Lin, H.-K., Scaglioni, P. P., Yung, T. M., & Pandolfi, P. P. (2006). The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Molecular Cell*, *24*(3), 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.09.013>
160. Singh, P., Schimenti, J. C., & Bolcun-Filas, E. (2015). A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics*, *199*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.169771>
161. Skupio, U., Sikora, M., Korostynski, M., Wawrzczak-Bargiela, A., Piechota, M., Ficek, J., & Przewlocki, R. (2017). Behavioral and transcriptional patterns of protracted opioid self-administration in mice. *Addiction Biology*, *22*(6), 1802–1816. <https://doi.org/10.1111/adb.12449>
162. Spector, D. L. (1993). Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annual Review of Cell Biology*, *9*, 265–315. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.09.110193.001405>
163. Spector, D. L. (2001). Nuclear domains. *Journal of Cell Science*, *114*(Pt 16), 2891–2893.
164. Spector, D. L., & Lamond, A. I. (2011). Nuclear Speckles. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(2), a000646. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000646>
165. Sternsdorf, T., Grötzinger, T., Jensen, K., & Will, H. (1997). Nuclear dots: Actors on Many Stages. *Immunobiology*, *198*(1–3), 307–331. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(97\)80051-4](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(97)80051-4)
166. Stoffler, D., Fahrenkrog, B., & Aebi, U. (1999). The nuclear pore complex: From molecular architecture to functional dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, *11*(3), 391–401. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80055-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80055-6)
167. Sutherland, R. J., Kolb, B., & Wishaw, I. Q. (1982). Spatial mapping: Definitive disruption by hippocampal or medial frontal cortical damage in the rat. *Neuroscience Letters*, *31*(3), 271–276. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(82\)90032-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(82)90032-5)
168. Sutherland, R. J., Weisend, M. P., Mumby, D., Astur, R. S., Hanlon, F. M., Koerner, A., Thomas, M. J., Wu, Y., Moses, S. N., Cole, C., Hamilton, D. A., & Hoising, J. M. (2001). Retrograde amnesia after hippocampal damage: Recent vs. remote memories in two tasks. *Hippocampus*, *11*(1), 27–42. [https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2001\)11:1<27::AID-HIPO1017>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2001)11:1<27::AID-HIPO1017>3.0.CO;2-4)

169. Swiech, L., Heidenreich, M., Banerjee, A., Habib, N., Li, Y., Trombetta, J., Sur, M., & Zhang, F. (2015). In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, *33*(1), 102–106. <https://doi.org/10.1038/nbt.3055>
170. Takahashi, J., Fujigasaki, H., Iwabuchi, K., Bruni, A. C., Uchihara, T., El Hachimi, K. H., Stevanin, G., Dürr, A., Lebre, A.-S., Trottier, Y., de Thé, H., Tanaka, J., Hauw, J.-J., Duyckaerts, C., & Brice, A. (2003). PML nuclear bodies and neuronal intranuclear inclusion in polyglutamine diseases. *Neurobiology of Disease*, *13*(3), 230–237. [https://doi.org/10.1016/S0969-9961\(03\)00080-9](https://doi.org/10.1016/S0969-9961(03)00080-9)
171. Terris, B., Baldin, V., Dubois, S., Degott, C., Flejou, J. F., Hénin, D., & Dejean, A. (1995). PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation. *Cancer Research*, *55*(7), 1590–1597.
172. Thomsen, M., & Caine, S. B. (2006). Cocaine self-administration under fixed and progressive ratio schedules of reinforcement: Comparison of C57BL/6J, 129X1/SvJ, and 129S6/SvEvTac inbred mice. *Psychopharmacology*, *184*(2), 145–154. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0207-0>
173. Torii, S., Egan, D. A., Evans, R. A., & Reed, J. C. (1999). Human Daxx regulates Fas-induced apoptosis from nuclear PML oncogenic domains (PODs). *The EMBO Journal*, *18*(21), 6037–6049. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.21.6037>
174. Van Damme, E., Laukens, K., Dang, T. H., & Van Ostade, X. (2010). A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *International Journal of Biological Sciences*, *6*(1), 51–67. <https://doi.org/10.7150/ijbs.6.51>
175. Vandamme, T. F. (2014). Use of rodents as models of human diseases. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, *6*(1), 2–9. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.124301>
176. Villagrà, N. T., Berciano, J., Altable, M., Navascués, J., Casafont, I., Lafarga, M., & Berciano, M. T. (2004). PML bodies in reactive sensory ganglion neurons of the Guillain–Barré syndrome. *Neurobiology of Disease*, *16*(1), 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.02.005>
177. Villagrà, N. T., Navascues, J., Casafont, I., Val-Bernal, J. F., Lafarga, M., & Berciano, M. T. (2006). The PML-nuclear inclusion of human supraoptic neurons: A new compartment with SUMO-1- and ubiquitin–proteasome-associated domains. *Neurobiology of Disease*, *21*(1), 181–193. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.07.003>
178. Voikar, V., Krackow, S., Lipp, H.-P., Rau, A., Colacicco, G., & Wolfer, D. P. (2018). Automated dissection of permanent effects of hippocampal or prefrontal lesions on performance at spatial, working memory and circadian timing tasks of C57BL/6 mice in IntelliCage. *Behavioural Brain Research*, *352*, 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.048>
179. von Koch, C. S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L. H., Price, D. L., & Sisodia, S. S. (1997). Generation of APLP2 KO mice and early

- postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiology of Aging*, 18(6), 661–669. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(97\)00151-6](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(97)00151-6)
180. von Mikecz, A., Zhang, S., Montminy, M., Tan, E. M., & Hemmerich, P. (2000). CREB-binding protein (CBP)/p300 and RNA polymerase II colocalize in transcriptionally active domains in the nucleus. *The Journal of Cell Biology*, 150(1), 265–273. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.1.265>
 181. Walrath, J. C., Hawes, J. J., Van Dyke, T., & Reilly, K. M. (2010). Genetically engineered mouse models in cancer research. *Advances in Cancer Research*, 106, 113–164. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(10\)06004-5](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(10)06004-5)
 182. Wang, D.-Y., Fulthorpe, R., Liss, S. N., & Edwards, E. A. (2004). Identification of estrogen-responsive genes by complementary deoxyribonucleic acid microarray and characterization of a novel early estrogen-induced gene: EEIG1. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 18(2), 402–411. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0202>
 183. Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153(4), 910–918. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.025>
 184. Wang, J., Shiels, C., Sasieni, P., Wu, P. J., Islam, S. A., Freemont, P. S., & Sheer, D. (2004). Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions. *The Journal of Cell Biology*, 164(4), 515–526. <https://doi.org/10.1083/jcb.200305142>
 185. Wang, P., Benhenda, S., Wu, H., Lallemand-Breitenbach, V., Zhen, T., Jollivet, F., Peres, L., Li, Y., Chen, S.-J., Chen, Z., de Thé, H., & Meng, G. (2018). RING tetramerization is required for nuclear body biogenesis and PML sumoylation. *Nature Communications*, 9, 1277. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03498-0>
 186. Wei, X., Yu, Z. K., Ramalingam, A., Grossman, S. R., Yu, J. H., Bloch, D. B., & Maki, C. G. (2003). Physical and functional interactions between PML and MDM2. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(31), 29288–29297. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212215200>
 187. Wiedenheft, B., Sternberg, S. H., & Doudna, J. A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482(7385), 331–338. <https://doi.org/10.1038/nature10886>
 188. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), 810–813. <https://doi.org/10.1038/385810a0>
 189. Witkin, J. M. (2011). A Vogel Conflict Test Using Food Reinforcement in Mice. W T. D. Gould (Red.), *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests, Volume II* (s. 159–169). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-313-4_10

190. Xiao, Y. H., Miller, W. H., Warrell, R. P., Dmitrovsky, E., & Zelenetz, A. D. (1993). Pulsed-field gel electrophoresis analysis of retinoic acid receptor-alpha and promyelocytic leukemia rearrangements. Detection of the t(15;17) translocation in the diagnosis of acute promyelocytic leukemia. *The American Journal of Pathology*, *143*(5), 1301–1311.
191. Xue, Y., Gibbons, R., Yan, Z., Yang, D., McDowell, T. L., Sechi, S., Qin, J., Zhou, S., Higgs, D., & Wang, W. (2003). The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(19), 10635–10640. <https://doi.org/10.1073/pnas.1937626100>
192. Yamada, M., Sato, T., Shimohata, T., Hayashi, S., Igarashi, S., Tsuji, S., & Takahashi, H. (2001). Interaction between neuronal intranuclear inclusions and promyelocytic leukemia protein nuclear and coiled bodies in CAG repeat diseases. *The American Journal of Pathology*, *159*(5), 1785–1795. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63025-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63025-8)
193. Yang, H., Wang, H., & Jaenisch, R. (2014). Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nature Protocols*, *9*(8), 1956–1968. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.134>
194. Yang, S., Jeong, J.-H., Brown, A. L., Lee, C.-H., Pandolfi, P. P., Chung, J. H., & Kim, M. K. (2006). Promyelocytic leukemia activates Chk2 by mediating Chk2 autophosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(36), 26645–26654. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604391200>
195. Yang, S., Kuo, C., Bisi, J. E., & Kim, M. K. (2002). PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nature Cell Biology*, *4*(11), 865–870. <https://doi.org/10.1038/ncb869>
196. Zhao, Y., Tang, F., Lee, D., & Xiong, W.-C. (2021). Expression of Low Level of VPS35-mCherry Fusion Protein Diminishes Vps35 Depletion Induced Neuron Terminal Differentiation Deficits and Neurodegenerative Pathology, and Prevents Neonatal Death. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 8394. <https://doi.org/10.3390/ijms22168394>
197. Zhong, S., Hu, P., Ye, T. Z., Stan, R., Ellis, N. A., & Pandolfi, P. P. (1999). A role for PML and the nuclear body in genomic stability. *Oncogene*, *18*(56), 7941–7947. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203367>
198. Zhong, S., Salomoni, P., & Pandolfi, P. P. (2000). The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nature Cell Biology*, *2*(5), E85-90. <https://doi.org/10.1038/35010583>
199. Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D., & Pandolfi, P. P. (2000). Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, *191*(4), 631–640. <https://doi.org/10.1084/jem.191.4.631>

Publikacje autorki niniejszej rozprawy doktorskiej

Koza, P., Przybyś, J., Klejman, A., Olech-Kochańczyk, G., Konopka, W. (2020). Generation of Transgenic Rats using a Lentiviral Vector Approach. *Journal of Visualized Experiments*, 17(159), [https://doi: 10.3791/60570](https://doi.org/10.3791/60570)